

КИСЕЛЕВ ИВАН СЕРГЕЕВИЧ

**ГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРВИЧНО-ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ
ФОРМЫ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии и медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Ольга Георгиевна Кулакова
заведующая научно-исследовательской лабораторией медицинской геномики
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования
"Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова" Минздрава РФ

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Ольга Олеговна Фаворова
заведующая кафедрой молекулярной биологии и медицинской биотехнологии
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования
"Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова" Минздрава РФ

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Элеонора Александровна Брага
главный научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии

доктор биологических наук, профессор
Ольга Евгеньевна Мустафина
заведующая лабораторией физиологической генетики Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института биохимии и генетики Уфимского научного центра
Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр» министерства науки
и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного Совета Д 002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН <http://www.eimb.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

А.М. Крицын

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Достижения в области молекулярной биологии и молекулярной медицины в последние десятилетия позволили значительно расширить представления о механизмах формирования и протекания многих распространенных заболеваний человека, что, в свою очередь, привело к существенному прогрессу в их диагностике и терапии. В настоящее время внимание многих исследователей направлено на изучение аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний, распространенность которых в мире постоянно возрастает.

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое хроническое заболевание центральной нервной системы (ЦНС), сочетающее в своем патогенезе аутоиммунную и нейродегенеративную компоненты и сопровождающееся прогрессирующей неврологической дисфункцией. Следствием неуклонного нарастания неврологического дефицита является необратимая инвалидизация пациентов в молодом трудоспособном возрасте, что обуславливает высокую социальную и экономическую значимость заболевания. РС встречается практически по всему земному шару, но распространенность его в разных популяциях сильно варьирует. В России это заболевание встречается с частотой около 80 случаев на 100 000 населения [Boyko et al. 2016].

Этиология заболевания остается до конца не раскрытой, хотя установлено, что РС представляет собой комплексное заболевание и развивается под воздействием факторов внешней среды у лиц с генетической предрасположенностью [Huitema, Schenk 2018]. При этом влияние внешних факторов на риск развития РС может быть в значительной мере опосредовано эпигенетическими механизмами, в частности, метилированием ДНК [Oksenberg 2013]. Наследование РС носит полигенный характер, и индивидуальный спектр независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов у больного может обуславливать различные проявления РС.

Течение РС характеризуется выраженной клинической гетерогенностью. В большинстве случаев у больных наблюдается ремиттирующая форма РС (РРС), характеризующаяся сменами периодов обострения (нарастание степени неврологического дефицита) и ремиссии (снижение или исчезновение неврологической симптоматики) [Lublin et al. 2014]. Однако у 10-15% пациентов непрерывное нарастание неврологического дефицита наблюдается с самого начала болезни, и такая тяжелая злокачественная форма РС получила название первично-прогрессирующей (ППРС) [Koch et al. 2009].

Сейчас в мире разработаны и успешно применяются различные иммуномодулирующие препараты, изменяющие течение РРС, однако абсолютное их большинство не эффективно при терапии ППРС [Thompson 2017]. Поскольку на ранних стадиях заболевания дифференциальная

диагностика ППРС и РРС может быть затруднена, в ряде случаев это приводит к назначению больным ППРС заведомо неэффективных при этой форме РС препаратов, а значит и к необратимому ухудшению состояния пациентов. Стоимость медикаментозной терапии РС в России для одного пациента составляет от 350 до 600 тыс. руб. в год [Boyko et al. 2017], что определяет не только социальную, но и экономическую значимость проблемы ранней дифференциальной диагностики ППРС и РРС.

ППРС имеет существенные отличия от РРС как по механизмам развития патологического процесса [Correale et al. 2017], так и по целому ряду демографических и клинических характеристик, таких как гендерное соотношение больных, средний возраст дебюта заболевания, клинические признаки дебюта, скорость прогрессирования заболевания и др. [Debouverie et al. 2008, Koch et al. 2009]. Эти отличия могут объясняться генетическими и эпигенетическими особенностями ППРС.

Изучение генетических особенностей РС традиционно проводили для РРС из-за его высокой распространенности. Наибольшую эффективность в обнаружении новых маркеров предрасположенности показал полногеномный поиск ассоциации (Genome Wide Association Study, GWAS), который в случае РРС позволил выявить более 200 однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP), ассоциированных с заболеванием [IMSGC et al. 2017]. Однако эффективность этого подхода напрямую зависит от размера исследуемых групп, состоящих в большинстве случаев из десятков и сотен тысяч людей. Всего два GWAS были проведены к настоящему моменту для больных ППРС, и каждый из них включал менее 1000 больных этой формой РС [IMSGC et al. 2011, Martinelli-Boneschi et al. 2012]. Проведенные GWAS не выявили значимо ассоциированных с ППРС полиморфных вариантов кроме аллеля *HLA-DRB1*15* – главного маркера предрасположенности к РРС. Относительная малочисленность пациентов с ППРС делает актуальным поиск генетических детерминант этой формы РС с использованием подхода «ген-кандидат», при этом особый интерес вызывает поиск полиморфных вариантов генов иммунного ответа, которые могут по-разному участвовать в формировании патогенетических особенностей ППРС и РРС.

Вместе с тем, даже для относительно хорошо изученного РРС совокупный эффект всех генетических вариантов, идентифицированных в GWAS, по разным оценкам может объяснить не более 30% наследуемости [Baranzini and Oksenberg 2017]. Свой вклад в проблему «недостающей» наследуемости РС могут вносить эпигенетические модификации, не затрагивающие последовательности ДНК, но влияющие на экспрессию генов в различных клетках или тканях. Одним из наиболее важных эпигенетических механизмов является метилирование ДНК в позиции C5 цитозинового основания в составе CpG-динуклеотидов. Метилирование CpG-сайтов в области промотора гена приводит к быстрому подавлению

генной экспрессии с участием репрессорных белков [Choy et al. 2010]. Поиск отдельных дифференциально метилированных сайтов генома (ДМС) и специфических паттернов метилирования, характеризующих РС, может помочь в понимании механизмов его развития и способствовать разработке новых эффективных препаратов для терапии болезни. С помощью полногеномного анализа с использованием чипов высокой плотности удалось показать изменение профиля метилирования ДНК из различных клеток и тканей больных РРС в сравнении со здоровыми индивидами [Huynh et al. 2014, Maltby et al. 2015, Maltby et al. 2017, Marabita et al. 2017]. Для больных ППРС подобных исследований не проводилось, что делает актуальным поиск эпигенетических маркеров, характеризующих эту тяжелую форму РС.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы было оценить вовлеченность генома в формирование предрасположенности к агрессивной первично-прогрессирующей форме РС на основании анализа связи генетической вариабельности (полиморфизм панели генов иммунного ответа) и эпигенетических модификаций (метилирование ДНК) с возникновением ППРС у этнических русских.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Провести анализ ассоциации носительства аллелей/генотипов полиморфных вариантов панели генов, вовлеченных в регуляцию иммунного ответа и воспалительных реакций, с развитием ППРС в сравнении со здоровыми индивидами контрольной группы.
- 2) Для выявления сходства и различий в генетической архитектуре ППРС и РРС провести для тех же генов анализ их ассоциации с РРС (в сравнении со здоровыми индивидами), а также аналогичный анализ при прямом сравнении между больными двумя формами РС.
- 3) Оценить прогностический потенциал выявленных генетических маркеров ППРС с помощью множественного логистического регрессионного анализа и ROC-анализа.
- 4) Для оценки вовлеченности эпигенетической модификации генома посредством его метилирования в формирование патогенетических особенностей двух форм РС провести полногеномный анализ профилей метилирования ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК) больных ППРС и РРС, а также здоровых индивидов контрольной группы с последующим сравнением полученных данных.
- 5) Для выявления у больных ППРС и РРС специфических профилей метилирования в CD4⁺ Т-лимфоцитах, играющих центральную роль в иммунопатогенезе РС, провести аналогичный анализ для ДНК, полученной из этих субпопуляций лимфоцитов.

Научная новизна работы

Впервые показана ассоциация с развитием ППРС аллелей/генотипов *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*11*, *IRF5*A/A*, *CXCR5*A/A*, *CLEC16A*G/G* и *IFNAR2*C*. Ассоциация с ППРС аллелей/генотипов *HLA-DRB1*15*, *IL7RA*C/C* и *IL4*C/C* показана впервые для русской популяции. Показано, что аллели/генотипы *HLA-DRB1*11*, *HLA-DRB1*15*, *IL7RA*C/C*, *CXCR5*A/A* и *CLEC16A*G/G* ассоциированы с РС независимо от его формы.

Впервые показано, что аллели и генотипы *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*09*, *IL4*C/C*, *IL6*C*, *IRF5*A/A*, *MIR196A2*C* и *IFNAR2*C* дискриминируют эти две формы РС; среди них выявлены ППРС-специфические (*HLA-DRB1*07*, *IL4*C/C*, *IRF5*A/A*, *IFNAR2*C*) и РРС-специфические варианты (*HLA-DRB1*09* и *IL6*C*).

Впервые показано участие метилирования ДНК – эпигенетического механизма регуляции генной экспрессии – в формировании основных форм РС: ППРС и РРС. Паттерны ДМС из МНК позволили дискриминировать образцы больных ППРС, больных РРС и здоровых индивидов, на три обособленные группы.

Впервые показано, что ДМС, обнаруженные у больных ППРС как в МНК, так и в CD4+ Т-лимфоцитах, характеризуются существенным гиперметилованием по сравнению с больными РРС и здоровыми индивидами контрольной группы.

Теоретическая и практическая значимость

Идентифицированы полиморфные варианты генов иммунного ответа как ассоциированные с РС независимо от его формы, так и дискриминирующие ППРС и РРС. Эти результаты способствуют лучшему пониманию как генетической архитектуры РС в целом, так и генетических различий его клинических форм, а также указывают на возможные общие и различающиеся патогенетические компоненты развития аутоиммунного воспаления при ППРС и РРС.

Предложены композитные генетические модели для оценки суммарной предсказательной способности выявленных генетических маркеров. Композитная модель, построенная для прямого сравнения «ППРС vs РРС», может быть полезной для определения клинической формы РС, что может способствовать выбору эффективных терапевтических стратегий на ранних стадиях лечения РС у конкретного индивида.

Различия, обнаруженные в паттернах метилирования ряда генов при ППРС и РРС, свидетельствуют об участии метилирования ДНК как эпигенетического механизма в формировании этих двух форм РС. Тот факт, что более половины выявленных ДМС располагались в CpG-островках и в соседних с ними областях, указывает на их возможное функциональное значение в регуляции экспрессии генов, а значит и степени вовлечения этих генов в патогенез ППРС и РРС.

В целом, полученные результаты позволяют расширить знания о патогенезе ППРС, что может послужить основой для поиска новых терапевтических мишеней при лечении этой агрессивной формы РС.

Положения, выносимые на защиту

1) Выявлена генетическая предрасположенность к ППРС как к заболеванию полигенной природы, в формирование которого вовлечены гены иммунного ответа.

2) Выявлены общие для ППРС и РС генетические детерминанты, а также варианты, различающие между собой эти две формы РС.

3) Показана особая роль локуса HLA в формировании клинического фенотипа РС: с развитием ППРС и РС ассоциировано носительство разных групп аллелей гена *HLA-DRB1*.

4) Для дифференциальной диагностики ППРС и РС могут быть полезны композитные модели, которые включают идентифицированные аллели/генотипы и обладают удовлетворительной предсказательной силой.

5) Показано различие профилей метилирования ДНК из МНК и CD4⁺ Т-лимфоцитов больных ППРС и РС, при этом ППРС характеризуется повышенным уровнем метилирования ДНК как по сравнению с РС, так и по сравнению со здоровыми индивидами.

Личное участие автора в получении научных результатов

Автору принадлежит основная роль в анализе литературных данных по теме диссертационной работы, разработке цели и задач исследования, статистической обработке полученных данных, их анализе и интерпретации, подготовке публикаций по результатам диссертационной работы. Автору принадлежит основная роль в формировании коллекции геномной ДНК больных ППРС и генотипировании полиморфных вариантов генов иммунного ответа у этих больных, а также в выделении клеток крови и подготовке всех образцов ДНК для полногеномного анализа метилирования. Автор непосредственно участвовал в составлении коллекций геномной ДНК больных РС и здоровых индивидов и их генотипировании.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты, представленные в настоящей работе, получены с использованием репрезентативных исследуемых групп и современных молекулярно-генетических методов, соответствующих поставленным целям и применяемых в аналогичных исследованиях. Материалы работы представлены на следующих международных и всероссийских научных конференциях: IX Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (2014, Москва); European Biotechnology Congress (2015, Bucharest); Clinical Epigenetics International Meeting CLEPSO (2016, Dusseldorf); 4-я Всероссийская конференция «Геномное секвенирование NGS-2016» (2016, Москва); 13th International Congress of Neuroimmunology (2016, Jerusalem); IX Всероссийская научно-практическая конференция с

международным участием «Молекулярная Диагностика 2017» (2017, Москва); II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (2017, Новосибирск); XIII Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (2018, Москва).

Публикации

Результаты работы изложены в виде 10 публикаций в рецензируемых российских и международных научных журналах и 6 тезисов в сборниках материалов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Она изложена на 136 страницах, включает 20 рисунков и 18 таблиц. Список литературы содержит 324 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом генетического исследования служила геномная ДНК, выделенная из цельной крови 110 больных ППРС (50 женщин, 60 мужчин) и 564 больных РРС (393 женщины, 171 мужчина), а также 424 здоровых индивидов (285 женщин, 139 мужчин), все – русской этнической принадлежности. Генотипирование выбранных генов-кандидатов осуществляли с помощью различных методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), а именно ПЦР с фланкирующими праймерами, аллелеспецифической ПЦР, ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и ПЦР в реальном времени. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism и IBM SPSS с применением двухстороннего критерия Фишера (p_f). Ассоциацию считали номинально значимой, если значение p_f для нее было меньше 0.05, а 95% доверительный интервал (ДИ) для отношения шансов (ОШ) не пересекал 1. Поправку на множественные сравнения проводили методом Бенджамини-Хохберга (p_{corr}) с использованием стандартных инструментов среды R. Порог статистической значимости для p_{corr} считали равным 0.05.

ДНК для полногеномного анализа метилирования выделяли у 8 больных ППРС (6 женщин и 2 мужчин), 14 больных РРС (9 женщин и 5 мужчин) и 8 здоровых индивидов (6 женщин, 2 мужчин) из МНК или CD4+ Т-лимфоцитов периферической крови. Оценку уровня метилирования ДНК проводили с помощью чипов высокой плотности Infinium Human Methylation 450 BeadChip на сканере чипов iScan (Illumina, США) в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН). Первичная обработка данных полногеномного метилирования ДНК и их нормализация были выполнены Л.В. Даниловой (Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore). Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием различных

средств среды R. Для функционального анализа генов, содержащих ДМС, использовали общедоступные базы данных Gene Ontology, Gene Cards, NCBI Gene и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ассоциации полиморфизма генов иммунного ответа с ППРС и РРС

Характеристика генов иммунного ответа, включенных в генетическое исследование.

В исследование были включены полиморфные варианты 18 генов, вовлеченных в развитие иммунного ответа и воспалительных реакций, для которых ассоциация с развитием ППРС в русской популяции ранее не изучалась, а именно генов цитокинов и их рецепторов (*CCR5*, *IL7RA*, *IL4*, *TNF*, *IL6*, *CXCR5*, *CCL5* и *TGFB1*), генов сигнального пути интерферонов (*IRF5*, *IFNAR1* и *IFNAR2*), генов Т-клеточных рецепторов (*CTLA4* и *CD86*), генов, продукты которых участвуют в презентации антигена (*CLEC16A* и *HLA-DRB1*), а также генов микроРНК (*MIR146A*, *MIR196A2* и *MIR499A*). Для высокополиморфного гена *HLA-DRB1* изучали распределение основных групп аллелей (далее – аллелей); для остальных генов исследовали биаллельные полиморфные участки, частота минорного аллеля которых (minor allele frequency, MAF) была не менее 5%.. Характеристики выбранных для исследования полиморфных вариантов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Исследуемые гены и их полиморфные варианты.

Локус	Ген	Продукт гена	SNP_ID, нуклеотидная замена
2q33.2	<i>CTLA4</i>	Цитотоксический Т-лимфоцит ассоциированный белок 4	rs231775, A>G
3p21.31	<i>CCR5</i>	С-С рецептор хемокина 5	rs333, w → del32
3q13.33	<i>CD86</i>	Мембранный белок CD86	rs2255214, G>T
5p13.2	<i>IL7RA</i>	α-цепь рецептора интерлейкина-7	rs6897932, C > T
5q31.1	<i>IL4</i>	Интерлейкин-4	rs2243250, C>T
5q33.3	<i>MIR146A</i>	МикроРНК hsa-mir-146a	rs2910164, C>G
6p21.32	<i>HLA-DRB1</i>	β1-цепь HLA класса II	Основные группы аллелей
6p21.33	<i>TNF</i>	Фактор некроза опухоли	rs1800629, G>A
7p15.3	<i>IL6</i>	Интерлейкин-6	rs1800795, C>G
7q32.1	<i>IRF5</i>	Транскрипционный фактор 5 семейства интерфероновых регуляторных факторов	rs4728142, G>A
11q23.3	<i>CXCR5</i>	С-Х-С рецептор хемокина 5	rs523604, A > G
12q13.13	<i>MIR196A2</i>	МикроРНК hsa-mir-196a-2	rs11614913, C>T
16p13.13	<i>CLEC16A</i>	Член А семейства 16 белков с С-лектиновым доменом	rs6498169, G>A
17q12	<i>CCL5</i>	С-Схемокин 5	rs2107538, C>T
19q13.2	<i>TGFB1</i>	Трансформирующий фактор роста β1	rs1800469, C>T
20q11.22	<i>MIR499A</i>	МикроРНК hsa-mir-499	rs3746444, A>G
21q22.11	<i>IFNAR1</i>	Субъединица 1 рецептора интерферонов α и β	rs1012335, G>C
21q22.11	<i>IFNAR2</i>	Субъединица 2 рецептора интерферонов α и β	rs2248202, C>A

Анализ ассоциации основных аллелей высокополиморфного гена HLA-DRB1 с ППРС и PPC. Проведено сравнение частот носительства аллелей гена HLA-DRB1 в группах больных ППРС, PPC и здоровых индивидов контрольной группы, значимость которых оценивали по критерию Фишера (рис. 1).

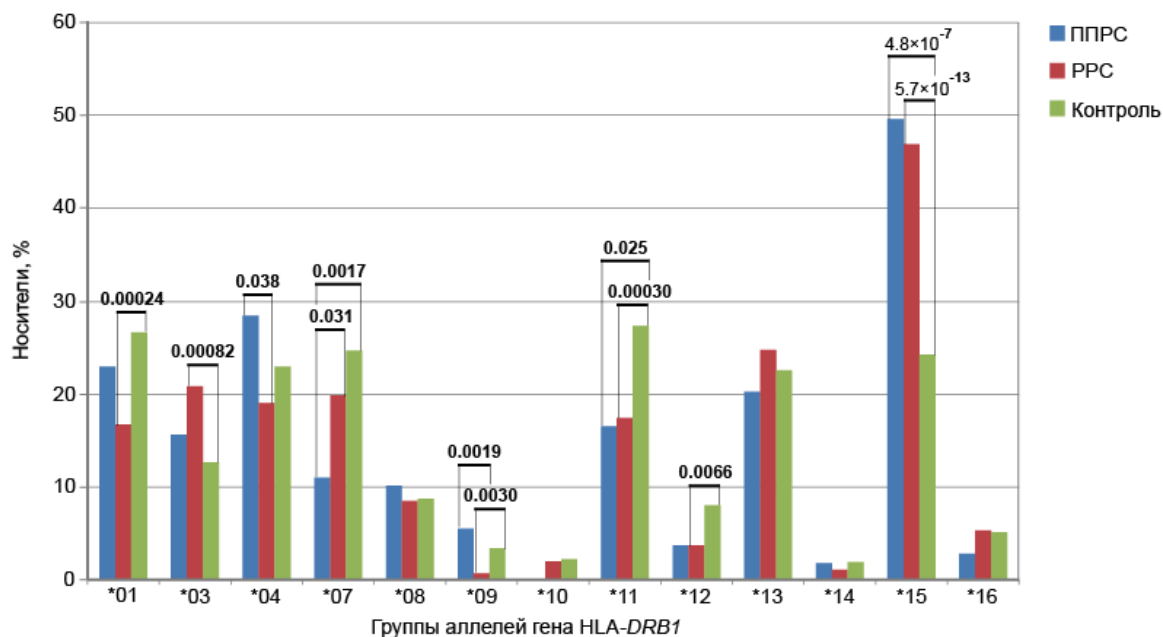


Рисунок 1. Сравнение частот носительства основных аллелей гена HLA-DRB1 у больных ППРС, PPC и здоровых индивидов контрольной группы. Для аллелей, значимо ассоциированных с предрасположенностью к ППРС или PPC ($p_f < 0.05$), на диаграмме указаны значения p_f при соответствующих сравнениях.

Как видно из рис. 1, в сравнении «ППРС vs Контроль» носительство аллеля HLA-DRB1*15 было позитивно ассоциировано с ППРС (ОШ = 3.08, $p_{corr} = 5.3 \times 10^{-5}$; здесь и далее в скобках указаны величины p_{corr} , выдержавшие поправку на множественные сравнения). Аллели HLA-DRB1*07 (ОШ = 0.38, $p_{corr} = 0.049$) и DRB1*11 (ОШ = 0.53) оказались негативно ассоциированы с этой формой PC. В сравнении «PPC vs Контроль» позитивно ассоциировано с PPC носительство аллелей HLA-DRB1*03 (ОШ = 1.83, $p_{corr} = 0.030$) и DRB1*15 (ОШ = 2.76, $p_{corr} = 1.3 \times 10^{-10}$), а негативно ассоциированы (протективные) – аллели DRB1*01 (ОШ = 0.56, $p_{corr} = 0.016$), DRB1*11 (ОШ = 0.56, $p_{corr} = 0.015$) DRB1*09 (ОШ = 0.20) и DRB1*12 (ОШ = 0.45). В сравнении «ППРС vs PPC» выявлены позитивные ассоциации с ППРС аллеля HLA-DRB1*09 (ОШ = 8.13, $p_{corr} = 0.042$) и аллеля HLA-DRB1*04 (ОШ = 1.69), а также негативная ассоциация аллеля HLA-DRB1*07 (ОШ = 0.50).

Анализ ассоциации носительства аллелей/генотипов биаллельных полиморфных участков генов иммунного ответа с ППРС и PPC. Определены частоты носительства аллелей/генотипов биаллельных полиморфных участков 17 исследованных генов иммунного ответа. Аллели/генотипы, носительство которых значимо ассоциировано с ППРС и/или PPC при перечисленных сравнениях ($p_f < 0.05$), представлены в таблице 2.

Таблица 2. Частоты носительства аллелей и генотипов биаллельных полиморфных участков генов иммунного ответа, для которых выявлена значимая позитивная ассоциация с ППРС и/или РРС.

А) Сравнение «ППРС vs Контроль»

Носительство аллеля/генотипа	Носители (%)		Значения p_f (p_{corr})*	ОШ (95% ДИ)
	Больные ППРС	Здоровые индивиды		
<i>IL4</i> *C/C	85 (77.3)	256 (60.8)	0.0012 (0.038)	2.17 (1.35-3.57)
<i>IL7RA</i> *C/C	69 (63.3)	203 (51.8)	0.039	1.61 (1.04-2.50)
<i>IRF5</i> *A/A	34 (30.9)	84 (19.9)	0.020	1.78 (1.12-2.85)
<i>IRF5</i> *A	87 (79.1)	286 (67.8)	0.026	1.80 (1.08-3.03)
<i>CXCR5</i> *A/A	43 (39.1)	101 (24.7)	0.0024	1.96 (1.25-3.03)
<i>CLEC16A</i> *G/G	27 (24.8)	57 (13.4)	0.0039	2.12 (1.27-3.57)
<i>IFNAR2</i> *C	69 (63.3)	222 (52.7)	0.042	1.57 (1.01-2.42)

Б) Сравнение «РРС vs Контроль»

Носительство аллеля/генотипа	Носители (%)		Значения p_f (p_{corr})*	ОШ (95% ДИ)
	Больные РРС	Здоровые индивиды		
<i>CD86</i> *G/G	194 (34.5)	118 (28.4)	0.044	1.33 (1.01-1.75)
<i>IL7RA</i> *C/C	342 (60.7)	203 (51.8)	0.0027 (0.049)	1.49 (1.15-1.92)
<i>IL6</i> *C	417 (73.9)	278 (66.0)	0.0073	1.46 (1.11-1.92)
<i>CXCR5</i> *A/A	188 (33.5)	101 (24.7)	0.0035	1.54 (1.16-2.04)
<i>CLEC16A</i> *G/G	102 (18.1)	57 (13.4)	0.045	1.43 (1.02-2.04)
<i>IFNAR2</i> *A	518 (92.0)	370 (87.9)	0.039	1.59 (1.04-2.44)

В) Сравнение «ППРС vs РРС»

Носительство аллеля/генотипа	Носители (%)		Значения p_f (p_{corr})*	ОШ (95% ДИ)
	Больные ППРС	Больные РРС		
<i>IL4</i> *C/C	85 (77.3)	346 (61.3)	0.0016 (0.038)	2.13 (1.35-3.45)
<i>IL6</i> *G/G	70 (63.6)	417 (73.9)	0.036	1.61 (1.05-2.50)
<i>IRF5</i> *A/A	34 (30.9)	90 (16.0)	0.00047 (0.019)	2.33 (1.47-3.70)
<i>MIR196A2</i> *C	103 (93.6)	484 (85.8)	0.028	2.43 (1.09-5.42)
<i>IFNAR2</i> *C	69 (63.3)	286 (50.8)	0.016	1.70 (1.11-2.57)

* величины p_{corr} , значимые после введения поправки на множественные сравнения

В сравнении «ППРС vs Контроль» позитивно ассоциация с ППРС наблюдалась для носительства генотипов *IL4**C/C, *IL7RA**C/C, *IRF5**A/A, *CXCR5**A/A, *CLEC16A**G/G и аллелей *IRF5**A и *IFNAR2**C. В сравнении «РРС vs Контроль» генотипами/аллелями риска были *IL7RA**C/C, *CD86**G/G, *IL6**C, *CXCR5**A/A, *CLEC16A**G/G и *IFNAR2**A. В сравнении «ППРС vs РРС» позитивно ассоциировано с ППРС было носительство генотипов *IL4**C/C, *IL6**G/G и *IRF5**A/A и аллелей *MIR196A2**C и *IFNAR2**C. Альтернативный генотипу *IL6**G/G вариант *IL6**C, позитивно ассоциированный с РРС в сравнении «РРС vs Контроль», оказался негативно ассоциированным при сравнении «ППРС vs РРС» (ОШ = 0.62; p_f = 0.036). Поправку на множественные сравнения выдерживали ассоциации вариантов генов *IL4*, *IRF5* и *IL7RA* с ППРС и/или РРС.

Сопоставляя результаты всех сравнений, приведенных на рис. 1 и в таблице 2, можно прийти к следующим заключениям. Аллели/генотипы HLA-*DRB1**11 и *15, *IL7RA**C/C, *CXCR5**A/A и *CLEC16A**G/G при сравнении с контрольной группой были ассоциированы не только с РРС, но и с ППРС, и, соответственно, не были выявлены при их прямом сравнении.

Поэтому их можно с полным правом отнести к категории вариантов, ассоциированных с РС независимо от его формы. Варианты *HLA-DRB1*07*, *IL4*С/С*, *IRF5*А/А* и *IFNAR2*С* были классифицированы нами как ППРС-специфические т.к. они оказались ассоциированы с ППРС при сравнении не только с контрольной группой, но и с РРС. Аллели *HLA-DRB1*09* и *IL6*С* можно отнести к РРС-специфическим вариантам: будучи позитивно ассоциированными с РРС в сравнении со здоровыми, они при сравнении «ППРС vs РРС» показывают негативную ассоциацию с ППРС. Эти данные схематически представлены на диаграмме Венна (рис. 2).

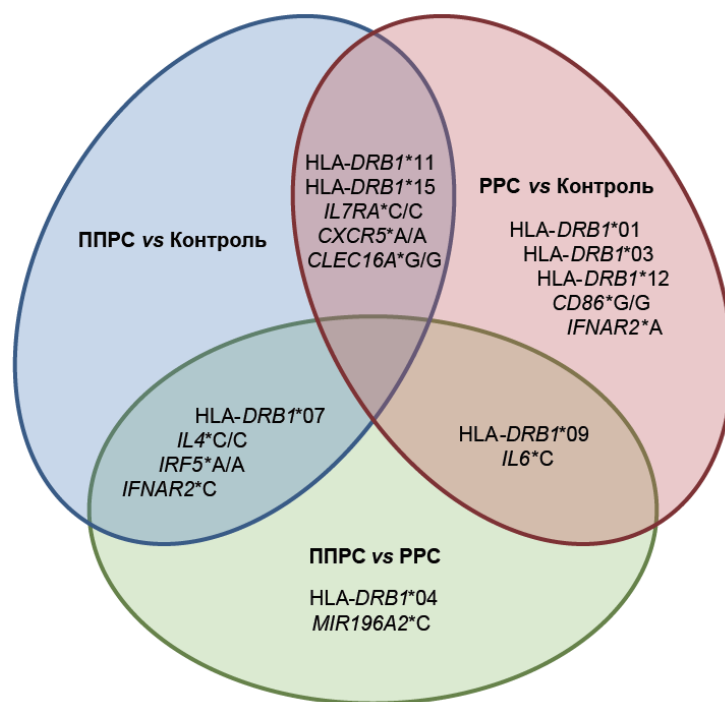


Рисунок 2. Аллели/генотипы исследуемых полиморфных вариантов, ассоциированные с ППРС и РРС.

В синем эллипсе расположены ППРС-ассоциированные варианты, в красном – РРС-ассоциированные, а в зеленом – варианты, дискриминирующие две формы РС при прямом сравнении.

Общие РС-специфичные варианты располагаются в пересечении синего и красного эллипсов, ППРС- и РРС-специфические варианты, идентифицированные при сравнении соответствующих форм РС со здоровыми контролями и друг с другом расположены в пересечениях синего и зеленого эллипсов и красного и зеленого эллипсов, соответственно.

В целом, в ходе исследования генетической вариабельности генов иммунного ответа, связанной с развитием ППРС, мы смогли выявить сходство и различия в генетической архитектуре ППРС и РРС. Для высокополиморфного гена *HLA-DRB1*, известного как главный ген предрасположенности к РРС [Hollenbach, Oksenberg 2015], получены результаты, свидетельствующие о вовлечении в формирование предрасположенности к РС, наряду с общими для двух форм РС вариантами (*HLA-DRB1*11* и **15*), также и различных аллелей этого гена; для ППРС это *HLA-DRB1*07*, а для РРС *HLA-DRB1*09*. Аллель *HLA-DRB1*04* дискриминирует ППРС и РРС между собой при прямом сравнении этих форм РС. Хотя причина описанного распределения вариантов гена *HLA-DRB1* в группах больных ППРС и РРС остается неизвестной, можно предполагать, что кодируемые ими белковые продукты отличаются по способности связывать различные аутоантигены и, таким образом, способствуют преимущественному развитию одной из двух форм РС: ППРС или РРС.

Среди исследованных биаллельных вариантов все общие для двух форм РС SNP располагались в генах, которые ранее были идентифицированы в GWAS [Bashinskaya et al.

2015]. Таким образом, мы валидировали GWAS-идентифицированную ассоциацию полиморфных вариантов не-HLA генов *IL7RA*, *CXCR5* и *CLEC16A* с РС независимо от его формы у русских больных. Все эти гены участвуют в ключевых этапах аутоиммунного процесса: в презентации АГ и в поддержании жизнедеятельности Т- и В-лимфоцитов как до, так и после их активации.

Помимо локуса HLA в генетическое своеобразие ППРС, согласно нашим данным, вносят вклад SNP генов *IL4*, *IRF5*, *IFNAR2*, а для PPC специфична ассоциация с SNP гена *IL6*. Наблюдаемые генетические отличия ППРС и PPC могут лежать в основе патогенетических особенностей этих форм РС. Одной из отличительных характеристик развития ППРС считают существенно большее вовлечение в его патогенез гуморального иммунного ответа [Pender 2004]. Среди продуктов выявленных нашей работой ППРС-специфических генов (*IL4*, *IRF5* и *IFNAR2*) IL-4 участвует в супрессии клеточного и стимуляции гуморального иммунного ответа, в первую очередь, посредством активации Th2-лимфоцитов [Redpath et al. 2015], а IRF5 и IFNAR2 вовлечены интерферон-зависимый путь передачи сигнала [Eames et al. 2016, Schreiber 2017]. Полученные нами данные впервые позволяют говорить о вкладе полиморфизма генов микроРНК в формирование различий между ППРС и PPC, однако эти результаты, безусловно, нуждаются в валидации.

Логистический регрессионный анализ и ROC-анализ выявленных генетических маркеров ППРС и PPC. Для оценки предсказательной способности идентифицированных полиморфных вариантов в определении риска развития конкретной формы РС произведен множественный логистический регрессионный анализ для всех аллелей/генотипов, выявленных в каждом из сравнений Таблицы 2. Для исключения влияния на результаты анализа пола и возраста как возможных конфаундеров, коэффициенты регрессии вычисляли после пропорционального взвешивания групп по этим характеристикам. При сравнении «ППРС vs Контроль» регрессионные коэффициенты для всех геномных маркеров кроме генотипа *IRF5**A/A были значимыми, что позволило включить их в аддитивную композитную модель для предсказания риска развития этой формы РС. При сравнении «PPC vs Контроль» регрессионный коэффициент оказался незначимым для генотипа *CXCR5**A/A и аллеля *IFNAR2**A, а при прямом сравнении двух форм РС – для аллелей *IFNAR2**C и *MIR196A2**C.

Для всех аддитивных композитных моделей и отдельных геномных маркеров, вошедших в их состав, были построены ROC-кривые. При сравнении «ППРС vs Контроль» (рис. 3А) композитная модель характеризовалась величиной AUC = 0.757, т.е. обладает существенной предсказательной силой. При сравнении «PPC vs Контроль» (рис. 3Б) AUC для композитной модели составил 0.722. В случае прямого сравнения «ППРС vs PPC» (рис. 3В) AUC композитной модели, включающей шесть маркеров, имел удовлетворительное значение 0.684.

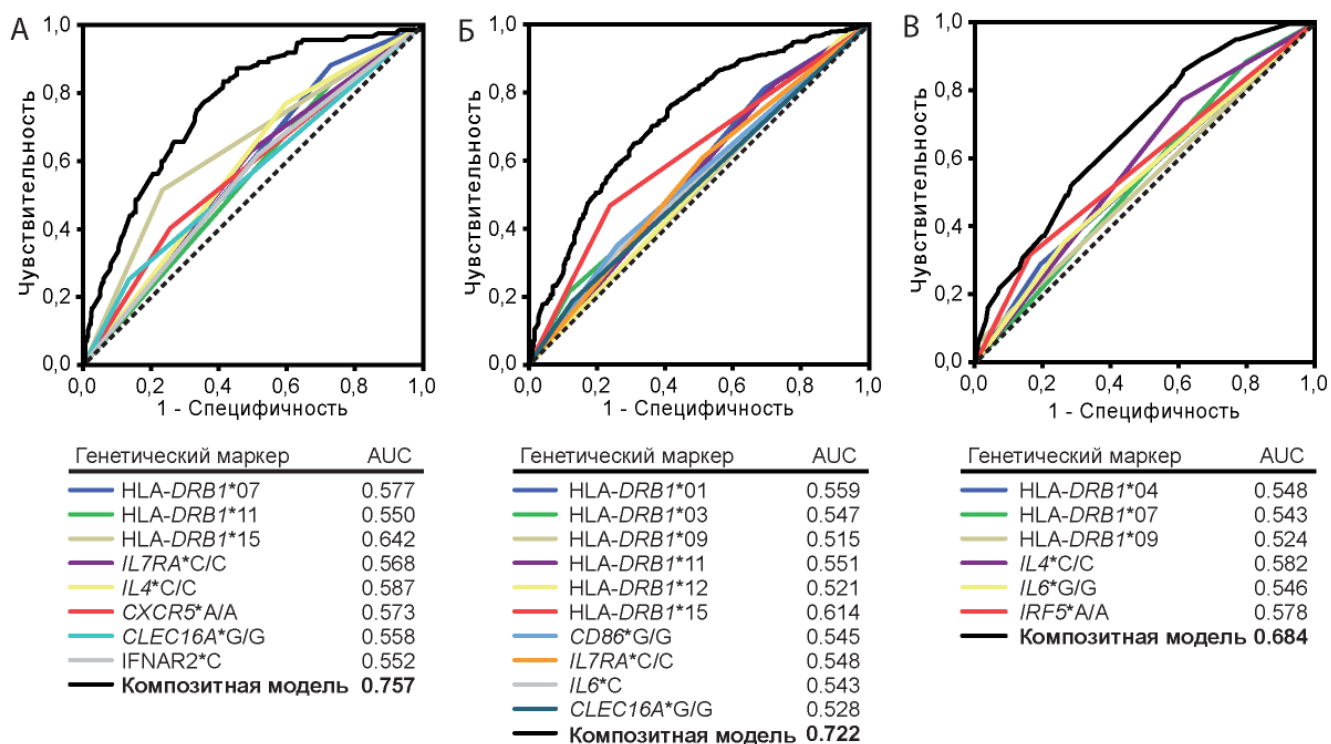


Рисунок 3. ROC-кривые, построенные для оценки предсказательной способности индивидуальных генетических маркеров и аддитивных композитных моделей в сравнениях «ППРС vs Контроль» (А), «PPC vs Контроль» (Б) и «ППРС vs PPC» (В). Значения площади под кривой (area under the curve, AUC) для индивидуальных маркеров и композитных моделей указаны под диаграммами.

Выявленные в ходе работы генетические маркеры, которые формируют композитные генетические модели, могут стать ценным инструментом для прогнозирования клинической формы РС. Хотя композитные модели и не достигают предсказательной силы, позволяющих надежно отличать ППРС от PPC, однако вместе с клиническими показателями течения РС у конкретного пациента они могут быть полезны для дифференциальной диагностики форм РС на ранней стадии заболевания.

Полногеномный анализ профилей метилирования ДНК больных ППРС и PPC

Анализ метилирования ДНК из мононуклеарных клеток крови. Сравнительный анализ метилирования ДНК из МНК выявил существенные различия в профилях метилирования ДНК при попарных сравнениях «ППРС vs Контроль», «PPC vs Контроль» и «ППРС vs PPC». Всего идентифицировано 136 ДМС, определяемых в одном или более сравнениях. В сравнении «ППРС vs Контроль» выявлено 67 ДМС, в сравнении «PPC vs Контроль» – 30 ДМС, а в сравнении «ППРС vs PPC» – 51 ДМС; 12 ДМС встречались в нескольких сравнениях. Карты интенсивности сигналов ДМС, обнаруженных при трех типах сравнения, представлены на рис. 3. При иерархической кластеризации по уровням метилирования 136 ДМС больные ППРС и PPC и здоровые индивиды контрольной группы объединялись в обособленные кластеры (верхние дендрограммы на рис. 4).

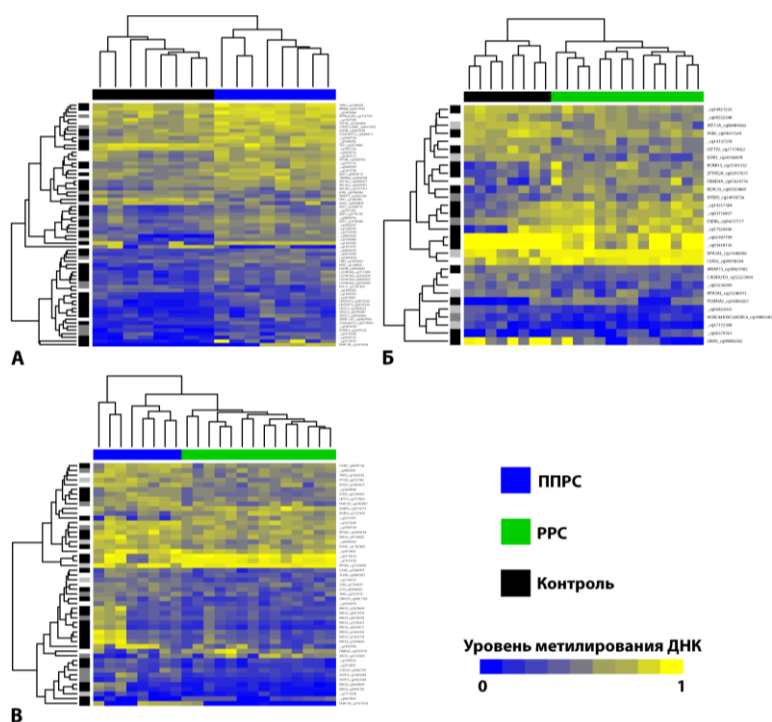


Рисунок 4. Карты интенсивности сигналов ДМС ДНК из МНК больных ППРС, РРС и здоровых индивидов. (А) – сравнение «ППРС vs Контроль»; (Б) – сравнение «РРС vs Контроль»; (В) – сравнение «ППРС vs РРС». Градиент цвета отражает уровень метилирования ДНК. Дендрограмма сверху показывает иерархическую кластеризацию образцов, где синий цвет обозначает больных ППРС, зеленый – больных РРС, черный – здоровых индивидов. Слева представлена иерархическая кластеризация ДМС, где цветом обозначена их локализация: черным – ДМС, расположенные в CpG-островках, темно-серым – в соседних с ними областях (shore), светло-серым – в отдаленных областях (shelf), белым – в прочих областях (sea). Справа указаны названия проб в соответствии со стандартной аннотацией Human Methylation 450k Bead Chip.

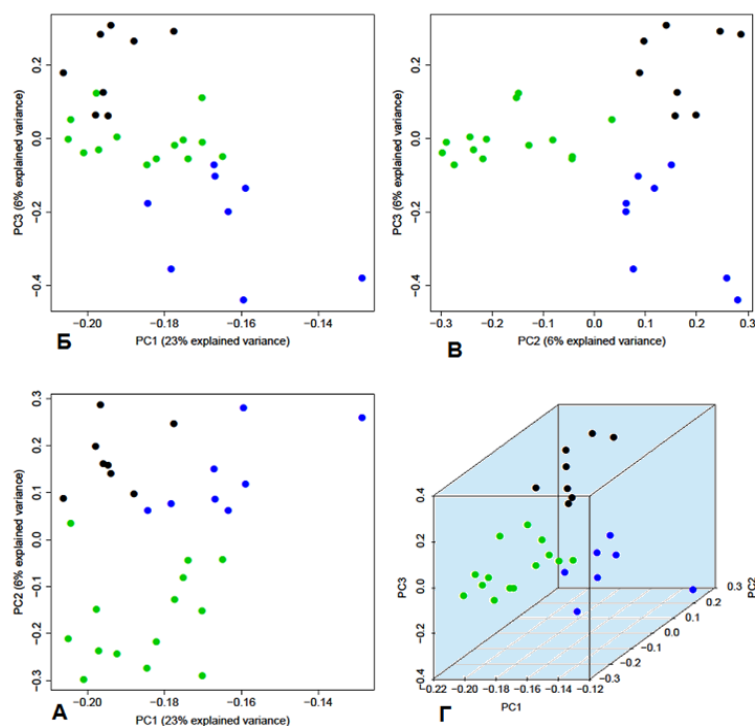


Рисунок 5. Двумерные (А-В) и трехмерная (Г) кластеризации образцов, построенные по выявленным ДМС с помощью метода главных компонент. Синие точки обозначают образцы ДНК больных ППРС, зеленые – больных РРС, черные – здоровых индивидов. По осям: главные компоненты, в скобках – доли варируемости данных, объясняемые компонентами.

Проведена визуализация данных для идентифицированных ДМС с помощью метода главных компонент (рис. 5). В пространствах двух и трех главных компонент образцы, включенные в исследование, хорошо дискриминировались на три группы: больные ППРС, больные РРС и здоровые индивиды.

Доля гиперметилированных ДМС при ППРС и РРС различается: при сравнении «РРС vs Контроль» она составляет менее половины ДМС (43%), а при сравнениях «ППРС vs Контроль» и при прямом сравнении «ППРС vs РРС» она равна 86% и 82% ДМС, соответственно. Более половины всех выявленных ДМС располагается в области генов, что не соответствует их

случайному распределению по геному, при котором для использованного в работе чипа высокой плотности (Human Methylation 450k Bead Chip) в области генов должно располагаться только ~30% ДМС. Более половины ДМС находятся в областях с наибольшим функциональным значением: в CpG-островках (61%, 50% и 53% для сравнений «ППРС vs Контроль», «РРС vs Контроль» и «ППРС vs РРС», соответственно) и в соседних с ними областях (16%, 10% и 18%, соответственно).

Таким образом, при анализе МНК были выявлены существенные различия в профилях метилирования ДНК между больными ППРС, РРС и здоровыми контролями. Хотя МНК представляют собой гетерогенную популяцию клеток, однако даже на этом уровне трехмерная визуализация выявленных ДМС, выполненная с помощью метода главных компонент, демонстрирует объединение индивидов каждой из сравниваемых групп в обособленный кластер, что свидетельствует о вовлечении метилирования ДНК в развитие разных форм РС. Выраженное гиперметилирование ДНК больных ППРС, как по сравнению со здоровыми индивидами, так и по сравнению с больными РРС, а также преимущественная локализация ДМС в CpG-островках и соседних с ними областях могут свидетельствовать о более существенной роли метилирования, направленного на подавление экспрессии генов, при ППРС.

Анализ метилирования ДНК из CD4+ Т-лимфоцитов. МНК включают в себя различные субпопуляции лейкоцитов, которые могут характеризоваться существенно различающимися паттернами дифференциального метилирования. Поэтому дальнейший анализ мы проводили в субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов, играющей центральную роль в иммунопатогенезе РС.

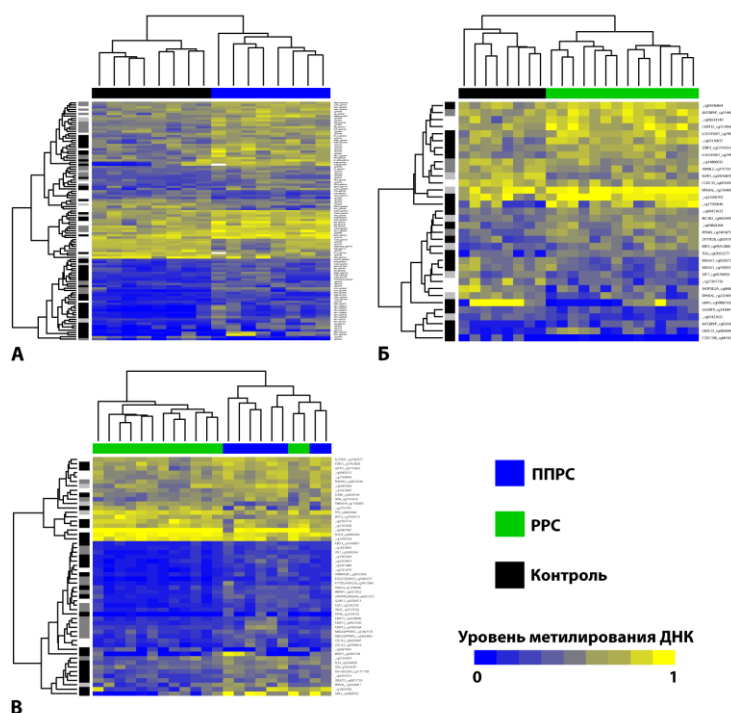


Рисунок 6. Карты интенсивности сигналов ДМС ДНК из CD4+ Т-лимфоцитов больных ППРС, РРС и здоровых индивидов. (А) – сравнение «ППРС vs Контроль»; (Б) – сравнение «РРС vs Контроль»; (В) – сравнение «ППРС vs РРС». Описание – см. рис. 5.

Сравнительный анализ метилирования ДНК из CD4⁺ Т-лимфоцитов выявил существенные различия в профилях метилирования между сравниваемыми группами. При трех сравнениях обнаружено 186 ДМС: в сравнении «ППРС vs Контроль» выявлено 108 ДМС, в сравнении «PPC vs Контроль» – 34 ДМС, а в сравнении «ППРС vs PPC» – 54 ДМС; 10 ДМС встречались в нескольких сравнениях. При иерархической кластеризации образцов ДНК на картах интенсивности сигналов ДМС (рис. 6) больные ППРС и PPC хорошо разделяются со здоровыми индивидами контрольной группы. При сравнении «ППРС vs PPC» наблюдали попадание двух больных PPC в кластер ППРС; ознакомление с их историями болезни показало, что они находились на момент забора крови в стадии обострения. По-видимому, активизация воспалительного процесса привела к их сближению с фенотипом ППРС.

Как и в случае МНК, у больных ППРС наблюдается выраженное гиперметилирование ДНК из CD4⁺ Т-лимфоцитов: при сравнении со здоровыми индивидами и с больными PPC гиперметилированным у них оказался 81% ДМС, в то время как у больных PPC только 59% ДМС гиперметилировано при сравнении с контрольной группой. Более половины ДМС находятся в областях с наибольшим функциональным значением: в CpG-островках (43%, 53% и 46%, соответственно при трех сравнениях) и соседних с ними областях (24%, 12% и 28%, соответственно). Как и в случае МНК, в CD4⁺ Т-лимфоцитах более половины всех выявленных ДМС обнаружено в области генов. В целом, в сравниваемых группах наблюдается сходство основных характеристик профилей метилирования ДНК из МНК и CD4⁺ Т-лимфоцитов, что может свидетельствовать о большом вкладе именно этой субпопуляции в картину метилирования ДНК в МНК.

Таблица 3. Гены, содержащие ДМС, которые выявили в CD4⁺ Т-лимфоцитах при сравнении групп больных ППРС, больных PPC и здоровых индивидов.

Сравнение	Выявленные ДМГ
ППРС vs Контроль	<i>AGA</i> ; <i>ASRGL1</i> ; <i>C11orf58</i> ; <i>PEAK3</i> ; <i>C1orf35</i> ; <i>CBFA2T3</i> ; <i>CCDC172</i> ; <i>CCDC85C</i> ; <i>CDK11B</i> ; <i>CLRN3</i> ; <i>CORO1C</i> ; <i>CRTAC1</i> ; <i>DCLRE1C</i> ; <i>ENOSF1</i> ; <i>ERICH1</i> (2); <i>FLI1</i> ; <i>FYT1D1</i> ; <i>KIAA0226</i> ; <i>H2AFY</i> ; <i>HKR1</i> (2); <i>HLA-DRB5</i> ; <i>IGDCC4</i> ; <i>IGF2BP1</i> (3); <i>IGSF9B</i> (2); <i>IMMT</i> ; <i>KIAA0513</i> ; <i>LCLAT1</i> (2); <i>LIME1</i> ; <i>SERPINA11</i> ; <i>NKAIN1</i> ; <i>NPAS3</i> (2); <i>OR2L13</i> (8); <i>PLEKHA2</i> ; <i>PRTFDC1</i> ; <i>PTH1R</i> ; <i>RASA3</i> ; <i>RHOJ</i> (2); <i>SIM2</i> ; <i>SLC22A16</i> ; <i>SLC35E4</i> ; <i>SLC46A2</i> ; <i>PTCD3</i> ; <i>SP140</i> (2); <i>SPAG1</i> ; <i>TGFBR3</i> ; <i>TMEM44</i> ; <i>TONSL</i> ; <i>TULP2</i> ; <i>UBXN7</i> ; <i>XKR5</i> ; <i>FAM157B</i> ; <i>GUSBP4</i> ; <i>HCG4B</i> (2); <i>HLA-H</i> (2)*
PPC vs Контроль	<i>ATF7</i> ; <i>CCDC108</i> ; <i>CCDC33</i> ; <i>CDRT15</i> ; <i>EBF3</i> ; <i>GALNT9</i> ; <i>GNAS</i> ; <i>IFITM5</i> ; <i>ILDRI</i> ; <i>LOC619207</i> (2); <i>LTBP3</i> ; <i>MDGA1</i> (2); <i>MYCBPAP</i> (2); <i>NCOR2</i> ; <i>OR2L13</i> ; <i>RPH3AL</i> (2)*; <i>SERHL2</i> ; <i>SH3PXD2A</i> ; <i>TDG</i> ; <i>ZFYVE28</i>
ППРС vs PPC	<i>ABCF2</i> ; <i>AKAP12</i> (3); <i>ASIC1</i> ; <i>ATP9A</i> ; <i>CBFA2T3</i> ; <i>CKB</i> ; <i>CLDN12</i> ; <i>COL1A2</i> (2); <i>ERICH1</i> ; <i>EXOSC7</i> ; <i>ZDHHC3</i> ; <i>FYT1D1</i> ; <i>KIAA0226</i> ; <i>GNAS</i> ; <i>HNRNPA2B1</i> ; <i>ICAM5</i> ; <i>IGDCC4</i> ; <i>INS-IGF2</i> ; <i>IGF2</i> ; <i>ITM2C</i> ; <i>KCNQ1</i> ; <i>KLF4</i> ; <i>LAMTOR2</i> ; <i>UBQLN4</i> ; <i>LEFTY2</i> ; <i>MRFAP1</i> ; <i>MYT1L</i> ; <i>PLCH2</i> ; <i>PLEKHA2</i> ; <i>RAB22A</i> (2); <i>RPH3AL</i> ; <i>SLCO5A1</i> ; <i>TMEM104</i> ; <i>TPO</i> ; <i>UFL1</i> ; <i>XKR5</i>

Жирным шрифтом отмечены гены, в которых обнаружены ДМС с пониженным уровнем метилирования в первой из сравниваемых групп. В скобках указано число ДМС в гене, если их более 1.

* Гены, в которых выявлены ДМС как с повышенным, так и с пониженным уровнем метилирования.

В сравнении «ППРС vs Контроль» выявлено 54 гена, содержащих ДМС (ДМГ), в сравнении «PPC vs Контроль» – 20, а в сравнении «ППРС vs PPC» – 36 ДМГ (табл. 3). Некоторые из представленных в табл. 3 ДМГ были выявлены в двух различных сравнениях. Так при сравнении больных обеими формами РС со здоровыми индивидами обнаруживалось дифференциальное метилирование гена *OR2L13*, функция которого к настоящему времени практически не изучена. Несколько генов оказались дифференциально метилированными при сравнении группы больных ППРС как с PPC, так и с контрольной группой. К ним относились ген негативного регулятора транскрипции *CBFA2T3*, ген *FYTTD1*, участвующий в процессинге и транспорте мРНК, ген *KIAA0226*, участвующий в регуляции аутофагии и эндоцитоза, ген *PLEKHA2*, участвующий в стимуляции иммунных реакций, ген *XKR5* вовлеченный в регуляцию пролиферации и дифференцировки клеток в ответ на цитокины, и гены с неизвестной функцией *ERICH1* и *IGDCC4*. Гены *GNAS*, кодирующий α -субъединицу стимулирующего G-белка, и *RPH3AL*, участвующий в везикулярном транспорте, были PPC-специфическими. На диаграмме Венна (рис. 7) схематически представлены ДМГ, специфичные для ППРС, специфичные для PPC и общие для двух форм РС.

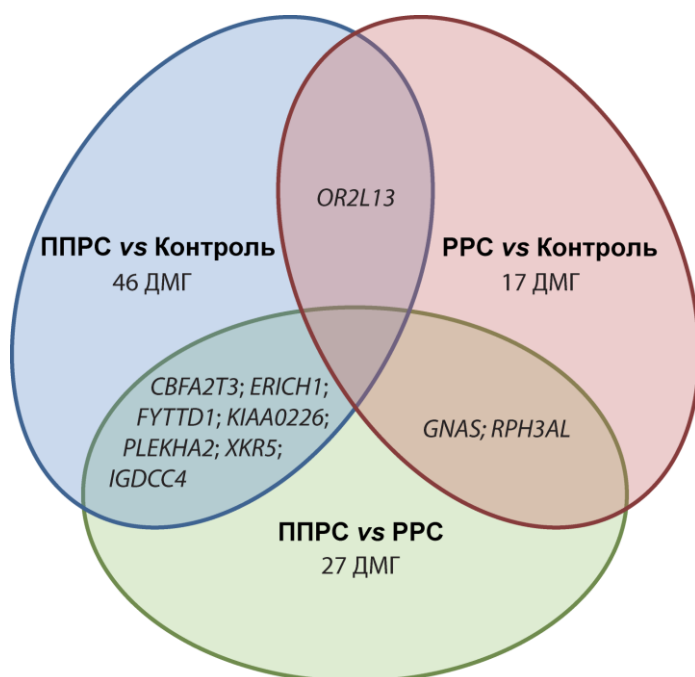


Рисунок 7. ДМГ из CD4⁺ Т-лимфоцитов, специфичные для ППРС, специфичные для PPC и общие для двух форм РС. Общие для двух форм РС ДМГ располагаются в пересечении синего и красного эллипсов, ППРС- и PPC-специфические ДМГ, идентифицированные при сравнении соответствующих форм РС со здоровыми контролями и друг с другом расположены в пересечениях синего и зеленого эллипсов и красного и зеленого эллипсов, соответственно.

Для всех ДМГ, выявленных в CD4⁺ Т-лимфоцитах, был проведен функциональный анализ с использованием базы данных GeneOntology [geneontology.org/] и web-инструмента PANTHER Classification System [pantherdb.org/] (рис. 8). Меньше половины из идентифицированных нами во всех сравнениях генов по базе Gene Ontology имеют подтвержденные для человека функции.

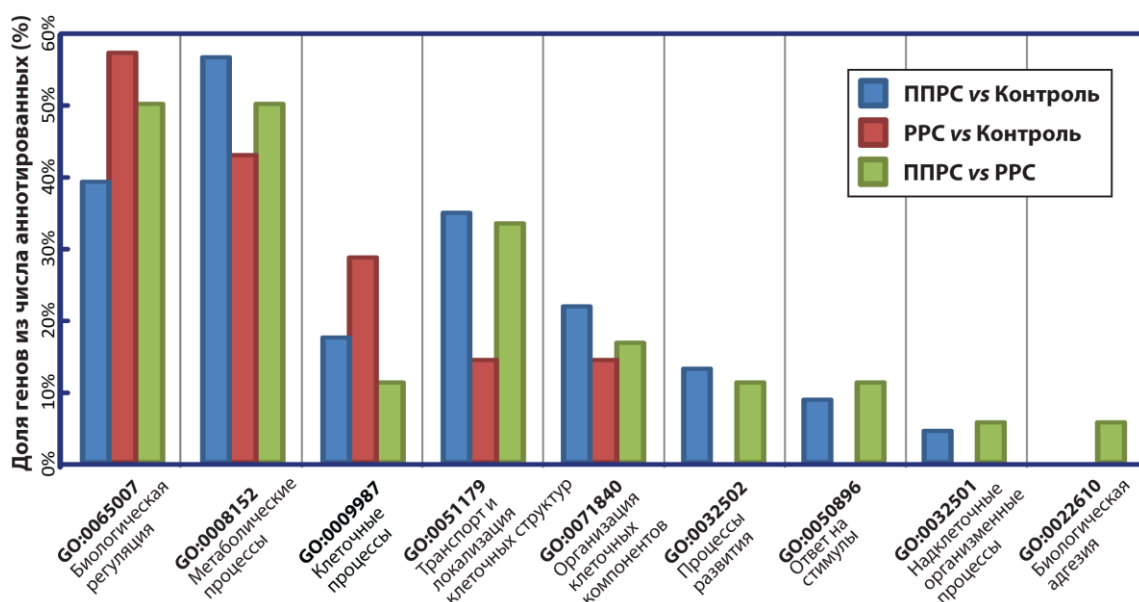


Рисунок 8. Биологические функции, в выполнение которых вовлечены гены, аннотированные по базе GeneOntology и выявленные в сравнениях «ППРС vs Контроль (синий цвет), «PPC vs Контроль» (красный цвет) и «ППРС vs PPC» (зеленый цвет). На гистограмме представлена доля генов в процентах от общего числа генов аннотированных с биологическими функциями по базе данных Gene Ontology. Названия и ID биологических функций в базе Gene Ontology представлены под гистограммой.

Как видно из рис. 8, аннотированные ДМГ, отличающие обе формы РС от здоровых контролей, в первую очередь вовлечены в процессы биологической регуляции (GO:0065007) и метаболические процессы (GO:0008152), однако наборы этих ДМГ сильно различаются между собой, как следует из сравнения ППРС и PPC. Это различие в наборах ДМГ между двумя формами РС отчетливо проявляется также в отношении процессов, вовлеченных в локализацию клеток и их структур и в организацию клеточных компонентов. Видно, что для ППРС больше, чем для PPC, характерно вовлечение ДМГ в метаболические процессы (GO:0008152) и процессы, связанные с локализацией клеток и их структур (GO:0051179), а для PPC – в биологическую регуляцию (GO:0065007) и клеточные процессы (GO:0009987). Кроме того, аннотированные ДМГ при ППРС включают гены, участвующие в процессах развития (GO:0032502), ответах на стимулы (GO:0050896) и надклеточных процессах (GO:0032501), которые вовсе не выявляются в сравнении «PPC vs Контроль». ДМГ, участвующие в процессах биологической адгезии (GO:0022610) обнаружены только в сравнении «ППРС vs PPC». В целом, перечисленные функции из аннотации базы GeneOntology относятся к глобальным механизмам поддержания жизнедеятельности клетки.

Согласно данным других баз данных, таких как KEGG, Gene Cards и NCBI Gene, можно выделить и другие биологические процессы, в которые могут быть вовлечены идентифицированные ДМГ. В контексте нашего исследования особого внимания заслуживают ДМГ, которые могут быть связаны с регуляцией иммунных и воспалительных реакций. Среди выявленных в CD4+ Т-лимфоцитах ДМГ к таким генам можно отнести только гены HLA-DRB5,

HCG4B, *HLA-H* и *RNF39*, расположенные в локусе HLA. Дифференциальное метилирование различных генов локуса HLA в CD4+ Т-лимфоцитах больных РС показывали и ранее [Maltby et al. 2017, Graves et al. 2014], что указывает на его вовлечение в патогенез разных форм РС не только на уровне генетической предрасположенности, но и на уровне эпигенетической регуляции экспрессии его генов. Мы не обнаружили дифференциального метилирования других генов, полиморфизмы которых по нашим данным вовлечены в иммунопатогенез ППРС и РРС.

В целом, результаты полногеномного анализа профилей метилирования ДНК как в МНК, так и в CD4+ Т-лимфоцитах, полученные в нашем исследовании, говорят об участии метилирования ДНК – одного из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов у млекопитающих – в развитии РС. Впервые показано, что этот эпигенетический механизм вовлечен в формирование двух клинически различных форм РС – ППРС и РРС, причем ППРС отличается от РРС бóльшими изменениями в паттерне метилирования ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы оценивали вовлеченность генома в формирование предрасположенности к агрессивной первично-прогрессирующей форме РС на основании анализа связи генетической вариабельности и изменения профилей метилирования ДНК с возникновением ППРС, опираясь на данные сравнений ППРС и РРС со здоровыми контролями, а также их прямого сравнения между собой. Привлечение третьего сравнения, на наш взгляд, расширяет возможности анализа полученных результатов.

В ходе проведенного анализа ассоциации панели полиморфных вариантов генов, вовлеченных в регуляцию иммунного ответа, с развитием ППРС и РРС, мы выявили сходство и различия вклада этих генов в наследственную предрасположенность к ППРС и РРС. Носительство вариантов *HLA-DRB1**11, *15, *IL7RA**C/C, *CXCR5**A/A и *CLEC16A**G/G, выявленных при сравнении больных как ППРС, так и РРС с контрольной группой, можно считать ассоциированным с РС независимо от его формы. Аллели/генотипы *HLA-DRB1**07, *IL4**C/C, *IRF5**A/A и *IFNAR2**C были идентифицированы как ППРС-специфические, т.к. они были ассоциированы с ППРС при сравнении как с больными РРС, так и с контрольной группой, а аллели *HLA-DRB1**09 и *IL6**C – как РРС-специфические. Проведенные логистический регрессионный анализ и ROC-анализ позволили оценить потенциал выявленных полиморфных вариантов для предсказания у конкретного пациента с РС на ранней стадии развития заболевания характера его дальнейшего течения по типу ППРС или РРС.

Полногеномный анализ метилирования ДНК из МНК и CD4+ Т-лимфоцитов больных ППРС, РРС и здоровых индивидов позволил выявить представительные спектры ДМС,

различающие эти группы индивидов между собой, и единственный общий для ППРС и РРС ДМС в гене *OR2L13*. ДМС, обнаруженные у больных ППРС как в МНК, так и в CD4+ Т-лимфоцитах, в основном были гиперметилированными по сравнению и с больными РРС, и со здоровыми индивидами контрольной группы (доля гиперметилированных генов составляла 81-86%). Больше половины всех выявленных ДМС располагались в CpG-островках и соседних с ними областях, что с высокой вероятностью указывает на их функциональное значение для регуляции генной экспрессии.

Как и при анализе генетической предрасположенности к двум формам РС, анализ уровней метилирования ДНК позволил выявить ППРС-специфические ДМС (в генах *CBFA2T3*, *FYTTD1*, *KIAA0226*, *PLEKHA2*, *XKR5*, *ERICH1* и *IGDCC4*) и РРС-специфические (в генах *GNAS* и *RPH3AL*). Ни один из этих ДМГ прямо не вовлечен в развитие иммунных и воспалительных реакций. При этом многие из них участвуют в регуляции транскрипции, процессинга и транспорта мРНК, а также во внутриклеточном сигналинге. Это может свидетельствовать в пользу участия метилирования ДНК в патогенезе основных форм РС на уровне общих интегральных систем регуляции жизнедеятельности клетки, в то время как в случае наследственной предрасположенности к ППРС и РРС существенную роль играет полиморфизм генов иммунного ответа. В целом, мы идентифицировали ряд полиморфных вариантов и ДМС генома, дискриминирующих ППРС от более частой ремиттирующей формы РС. Эти характеристики генома потенциально могут быть использованы в качестве маркеров для дифференциальной диагностики форм РС на ранней стадии заболевания. Это может помочь врачу ускорить назначение специфической медикаментозной терапии, которая уже разработана не только для РРС, но и для ППРС [Montalban et al. 2017], и минимизировать накопление необратимых неврологических нарушений у конкретного пациента.

ВЫВОДЫ

1) Выявлены ассоциации носительства аллелей/генотипов генов иммунного ответа HLA-*DRB1**07, *11 и *15, *IL7RA**C/C, *IL4**C/C, *IRF5**A/A, *CXCR5**A/A, *CLEC16A**G/G и *IFNAR2**C, с развитием ППРС у этнических русских при сравнении со здоровыми индивидами контрольной группы. Выявлены ассоциации носительства аллелей/генотипов генов иммунного ответа HLA-*DRB1**01, *03, *09, *11, *12 и *15, *CD86**G/G, *IL7RA**C/C, *IL6**C, *CXCR5**A/A, *CLEC16A**G/G и *IFNAR2**A, с развитием РРС. Сопоставление этих данных свидетельствует о том, что аллели/генотипы HLA-*DRB1**11, *15, *IL7RA**C/C, *CXCR5**A/A и *CLEC16A**G/G, ассоциированы с РС независимо от его формы.

2) Ассоциации носительства аллелей/генотипов HLA-*DRB1**04, *07 и *09, *IL4**C/C, *IL6**C, *IRF5**A/A, *MIR196A2**C, *IFNAR2**C с одной из двух форм РС, выявленные при их

прямом сравнении, позволили отнести аллели/генотипы *HLA-DRB1*07*, *IL4*C/C*, *IRF5*A/A*, *IFNAR2*C* к ППРС-специфическим, а *HLA-DRB1*09*, *IL6*C* – к РРС-специфическим вариантам.

3) Логистический регрессионный анализ и ROC-анализ позволили оценить предсказательную способность выявленных генетических маркеров для определения клинической формы РС. Композитная модель, построенная для прямого сравнения ППРС с РРС, обладает AUC = 0.684, что делает ее полезной для предсказания у конкретного пациента на ранней стадии развития РС характера его дальнейшего течения по типу ППРС или РРС.

4) Профили метилирования ДНК из мононуклеарных клеток крови и CD4+ Т-лимфоцитов при полногеномном анализе у больных ППРС, больных РРС и у здоровых индивидов различаются между собой. Большинство выявленных дифференциально метилированных сайтов генома (ДМС) локализовано в CpG-островках или в непосредственной близости от них. Более половины всех выявленных ДМС обнаружено в области генов. ДМС, обнаруженные у больных ППРС как в мононуклеарных клетках, так и в CD4+ Т-лимфоцитах, характеризуются повышенным уровнем метилирования как по сравнению с больными РРС, так и по сравнению со здоровыми индивидами.

5) Анализ профилей метилирования ДНК в CD4+ Т-лимфоцитах позволил выявить ППРС-специфические ДМС (в генах *CBFA2T3*, *FYTTD1*, *KIAA0226*, *PLEKHA2*, *XKR5*, *ERICH1* и *IGDCC4*) и РРС-специфические (в генах *GNAS* и *RPH3AL*). Обнаружен единственный общий для ППРС и РРС ДМС, локализованный в гене *OR2L13*. При анализе функций генов, содержащих ДМС, показано их преимущественное участие в глобальных механизмах поддержания жизнедеятельности клетки.

6) В целом, в формирование предрасположенности к ППРС и РРС вовлечены как генетические, так и эпигенетические механизмы, что открывает возможность уточнения особенностей патогенеза ППРС как клинически обособленной формы РС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах

- 1) **И.С. Киселев**, О.Г. Кулакова, Н.М. Баулина, В.В. Башинская, Е.В. Попова, А.Н. Бойко, О.О. Фаворова. Вариабельность гена *MIR196A2* как фактор риска развития первично-прогрессирующего рассеянного склероза. // Молекулярная биология. 2019. №2. С.282-9.
- 2) **I. Kiselev**, V. Bashinskaya, N. Baulina, M. Kozin, E. Popova, A. Boyko, O. Favorova, O. Kulakova. Genetic differences between primary progressive and relapsing-remitting multiple sclerosis: The impact of immune-related genes variability. // Multiple Sclerosis and Related Disorders. 2019. T.29. C.130-6.
- 3) Е.В. Попова, **И.С. Киселев**, А.Н. Бойко, С.А. Сиверцева, Н.А. Малкова, Д.С. Коробко, Н.Н. Спирин, Д.С. Касаткин, А.В. Караева, Е.Л. Турова, Н.Н. Спирина, Л.И. Волкова, Н.М. Баулина, В.В. Башинская, О.Г. Кулакова, О.О. Фаворова. Полиморфные варианты генов иммунного ответа как факторы риска развития первично-прогрессирующего рассеянного склероза. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т.117. №2. С.14-21.

- 4) **I.S. Kiselev**, M.R. Kabilov, O.G. Kulakova, L.V. Danilova, E.V. Popova, O.A. Baturina, N.M. Baulina, A.N. Boyko, A.V. Favorov, O.O. Favorova, V.V. Vlassov. Whole-genome DNA methylation profiles in CD4+ and CD14+ cells depending on multiple sclerosis activity. // *Acta Naturae*. 2017. Т.9. №1сп. С.94.
- 5) О.Г. Кулакова, М.Р. Кабилов, Л.В. Данилова, Е.В. Попова, О.А. Батурина, Е.Ю. Царева, Н.М. Баулина, **И.С. Киселев**, А.Н. Бойко, А.В. Фаворов, О.О. Фаворова, В.В. Власов. Полногеномный анализ метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных различными формами рассеянного склероза. // *Acta Naturae*. 2016. Т.8. №2. С.39-47.
- 6) **I. Kiselev**, V. Bashinskaya, O. Kulakova, N. Baulina, E. Popova, A. Boyko, O. Favorova. Variants of MicroRNA Genes: Gender-Specific Associations with Multiple Sclerosis Risk and Severity. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Т.16. №8. С.20067-81.
- 7) V.V. Bashinskaya, O.G. Kulakova, **I.S. Kiselev**, N.M. Baulina, A.V. Favorov, A.N. Boyko, E.Yu. Tsareva, O.O. Favorova. GWAS-identified multiple sclerosis risk loci involved in immune response: Validation in Russians. // *Journal of Neuroimmunology*. 2015. №282. С.85-91.
- 8) **И.С. Киселев**, В.В. Башинская, Н.М. Баулина, Е.В. Попова, А.Н. Бойко, О.Г. Кулакова, О.О. Фаворова. Полиморфные варианты генов микроРНК ассоциированы с развитием аутоиммунного воспаления при рассеянном склерозе. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015. Т.115. №2. С.59.
- 9) V.V. Bashinskaya, O.G. Kulakova, **I.S. Kiselev**, N.M. Baulina, A.N. Boyko, E.Yu. Tsareva, O.O. Favorova. Genetics of multiple sclerosis: association analysis of GWAS-identified and microRNA-linked common genetic variations. // *Journal of Biotechnology*. 2015. Т.208. С. S94-S95.
- 10) **И.С. Киселев**. Анализ ассоциации полиморфизма генов, вовлеченных в развитие воспаления, с предрасположенностью к рассеянному склерозу. // *Вестник Российского Государственного Медицинского Университета*. 2014. №2. С.268-269.

Тезисы в сборниках материалов конференций

- 1) **И.С. Киселев**, В.В. Башинская, Н.М. Баулина, М.С. Козин, Е.В. Попова, А.Н. Бойко, О.О. Фаворова, О.Г. Кулакова. Полиморфные варианты генов иммунного ответа как маркеры клинического фенотипа рассеянного склероза. // Сборник трудов международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018». 2018. С.96-7.
- 2) И.С. Киселев. Связь активности патологического процесса при различных формах рассеянного склероза с профилем метилирования ДНК в иммунных клетках крови. // Сборник тезисов XIII Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. 2018. С.257.
- 4) **Киселев И.С.**, Кулакова О.Г., Кабилов М.Р., Данилова Л.В., Башинская В.В., Баулина Н.М., Батурина О.А., Попова Е.В., Бойко А.Н., Фаворова О.О. Генетика и эпигенетика первично-прогрессирующего рассеянного склероза как особой агрессивной формы заболевания. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» Т.2. С.64-5.
- 5) O.G. Kulakova, N.M. Baulina, **I.S. Kiselev**, V.V. Bashinskaya, E.V. Popova, A.N. Boyko, O.O. Favorova. MicroRNA expression levels and variants of microRNA genes as biomarkers of multiple sclerosis clinical course. // 13th ISNI Congress, Book of Abstracts. 2016. С.140-141.
- 6) **И.С. Киселев**, М.Р. Кабилов, О.Г. Кулакова, Л.В. Данилова, Е.В. Попова, О.А. Батурина, Е.Ю. Царева, Н.М. Баулина, А.Н. Бойко, А.В. Фаворов, О.О. Фаворова, В.В. Власов. Сравнение полногеномных профилей метилирования ДНК при различных формах рассеянного склероза. Сборник тезисов 4-й Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию «NGS-2016». 2016. С.29.
- 7) O.G. Kulakova, N.M. Baulina, M.R. Kabilov, L.V. Danilova, E.V. Popova, O.A. Baturina, E.U. Tsareva, **I.S. Kiselev**, A.N. Boyko, V.V. Vlassov, A.V. Favorov, O.O. Favorova. Genome-Wide DNA Methylation Profiling Identifies Differential Epigenetic Patterns in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Relapsing-Remitting and Primary-Progressive Multiple Sclerosis Patients. CLEPSO 6-th International Meeting Program & Abstract Book. 2016. С.5-6.