(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0139317
(43) 공개일자 2024년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *G16B 25/10* (2019.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
G16B 25/10 (2019.02)
(21) 출원번호 10-2023-0033167
(22) 출원일자 2023년03월14일
심사청구일자 2023년03월14일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이상수
강원도 춘천시 후석로 459, 101동 1504호
(74) 대리인
특허법인본

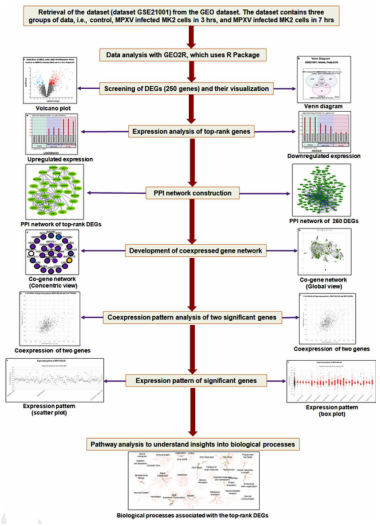
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **원숭이두창 바이러스 감염 진단용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 원숭이두창 바이러스 감염 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 유전자 LOC695323, TMEM107 및 LOC695427의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

유전자 LOC695323, TMEM107 및 LOC695427의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D 중 어느 1종 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 원숭이두창바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 키트가 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 원숭이두창바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 8

개체로부터 유전자 LOC695323, TMEM107 및 LOC695427의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정한 유전자의 발현 수준을 대조군에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 측정한 유전자 LOC695323, TMEM107 및 LOC695427의 발현 수준이 대조군에서의 유전자의 발현 수준보다 상

향 발현되는 경우 원숭이두창바이러스에 감염된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

개체로부터 유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D 중 어느 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 측정한 유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D 중 어느 1종 이상의 발현 수준이 대조군에서의 유전자의 발현 수준보다 상향 발현되는 경우 원숭이두창바이러스에 감염된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

개체로부터 유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 측정한 유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현 수준이 대조군에서의 유전자의 발현 수준보다 하향 발현되는 경우 원숭이두창바이러스에 감염된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 원숭이두창 바이러스 감염 진단용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 비아프리카 국가에서 원숭이두창(MPX; monkeypox)이 확산되어 세계적인 우려가 되고 있다. MPX와 그 감염은 2022년 5월 초 영국에서 확인되었다. 결과적으로 바이러스는 유럽 전역으로 퍼졌다. 그 후, 바이러스는 전 세계적으로 다른 비 전염병 국가로 빠르게 퍼졌다. 2022년 12월 7일 현재 미국 질병통제예방센터(CDC)는 110개국에서 82,199건의 감염 사례가 보고되었다고 밝혔다. 그들은 또한 13개국에서 65명의 사망자를 기록했다. 가장 많은 감염 사례는 미국에서 기록되었으며, 알려진 사례는 28,224건이다. 미국 외에도 유럽 국가 전체에 바이러스가 퍼졌다. 스페인에서 7,317건, 영국에서 3,698건, 독일에서 3,662건이 보고되었다. 이전에는 바이러스 감염이 중앙 및 서아프리카와 같은 아프리카 국가의 일부 지역으로 제한되었다. 이전에는 아프리카 이외의 국가에서 드문 MPX 발병이 보고되었다. 이러한 주기적인 발병은 동물의 수입과 해외 여행이라는 두 가지 주요 요인과 관련이 있다. 그러나 전 세계적으로 감염이 증가함에 따라 WHO는 2022년 7월 23일에 MPX 질병을 공중 보건 비상사태로 발표했다.

[0003] 원숭이두창은 동물원성 질병이며 질병의 병원체는 원숭이두창 바이러스(monkepox virus; MPXV)이다. 이 바이러스는 Poxviridae과 Orthopoxvirus 속에 속한다. MPXV는 게놈이 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 암호화하는 DNA 바이러스이다. 바이러스 게놈은 약 197kb의 선형 DNA로 구성된다. 게놈에는 약 190개의 겹치지 않는 유전자가 포함되어 있다. 이 유전자는 겹치지 않는 ORF이다. 연구원들은 이전에 MPXV의 다양성을 설명했다. 그들은 MPXV의 두

가지 클레이드인 서아프리카(WA) 클레이드와 콩고 분지(CB) 클레이드를 시연했다. CB 클레이드는 중앙 아프리카 클레이드라고도 한다. 두 MPXV 하위 유형 중에서 WA 클레이드는 약 600년 전에 나타났다. 그 후, CB 클레이드는 WA 클레이드에서 분리되었다. CB 클레이드의 바이러스는 WA 클레이드의 바이러스보다 더 치명적인 것으로 알려져 있다. 그러나 연구원들은 최근 발생하는 새로 출현하는 바이러스의 역학적 패턴의 변화를 관찰했다. WHO는 MPXV의 명명법에 대한 새로운 명명 시스템을 제안했다. 그들은 2022년 8월 12일에 출판된 Clade I, Clade IIa 및 Clade IIb의 세 가지 클레이드를 발표했다. 이 바이러스는 동물에서 사람으로, 사람에서 사람으로 전염될 수 있다. 최근에는 사람에서 동물로의 바이러스 전파가 보고되고 있다. 또한, 최근에는 사람에서 개로의 전염이 보고되고 있다.

[0004] 바이러스의 잠복기는 5~21일이다. 감염 후 MPXV는 복제를 시작한다. Poxviridae 과의 구성원으로서 감염 2시간 이내에 DNA 합성이 관찰되었다. 복제는 세포질의 공장으로 알려진 이산 핵 인접 부위 내에서 발생한다. 바이러스 공장은 단일 비리온에서 발생하는 것으로 알려져 있다. 처음에 공장은 매우 조밀한 소포체 막으로 둘러싸여 있다. 이것은 복제에서 역할을 하며 바이러스 mRNA의 전사 및 번역 사이트이다. 그러나 바이러스 감염 및 복제 메커니즘에 대한 보다 자세한 이해도 필요하다.

[0005] 바이러스 복제 동안 숙주의 유전자 발현 패턴이 탐색되었다. 숙주와 바이러스 유전자의 공동 발현 패턴은 상향 조절된 유전자와 하향 조절된 유전자를 동시에 펼칠 수 있다. 따라서 이러한 유전자에 대한 연구는 중요한 연구 분야이다. 이것은 우리가 숙주 세포를 사용하는 바이러스 복제 메커니즘을 밝히는 데 도움이 되었다. 이 연구는 또한 바이러스에 대한 새로운 치료법 개발로 이어질 수 있다. 연구자들은 감염 시 숙주의 유전자 발현 패턴이나 숙주 유전자와 다른 바이러스의 바이러스 동시 발현 패턴을 이해하기 위해 노력하고 있다. 연구자들은 또한 MPXV 감염 동안 숙주의 유전자 발현 패턴을 평가했다. 폭스 바이러스 감염 동안 바이러스 유전자 발현 프로그램을 이해하려고 시도했다. 이를 위해 MPXV와 Vaccinia Western Reserve(VACV)의 두 가지 바이러스의 유전자 발현 패턴을 이해하기 위한 특수 마이크로어레이가 개발되었다. 이 연구는 두 가지 바이러스 감염의 전사체 기반 시간 지도를 분석했는데, 이는 두 전사체가 두 바이러스에 대해 별개의 유전자 발현 특징을 가지고 있음을 나타낸다. 또 다른 연구에서는 MPXV 및 VACV로 감염된 인간 세포에서 유전자 발현 프로파일이 관찰되었다. 이 연구는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6 및 CCL5와 같은 일부 면역 보호 유전자의 억제에 주목했다. 연구자들은 MPXV, VACV 및 우두 바이러스 유전자 발현을 맵핑했다. 그들은 HeLa 세포에서 MPXV-, VACV- 및 Cowpox 바이러스에 감염된 유전자 발현을 연구했으며 수많은 감염 조절 유전자 클러스터를 밝혀냈다. 연구원들은 또한 면역 반응 및 백혈구 이동과 관련된 유전자와 같은 다양한 유형의 유전자에 주목했다. 유사하게 연구자들은 게놈 마이크로어레이를 사용하여 MPXV 감염 동안 히말라야 원숭이(Macaca mulatta)의 신장 상피 세포(MK2 세포)에서 유전자 발현 프로필을 설명하려고 시도했다. 그들은 3시간과 7시간에 차등적으로 발현되는 유전자를 이해하려고 시도했고 많은 유전자가 감염 조절에 관여한다고 결론지었다. 그러나 MPXV 감염에 대한 더 많은 정보를 제공할 수 있는 유전자 발현 패턴을 탐색하는 것이 필수적이다.

[0006] 우리 연구의 주요 연구 목적은 MPXV 복제의 게놈 환경을 이해하기 위해 MPXV 복제 동안 차별적으로 발현된 유전자(differentially expressed genes; DEG)와 최상위 DEG를 평가하는 것이다. 이 연구의 다른 목적은 단백질-단백질 상호작용(PPI) 네트워크와 MPXV 복제 동안 최상위 DEG의 공동 발현을 밝히는 것이다. 마지막으로 최상위 DEG와 생물학적 과정 간의 연관성을 이해하려고 시도했다. 이 연구는 MPXV 복제의 게놈 패턴을 이해하고 MPXV 감염을 치료하기 위한 새로운 치료 발견 및 개발에 대한 통찰력을 제공하는 데 도움이 될 것이다.

선행기술문헌

[0007] [1] WHO, Monkeypox: experts give virus variants new names. 2022. <https:// www.who.int/news/item/12-08-2022-monkeypox--experts-give-virus-variantsnew-names> (Accessed on 7 October, 2022).

[0008] [2] Mohapatra R.K, et al. Unexpected sudden rise of human monkeypox cases in multiple non-endemic countries amid COVID-19 pandemic and salient counteracting strategies: Another potential global threat? Int J Surg 2022;103: 106705.

[0009] [3] CDC, Monkeypox Outbreak Global Map. 2022. <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html>. (Accessed on 8 December, 2022).

[0010] [4] Bunge E.M, et al. The changing epidemiology of human monkeypox-A potential threat? A systematic review. PLOS Negl Trop Dis 2022;16(2):e0010141.

[0011] [5] Bhattacharya M, Dhama K, Chakraborty C. Recently spreading human monkeypox virus infection and its

transmission during COVID-19 pandemic period: a travelers' prospective. Travel Med Infect Dis 2022;49:102398.

[0012] [6] Shchelkunov S.N, et al. Analysis of the monkeypox virus genome. Virology 2002; 297(2):172-94.

[0013] [7] Kugelman J.R, et al. Genomic variability of monkeypox virus among humans, Democratic Republic of the Congo. Emerg Infect Dis 2014;20(2):232-9.

[0014] [8] Hendrickson R.C, et al. Orthopoxvirus genome evolution: the role of gene loss. Viruses 2010;2(9):1933-67.

[0015] [9] Nakazawa Y, et al. A phylogeographic investigation of African monkeypox. Viruses 2015;7(4):2168-84.

[0016] [10] Chakraborty C, et al. Appearance and re-appearance of zoonotic disease during the pandemic period: long-term monitoring and analysis of zoonosis is crucial to confirm the animal origin of SARS-CoV-2 and monkeypox virus. Vet Q 2022;42(1): 119-24.

[0017] [11] Seang S, et al. Evidence of human-to-dog transmission of monkeypox virus. Lancet 2022;400(10353):658-9.

[0018] [12] Katsafanas G.C, Moss B. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. Cell Host Microbe 2007;2(4):221-8.

[0019] [13] Moss B. Poxvirus DNA replication. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5(9): a010199.

[0020] [14] Hasankhani A, et al. Differential co-expression network analysis reveals key hubhigh traffic genes as potential therapeutic targets for COVID-19 pandemic. Front Immunol 2021;12:789317.

[0021] [15] Chakraborty C, et al. Understanding gene expression and transcriptome profiling of COVID-19: an initiative towards the mapping of protective immunity genes against SARS-CoV-2 infection. Front Immunol 2021;12:724936.

[0022] [16] Rubins K.H, et al. Comparative analysis of viral gene expression programs during poxvirus infection: a transcriptional map of the vaccinia and monkeypox genomes. PLOS One 2008;3(7):e2628.

[0023] [17] Rubins K.H, et al. Stunned silence: gene expression programs in human cells infected with monkeypox or vaccinia virus. PLOS One 2011;6(1):e15615.

[0024] [18] Bourquain D, Dabrowski P.W, Nitsche A. Comparison of host cell gene expression in cowpox, monkeypox or vaccinia virus-infected cells reveals virus-specific regulation of immune response genes. Virol J 2013;10:61.

[0025] [19] Alkhalil A, et al. Gene expression profiling of monkeypox virus-infected cells reveals novel interfaces for host-virus interactions. Virol J 2010;7:173.

[0026] [20] Barrett T, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. Nucleic Acids Res 2013;41(Database issue):D991-5.

[0027] [21] Ritchie M.E, et al. limma powers differential expression analyses for RNAsequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res 2015;43(7):e47.

[0028] [22] Saito R, et al. A travel guide to Cytoscape plugins. Nat Methods 2012;9(11): 1069-76.

[0029] [23] Shannon P, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res 2003;13(11):2498-504.

[0030] [24] Morris J.H, et al. clusterMaker: a multi-algorithm clustering plugin for Cytoscape. BMC Bioinform 2011;12:436.

[0031] [25] Prasad K, et al. Brain disease network analysis to elucidate the neurological manifestations of

COVID-19. Mol Neurobiol 2021;58(5):1875-93.

[0032] [26] Obayashi T, et al. COXPRESdb v7: a gene coexpression database for 11 animal species supported by 23 coexpression platforms for technical evaluation and evolutionary inference. Nucleic Acids Res 2019;47(D1):D55-62.

[0033] [27] Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. Nucleic Acids Res 2018;46(D1):D649-55.

[0034] [28] Haw R, et al. Perform pathway enrichment analysis using reactomeFIViz. Methods Mol Biol 2020;2074:165-79.

[0035] [29] Breheny P, Stromberg A, Lambert J. p-value histograms: inference and diagnostics. High Throughput 2018;7(3):23.

[0036] [30] Cheadle C, et al. Analysis of microarray data using Z score transformation. J Mol Diagn 2003;5(2):73-81.

[0037] [31] Moreno-Altamirano M.M.B, Kolstoe S.E, Sanchez-Garcia F.J. Virus control of cell metabolism for replication and evasion of host immune responses. Front Cell Infect Microbiol 2019;9:95.

[0038] [32] Dissanayake T.K, et al. Comparative transcriptomic analysis of rhinovirus and influenza virus infection. Front Microbiol 2020;11:1580.

[0039] [33] Li M, et al. Transcriptome analysis of responses to dengue virus 2 infection in aedes albopictus (Skuse) C6/36 cells. Viruses 2021;13(2):343.

[0040] [34] Thaker S.K, Ch'ng J, Christofk H.R. Viral hijacking of cellular metabolism. BMC Biol 2019;17(1):59.

[0041] [35] Syed G.H, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. Trends Endocrinol Metab 2010;21(1):33-40.

[0042] [36] Diehl N, Schaal H. Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. Viruses 2013;5(12):3192-212.

[0043] [37] Hornuss D, et al. Transmission characteristics, replication patterns and clinical manifestations of human monkeypox virus - an in-depth analysis of four cases from Germany. Clin Microbiol Infect 2022. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.09.012.

[0044] [38] Lapa D, et al. Monkeypox virus isolation from a semen sample collected in the early phase of infection in a patient with prolonged seminal viral shedding. Lancet Infect Dis 2022;22(9):1267-9.

[0045] [39] Moschese D, et al. Isolation of viable monkeypox virus from anal and urethral swabs, Italy, May to July 2022. Eur Surveill 2022;27(36).

[0046] [40] Singh R, et al. Replication-dependent histone isoforms: a new source of complexity in chromatin structure and function. Nucleic Acids Res 2018;46(17): 8665-78.

[0047] [41] Tagami H, et al. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. Cell 2004;116(1):51-61.

[0048] [42] Suchkov S.V, et al. Study of the conditions of activation and stabilization of DNAmethylases from Shigella sonnei 47 during fractionation, purification and storage. Biokhimiia 1986;51(8):1369-76.

[0049] [43] Clement C, et al. High-resolution visualization of H3 variants during replication reveals their controlled recycling. Nat Commun 2018;9(1):3181.

[0050] [44] Jamai A, Imoberdorf R.M, Strubin M. Continuous histone H2B and transcriptiondependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. Mol Cell 2007; 25(3):345-55.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0051] 본 발명은 원숭이두창 바이러스 복제 동안 차별적으로 발현된 유전자들을 분석하여, 해당 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 원숭이두창 바이러스 감염 진단용 조성물, 키트, 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0052] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0053] 본 발명은 유전자 LOC695323, TMEM107 및 LOC695427의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 조성물은 유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D 중 어느 1종 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 상기 조성물은 유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0056] 상기 조성물은 유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0057] 상기 조성물은 유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19의 발현수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 원숭이두창바이러스 감염 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0059] 상기 키트가 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

[0060] 본 발명은 또한, 개체로부터 유전자 LOC695323, TMEM107 및 LOC695427의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정한 유전자의 발현 수준을 대조군에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 원숭이두창 바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법을 제공한다.

[0061] 상기 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법은 측정한 유전자 LOC695323, TMEM107 및 LOC695427의 발현 수준이 대조군에서의 유전자의 발현 수준보다 상향 발현되는 경우 원숭이두창바이러스에 감염된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 상기 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법은 개체로부터 유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D 중 어느 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0063] 상기 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법은 측정한 유전자 HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D 중 어느 1종 이상의 발현 수준이 대조군에서의 유전자의 발현 수준보다 상향 발현되는 경우 원숭이두창바이러스에 감염된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0064] 상기 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법은 개체로부터 유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0065] 상기 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법은 상기 측정한 유전자 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현 수준이 대조군에서의 유전자의 발현 수준보다 하향 발현되는 경우 원숭이두창바이러스에 감염된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0067] 본 발명에 따르면, 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물, 키트, 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은, 본 발명에서 차등적으로 발현된 유전자 분석을 위한 흐름도이다.

도 2는, 대조군, MPXV 감염 MK2 세포(3시간) 및 MPXV 감염 MK2 세포(7시간) 사이의 화산 플롯을 통한 DEGs 데이터 분석 결과의 시각화를 나타내며, (a)의 화산 플롯은 대조군 대 MPXV 감염 MK2 세포(3시간)의 데이터 분석 결과를 나타낸다. (b) 화산 플롯은 MPXV 감염 MK2 세포(7시간) 대 대조군의 데이터 분석 결과를 나타낸다. (c) 화산 플롯은 MPXV 감염 MK2 세포(3시간) 대 MPXV 감염 MK2 세포(7시간)의 데이터 분석 결과를 나타낸다. 화산 플롯에서 빨간색과 파란색 점은 각각 상향 조정 및 하향 조정된 DEG를 나타낸다.

도 3은, 일부 최상위 DEG 및 그 발현 패턴을 나타낸다. (a)는 LOC695323, TMEM107, LOC695427, HIST1H2AD, HOXA9, OC705469, BAMBI, PMAIP1의 발현 패턴을 나타낸다. (b)는 LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, HIST1H2BJ, SLC7A11의 발현 패턴을 나타낸다. (c)는 EID2, SOX4, HIST1H3D, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2, CDK19의 발현 패턴을 나타낸다.

도 4는, 250개의 DEG 및 최상위 DEG에서 개발된 PPI 네트워크의 시각화를 나타낸다. (a)는 최상위 DEG에서 개발된 PPI 네트워크의 시각화를 나타내고, (b)는 250 DEG에서 개발된 PPI 네트워크의 시각화를 나타낸다. PPI 네트워크는 Cytoscape 소프트웨어를 사용하여 개발되었다.

도 5는, 최상위 DEG의 공동 발현 유전자 네트워크의 글로벌 뷰 및 계층적 클러스터링을 나타낸다. (a)는 공동 발현 유전자 네트워크에서 2D로 글로벌 뷰를 나타낸다. 최상위 DEG의 모든 유전자의 공동 발현 연관에 대한 2D 형태의 글로벌 뷰는 UMAP를 사용하여 개발되었다. (c)는 최상위 DEG의 공동 발현 유전자 네트워크의 계층적 클러스터을 나타내다. 계층적 클러스터링은 히트 맵을 통해 시각화되었다. 여기서는 평균 연결 방법을 사용했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 본 명세서에서 사용되는 용어 '개체'는, 원숭이두창바이러스를 갖고 있거나, 원숭이두창바이러스에 감염되어 있는 것으로 추정되거나, 원숭이두창바이러스 감염 여부를 판단해야 하는 개체로서, 사람, 원숭이 등의 포유 동물을 포함한다.

[0070] 본 발명의 원숭이두창바이러스 감염 진단용 조성물은 유전자 LOC695323, TMEM107, LOC695427, HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ, HIST1H3D, HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 포함한다.

[0071] 본 발명의 원숭이두창바이러스 감염 진단용 키트는 유전자 LOC695323, TMEM107, LOC695427, HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ, HIST1H3D, HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0072] 본 발명의 원숭이두창바이러스 감염 진단용 정보 제공 방법은 개체로부터 유전자 LOC695323, TMEM107, LOC695427, HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ, HIST1H3D, HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19 중 어느 1종 이상의 발현수준을 측정하는 단계를 포함한다.

[0074] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0075] **방법**

[0076] 배열 데이터 획득

[0077] 데이터 세트는 GEO 데이터베이스에서 검색되었다. GEO 데이터베이스는 NCBI의 개방형 리소스 데이터베이스이다. 이 연구에서는 데이터 세트 GSE21001을 사용했다. "Monkeypox virus", "Infection" 및 "Microarray"를 포함한 다양한 키워드가 GEO 데이터 세트를 검색하는 데 사용되었다.

[0078] 원숭이두창 바이러스 및 MK2 세포

[0079] 모든 MK2 세포주 발현 데이터는 GEO 데이터베이스에서 검색되었다. 데이터 세트는 대조군, MPXV 감염 MK2 세포(3시간) 및 MPXV 감염 MK2 세포(7시간)의 세 가지 범주로 구분되었습니다. 우리의 데이터 세트에는 9개의 인간 샘플이 포함되어 있습니다: 3개의 대조군, 3시간에서 3개의 MPXV 감염 MK2 세포, 7시간에서 3개의 MPXV 감염 MK2 세포(표 1).

[0080] DEG의 데이터 전처리 및 분석

[0081] 통계 도구 GEO2R을 사용하여 로우 유전자 발현 데이터를 평가했다. GEO2R은 GEO 쿼리와 imma R 패키지를 활용하여 로우 유전자 발현 데이터를 분석하는 도구이다. 데이터 분석 후 데이터 표현을 위해 다양한 통계 플롯이 개발되었다. 다음 플롯이 개발되었다: 화산 플롯, 평균 차이(MD) 플롯, UMAP(Uniform Manifold approximation and projection) 플롯, 표현 밀도 플롯, 벤 다이어그램, 조정된 p-값 히스토그램, 상자 플롯, 조정된 t-통계량 q-q(분위수- 분위수) 도표 및 평균 분산 추세 도표.

[0082] DEG의 단백질-단백질 상호 작용 네트워크 분석

[0083] 250개 DEG에서 최상위 DEG를 매핑하고, 최상위 단백질 코딩 DEG는 STRING 도구를 사용하여 네트워크를 계산하는 데 사용되었다. PPI 네트워킹은 Cytoscape 소프트웨어를 사용하여 묘사되었다. STRING 데이터베이스를 사용하여 단백질 코딩 DEG의 PPI를 탐색했다. Cytoscape는 네트워크를 개발하고 Java 프로그래밍 언어와 Cytoscape 응용 프로그램 프로그래밍 인터페이스(API)를 사용하여 시각화하고 Cytoscape(버전 3.8.2)를 사용하여 시각화했다.

[0084] 모듈의 기능 주석에 사용되는 자동화된 파이프라인 및 시각적 탐색은 Cytoscape 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 모듈 네트워크 시각화를 위해 Cytoscape에 도입할 수 있는 파일을 생성하기 위해 상호 작용 네트워크의 정확한 시각화를 지원하기 위해 데이터 스크립트가 추가되었다. 본 연구에서는 신뢰도 점수 > 0.95인 유전자를 사용하였고, 유전자 데이터에 k-평균 클러스터링 알고리즘을 적용하였다.

[0085] 공동 발현 유전자 네트워크의 구축

[0086] 여기서 공동 발현 유전자의 네트워크, 2D(2차원 공간) 공간의 모든 유전자, 계층적 클러스터링, 두 유전자를 사용한 공동 발현의 산점도, 유전자의 발현 패턴을 개발했다. 동시 발현 유전자 네트워크를 구축하기 위해 COXPRESdb v7 서버를 사용하였다. 데이터베이스는 11종의 동물 종에 대한 공동 발현 정보를 제공했으며 플랫폼은 Macaca mulatta의 공동 발현 유전자에 사용되었다(Mcc-m 플랫폼). 공동 발현된 유전자 네트워크를 개발하기 위한 입력으로 Entrez 유전자 ID가 삽입되었다. 따라서 모든 Entrez Gene ID에서 최상위 유전자를 검색했다. 이 검색에서 모든 Macaca mulatta 유전자가 연구에 사용되었다.

[0087] 본 연구는 9개의 데이터세트(대조군, 3시간에서 MPXV 감염된 MK2 세포, 7시간에서 MPXV 감염된 MK2 세포)를 사영하였고, 아래 표 1은 상기 9개의 데이터세트의 특징을 나타낸다.

표 1

Group	Accession	Title	Source name	Infection	Cell type	Virus replication time
Control	GSM524843	a-Control	*Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Mock infected	MK2	None
MPXV infected MK2 cell in 3 hrs	GSM524844	a- 3 hpi	Infected *Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Monkeypox virus	MK2	3 h
MPXV infected MK2 cell in 7 hrs	GSM524845	a- 7 hpi	Infected *Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Monkeypox virus	MK2	7 h
Control	GSM524846	b-Control	*Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Mock infected	MK2	None
MPXV infected MK2 cell in 3 hrs	GSM524847	b- 3 hpi	infected *Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Monkeypox virus	MK2	3 h
MPXV infected MK2 cell in 7 hrs	GSM524848	b- 7 hpi	Infected *Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Monkeypox virus	MK2	7 h
Control	GSM524849	c-Control	*Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Mock infected	MK2	None
MPXV infected MK2 cell in 3 hrs	GSM524850	c- 3 hpi	Infected *Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Monkeypox virus	MK2	3 h
MPXV infected MK2 cell in 7 hrs	GSM524851	c- 7 hpi	Infected *Macaca mulatta* kidney epithelial cells	Monkeypox virus	MK2	7 h

[0089]

[0090] 생물학적 과정에 대한 통찰력을 이해하기 위한 경로 분석

[0091] 인간의 광범위한 생물학적 과정(병리학적 및 생리학적)을 나타내는 경로 농축 분석은 Reactome 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 생물학적 과정을 분석하기 위한 Macaca mulatta 플랫폼은 Reactome에서 발견되지 않았다. 따라서 인간의 생물학적 과정이 분석에 사용되었다. 그것은 발현된 유전자와 DNA 복제, 대사, 수송 및 신호 전달과 같은 다양한 세포 과정 사이의 관계를 제공한다. Reactome을 사용하여 두 가지 주요 유형의 분석을 수행할 수 있다. 컷오프 값을 제외한 유전자 점수를 사용하는 유전자 집합 농축 분석(GSEA)과 몇 가지 중요한 유전자를 사용하는 경로 농축이다. 본 연구에서는 상위 24개의 DEG를 기반으로 경로 강화 분석을 수행하였다.

[0092] MPXV infected MK2 세포의 유전자 발현 패턴 분석 개요는 도 1에 묘사되어 있다.

[0094] **결과**

[0095] MPXV에 감염된 MK2 세포의 데이터 수집 및 DEG 프로파일링

[0096] GSE21001 데이터 세트의 유전자 발현 프로필이 GEO 데이터베이스에서 획득하였고, 데이터 세트를 추가로 분석했다. 우리의 데이터 세트에는 세 그룹의 MPXV 감염 MK2 세포 샘플 9개가 포함되어 있다(대조군 1개와 MPXV 감염 MK2 세포가 있는 2개 시간 포인트에서의 2개 그룹: 7시간 및 3시간)(표 1). 먼저 데이터 세트를 사용하여 화산 플롯(산포 및 통계 플롯)을 개발했다. 이 플롯은 배수 변화(변화의 크기)에 대한 DEG의 p-값(통계적 유의성)을 나타낸다. 데이터 세트의 화산 플롯이 도 2에 묘사되어 있다. 데이터 세트를 사용하여 3개의 화산 플롯이 생성되었다. 대조군 대 7시간에서 MPXV-감염된 MK2 세포(도 2b) 및 (iii) 3시간에서 MPXV-감염된 MK2 세포 대 7시간에서 MPXV-감염된 MK2 세포의 데이터(도 2c). 화산 플롯에서 빨간색과 파란색 점은 각각 상향 조정 및 하향 조정된 DEG를 나타내며 p-값 컷오프 0.05로 조정되었다.

[0097] 게다가, MD 플롯은 로그 강도 차이 대 로그 강도 평균을 이해하고 DEG를 시각화하기 위해 개발되었다. 여기에서 우리의 데이터 세트를 사용하여 3개의 MD 플롯이 생성되었다. (i) 대조군 대 3시간에서 MPSV 감염된 MK2 세포의 데이터; (ii) 대조군 대 7시간에서 MPXV-감염 MK2 세포의 데이터; 및 (iii) 3시간에서 MPXV 감염 MK2 세포 대 7시간에서 MPXV 감염 MK2 세포의 데이터.

[0098] 또한 DEG 데이터는 수많은 통계 플롯을 사용하여 제시되었다. 먼저, 서로 연관된 샘플을 시각화하는 데 도움이 되는 UMAP 플롯이 개발되었다. 우리의 분석은 대조군, 3시간에 MPXV에 감염된 MK2 세포, 7시간에 MPXV에 감염된 MK2 세포를 검출했다. 이어서, 데이터 세트의 분석 결과를 벤 다이어그램을 통해 나타내었으며, 세 그룹 간의 공통 DEG를 나타내었다: 대조군 대 3시간에서 MPXV-감염 MK2 세포, 대조군 대 7시간에서 MPXV-감염 MK2 세포, 및 3시간에서 MPXV에 감염된 MK2 세포 대 7시간에서 MPXV에 감염된 MK2 세포. 이 그룹 중에서 110개의 중요한 DEG가 공통적인 것으로 나타났다. 다음으로 데이터 세트를 사용하여 샘플의 박스 플롯을 구성했다. 플롯은 이 연구에서 사용된 샘플 값의 분포를 나타낸다. 세 그룹의 DEG 값의 발현 밀도를 나타내기 위해 발현 밀도 플롯이 개발되었다. 이 방법은 실험의 p-값 히스토그램의 패턴을 나타내는 히스토그램을 사용하여 이러한 테스트의 p-값을 시각화한다. 이 실험은 p-값이 감소하는 경향을 나타낸다. 또한, 분포의 그래픽 보기를 제공하기 위해 DEG의 데이터 샘플을 사용하여 조정된 t-통계 분위수-분위수(q-q) 플롯을 개발했다. 플롯은 샘플 분위수를 스튜던트 t-분포의 이론적 분위수와 비교한다. 마지막으로 평균-분산 추세 플롯이 그려졌다. 이 플롯은 표현 통계를 이해하고 평균-분산 관계를 평가하는 데 도움이 된다.

[0099] Top-listed DEGs 및 그들의 발현 양상

[0100] 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 연구에서는 상당한 DEG가 관찰되었다. 24개 DEG의 p값과 F값을 기록하였다. 두 시점에서 이들 유전자의 발현 패턴은 도 3a-c에 도시되어 있다. 대조군과 비교하여 두 시점(3시간 및 7시간)에서 일부 유전자의 발현에서 상향 경향이 관찰되었다. 유전자는 LOC695323, TMEM107, LOC695427, HIST1H2AD, LOC705469, PMAIP1, HIST1H2BJ 및 HIST1H3D였다. 유사하게, 대조군과 비교하여 두 시점에서 일부 유전자의 발현에서 하향 경향이 주목되었다. 유전자는 HOXA9, BAMBI, LMO4, PAX6, AJUBA, CREBRF, CD24, JADE1, SLC7A11, EID2, SOX4, B4GALT5, PPARGC1A, BUB3, SOS2 및 CDK19였다.

표 2

Sl. No.	Gene symbol	Gene name	P Value	F
1	LOC695323	histone H4	4.26e-10	418.9
2	TMEM107	transmembrane protein 107	6.65e-10	381.5
3	LOC695427	histone H3.1	9.85e-10	351.3
4	HIST1H2AD	histone cluster 1, H2ad	1.99e-09	303
5	HOXA9	homeobox A9	3.01e-09	277.5
6	LOC705469	histone H2A type 1	3.04e-09	277.1
7	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor	3.09e-09	276.1
8	PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	4.95e-09	249.9
9	LMO4	LIM domain only 4	7.09e-09	231.6
10	PAX6	paired box 6	8.94e-09	220.5
11	AJUBA	ajuba LIM protein	1.09e-08	211.2
12	CREBRF	CREB3 regulatory factor	1.14e-08	209.4
13	CD24	CD24 molecule	1.53e-08	196.6
14	JADE1	jade family PHD finger 1	1.54e-08	196.5
15	HIST1H2BJ	histone cluster 1, H2bj	1.61e-08	194.6
16	SLC7A11	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	1.67e-08	193
17	EID2	EP300 interacting inhibitor of differentiation 2	1.98e-08	186.2
18	SOX4	SRY-box 4	2.26e-08	181
19	HIST1H3D	histone cluster 1, H3d	2.68e-08	174.7
20	B4GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	2.77e-08	173.4
21	PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	4.53e-08	156.1
22	BUB3	BUB3 mitotic checkpoint protein	4.71e-08	154.8
23	SOS2	SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2	5.81e-08	148
24	CDK19	cyclin-dependent kinase 19	6.21e-08	145.9

[0102]

[0104] 중요한 단백질 코딩 DEG의 PPI 네트워크 구축

[0105] 식별된 DEG의 단백질-단백질 상호 작용을 조사하기 위해 표 2의 DEG를 사용하여 PPI 네트워크를 플로팅했다.

[0106] PPI 네트워크는 17개의 에지와 32개의 노드를 나타내는 도 4a에 묘사되어 있다. 또한 도 4b와 같이 250개의 유전자를 사용하여 PPI 네트워크를 구축했다. PPI 네트워크의 조밀하게 연결된 영역은 단백질 네트워크의 중간 영역에 가까운 하부 섹션에서 확인되었다. 결과적으로 PPI 네트워크에 중요한 클러스터가 형성되었다.

[0108] 최상위 DEG의 공동 발현 유전자 네트워크

[0109] 공동 발현 분석을 더 탐구하기 위해, 공동 발현된 유전자 네트워크가 개발되었다. 공동 발현 유전자 네트워크를 개발하는 데 사용된 입력 Entrez 유전자 ID는 표 S3에 나열되어 있다.

[0110] 또한 네트워크에서 24개의 에지가 식별되었으며 그 중 8개의 노드가 상호 연결되었다. 그 후, 공동 발현 유전자 네트워크의 원형 보기의 Graphviz 모드가 개발되어 Entrez 유전자 ID가 있는 유전자를 이해하는 데 도움이 되었다. 공동 발현 분석의 상호 연결된 유전자를 이해하기 위해 공동 발현 유전자 네트워크의 동심도를 플로팅했다. 또한 Entrez Gene ID와 상호 연결되는 유전자를 더 잘 이해하기 위해 Graphviz 모드를 사용하여 공동 발현된 유전자 네트워크의 동심도를 표시했다. 공동-발현된 유전자 네트워크 둘 다는 상호연결된 유전자를 갖는 클러스터를 나타내었다. HIST1H2AD라는 이 클러스터에서 중앙 유전자가 확인되었고 6개의 유전자가 이 클러스터와 연관되었다. 히스톤 H4(Entrez Gene ID: 697721), 히스톤 H2A 유형 1-B/E(Entrez Gene ID: 697977) 및 히스톤 H2A 유형 1-H(Entrez Gene ID: 704994)를 포함한 일부 추가 유전자가 클러스터에서 발견되었다. KEGG 맵과 관련된 최상위 DEG를 식별했다.

[0111] 상위 목록에 있는 DEG의 공동 발현 유전자 네트워크의 글로벌 보기 및 계층적 클러스터링

[0112] 공동 발현된 유전자 네트워크의 글로벌 뷰가 2D 공간으로 생성되었다. 이를 통해 연구원은 다양한 종에서 관심 있는 유전자 집합 간의 연관성을 직관적으로 이해하고 UMAP를 사용하여 2D 공간에서 모든 유전자의 동시 발현 연관성을 시각화할 수 있다. 공동 발현된 유전자 네트워크의 2D 형태에 대한 전체적인 관점이 도 5a에 도시되어 있다. 채석되고 공동 발현된 유전자가 있는 2D 공간의 전체 보기가 플롯되었다(도 5b). 또한 최상위 DEG의 동시 발현 유전자 네트워크의 계층 적 클러스터링이 구성되었다. 이것은 히트맵을 사용하여 표현되었다(그림 5c). 공동 발현된 유전자 네트워크의 계층적 클러스터링은 LOC695427, LOC705469, HIST1H2AD, HIST1H3D 및 HIST1H2BJ의 5개 유전자가 있는 밀집된 클러스터를 나타낸다. 또한 HIST1H2AD가 중요한 유전자이고 다른 유전자가 이 유전자와 연관되어 있음을 나타낸다.

[0113] 두 관련 유전자를 이용한 공동발현 패턴 분석

[0114] 두 관련 유전자의 공동 발현 패턴이 생성되었고 그들의 z-점수가 계산되었다. z-점수는 표현된 유전자의 발현 수준에 대한 반정량적 추정 및 관계를 제공한다. 2개의 관련 유전자 및 이들의 z-점수의 공동-발현 분석을 수행하였다. 이 연구에서 HIST1H2AD는 한쪽 끝에 사용되었고 다른 쪽 끝에는 4개의 유전자(LOC695427, LOC705469, HIST1H3D 및 HIST1H2BJ) 중 하나가 사용되었다. HIST1H2AD와 LOC695427, HIST1H2AD와 LOC705469, HIST1H2AD와 HIST1H3D, HIST1H2AD와 HIST1H2BJ의 공동 발현은 도 S4a-S4d에 나와 있으며 z 점수는 각각 7.25, 5.78, 5.73 및 5.74이다.

[0115] 중요한 유전자의 발현 패턴

[0116] 여기서, 이 과정의 시그니쳐 유전자라고 불리는 5개의 중요한 유전자(HIST1H2AD, LOC695427, LOC705469, HIST1H3D, HIST1H2BJ)의 발현 패턴을 확인하였다. 발현 패턴은 ArrayExpress 데이터베이스의 이전 유전자 발현 데이터 세트를 사용하여 분석되었다. 두 가지 발현 패턴이 평가되었다: 모든 샘플의 정규화된 발현 패턴과 산점도 및 박스 플롯에 개별적으로 묘사된 그룹화된 실험. 각 샘플에서 HIST1H2AD의 정규화 된 발현 패턴은 도 S5a에 묘사되어 있다. 산점도의 표현된 샘플은 2.5와 7.0 사이였고, 산점도의 조밀한 군집은 3.5와 5.0 사이였다. 또한 그룹화 된 실험에서 HIST1H2AD의 정규화 된 발현 패턴이 도 S5b에 묘사되어 있다. 28개의 박스 플롯이 이 그림에 표시되어 있다. 28개 박스 플롯의 중앙값은 4.0-4.5였다.

[0117] 모든 샘플에서 LOC695427의 정규화된 발현 패턴은 도 S6a에 묘사되어 있다. 특히, 산점도의 표현된 샘플은 3.0과 7.0 사이였고 산점도의 조밀한 클러스터는 4.0과 5.5 사이였다. 그룹화 된 실험에서 LOC695427의 정규화 된 발현 패턴은 그림 S6b에 표시되어 있으며 28 개의 상자 그림이 이 그림에 표시된다. 대부분의 박스 플롯의 중앙값은 4.5-5.0이었다.

[0118] 모든 샘플에서 LOC705469의 정규화 된 발현 패턴은 그림 S7a에 묘사되어 있다. 산점도의 표현된 샘플은 3.6과 5.6 사이였고 산점도의 조밀한 클러스터는 4.0과 4.6 사이였다. 또한 그룹화 된 실험의 정규화 된 표현 패턴은 그림 S7b에 표시되어 있으며 28 개의 상자 그림이 이 그림에 표시된다. 대부분의 박스 플롯의 중앙값은 4.2에서 4.6 사이였다.

[0119] 마찬가지로 모든 샘플에서 HIST1H3D의 정규화 된 발현 패턴이 도 S8a에 나와 있다. 산점도의 표현된 표본은 4.0과 7.0 사이였고 산점도의 조밀한 군집은 4.0과 5.0 사이였다. 또한, 그룹화된 실험에서 정규화된 발현 패턴은

도 8b에 도시되어 있고, 이 도면에는 28개의 박스 플롯이 도시되어 있다. 대부분의 박스 플롯의 중앙값은 4.5에서 5.0 사이였다.

[0120] 각 샘플에서 HIST1H2BJ의 정규화 된 발현 패턴은 도 S9a에 묘사되어 있다. 산점도의 표현된 표본은 3.0과 7.0 사이였고 산점도의 조밀한 군집은 5.0과 6.5 사이였다.

[0121] 또한 그룹화 된 실험에서 정규화 된 발현 패턴이 도 S9b에 표시되어 있으며 28 개의 상자 그림이 이 그림에 나와 있다. 대부분의 박스 플롯의 중앙값은 5.0에서 5.5 사이였다.

[0122] 특히 중요한 질문은 분석 중에 발견된 5개의 유전자가 복제 과정과 관련이 있는지 여부였다. 광범위한 문헌 조사를 수행한 결과, 이 5가지 시그니처 유전자(HIST1H2AD, LOC695427, LOC705469, HIST1H3D 및 HIST1H2BJ)의 연관성이 이전 연구에서 유전자 복제와 관련되어 설명되었다(표 S5).

[0124] 생물학적 과정에 대한 통찰력을 위한 경로 분석

[0125] 또한 상위 24개 DEG 및 생물학적 프로세스에 대한 통찰력을 얻기 위해 경로 분석을 수행했다. 24 DEG와 관련된 매핑된 생물학적 프로세스는 표 S6에 표시되어 있다. 분석된 경로의 개요는 도 S10a에 묘사되어 있다. DNA 복구, DNA 복제, 유전자 발현(전사) 및 신호 전달과 같은 다양한 생물학적 과정에 관여하는 최상위 유전자를 나타낸다. 특히 모든 생물학적 과정에 대한 더 깊은 통찰력을 얻었다. 여기서 우리는 DNA 복제 및 복구와 같은 심오한 통찰력의 두 가지 예를 제시한다. 먼저, 사전 개시, 복제 전 복합체의 조립 및 복제 원점에서의 ORC 조립이 DNA 복제 과정에 관여한다는 것을 발견했다(도 S10b). 둘째, 염기 절제 복구, AP사이트 형성, 탈피리미딘화 및 탈퓨린화가 DNA 복구 과정에 관여하는 것으로 밝혀졌다(도 S10b). 또한, 상위 24개 DEG와 관련된 생물학적 과정의 풍경 지도가 개발되었다(도 S11). DEG의 시그니처 유전자와 관련된 생물학적 과정이 확인되었다(표 S7).

[0127] **논의**

[0128] 바이러스 복제는 복제 메커니즘에 관한 중요한 정보를 제공하는 중요한 연구 주제이다. 몸에 들어가면 바이러스는 복제하기 위해 숙주 세포의 분자 기계에 의존한다. 따라서 숙주 세포 복제 메카니즘에 대한 이해가 필수적이다. 여기에서 우리는 MPXV 복제 동안 숙주 세포 유전자 발현 및 동시 발현 패턴을 이해하려고 시도했다. 또한 MPXV 복제 동안 단백질 코딩 유전자의 PPI 네트워킹 패턴이 묘사되었다. 유의하게 발현된 유전자를 식별하기 위해 3시간 및 7시간의 두 시점에서 발현 패턴을 매핑했다. 또한 MPXV에 감염된 Macaca mulatta(MK2 세포)의 신장 상피 세포에서 유전자 발현 패턴을 연구했다. 상위 250개 DEG의 유전자 ID, p-값 및 F 값을 확인했다. 이 유전자들로부터 우리는 24개의 최상위 유전자를 확인했다. 그 후 상위 24개 단백질 코딩 유전자와 250 DEG를 사용하여 PPI 네트워크를 구성했다. 또한, 상위 24개의 유전자와 다른 유전자 간의 연관성을 이해하기 위해 공동 발현 지도를 개발했다. 동시 발현 패턴 분석에서 우리는 5개의 시그니처 유전자를 선택하고 복제에서 그들의 역할을 이해하기 위해 더 탐구했다. 5개의 시그니처 유전자의 발현 패턴을 분석하였다. 그러나 일부 연구자들은 바이러스의 유전자 발현 패턴을 이해하려고 시도했다. 기존 연구자들은 마이크로어레이 분석을 사용하여 유전자 발현 패턴을 분석하고 MPXV 및 백시니아 게놈의 전사 지도를 준비했다. 또한 두 바이러스의 유전자 발현에 대한 비교 조사를 수행하였다. 다른 연구에서 기존 연구자들은 MPXV 및 VACV의 유전자 발현 패턴을 결정했다. 그들은 MPXV 유도-IL-6, IL-1α, IL-1β, TNF-α 및 CCL5와 같은 일부 선천적 면역 체계 유전자의 발현 억제를 발견했다. 기존 연구자들은 마이크로어레이 분석을 사용하여 MPXV에 감염된 MK2 세포의 유전자 발현 패턴을 3시간 및 7시간에 보고했다. 그들은 상향 조절된 유전자와 하향 조절된 유전자를 모두 확인했다. 그들은 또한 DEG의 기능적 분포를 발견했다. 그들은 결합된 마이크로어레이와 통계 분석을 사용하여 숙주-병원체 상호작용의 인터페이스를 매핑했다. 그러나 동일한 데이터 세트를 사용하여 DEG, PPI 네트워킹, 동시 발현 및 경로 분석을 수행했다. 우리 연구는 생물 정보학, 시스템 생물학 및 통계적 접근의 세 가지 영역에 대한 혼합 분석 모드를 사용했다. 우리는 연구의 최종 가설을 결정하기 위해 포괄적인 분석을 수행했다.

[0129] 우리는 MPXV에 감염된 MK2 세포의 DEG를 9개의 데이터 세트에서 평가했다: 대조군, 3시간에 MPXV에 감염된 MK2 세포, 7시간에 MPXV에 감염된 MK2 세포(표 1). 기존 연구자들은 인플루엔자 바이러스와 라이노바이러스(RV)의 비교 전사체 조사를 수행했다. 본 연구의 연구자들은 DEG 분석을 수행하였고, 최종적으로 RV, 인플루엔자 A 바이러스 및 인플루엔자 B 바이러스를 사용하여 DEG를 결정하였다. 마지막으로 상위 20개의 상향 조절된 DEG가 확인되었다. 유사하게, 기존 연구자들은 뎅기 바이러스 2에 감염된 C6/36 세포의 전사 패턴을 밝히기 위해 전사체 연구를 수행했다. 총 1239 DEG가 확인되었다. 이 유전자 중 1133개는 상향 조절되었고 106개는 하향

조절되었다. 그러나 본 연구에서는 MPXV에 감염된 MK2 세포에서 상위 250 DEG를 확인했다(표 S1). 이들 유전자로부터 24개의 최상위 유전자 DEG를 동정하였다. 최상위 유전자에서 8개의 상향 조절된 유전자와 16개의 하향 조절된 유전자를 발견했다. 또한 복제와 관련된 5개의 시그니처 유전자(HIST1H2AD, LOC695427, LOC705469, HIST1H3D 및 HIST1H2BJ)는 MPXV 복제 기계로 작용할 수 있다. 우리의 연구는 MPXV 복제에 대한 중요한 게놈 환경을 밝혔다. 따라서 본 연구의 결과는 MPXV에 감염된 숙주 세포의 복제에 대한 추가 연구의 토대를 마련했다.

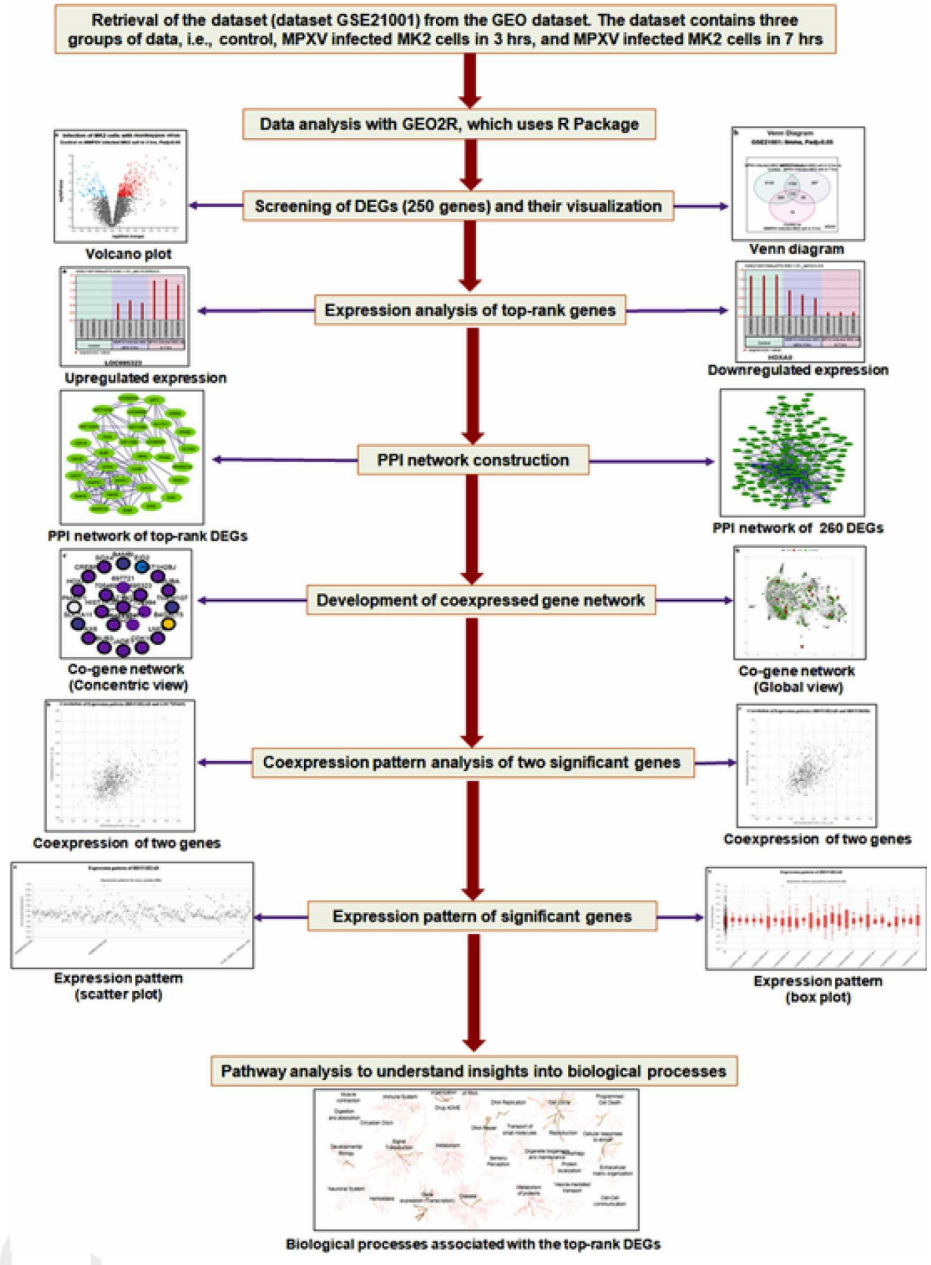
[0130] 바이러스의 역학 및 전송 패턴은 복제와 관련이 있다. 최근 연구에서는 MPXV의 복제 및 임상 증상을 조사했다. 기존 연구자들은 독일의 4가지 사례에서 MPXV의 복제 패턴, 전송 특성 및 임상 증상을 분석했다. 기존 연구자들은 MPXV 환자의 정액 샘플을 분석했다. 연구자들은 바이러스 발산 기간을 모니터링하려고 시도했다. 그들은 실시간 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통해 MPXV 복제를 연구했다. 증상 발현 6일 후 채취한 정액을 Vero E6 세포에 접종하였다. MPXV 복제는 RT-PCR을 사용하여 확인되었다. 유사하게 기존 연구자들은 환자의 요도 및 항문 면봉에서 샘플을 수집했다. 그들은 MPXV 특정 RT-PCR을 사용하여 바이러스 복제를 확인했다. 최근 연구에서 연구원들은 진단 목적으로 RT-PCR 또는 기타 분석을 사용하여 MPXV 복제를 조사하고 바이러스 발산을 이해하려고 시도했다. 그러나 최근 연구에서는 MPXV 복제의 게놈 환경을 밝히지 못했다. 이 연구에서는 MPXV에 감염된 숙주 세포(MK2 세포)의 DEG와 복제 패턴, 기계 및 게놈 환경에서 동시 발현 패턴에 대한 심층 분석을 수행했다. 따라서 본 연구는 전염병이 없는 국가에서 MPXV 발병의 현재 시나리오에서 참신하고 주목할 만하다.

[0132] **결론**

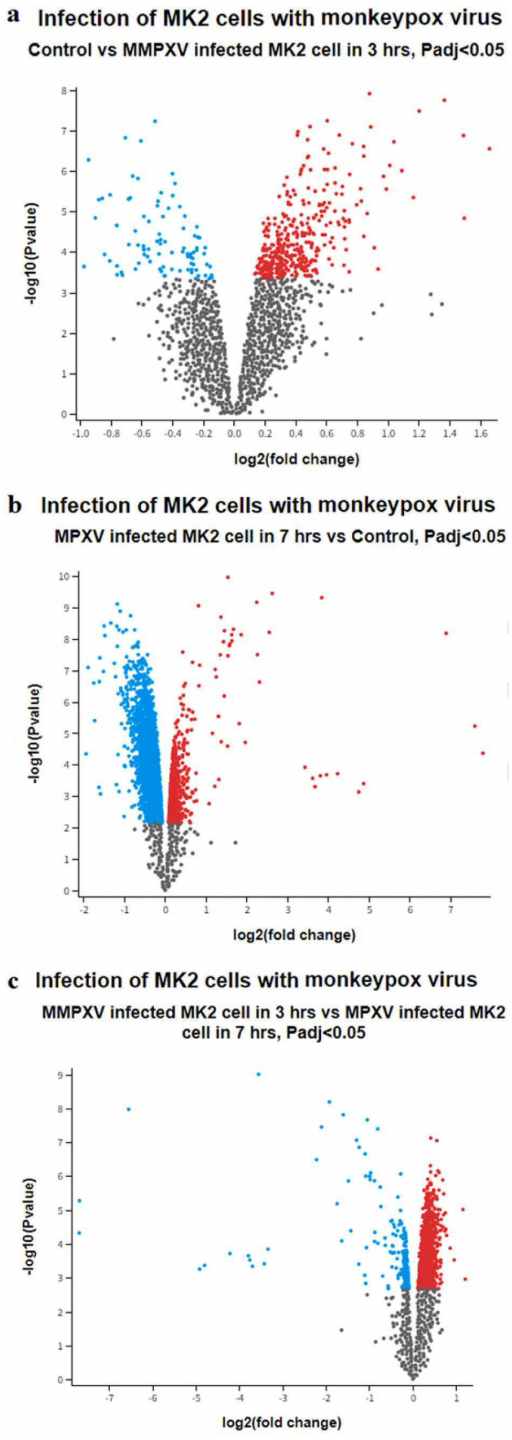
[0133] 효과적인 치료의 부족은 최근 MPXV 감염이 있는 비 전염병 국가에서 분명하다. 생물 정보학, 시스템 생물학 및 통계적 접근 방식을 사용하여 24개의 최상위 DEG를 식별했다. 또한 5개의 시그니처 유전자가 확인되었다. 이러한 유전자는 숙주 세포에서 MPXV 복제를 위한 조절 유전자로 작용할 수 있다. 따라서 이러한 발견은 MPXV 복제 기계 및 MPXV 복제의 게놈 환경을 결정하는 데 도움이 된다. 또한 이번 연구 결과는 MPXV 감염 중 복잡한 숙주-바이러스 상호 작용, 복제 및 질병 진행에 대한 이해를 높이는 데 도움이 될 것이다. 이 주제에 대한 향후 연구는 이러한 기본 데이터의 도움을 받을 것이다. 또한 최상위 DEG, 분석된 250 DEG의 PPI 네트워크, 24개의 최상위 DEG 및 공동 발현 네트워크의 통합은 MPXV에 대한 새로운 치료 분자를 개발하기 위한 유망한 치료 표적이다.

도면

도면1


Retrieval of the dataset (dataset GSE21001) from the GEO dataset. The dataset contains three groups of data, i.e., control, MPXV infected MK2 cells in 3 hrs, and MPXV infected MK2 cells in 7 hrs
Data analysis with GEO2R, which uses R Package
Screening of DEGs (250 genes) and their visualization
Volcano plot
Venn diagram
Expression analysis of top-rank genes
Upregulated expression
Downregulated expression
PPI network construction
PPI network of top-rank DEGs
PPI network of 260 DEGs
Development of coexpressed gene network
Co-gene network (Concentric view)
Co-gene network (Global view)
Coexpression pattern analysis of two significant genes
Coexpression of two genes
Coexpression of two genes
Expression pattern of significant genes
Expression pattern (scatter plot)
Expression pattern (box plot)
Pathway analysis to understand insights into biological processes
Biological processes associated with the top-rank DEGs

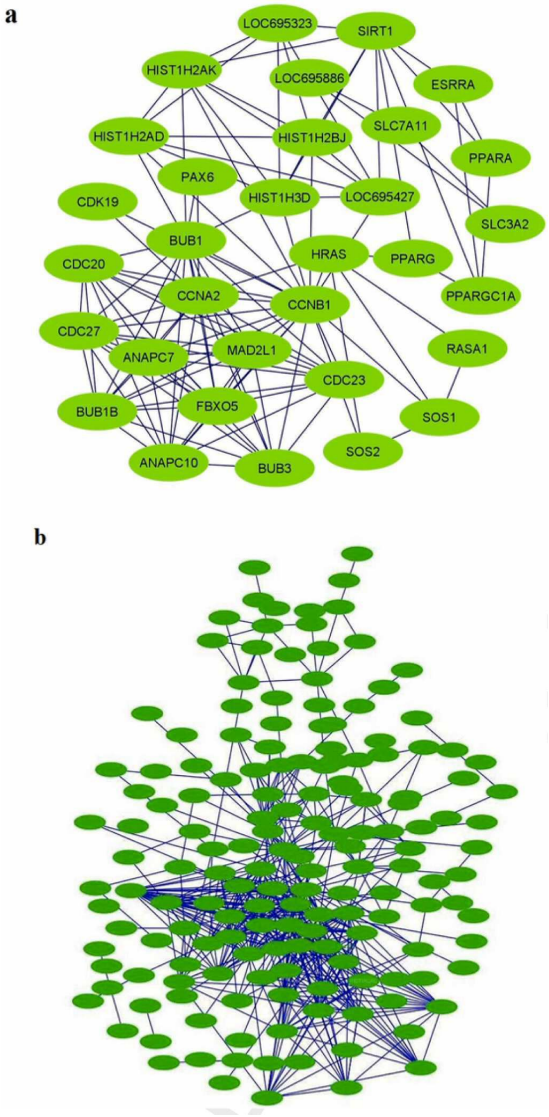
도면2


a Infection of MK2 cells with monkeypox virus
Control vs MMPXV infected MK2 cell in 3 hrs, Padj<0.05
-log10(Pvalue)
log2(fold change)
b Infection of MK2 cells with monkeypox virus
MPXV infected MK2 cell in 7 hrs vs Control, Padj<0.05
-log10(Pvalue)
log2(fold change)
c Infection of MK2 cells with monkeypox virus
MMPXV infected MK2 cell in 3 hrs vs MPXV infected MK2 cell in 7 hrs, Padj<0.05
-log10(Pvalue)
log2(fold change)

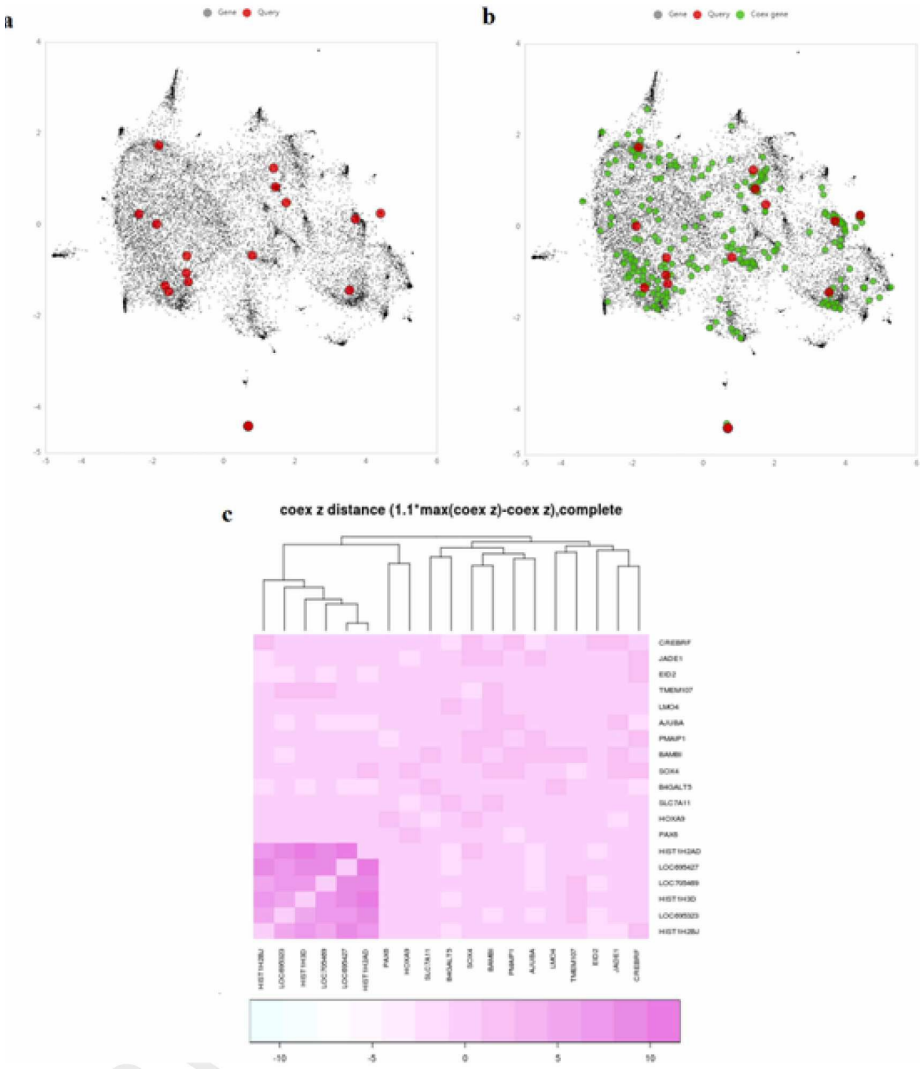
도면3


a
LOC695323
TMEM107
LOC695427
HIST1H2AD
HOXA9
LOC705469
BAMBI
PMAIP1
b
LMO4
PAX6
AJUBA
CREBRF
CD24
JADE1
HIST1H2BJ
SLC7A11
c
EID2
SOX4
HIST1H3D
B4GALT5
PPARGC1A
BUB3
SOS2
CDK19

도면4


a
LOC695323
SIRT1
HIST1H2AK
LOC695886
ESRRA
HIST1H2AD
HIST1H2BJ
SLC7A11
PPARA
PAX6
HIST1H3D
LOC695427
CDK19
SLC3A2
BUB1
HRAS
PPARG
CDC20
CCNA2
CCNB1
PPARGC1A
CDC27
ANAPC7
MAD2L1
RASA1
CDC23
BUB1B
FBXO5
SOS1
SOS2
ANAPC10
BUB3
b

도면5


a
Gene
Query
b
Gene
Query
Coex gene
c
coex z distance (1.1*max(coex z)-coex z),complete
CREBRF
JADE1
EID2
TMEM107
LMO4
AJUBA
PMAIP1
BAMBI
SOX4
B4GALT5
SLC7A11
HOXA9
PAX6
HIST1H2AD
LOC695427
LOC705469
HIST1H3D
LOC695323
HIST1H2BJ
-10
-5
0
5
10