

Н.Е. Гаращенко¹, Ю.П. Джиоев^{1,2}, А.И. Парамонов¹, Л.А. Степаненко¹,
С.И. Малов¹, О.В. Колбасеева¹, И.В. Малов¹, В.И. Злобин¹

РЕКОНСТРУКЦИЯ САЙТОВ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНОМНЫХ СТРУКТУРАХ ШТАММОВ ГЕНОТИПА 6 ВИРУСА ГЕПАТИТА С

¹ ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Иркутск, Россия

² ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

В геномах 46 штаммов генотипа 6 вируса гепатита С посредством комплекса биоинформационных программ RDP выявлены 6 штаммов-рекомбинантов, в которых зафиксированы 7 сайтов рекомбинации. Для них определены родительские штаммы, от которых они могли быть получены. Большая часть сайтов рекомбинации приходится на область структурных генов С, E1 и E2 и неструктурных генов NS5a и NS5b. В одном штамме выявлен уникальный сайт рекомбинации в высоко консервативном гене NS3. По результатам исследования определены «горячие точки» рекомбинации в штаммах генотипа 6 вируса гепатита С.

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип 6, программные методы RDP, сайты рекомбинации

RECONSTRUCTION OF RECOMBINATION SITES IN GENOMIC STRUCTURES OF THE STRAINS OF GENOTYPE 6 OF HEPATITIS C VIRUS

N.E. Garashchenko¹, Y.P. Dzhioev^{1,2}, A.I. Paramonov¹, L.A. Stepanenko¹,
S.I. Malov¹, O.V. Kolbaseeva¹, I.V. Malov¹, V.I. Zlobin¹

¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

² Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

The encoded portion of the complete genomes of 46 strains of the genotype 6 of hepatitis C virus through bioinformatics RDP programs complex group of 6 recombinants strains was identified, in which 7 recombination sites were fixed. Strains correspond to the three-recombinant HCV subtypes: 6a, 6b and 6I. For each of the identified recombinant we defined parent strains from which they can be obtained. Three recombinants were obtained from parent strains of the same subtype (homologous inside subgenotypic recombination). For the remaining three recombinants parent strains were members of three different subtypes (between subgenotypic recombination). In one strain we identified a unique recombination site in a highly conservative NS3 gene. Most of the recombination sites occurred in the region of the structural genes C, E1 and E2, and in the area of non-structural genes NS5a and NS5b. In the recombinant strain DQ480518-6a two recombination site were identified. One site is located in the structural and nonstructural genes (E2 + NS1 + NS2), and a second one in non-structural region. Dimensions of recombination sites can vary from 86 to 1072 nucleotide bases. The study identified "hot spots" of recombination in the strains of genotype 6 of hepatitis C virus. The recombinants were found in the population of the three countries: the United States (from the serum of an immigrant), Hong Kong and China.

Key words: hepatitis C virus, genotype 6 strains of hepatitis C virus, software RDP methods, recombination sites, "hot spots" of recombination

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (ВГС) распространён повсеместно на всех континентах. Он является одной из основных причин острого и хронического заболевания печени и в последние годы приобретает всё большее социально-экономическое значение [14]. Был открыт в 1989 г. и в настоящее время отнесён к роду *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*. ВГС включает 7 генотипов и 67 субтипов [7, 12]. Более 170 млн человек в мире инфицированы ВГС, из которых ежегодно умирает от 350 000 до 500 000 человек [14]. Несмотря на свою актуальность против него до сих пор не создана вакцина [8]. Проблема вирусного гепатита С в России также актуальна, и, по последним данным, доля им инфицированных достигает почти 3 % и прогнозируется дальнейший рост [1, 2].

На течение инфекционного процесса ГС большое влияние оказывает значительная генетическая гетерогенность вируса [1]. Генетическое разнообразие ВГС связывают в основном с высокой частотой

мутации и при этом фактически не учитывают рекомбинационную, считая, что ему несвойственен данный тип изменчивости из-за «нежизнеспособности» таких рекомбинантов [1]. Поэтому вопрос о наличии механизмов рекомбинации у ВГС до сих пор остаётся открытым, хотя рекомбинация отмечена во всех группах ДНК-содержащих и у многих РНК-содержащих вирусов [3], в том числе и у ряда представителей рода *Flavivirus* [4].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение реконструкционного анализа возможных сайтов рекомбинации среди штаммов генотипа 6 вируса гепатита С посредством высокочувствительных биоинформационных программных методов, ориентированных на выявление рекомбинационных событий в геномных структурах вирусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали кодируемые части геномов 46 штаммов генотипа 6 ВГС из базы данных Gen

Bank. Геномные последовательности были выровнены программой Clustal W с использованием штрафа за открытие делеции 15 и штрафа за продолжение 6,66 [13]. Определение локусов и профилей сайтов рекомбинации производили с помощью 7 программных методов, реализованных в пакете программ RDP v. 4.61: RDP, Geneconw, BootScan, Chimaera, 3Seq, SiScan, Maxchi [5, 9, 11]. Для этих программ применяли следующие настройки: RDP – внешние и внутренние ссылки, размер окна 30; Geneconw, g-scale = 1; BootScan – длина окна 200, шаг 20, использовать UPGMA-дерево, число повторов бутстрепа 100; MaxChi – заданный размер окна, 70 переменных сайтов на окно, не использовать пропуски; Chimaera – заданный размер окна, 70 переменных сайтов на окно. Все прочие настройки выставлены по умолчанию. Филогенетическое предположение присутствия рекомбинаций было получено с использованием метода Neighbor-net из программы Splits Tree v. 4.1 [10]. Статистический тест проводили с помощью метода Conduct Phi Test for Recombinations из программной системы Splits Tree 4 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска рекомбинационных сайтов в кодируемой части геномов 46 штаммов генотипа 6 ВГС было использовано 7 программных методов из пакета программ RDP v. 4.61. Учитывали только те выявленные сайты, в которых статистическая значимость фиксации сигналов рекомбинации была при $p < 0,05$. Также для повышения статистической значимости оценивали лишь те рекомбинационные сайты, фиксация которых происходила не менее чем 2 программами со значениями $p < 0,005$. Посредством этих подходов было окончательно зафиксировано 6 штаммов-рекомбинантов генотипа 6 ВГС, представленных в таблице 1.

Программой Phi-тест была оценена статистическая значимость выявленных рекомбинантов в исследуемой выборке, которая составляла $p = 0,000001$. Из 7 программ только 6 выявили статистически значимые вероятности наличия этих сайтов (программой BootScan не было выявлено ни одного сайта). Три рекомбинантных штамма принадлежат субтипу 6а (DQ480515, DQ480518, DQ480519), а остальные рекомбинанты представляют два разных субтипа генотипа 6 (EF424628-6I, NC_009827-6b, D84262-6b). В

6 рекомбинантных штаммах зафиксировано 7 сайтов рекомбинации, причём в рекомбинанте DQ480518-6а их 2. Размеры полученных сайтов рекомбинации колеблется в диапазоне от 86 до 1072 нуклеотидов. Программная поддержка этих трёх штаммов варьирует от 3 до 5 программ.

Был проведён поиск родительских штаммов, от которых могли произойти полученные рекомбинанты, результаты которых представлены в таблице 2.

Для каждого рекомбинанта установлены оба родительских штамма, один из которых является основным (мажорным), которому мог принадлежать полученный сайт, минорный – менее вероятный родитель. Из 6 штаммов-рекомбинантов 3 выделены в Гонконге, 2 – в Тайланде, 1 – в США. Причём для 3 рекомбинантов оба родительских штамма выделены от больных после лечения интерфероном (DQ480515, DQ480518, DQ480519 и они относятся к субтипу 6а). Для 2 рекомбинантов (NC_009827-6b, D84262-6b) основной родитель был выделен от больного после лечения интерфероном, а минорный родитель – из сыворотки донора крови (выделен в Китае), причём оба родительских штамма представляют разные субтипы генотипа 6 ВГС – 6а и 6в. Родители рекомбинанта EF424628-6I также представлены разными генотипами – 6f (основной, выделен в США) и 6а (минорный). Штамм основного родителя был выделен из сыворотки иммигранта из Азии, а минорный – 6а – от больного после лечения интерфероном (Гонконг). Интересно, что позиции сайтов рекомбинации для рекомбинантов DQ480515, DQ480518, DQ480519 расположены в неструктурной области генома, а сайты других трёх рекомбинантов в структурной области – в генах E1 и E2.

Схема структуры сайтов рекомбинации в рекомбинантных штаммах представлена на рисунке 1.

Как видим, эти рекомбинанты разделились на две группы – внутрисубгенотипные и межсубгенотипные. Внутрисубгенотипные рекомбинанты отнесены к субтипу 6а, как и их родительские штаммы. Для внутрисубгенотипных рекомбинантов выявляется другая картина. Субтип рекомбинанта EF424628-6I был сформирован двумя родительскими штаммами разных субтипов – DQ835760-6f (основной) и DQ480518-6а (минорный). Для двух других рекомбинантов – NC_009827-6b и D84262-6b – также различны

Таблица 1
Рекомбинантные штаммы генотипа 6 вируса гепатита С, их позиции и степень статистической значимости

Позиции сайтов	Штаммы-рекомбинанты	RDP	Geneconv	Maxchi	Chimaera	SiScan	3Seq
7862–8739	DQ480519-6а	$9,74 \times 10^{-04}$	$1,98 \times 10^{-07}$	$1,73 \times 10^{-03}$	NS	NS	NS
1844–2916	DQ480518-6а	$3,72 \times 10^{-12}$	$1,28 \times 10^{-16}$	$1,76 \times 10^{-08}$	$1,83 \times 10^{-06}$	$1,62 \times 10^{-12}$	$6,92 \times 10^{-05}$
5474–6389		$6,14 \times 10^{-12}$	$4,73 \times 10^{-14}$	$3,02 \times 10^{-08}$	$1,23 \times 10^{-05}$	$1,18 \times 10^{-11}$	NS
4638–5505	DQ480515-6а	$1,20 \times 10^{-06}$	$2,08 \times 10^{-10}$	$2,31 \times 10^{-05}$	$7,52 \times 10^{-03}$	NS	NS
1106–1192	EF424628-6I	NS	NS	$4,35 \times 10^{-03}$	NS	NS	$3,75 \times 10^{-03}$
1841–2098	NC_009827-6b	$6,85 \times 10^{-04}$	NS	NS	$6,85 \times 10^{-03}$	NS	NS
1840–2096	D84262-6b	$6,85 \times 10^{-04}$	NS	NS	$6,85 \times 10^{-03}$	NS	NS

Примечание: NS – нет сайтов рекомбинации.

Рекомбинанты генотипа 6 вируса гепатита С, их родительские штаммы и позиции сайтов рекомбинации в геномах

Штаммы-рекомбинанты	Позиции сайтов	Позиции в геноме	Родительские штаммы	Источник изоляции	Страна изоляции
DQ480519-6a (Гонконг)	7862–8739	NS5	DQ480521-6a	Больной	Гонконг
			DQ480520-6a	Больной	Гонконг
DQ480518-6a (Гонконг)	1844–2916	E2 + NS1 + NS2	DQ480520-6a	Больной	Гонконг
			DQ480519-6a	Больной	Гонконг
	5474–6389	NS4b + NS5a	DQ480513-6a	Больной	Гонконг
			DQ480520-6a	Больной	Гонконг
DQ480515-6a (Гонконг)	4638–5505	NS3 + NS4a + NS4b	DQ480523-6a	Больной	Гонконг
			DQ480514-6a	Больной	Гонконг
EF424628-6i (США)	1106–1192	E1 + E2	DQ835760-6f	Сыворотка иммигранта из Азии	США
			DQ480518-6a	Больной	Гонконг
NC_009827-6b (Таиланд)	1841–2098	E2	DQ480512-6a	Больной	Гонконг
			EU798760-6v	Сыворотка донора крови	Китай
D84262-6b (Таиланд)	1840–2096	E2	DQ480512-6a	Больной	Гонконг
			EU798760-6v	Сыворотка донора крови	Китай

Примечание: основной – DQ480521-6a; минорный – DQ480520-6a; больной – больной после лечения интерфероном.

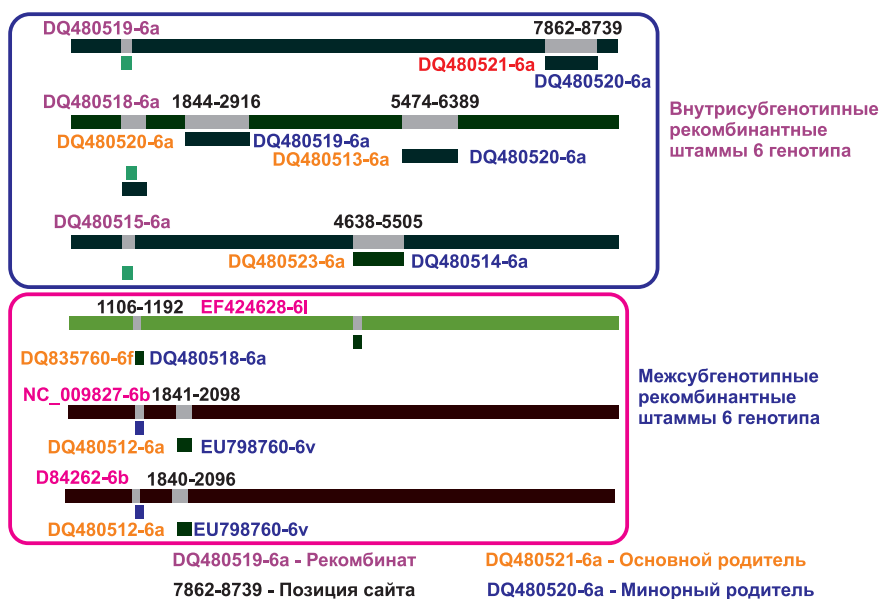


Рис. 1. Схема позиции сайтов рекомбинации в штаммах-рекомбинантах генотипа 6 вируса гепатита С и их родительские штаммы.

субтипы их родительских штаммов – DQ480512-6a и EU798760-6v. Хотя такая межсубгенотипная структура данных рекомбинантов выявлена впервые, что может свидетельствовать о наличии таких рекомбинантов среди представителей генотипа 6 вируса гепатита С. Возможно, это будет подтверждено при расширении исследуемой группы штаммов данного генотипа.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES**

1. Калинина О.В. Вирус гепатита С: механизмы изменчивости, классификация, эволюция // Вопросы вирусологии. – 2015. – № 5. – С. 5–10.

Kalinina OV (2015). Hepatitis C virus: variability mechanisms, classification, evolution [Virus hepatitis C: mekhanizmy izmenchivosti, klassifikatsiya, evolyutsiya]. *Voprosy virusologii*, (5), 5-10.

2. Чистякова М.В., Говорин А.В., Радаева Е.В., Гончарова Е.В., Морозова Е.И. Кардиогемодинамические нарушения у больных с хроническими гепатитами // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – № 1. – С. 51–54.

Chistyakova MV, Govorin AV, Radaeva EV, Goncharova EV, Morozova EI (2012). Cardiohemodynamic disorders in patients with chronic hepatitis [Kardiogemodinamicheskie narusheniya u bol'nykh s khronicheskimi

gepatitam]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*, (1), 51-54.

3. Becher P, Tautz N (2011). RNA recombination in pestiviruses – cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biology*, 8 (2), 216-224.

4. Bertrand Y, Topel M, Elvang A, Melik W, Johansson M (2012). First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One*, 7 (2), e31981.

5. Boni MF, Posada D, Feldman MW (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*, 176 (2), 1035-1047.

6. Bruen TC, Philippe H, Bryant D (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics*, 172 (4), 2665-2681.

7. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244 (4902), 359-362.

8. European Association for Study of Liver (2014). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 60 (2), 392-420.

9. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2000). Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*, 16 (7), 573-582.

10. Huson DH, Bryant D (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, 23 (2), 254-267.

11. Smith MJ (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.*, 34 (2), 126-129.

12. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 59 (1), 318-327.

13. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, (22), 4673-4680.

14. World Health Organization (2014). Fact sheet № 164.

Сведения об авторах Information about the authors

Гарашенко Надежда Евгеньевна – студентка ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1., тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: nadzelin@mail.ru)

Garashchenko Nadezhda Evgenievna – Student of Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, Krasnogo Vostanya str., 1.; tel.: +7 (3952) 33-34-41; e-mail: nadzelin@mail.ru)

Джиоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; e-mail: alanir07@mail.ru)

Dzhioev Yuri Pavlovich – Candidate of Biological Sciences, Leading Research Officer of Scientific Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University, Senior Research Officer of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnosis of Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems (664003, Irkutsk, Timiryazev str., 16; e-mail: alanir07@mail.ru)

Парамонов Алексей Игоревич – лаборант-исследователь лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: paramonov_a.i@mail.ru)

Paramonov Alexey Igorevich – Clinical Research Assistant of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnosis of Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: paramonov_a.i@mail.ru)

Степаненко Лилия Александровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: steplia@mail.ru)

Stepanenko Lilia Alexandrovna – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer of Scientific Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University (e-mail: steplia@mail.ru)

Малов Сергей Игоревич – аспирант ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России
Malov Sergey Igorevich – Postgraduate of Irkutsk State Medical University

Колбасеева Ольга Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: kolbaseeva@yandex.ru)

Kolbaseeva Olga Vladimirovna – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of Scientific Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University (e-mail: kolbaseeva@yandex.ru)

Малов Игорь Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, ректор ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России

Malov Igor Vladimirovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Rector of Irkutsk State Medical University

Злобин Владимир Игоревич – академик РАН, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии с курсом клинической лабораторной диагностики, директор НИИ биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: vizlobin@mail.ru)

Zlobin Vladimir Igorevich – Academician of RAS, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, Director of Scientific Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University (e-mail: vizlobin@mail.ru)