

А. А. Акуневич

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОТНОСТИ КОДИРУЮЩИХ УЧАСТКОВ В
ГЕНОМЕ FOWLPOX ВИРУСА И ДРУГИХ АВИПОКСВИРУСОВ**

Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. В. В. Хрусталёв

Кафедра общей химии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A. A. Akunevich

**GENE DENSITY DISTRIBUTION IN THE GENOME OF FOWLPOX
VIRUS AND OTHER AVIPOXVIRUSES**

Tutor: PhD, Associate Professor V. V. Khrustalev

Department of General Chemistry,

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Анализ полногеномных последовательностей штаммов Fowlpox вируса и близких ему представителей рода Avipoxvirus показал, что для них характерно симметричное мутационное АТ-давление и особое распределение плотности генов (более высокая на 3'-конце «плюс» цепи и на 3'-конце «минус» цепи). В итоге выдвинута гипотеза о изначальном положении точки начала репликации в середине генома вируса с последующим её перемещением в терминальный повтор.

Ключевые слова: Fowlpox вирус, Avipoxvirus, плотность генов.

Resume. Analysis of the Fowlpox virus whole genome sequences and other Avipoxvirus species showed that there is symmetrical mutational AT-pressure and a special distribution of gene density (higher density is found on 3'-end of the plus strand and on 3'-end of the complementary strand). A hypothesis about the initial position of the origin of replication in the center of viral genome and its subsequent movement to the terminal repeats was developed.

Keywords: Fowlpox virus, Avipoxvirus, gene density.

Актуальность. Fowlpox вирус — двуцепочечный ДНК вирус семейства Poxviridae, который рассматривается в качестве перспективного вирусного вектора для генной и клеточной терапии [3]. Одна из отличительных особенностей вируса — его большие размеры: длина генома в среднем составляет 290,000 п.о., размер вириона — до 330*280*200 нм [5]. Fowlpox вирус является одним из самых высокоорганизованных представителей домена: по сложности строения поверхностных структур и организации генетического материала он в какой-то степени приближается к бактериальным клеткам [1]. Для работы с вирусом в целях биотехнологии следует понимать и учитывать особенности строения его генома.

Цель: описать характер распределения плотности кодирующих участков в геноме Fowlpox вируса и других Авипоксвирусов, прояснить причины подобного явления.

Задачи:

1. Составить генетические карты для всех доступных нуклеотидных последовательностей штаммов Fowlpox вируса и эволюционно близких ему представителей рода Avipoxvirus.

2. Вычислить значения общих частот использования нуклеотидов в кодирующих последовательностях вирусов, а также частот использования нуклеотидов в

че-тырёхкратно и двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов, приведены результаты расчётов в графической форме.

3. Выявить характер распределения плотности генов в обеих цепях изученных вирусов.

4. Сравнить характер распределения плотности генов Fowlpox вируса с такими другими представителями рода Avipoxvirus.

5. Выдвинуть гипотезу о причине возникновения сдвига в плотности генов и частотах использования нуклеотидов.

Материал и методы. Для анализа использовались полногеномные нуклеотидные последовательности Fowlpox вируса (9 штаммов, доступны в базе GenBank: NC_002188.1, MH734528.1, MH719203.1, MH709125.1, MH709124.1, MF766432.1, MF766431.1, MF766430.1, AJ581527.1) и других представителей рода Avipoxvirus (Canarypox virus — NC_005309.1, Flamingopox virus — NC_036582.1, Penguinpox virus — NC_024446.1, Pigeonpox virus — NC_024447.1, два штамма Shearwaterpox virus — KX857216.1 и KX857215.1, Turkeypox virus — NC_028238.1). Построение генетических карт осуществлялось в программе Microsoft Office Excel. Подсчёт частот использования G, C, A и T в четырёхкратно вырожденных сайтах (G4f, C4f, A4f, T4f) и в двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов (G2f3p, C2f3p, A2f3p, T2f3p) осуществлялся с использованием алгоритма VVK Protective buffer (доступен на сайте <https://chemres.bsmu.by>). Достоверность различий устанавливалась с помощью t-теста для относительных величин.

Результаты и их обсуждение. Анализ нуклеотидного состава показал, что частоты использования A и T в четырёхкратно вырожденных сайтах кодирующих участков штамма SD15-670.2 Fowlpox вируса ($A4f = 35,47 \pm 0,87\%$; $T4f = 40,18 \pm 0,93\%$) достоверно выше ($P < 0,0001$, для 257 генов), чем таковые для G и C ($G4f = 13,05 \pm 0,66\%$; $C4f = 11,29 \pm 0,63\%$). Частоты использования нуклеотидов в двукратно вырожденных сайтах ($A2f3p = 34,26 \pm 0,69\%$; $T2f3p = 39,47 \pm 0,72\%$; $G2f3p = 10,19 \pm 0,43\%$; $C2f3p = 16,08 \pm 0,59\%$) в целом повторяют распределение, характерное для таковых в четырёхкратно вырожденных сайтах. Такая же картина наблюдается во всех остальных изученных штаммах рода Avipoxvirus. Причиной подобного сдвига в частотах использования нуклеотидов является симметричное мутационное АТ-давление, характерное изображение последствий которого приведено на Рисунке 1 для Fowlpox вируса и на Рисунке 2 для Turkeypox вируса [2].

Частоты использования аденина в двукратно вырожденных сайтах кодирующих участков 3'-конца плюс цепей Canarypox, Flamingopox, Penguinpox, Pigeonpox вирусов достоверно выше ($P < 0,05$), чем таковые 5'-конца комплементарных цепей. Значения A2f3p для 3'-конца плюс цепей Canarypox, Flamingopox, Penguinpox, Pigeonpox вирусов составляют $35,19 \pm 1,13\%$; $36,27 \pm 1,08\%$; $35,80 \pm 1,13\%$ и $36,00 \pm 1,18\%$ соответственно, значения A2f3p для 5'-конца комплементарной цепи — $32,91 \pm 1,41\%$; $33,61 \pm 1,50\%$; $33,60 \pm 1,70\%$ и $32,58 \pm 1,96\%$ соответственно. Значение A2f3p для 3'-конца плюс цепей Fowlpox вируса (NC_002188.1) составляет $34,80 \pm 1,18\%$; для 5'-конца комплементарной цепи — $32,73 \pm 1,37\%$. Полученные результаты совпадают с таковыми для всех остальных изученных штаммов Fowlpox вируса, за исключением двух — Fowlpox

isolate SD15-670.1 и isolate SD15-670.2.

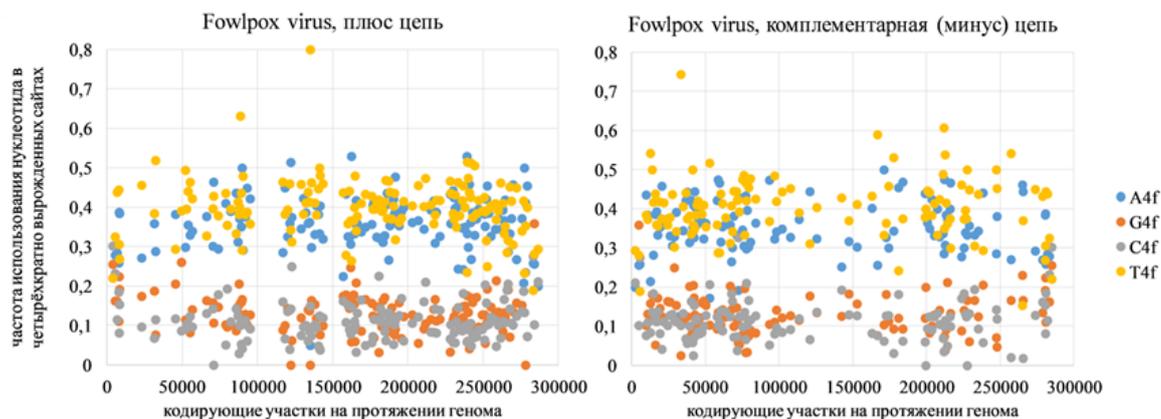


Рис. 1 — Частота использования А, G, С и Т в четырёхкратно вырожденных сайтах для каждого гена на протяжении обеих цепей генома Fowlpox вируса

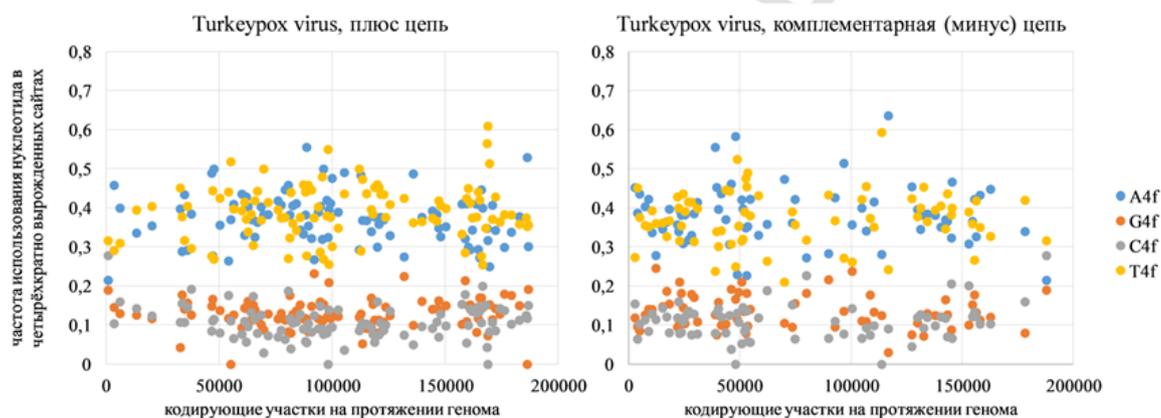


Рис. 2 — Частота использования А, G, С и Т в четырёхкратно вырожденных сайтах для каждого гена на протяжении обеих цепей генома Turkeypox вируса

Частота использования цитозина в двукратно вырожденных сайтах кодирующих участков 5'-конца комплементарной цепи Shearwaterpox вируса (KX857216.1) достоверно выше ($P < 0,05$) таковой 3'-конца плюс цепи: $13,26 \pm 1,67\%$ против $10,73 \pm 1,01\%$.

Иные достоверные различия между 5'-концами плюс цепей и 3'-концами комплементарных цепей, а также между 3'-концами плюс цепей и 5'-концами комплементарных цепей в показателях, характеризующих частоты использования нуклеотидов в двукратно и четырёхкратно вырожденных сайтах, не были обнаружены.

На рисунках 1 и 2 также заметен ассиметричный сдвиг в плотности генов: на «плюс» цепи справа она больше, чем слева, на «минус» цепи — наоборот. Наибольшее различие в распределении кодирующих участков выявлено у Pigeonpox вируса: плотность генов равна 76% на 3'-конце плюс цепи и 73,74% на 3'-конце комплементарной цепи. Наименьшее различие в данных показателях характерно для Shearwaterpox вируса (KX857215.1): плотность генов равна 40,14% на 5'-конце плюс цепи, 69,41% — на 3'-конце плюс цепи, 59,86% — на 3'-конце комплементарной цепи и 30,59% — на 5'-конце комплементарной цепей. Среди изученных штаммов Fowlpox вируса в целом характерно следующее распределение плотности генов: $43,76 \pm 0,51\%$ на 5'-конце плюс цепи, $64,89 \pm 0,69\%$ — на 3'-конце плюс цепи, $56,24 \pm 0,51\%$ — на 3'-конце ком-

плементарной цепи и $35,11 \pm 0,69\%$ — на 5'-конце комплементарной цепей. Подобное распределение в плотности генов может быть ре-зультатом асимметричного мутационного АТ-давления, возникающего во время ре-пликации [2]. Учитывая тот факт, что семейство *Rovviridae* имеет некоторое сходство в организации генетического материала с таковым бактериальных клеток, автором выдвинута следующая гипотеза.

Известно, что на лидирующих цепях геномов бактерий плотность кодирующих участков выше, чем на отстающих, что особенно выражено при низкой общей GC-насыщенности геномов. В таком случае, точка начала репликации должна была бы находиться примерно на середине генома вируса, но, согласно литературным данным, она находится в инвертированных повторах [5]. Следовательно, на лидирующих цепях изучаемых вирусов плотность генов ниже, чем на отстающих.

В генах с лидирующих цепей геномов бактерий, как правило, выше содержание G и A, чем в отстающих. Однако при анализе частот использования нуклеотидов в четырёхкратно и двукратно вырожденных сайтах кодирующих участков изучаемых вирусов достоверные различия между 5'- и 3'-участками обеих цепей были выявлены только для показателя A2f3p. Как ни странно, различия достоверны при сравнении общих частот использования нуклеотидов: G и A достоверно чаще используются на цепях с более высокой плотностью генов.

Исходя из этого, по всей видимости, точка начала репликации в весьма далёком эволюционном прошлом находилась в середине вирусного генома Авипоксви-вирусов. Из-за этого возникли сдвиги в плотности генов и в общих частотах использования нуклеотидов в них. Затем точка начала репликации транслоцировалась в терминальный повтор — асимметричное мутационное давление сменило своё направление, и на данный момент частоты использования нуклеотидов в генах с лидирующих и отстающих цепей выровнялись, а в геномах некоторых видов плотность кодирующих участков успела приблизиться к равномерной в большей степени, чем у остальных.

Выводы:

1. У представителей рода *Aviroxvirus* и *Fowlrox* вируса в частности наблюдаются высокие частоты использования A и T в четырёхкратно и двукратно вырожденных сайтах кодирующих последовательностей, из чего следует, что для изученных вирусов характерно симметричное мутационное АТ-давление.

2. Распределение плотности кодирующих участков в геномах изученных штаммов не является характерным для вирусов, точка начала репликации которых находится на концах цепи вирусной ДНК.

3. При анализе различий в распределении генов по обеим цепям для каждой половины генома были выявлено, что частота использования аденина в двукратно вырожденных сайтах генов 3'-конца плюс цепей *Canaryrox*, *Flamingorox*, *Penguinrox*, *Pigeonrox* и *Fowlrox* вируса достоверно выше таковой для 5'-конца комплементарной цепи.

4. Наибольшее различие в распределении плотности генов характерно для *Pigeonrox* вируса, наименьшее — для *Shearwaterrox* вируса (штамм 2). Значения плотности кодирующих участков в изученных полногеномных последовательностях *Fowlrox* вируса в целом являются общими для всех штаммов данного вида.

5. Учитывая сходство в организации генетического материала с таковой бактериальных клеток и проводя на основании этого аналогию, автором сделан вывод, что ранее точка начала репликации вируса находилась примерно в середине вирусного генома, на что указывает особое распределение плотности кодирующих участков на обеих цепях вирусной ДНК.

Литература

1. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С. А. Бабичев. — Санкт-Петербург: СпецЛит, 2012. — 760 с.
2. Хрусталёв, В. В. Репликация, транскрипция, мутационное давление / В. В. Хрусталёв; под ред. Е. В. Барковского. — Минск: БГМУ, 2011. — 280 с.
3. Lundstrom, K. Latest trends in cancer therapy applying viral vectors / K. Lundstrom // *Future virology*. — 2017. — № 12. — С. 667-684.
4. Moss, B. Poxvirus DNA Replication / B. Moss // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. — 2013. — № 9. — С. 1-12.
5. The Genome of Fowlpox Virus / C. L. Afonso, E. R. Tulman, Z. Lu et al. // *Journal of Virology*. — 2000. — № 8. — P. 3815-3831.