DOI: 10.34617/7y1m-3f58
УДК 578.831.2

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ПАРАМИКСОВИРУСОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Киселев Сергей Сергеевич[1], канд. биол. наук
Панюков Валерий Васильевич[2], канд. физ.-мат. наук
Осепчук Денис Васильевич[3], д-р с.-х. наук
Зимин Андрей Антонович[4], канд. биол. наук
[1]Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, Российская Федерация
[2]Институт математических проблем биологии РАН – филиал ФИЦ «Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН», г. Пущино, Российская Федерация
[3] ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, Российская Федерация
[4]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, Российская Федерация

В данной работе исследована таксономия 67 парамиксовирусов подсемейства *Orthoparamyxoviridae*. Для одного из них, вируса Сендай, ранее было показано онколитическое действие на ряд опухолей, в том числе на опухоли злокачественного мастита собак. С помощью сравнения полных геномов было показано, что представители рода *Respirovirus* кластеризуются в две группы, одна из которых включает в себя вирусы парагриппа 1 типа и 3 типа, а другая – вирус Сендай и респировирус гигантской белки. Существование второй группы также независимо подтверждается при анализе филогенетического дерева, построенного на основе выравнивания нуклеотидной последовательности гена РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Ключевые слова: *k*-меры; парамиксовирусы; методы без использования выравнивания, вирус Сендай

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF ONCOLYTIC PARAMIXOVIRUSES PERSPECTIVE FOR MALIGNANT TUMORS THERAPY IN LIVESTOCK

Kiselev Sergey Sergeevich[1], PhD Biol. Sci.
Panyukov Valery Vasilievich[2], PhD Phys.-Math. Sci.
Osepchuk Denis Vasilyevich[3], Dr. Agr. Sci.
Zimin Andrey Antonovich[4], Ph. D. Biol. Sci.
[1]Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation
[2]Institute of Mathematical Problems of Biology RAS - the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation
[3]Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation
[4]G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

In this work, the taxonomy of 67 paramyxoviruses from subfamily *Orthoparamyxoviridae* has been studied. For one of these, the Sendai virus has previously been shown to have an oncolytic effect

on a number of tumors, including canine malignant mastitis tumors. Using the method of whole-genome analysis, it was shown that representatives of the genus *Respirovirus* are divided into two clusters, one of which includes parainfluenza virus 1 and parainfluenza virus 3, and the other includes the Sendai virus and giant squirrel respirovirus. The existence of the second group is also independently confirmed by the analysis of the phylogenetic tree inferred from the alignment of the nucleotide sequence of the RNA-dependent RNA polymerase gene.

Key words: *k*-mers; paramyxoviruses; alignment-free methods; Sendai virus

Перспективы онколитической виротерапии человека и сельскохозяйственных животных. Онколитическая виротерапия является новым направлением литической и иммунной терапии рака [1]. Часто отдается предпочтение внутриопухолевому применению, поскольку оно позволяет избежать возможных проблем, связанных с системным применением. Такая виротерапия была одобрена в Китае в 2005 году и 2015 в США. Онколитические вирусы избирательно реплицируются в опухолевых клетках и убивают их. Долгое время считалось, что терапевтическая эффективность этого подхода заключается в прямом вирусном онколизисе. В настоящее время показано, что дополнительно возникает эффективный противоопухолевый иммунитет. В первую очередь для этого лечения использовались рекомбинантные аденовирусы и герпесовирусы. Сейчас большое внимание уделяется парамиксовирусам. Парамиксовирусы являются перспективной и одновременно хорошо изученной моделью онколитических вирусов с большим терапевтическим потенциалом. Ещё один пример – это реовирус, который оказался эффективнным при доклиническом исследовании, и низкотоксичным для людей. Другим примером являются онколитические парамисксовирусы.

Противоопухолевая эффективность вируса парагриппа мышей и ряда других парамиксовирусов животных. Онколитические парамиксовирусы включают некоторые штаммы вирусов кори, эпидемического паротита, болезни Ньюкасла и вируса Сендай [2, 3]. Все эти вирусы индуцируют высокоспецифичную гибель злокачественных клеток. Противоопухолевая эффективность онколитических парамиксовирусов связана с тремя основными свойствами этих вирусов:

1) селективной репликацией в опухолевых клетках;

2) онколитическими свойствами вирусов как таковых;

3) их иммуностимулирующей способностью.

К сказанному можно добавить, что рецепторы парамиксовирусов в большем числе представлены на поверхности многих раковых клеток. Эти вирусы индуцируют появление поликарионной структуры и их распространению внутри опухоли без воздействия нейтрализующих антипарамиксовирусных антител хозяина. Парамиксовирусы являются мощными индукторами иммуностимулирующих цитокинов. Нейраминидаза оболочки, например, вирусов болезни Ньюкасла, эпидемического паротита и вируса Сендай, может расщеплять сиаловые кислоты на поверхности злокачественных клеток. Это приводит к доступности антигенов раковых клеток для иммунной системы животного или человека.

Исследования вирусного онколизиса, вызванного парамиксовирусами, выявили их свойства, как те, которые являются общими для многих онколитических вирусов, а также некоторые, которые характерны только для онколитических парамиксовирусов. Подробно описан механизм индукции гибели раковых клеток, вызванный вирусом болезни Ньюкасла [4], в частности Т-клеточный иммунный ответ.

Объектом геномного исследования данной работы является онколитический вирус парагриппа мышей и вирусы подсемейства *Orthoparamyxoviridae*. *Murine respirovirus* или вирус парагриппа мышей, который ранее назывался Sendai virus,

принадлежит к роду *Respirovirus* семейства *Paramyxoviridae* (таксономия согласно ICTV Taxonomy history: Murine respirovirus на сайте ICTV – https://talk.ictvonline.org//taxonomy/p/taxonomy-history? taxnode_id = 201851624 – род: *Respirovirus*, подсемейство: *Orthoparamyxoviridae* семейство: *Paramyxoviridae*, отряд: *Mononegavirales*, класс: *Monjiviricetes*, тип: *Negarnaviricota*, царство: *Orthornavirae*. Геном этого вируса представляет собой одну цепь (-)-РНК длиной в 15384 нуклеотидов. Репликация этого нефрагментированного (-)-РНК-генома и всё развитие вируса происходит в цитоплазме. Вирусные частицы большие, их размер варьирует от 150 до 250 нм. Вирус парагриппа мышей вызывает легко передаваемые инфекции дыхательных путей в колониях мышей. Не зарегистрировано ни одного случая заболеваний, вызванных этим вирусом, у человека, кошек, собак или сельскохозяйственных животных. Вирус парагриппа мышей, ослабленный с помощью методов генной инженерии, не вызывает заболеваний дыхательных органов у грызунов. В ряде исследований было показано, что такой вариант вируса распространяется в опухолях животных и убивает раковые клетки. При этом здоровые клетки тканей остаются нетронутыми и могут нормально развиваться. Специфическое онколитическое действие этого вируса является весьма перспективным для лечения онкозаболеваний у человека, домашних и сельскохозяйственных животных. Было обнаружено, что вирус парагриппа мышей подавлял развитие или полностью уничтожал карциномы поджелудочной железы, толстой кишки и простаты, а также фибросаркомы и нейробластомы, не влияя при этом на окружающие нормальные клетки. Менее эффективное действие в моделях ксенотрансплантатов крыс было показано в экспериментальной терапии этим вирусом меланом, нейробластом, плоскоклеточной и гепатоцеллюлярной опухолей. Подобные результаты были показаны ещё для ряда опухолей человека, домашних и сельскохозяйственных животных [1-3].

Методика исследований. С помощью базы данных NCBI Taxonomy нами было отобрано для последующего анализа 67 геномов парамиксовирусов, относящихся к подсемейству *Orthoparamyxoviridae*. Соответствующие аннотации и генные карты были получены из GenBank. Сами нуклеотидные последовательности представлены в GenBank в виде кДНК. Для гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (*L*, large protein) было проведено выравнивание с помощью алгоритма MUSCLE, которое затем использовалось для построения филогенетического дерева методом максимального правдоподобия в программе IQ-TREE (версия 1.6.12) [5]. Оптимальной моделью нуклеотидных замен оказалась GTR+F+R5. 1000 итераций «сверхбыстрого бутстреп-анализа» (ultrafast bootstrap) [6] использовали для определения уровня поддержки ветвей. Для расчёта матрицы попарных расстояний между геномами парамиксовирусов по используемым *k*-мерам применяли программу собственной разработки GnmDistUsKm. Поскольку все эти геномы представляют собой одноцепочечную (-)-РНК, то режим «дуплексов» не использовали – анализировали только прямое совпадение *k*-меров длиной 7 нуклеотидов. Затем с помощью метода присоединения ближайших соседей [7] на основе данной матрицы расстояний было построено филогенетическое дерево в программе MEGA 6 [8]. Визуализация обоих деревьев проводилась в MEGA 6.

Результаты исследований и их обсуждение. Длина анализируемых геномов варьировала от 15276 нуклеотидов (*Nariva virus*) до 20148 нуклеотидов (*Pohorje myoides paramyxovirus* 1 isolate TT02/05). Оказалось, что во всех геномах наблюдается преобладание A/T-пар: GC-состав от 34,5% (у вируса парагриппа человека типа 3) до 48,1% (вирус кори IC323-EGFP).

Необходимо отметить, что полногеномное выравнивание не удалось осуще-

ствить как для полного набора из 67 геномов, так и для набора геномов близкородственных (по NCBI Taxonomy) вирусов Сёндай, парагриппа 1 типа и парагриппа 3 типа. По-видимому, это произошло из-за низкого уровня гомологии между геномами и их небольшой длины. Поэтому был проанализирован ген *L*, кодирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу, который является модельным филогенетическим маркером для парамиксовирусов. Его выравнивание использовалось для получения филогенетического дерева в программе IQ-TREE с помощью метода максимального правдоподобия [5]. При этом было обнаружено, что оптимальной моделью нуклеотидных замен являлась GTR+F+R5. Доля консервативных сайтов в выравнивании составила 24,7% согласно IQ-TREE. На рис. 1 показано построенное филогенетическое дерево.

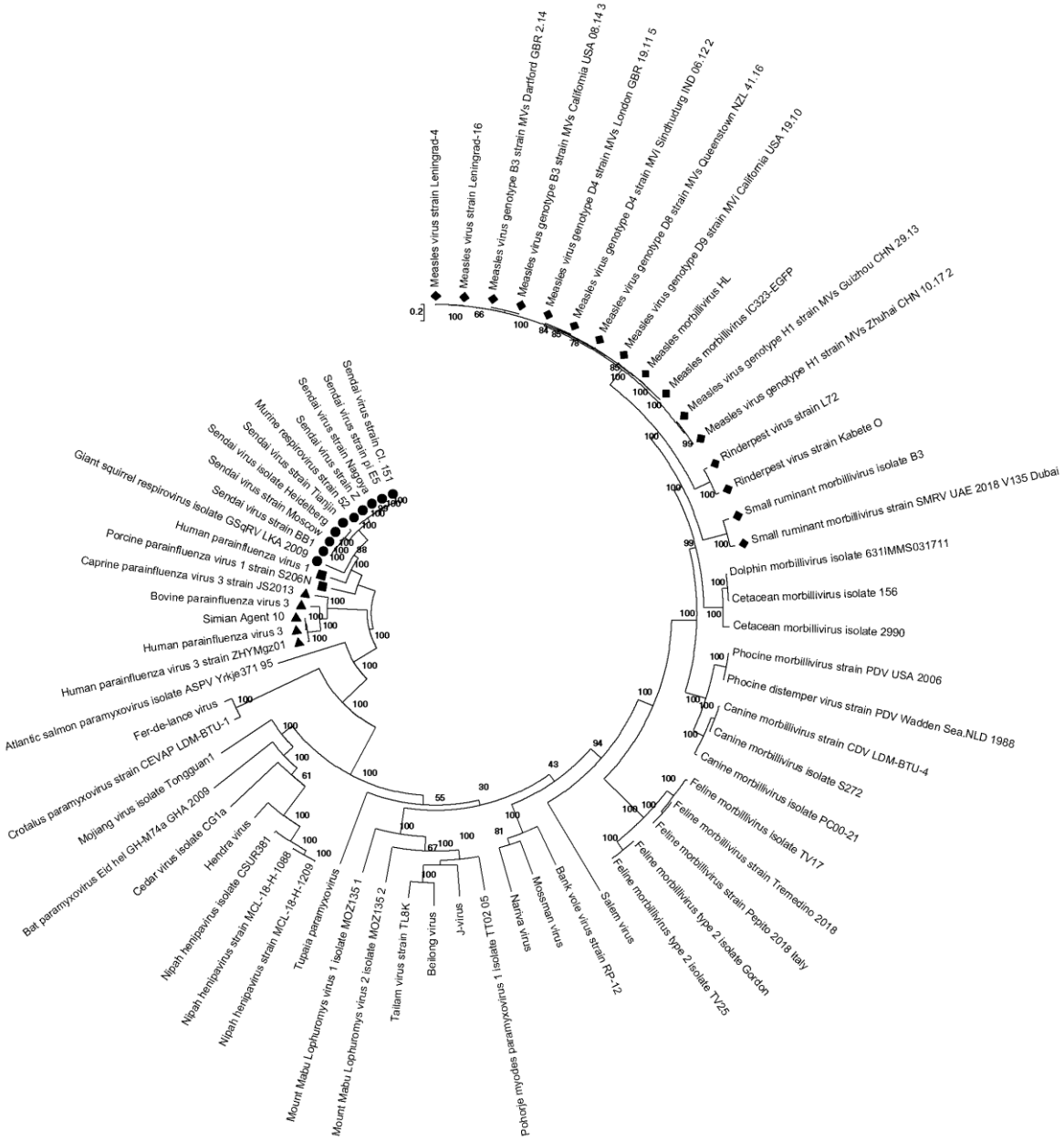

Рисунок 1 – Филогенетическое дерево, построенное с помощью метода максимального правдоподобия на основе выравнивания нуклеотидной последовательности гена *L*, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. Рядом с узлами ветвления представлены значения бутстреп-поддержки в процентах от 1000 повторов статистическо-

го анализа: «ultrafast bootstrap» [6]. Число нуклеотидных замен на позицию приведено на масштабной линейке. Представители рода *Respirovirus* обозначены следующими маркерами: чёрными кругами – вирус Сёндай и респировирус гигантской белки, чёрными квадратами – вирус парагриппа человека 1 типа и вирус парагриппа свиней 1 типа, чёрными треугольниками – вирус парагриппа человека 3 типа, вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота. Чёрными ромбами обозначены вирусы кори, чумы крупного рогатого скота и морбилливирусы мелких жвачных млекопитающих.

Обычно для построения филогенетических деревьев используют результаты множественного выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот или белков. В данном случае нами был использован подход без предварительного выравнивания биологических последовательностей (alignment-free). Последовательности нуклеотидов геномов парамиксовирусов разбивали на олигонуклеотиды длиной *k* со сдвигом в 1 нуклеотид, так называемые «*k*-меры». При этом учитывались все варианты используемых в данных вирусных геномах *k*-меров. Геномы парамиксовирусов представляют собой одноцепочечную (-)-РНК, поэтому для определения эволюционной истории данных геномов учитывались только идентичные *k*-меры. Сначала был определен оптимальный размер *k*-меров. Он оказался равным 7 нуклеотидам. Далее сходство между каждой парой геномов было рассчитано по формуле Сёренсена [9]. Данные этого этапа были представлены в виде матрицы сходств. После этого полученная матрица сходств геномов парамиксовирусов была переведена в матрицу расстояний по формуле

$$dist = 1 - sim,$$

где *dist* – расстояние между двумя геномами, а *sim* — сходство по Сёренсену. Выведенную матрицу расстояний использовали в пакете программ MEGA 6 [8] на входе программы по построению филогенетического дерева с помощью алгоритма присоединения ближайших соседей [7]. На рис. 2 представлено полученное дерево для исследованных геномов парамиксовирусов подсемейства *Orthoparamyxoviridae*.

Деревья, приведённые на рис. 1 и рис. 2, отличаются по своей топологии. На дереве, построенном на основе выравнивания маркерного гена *L* (рис. 1), видно, что представители рода *Respirovirus* находятся на двух ветвях, уровень бутстреп-поддержки которых составляет 100 %. На одной из них вирус Сендай и близкородственный респировирус гигантской белки (обозначены чёрными кружками), а также вирус парагриппа человека 1 типа и вирус парагриппа свиней 1 типа (обозначены чёрными квадратами). На другой – вирус парагриппа человека 3 типа вместе с близкородственным вирусом мартышек Simian agent 10 и вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота (обозначены чёрными треугольниками).

В свою очередь, на дереве, построенном с помощью метода присоединения ближайших соседей на основании попарных расстояний между геномами без применения выравнивания (рис. 2), видно, что вирус Сендай и респировирус гигантской белки (обозначены чёрными кружками) находятся в кластере, отделённом от остальных анализируемых вирусов. Вирусы парагриппа 1 типа (обозначены чёрными квадратами) и парагриппа 3 типа (обозначены чёрными треугольниками) расположены на отдельной ветви, а в соседней кладе присутствуют морбилливирусы кошачьих. Однако на обоих деревьях выделяется группа, содержащая вирус кори, вирус чумы крупного рогатого скота и морбилливирус мелких жвачных млекопитающих (обозначены чёрными ромбами).

Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, построенное с помощью метода присоединения ближайших соседей на основе попарного сравнения геномов парамиксовирусов по используемым 7-мерам. На масштабной линейке отражено различие между геномами в процентах. Маркеры для представителей рода *Respirovirus*, вируса кори, чумы крупного рогатого скота и морбилливируса мелких жвачных млекопитающих такие же, как на рис. 1.

Выводы. Методы, основанные на выравнивании биологических последовательностей, на текущий момент являются наиболее распространёнными для построения филогенетических деревьев. Методы, свободные от выравниваний, в частности, на основе попарных сравнений геномов по используемым *k*-мерам, в ряде случаев приводят к получению дерева с альтернативной топологией, при этом, как правило, сохраняются ветви с организмами, обладающими высокой степенью родства. Взаимное расположение крупных групп может требовать дальнейшего уточнения, в том числе с применением анализа аминокислотных последовательностей.

Работа частично поддержана средствами гранта РФФИ (проект № 18-07-00899) для Киселева С.С. и Панюкова В.В. Исследование для Зимина А.А. частично поддержано бюджетом ИБФМ РАН и частично поддержано для него же грантом

РФФИ (проект № 20-54-53018 ГФЕН_а) и выполнено им в рамках этого проекта.

Список литературы

1. Russel S.J. Oncolytic virotherapy / S.J. Russel, K.W. Peng, J.C. Bell // Nat. Biotechnol. 2012. V. 30. P. 658-672.

2. Adderson E. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based human parainfluenza virus type 1 vaccine in 3- to 6-year-old children / E. Adderson, K. Branum, R.E. Sealy, B.G. Jones, S.L. Surman, R. Penkert, et al. // Clin. Vaccine. Immunol. 2015. V. 22. P. 298-303.

3. Schirrmacher V. Oncolytic Newcastle disease virus as a prospective anti-cancer therapy. A biological agent with potential to break therapy resistance / V. Schirrmacher // Expert. Opin. Biol. Ther. 2015. V. 15. P. 1757-1771.

4. Zamarin D. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy / D. Zamarin, P. Palese // Future Microbiol. 2012. V. 7. P. 347-367.

5. Nguyen L.-T. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies / L.-T. Nguyen, H.A. Schmidt, A. von Haeseler, B.Q. Minh // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. P. 268-274.

6. Hoang D.T. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation / D.T. Hoang, O. Chernomor, A. von Haeseler, B.Q. Minh, L.S. Vinh // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 518-522.

7. Saitou N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406-425.

8. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725-2729.

9. Sorensen T. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content / T. Sorensen // Kongelige Danske Videnskabernes Selskab. Biol. krifter. 1948. V. 4. P. 1-34.

DOI: 10.34617/bche-gz73
УДК 578.81

РЕКОНСТРУКЦИИ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ МЕЖДУ SV1-РОДСТВЕННЫМИ АКТИНОФАГАМИ

Киселев Сергей Сергеевич[1], канд. биол. наук
Зимин Андрей Антонович[2], канд. биол. наук
Лу Иньхуа[3], PhD Biol. Sci.
Панюков Валерий Васильевич[4], канд. физ.-мат. наук
[1]*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, Российская Федерация*
[2]*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, Российская Федерация*
[3]*Колледж наук о жизни, Педагогический университет Шанхая, г. Шанхай, Китай*
[4]*Институт математических проблем биологии РАН - филиал ФИЦ «Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН», г. Пущино, Российская Федерация*

В данной работе исследована таксономия десяти SV1-подобных актинофагов, хозяевами которых являются бактерии рода *Streptomyces*, с использованием методов