

تغییرات نوکلئوتیدی توالی ژن کدکننده پروتئین چند عملکردی X در فرد مبتلا به ویروس هپاتیت B

علیرضا محبی^۱، علی شاکری مقدم^۲، یوسف دوزندگان^۱، نازنین لورستانی^۱، اعظم میرعرب^۱، دکتر عبدالوهاب مرادی^۳، دکتر علیجان تیرایی^۴
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۳- استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۴- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: عفونت مزمن با ویروس هپاتیت B (HBV) یکی از عوامل اصلی در ایجاد سیروز و سرطان سلول کبدی است. بیماری‌زایی ویروس به وسیله پروتئین چندعملکردی x (HBx) صورت می‌گیرد. تغییر در توالی ژن کدکننده این پروتئین باعث تنظیم فاکتورهای نسخه‌برداری و بیماری‌زایی می‌شود. این مطالعه به منظور آنالیز ژنتیک تکاملی ژن کدکننده HBx در فرد مبتلا به HBV مزمن انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ابتدا از فرد آلوده به عفونت مزمن با ویروس هپاتیت B توالی کامل کدکننده HBx تکثیر و کلون شد. سپس با توالی‌های مرجع ژنوتیپ‌ها، سروتیپ‌ها و زیرسروتیپ‌های مختلف ویروس موجود در پایگاه GenBank هم‌ردیفی توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer انجام شد. از نتیجه هم‌ردیفی برای رسم درخت فیلوژنتیک توسط سرور T-rex و آنالیز ژنتیک جمعیت توسط نرم‌افزار DnaSP استفاده شد. انتخاب طبیعی در سطح نوکلئوتید و پروتئین توسط تست Tajima's D/Tajima's D انجام گردید. یافته‌ها: جهش شناخته شده‌ای در سطح پروتئین در توالی کدکننده HBx فرد آلوده مزمن یافت نشد. نتایج انتخاب طبیعی نشان‌دهنده جهش‌های خنثی در ژن HBx بود. نتایج فیلوژنی نشان داد توالی کدکننده HBx در فرد آلوده مزمن قرابت ژنتیکی به ژنوتیپ D و زیرسروتیپ ayw2 داشت.

نتیجه‌گیری: چندریختی انتخاب طبیعی در ژن کدکننده HBx رخ می‌دهد. همچنین نتیجه فیلوژنی مطالعه حاضر با یافته‌های پیشین استان گلستان و ایران که فراوانی ژنوتیپ D و زیرسروتیپ ayw2 را گزارش داده‌اند؛ مطابقت دارد.

کلیدواژه‌ها: ویروس هپاتیت B پروتئین چندعملکردی x، ژنتیک جمعیت، DnaSP، ژنوتیپ D، سروتیپ ayw2

* نویسنده مسؤول: دکتر علیجان تیرایی، پست الکترونیکی tabarraei@goums.ac.ir

نشانی: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی شناسی، تلفن ۰۱۷-۳۲۴۲۱۷۱۷، نمابر ۳۲۳۲۵۵۸۱
وصول مقاله: ۱۳۹۵/۵/۲، اصلاح نهایی: ۱۳۹۵/۱۱/۱۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۱

مقدمه

فعال‌کننده نسخه‌برداری است و نیز سبب تخریب پروتئین سرکوبگر تومور (پروتئین 53 p) می‌گردد. در سرم بیماران HCC (۱۰۰ درصد) تولید آنتی‌بادی ضد HBx به میزان بالا رخ می‌دهد. با توجه به این مطلب می‌توان از این پروتئین به عنوان یک شناساگر پیش‌آگاهی برای شناسایی عفونت‌های HBV و HCC استفاده نمود (۳). ناحیه کدکننده آنتی‌ژن x با ناحیه پروموتور قالب خواندن باز Pre-Core (PreC) ویروس همپوشانی دارد (۱). جهش در این ناحیه (نوکلئوتیدهای ۱۷۶۲ و ۱۷۶۴) یا کدون ۲۸ ناحیه PreC اغلب منجر به تغییر الگوی ترجمه شده و به تولید پروتئین کوتاه شده x می‌گردد که در نهایت سبب غیاب آنتی‌ژن e (HBeAg) در گردش و با آسیب شدید کبد همراه است (۴). فرم کوتاه شده HBx به کرات

عفونت مزمن با ویروس هپاتیت B (Chronic infection with Hepatitis B virus: HBV) نقش مهمی در ایجاد سیروز و سرطان سلول کبدی (Hepatocellular Carcinoma: HCC) بازی می‌کند. بیماری‌زایی سرطان کبد مرتبط با HBV به خوبی شناخته نشده است (۱). شواهد نشان می‌دهد که پروتئین چندعملکردی x ویروس هپاتیت B (HBx) نقش مهمی در بیماری‌زایی HCC دارد (۱). ویروس هپاتیت B دارای ۶ قالب باز خواندن هستند که کوچک‌ترین آن توالی کدکننده HBx است. این پروتئین از ۱۵۴ اسیدامینه با وزن مولکولی ۱۷ کیلو دالتون تشکیل شده است (۲). این پروتئین یک

یابد. محصول PCR بر روی ژل ۰/۸ درصد آگاروز (۷۵ ولت، ۴۰ میلی آمپر) برده شد و با طول موج ۳۲۰ نانومتر اشعه ماورای بنفش که خسارتی به DNA وارد نشود؛ خیلی سریع (کمتر از ۱۵ ثانیه) مشاهده شد. ژل حاوی DNA مورد نظر بر روی دستگاه ترنس لومیناتور (Gel-Vue II, syngene, USA) قرار داده شد و با طول موج ماورای بنفش ۳۶۵ نانومتر قطعه مورد نظر از ژل بریده شد و طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گردید. استخراج از ژل توسط QIAquick Gel Extraction Kit (Cat: 28704, Qiagen, Germany) و طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. کلونینگ TA، مستعد سازی باکتری و ترانسفورماسیون توسط InsTAclone PCR Cloning Kit (Cat: #K1213, Thermofisher, USA) و مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد.

استخراج پلاسمید و PCR کلونی: استخراج پلاسمید از کلونی‌های ترانسفورم شده صورت گرفت. برای این منظور کلونی‌های مورد نظر در طول شب درون محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین) Plasmid DNA Purification Kit (Cat: 12143, Qiagen, Germany) و مطابق با پروتکل شرکت سازنده استخراج پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط صورت گرفت. از کلونی‌های مورد استفاده برای استخراج پلاسمید برای انجام PCR کلونی مطابق با پروتکل دمایی و مواد فوق استفاده شد. همچنین برای استخراج‌های پلاسمید متناظر نیز PCR انجام شد.

توالی‌یابی: برای توالی‌یابی، غلظت ۱۰۰ نانوگرم استخراج پلاسمید حاوی ژن مورد نظر به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و به روش Sanger صورت پذیرفت. برای حفظ نوکلئوتیدهای ابتدایی و انتهایی ژن مورد نظر از پرایمرهای مخصوص توالی‌یابی در وکتور TA توسط خود شرکت استفاده شد. اصلاحات اولیه نتایج توالی‌یابی توسط نرم‌افزار BioEdit v7.1.9 و سپس مقایسه آن با توالی‌های مرجع توسط نرم‌افزار CLC Sequence Viewer (CLC bio, a QIAGEN Company) صورت گرفت (۱۴).

بازیابی داده‌ها و روش‌های آنالیز: توالی کدکننده با طول کامل HBx از پایگاه داده GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با کدهای دسترسی زیر بود.

HE974381.1, HE974375.1, HE974370.1, HE974383.1, HE974376.1, AF286594.1, HE974368.1, HE974369.1, AB846650.1, AB516395.1, HE974384.1, HE974380.1, AB625343.1, AB625342.1, HE815465.1, AF151735.1, HE974367.1

توالی‌ها از ژنوتیپ‌های A, D, E, F, G, H و زیر سروتیپ‌های شایع ayw2, ayw3 و adr بودند. توالی کدکننده HBx به دست آمده در این مطالعه با کد دسترسی KX544797 در پایگاه داده GenBank به ثبت رسید.

در HCC دیده می‌شود و به‌نظر با افزایش بیان آنکوژن‌های سلولی RAS و MYC در سرطان‌زایی نقش دارد (۵).

آنالیز چندریختی توالی DNA و SNP ها (چندریختی‌های یک نوکلئوتید) می‌تواند اهمیت تکاملی چندریختی‌های DNA و عوامل دموگرافیک و انتخابی بر جمعیت‌ها و گونه‌ها را مشخص کند (۶). داده‌های چندریختی DNA ابزاری قدرتمند (به‌عنوان شناساگر مولکولی) در محدوده وسیعی از علوم نظیر پزشکی، پرورش گیاه و حیوان، ژنتیک محافظتی، ژنتیک اپیدمیولوژی و علوم دیگر هستند (۷). از نرم‌افزارهای قدرتمند بیوانفورماتیک در این زمینه می‌توان به نرم‌افزار MEGA که اولین بار در دهه ۱۹۹۰ ایجاد شد و نرم‌افزار DnaSP اشاره کرد که به‌طور وسیع به آنالیز داده‌های چندریختی DNA می‌پردازند (۹، ۸). در این مطالعه نقش انتخاب طبیعی در تغییرات رشد جمعیت به‌وسیله آزمون Tajima's D در جمعیتی از توالی‌های ژن HBx ثبت شده در پایگاه داده ژن (GenBank) و توالی نوکلئوتیدی ژن مذکور از فرد آلوده به عفونت مزمن ویروس هپاتیت B بررسی شد.

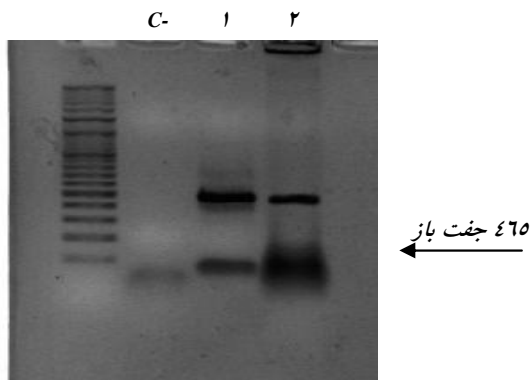
روش بررسی

تهیه نمونه سرم: DNA استخراج شده از نمونه سرم از فرد آلوده به‌صورت مزمن با HBV از مطالعه قبلی تهیه شد (۱۱، ۱۰).

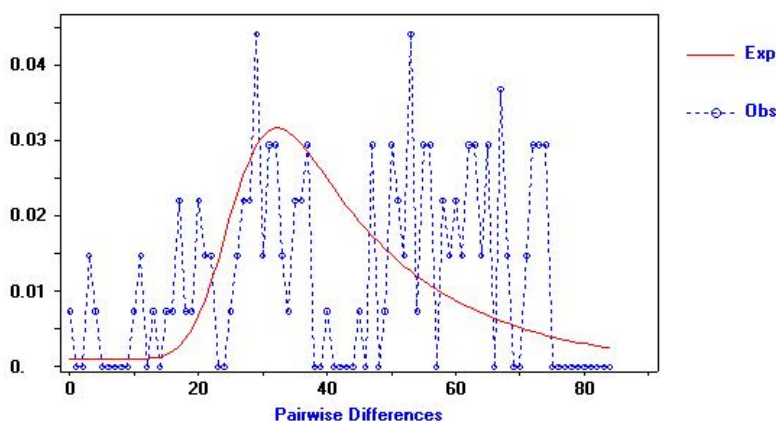
طراحی پرایمر ژن HBx: پرایمرهای پیش‌رو 5'-TCTCTCGGAAATACACCT-3' و معکوس 5'-GGTGTGGTGAACAGACCAA-3' با استفاده از نرم‌افزار Primer3web version 4.0.0 طراحی شدند. به‌طوری که کاملاً ناحیه کدکننده ژن HBx را پوشش دهند (۱۲). پرایمرها سپس توسط نرم‌افزار Primer-BLAST با پایگاه داده غیر تکراری GenBank هم‌ردیفی شدند تا اندازه محصول و صحت پرایمرها تعیین شود (۱۳).

انجام PCR، استخراج از ژل و کلونینگ در وکتور TA: واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) توسط آنزیم Maxima Hotstart Taq DNA polymerase (Cat: EP0601, thermofisher, USA) با غلظت ۱/۲۵ واحد، بافر آنزیم، ۲/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۸ میلی‌مولار dNTPs و ۵۰۰ نانوگرم DNA الگوی سرم آلوده انجام شد. چرخه PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (PEQLAB-Life Science, USA) طبق پروتکل دمایی زیر انجام شد.

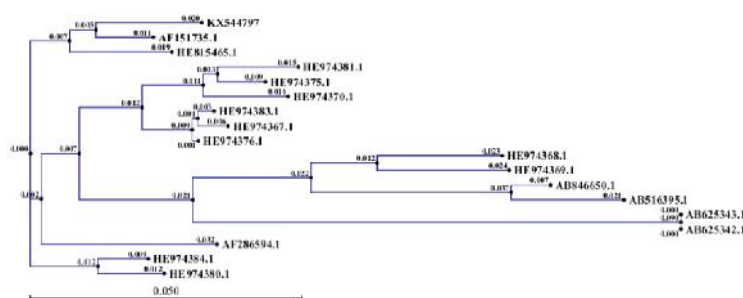
دنا توریشن اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت و به دنبال آن ۳۵ حلقه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. برای انجام کلونینگ TA، دمای طویل سازی نهایی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا شانس الحاق آدنین به انتهای زنجیره افزایش



شکل ۱: تصویر PCR و PCR کلونی ژن HBx
 C- کنترل بدون الگو؛ ۱: کنترل مثبت حاوی الگو؛ ۲: PCR کلونی از کلونی ترانسفورم شده



شکل ۲: تکامل ژنتیکی ژن HBx
 ژن HBx پس از گذراندن یک دوره فراوانی کم و انتخاب طبیعی به تعادل و فراوانی بیشتری رسیده است (کاهش شیب منحنی)



شکل ۳: درخت فیلوژنی ۱۷ ژنوتیپ مختلف کدکننده ژن HBx ثبت شده در پایگاه GenBank و بررسی قرابت ژنتیکی با توالی حاصله این مطالعه (KX544797)

۱۵ و ۱۶). معبرسازی داده‌ها توسط Bootstrap و تعداد تکرار ۱۰۰۰ انجام گردید.

یافته‌ها

نتایج Primer-BLAST نشان داد که محصول جفت پرایمر، حاوی ۴۶۵ جفت باز توالی کدکننده ژن HBx است (شکل یک). محصول PCR پس از استخراج از ژل به وسیله کیت، در وکتور TA وارد شد. از کلونی‌های ترانسفورم شده برای PCR کلونی استفاده شد (شکل یک، چاهک شماره ۲).

مطالعه آمار ژنتیکی و چندریختی توالی به وسیله DnaSP و رسم درخت فیلوژنیک: آنالیزهای آماری تغییرات اندازه جمعیت و تست انتخاب طبیعی توسط نرم‌افزار DnaSP (DNA Sequence Polymorphism v5.10) بر روی توالی‌های بازبازی شده از GenBank و ژن توالی شده از فرد آلوده به cHBV صورت پذیرفت (۹). از نرم‌افزار مذکور برای ترجمه نوکلئوتیدها به اسید آمینه‌های مربوطه نیز استفاده شد. رسم درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم‌افزار T-rex و روش Neighbor-joining انجام شد

نوکلئوتیدی انتخاب شده در این مطالعه بین توالی‌های مورد استفاده، انتخاب طبیعی مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود. علاوه بر این نشان داده شد که علاوه بر اعمال انتخاب طبیعی بر تغییر در فراوانی نوکلئوتیدی ژن کدکننده HBx، این ژن پس از عبور از یک تنگنای ژنتیکی (شکل ۲)، افزایش شیب منحنی به یک قله عبور کرده و اکنون نوکلئوتیدهای انتخابی در فراوانی کمی هستند (کاهش شیب منحنی). با توجه به متمایل بودن Tajima's D به سمت صفر، حتی می‌توان این گونه برداشت کرد که از به تعادل رسیدن این ژن پس از عبور از تنگنا، رشد جمعیت در نوکلئوتیدهای انتخاب شده در ژن HBx در حال گسترش خواهند بود.

درخت تکاملی (Neighbour-joining) برای ۱۸ توالی کدکننده HBx رسم گردید. نزدیک بودن به واقعیت این درخت با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap آزمایش شد. توالی کدکننده HBx توالی یابی شده در این مطالعه با bootstrap ۷۵۷ با ژنوتیپ D ویروس هپاتیت B، و با فاصله ۴ گره و bootstrap ۸۶۷ از سروتیپ adr قرار داشت. نزدیک‌ترین قرابت ژنتیکی با سروتیپ 2 ayw (bootstrap 792) بود. این نتایج مشابه با یافته‌های به‌دست آمده با ژنوتیپ شایع D در استان گلستان، شهرستان گرگان بود (۱۹). همچنین مطابق مطالعه محبی و همکاران که پراکندگی 2 ayw در ایران را بیش از ۹۴ درصد گزارش نمودند (۲۰)؛ توالی HBx در اینجا مطابق با این سروتیپ بود (شکل ۳).

نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان می‌دهد که جهش‌های خنثی در نتیجه انتخاب طبیعی بر روی ژن X ویروس هپاتیت B صورت می‌گیرد. این انتخاب در جهت انتخاب نوکلئوتیدی در اثر تنگنای ژنتیکی و افزایش جمعیت این نوکلئوتیدها است. با توجه به کم بودن اندازه جمعیت در این مطالعه کاملاً نمی‌توان این فرضیه را رد نمود. همچنین توالی به‌دست آمده از ژن کدکننده HBx، قرابت نوکلئوتیدی به ژنوتیپ D و سروتیپ 2 ayw داشت که مطابق با گزارش‌های منطقه و کشور است.

References

- Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med*. 2006 Feb; 147(2): 58-66. doi: 10.1016/j.lab.2005.10.003
- Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2001 Oct; 34(4 Pt 1): 617-24.
- Zhang X, Dong N, Zhang H, You J, Wang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells. *J Lab Clin Med*. 2005 Feb; 145(2): 98-104. doi: 10.1016/j.lab.2004.11.018
- Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH. Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J Gen Virol*. 1997 Jun; 78 (Pt 6): 1469-78.
- Yano Y, Azuma T, Hayashi Y. Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical

نتایج توالی‌یابی ابتدا توسط نرم‌افزار BioEdit مطابق با نمودارهای کروماتوگرام اصلاح گردید. ترجمه کدون‌های توالی‌یابی شده به اسید آمینه مربوطه نشان داد که هیچ جهش شناخته شده‌ای در سطح اسید آمینه صورت نگرفته است. سپس توسط توالی‌های GenBank ویروس هپاتیت B و با کمک نرم‌افزار CLC Sequence Viewer هم‌ردفی انجام شد. از توالی‌های هم‌ردیف شده برای آنالیز تست خنثی بودن، Tajima's D استفاده شد. براین اساس تعداد جایگاه‌های پلیمرفیک S برابر ۱۳۵ و ۲۹ درصد کل ژن به‌دست آمد. مطابق با این یافته در سطح نوکلئوتید، نتایج اشتقاق طبیعی در توالی‌های هم‌ردیف شده دیده شد (شکل ۲). در سطح پروتئین نیز هیچ انتخاب طبیعی معنی‌داری مشاهده نشد.

درخت فیلوژنی (شکل ۳) همانطور که ذکر شد؛ رسم گردید. ژن توالی‌یابی شده بیشترین قرابت را با توالی مرجع ژنوتیپ D و سروتیپ 2 ayw ویروس هپاتیت B داشت و دورترین فاصله ژنتیکی را با ژنوتیپ A2 (۸ گره) داشت. داده‌های درخت فیلوژنیک به‌وسیله Bootstrap و ۱۰۰۰ تکرار تایید شدند.

بحث

در این مطالعه آنالیزهای آماری ژنتیکی به‌وسیله نرم‌افزار DnaSP صورت گرفت. این نرم‌افزار از متداول‌ترین آنالیزهای آماری برای کمی سنجی چندریختی DNA استفاده می‌کند. این آنالیزها شامل تعداد جایگاه‌های تفکیک‌کننده، متوسط تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی، تعداد هاپلوتیپ‌ها و گوناگونی هاپلوتیپ‌ها، آنالیزالگوی توزیع تغییرات DNA یا محاسبه رویدادهای تکاملی متناوب است (۷).

دو راه برای بررسی یک جمعیت وجود دارد. یکی آنالیز توزیع فراوانی تفاوت‌های نوکلئوتیدی دو توالی است که الگویی متناوب از تغییرات را نشان می‌دهد (۱۷). روش دیگر انجام تست انتخاب طبیعی و تست Tajima's D، روشی برای آنالیز تغییرات اندازه جمعیت براساس جهش‌های خنثی است (۱۸). در ۱۸ توالی

characteristics. *World J Hepatol*. 2015; 7(3): 583-92. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.583

6. Przeworski M, Hudson RR, Di Rienzo A. Adjusting the focus on human variation. *Trends Genet*. 2000 Jul; 16(7): 296-302.

7. Rozas J. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Methods Mol Biol*. 2009; 537: 337-50. doi: 10.1007/978-1-59745-251-9_17

8. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016 Jul; 33(7): 1870-74. doi: 10.1093/molbev/msw054

9. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009 Jun; 25(11): 1451-52. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187

10. Zhand S, Karami C, Hosseinzadeh Adli A, Tabarraei A, Khodabakhshi B, Moradi A. Correlation between hepatitis B G1896A precore mutations and HBeAg in chronic HBV patients. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 Feb; 8(2): e17126. doi: 10.5812/jjm.17126
11. Karami C, Adli AH, Zhand S, Tabarraei A, Talei R, Saeidi M, et al. Study of genotype, subtype and mutation in the S gene in hepatitis B patients Co-infected with HIV in Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(12): 1-5.
12. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug; 40(15): e115. doi: 10.1093/nar/gks596
13. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13: 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
14. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series.* 1999; 41(2): 95-98.
15. Boc A, Diallo AB, Makarenkov V. T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul; 40(Web Server issue): W573–W579. doi: 10.1093/nar/gks485
16. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987 Jul; 4(4): 406-25.
17. Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol.* 1992 May; 9(3): 552-69.
18. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989 Nov; 123(3): 585-95.
19. Moradi A, Zhand S, Ghaemi A, Javid N, Tabarraei A. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran. *Virus Genes.* 2012 Jun; 44(3): 382-87. doi: 10.1007/s11262-012-0715-z
20. Mohebbi SR, Amini-Bavil-Olyae S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Sep; 14(9): 858-66. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02053.x

Original Paper

Hepatitis B virus x protein coding sequence variation in chronically infected patient

Mohebbi A (B.Sc)¹, Shakeri-Moghaddam A (B.Sc)², Doudazndegan Y (B.Sc)¹
Lorestani N (B.Sc)¹, Mir-Arab A (B.Sc)¹, Moradi AV (Ph.D)³, Tabarraei A (Ph.D)^{*4}

¹M.Sc Student in Virology, Student Research Committee, Golstan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

²M.Sc Student in Microbiology, Student Research Committee, Golstan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

³Professor, Infectious Diseases Research Center, Golstan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ⁴Associate Professor, Infectious Diseases Research Center, Golstan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Chronic infection with Hepatitis B virus (HBV) is one of the main causes of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The pathogenicity of the virus is determined by the multi-functional protein x (HBx). Changing the sequence of the gene encoding this protein causes the regulation of transcription and pathogenicity factors. This study was done to analyze the genetic dynamics of the HBx coding gene in a person with chronic HBV.

Methods: In this descriptive laboratory study, an infected person with chronic hepatitis B virus infection was first amplified and cloned into complete sequence of HBx encoder. Then, the reference sequences of genotypes, serotypes and different virus subtypes of the GenBank database were matched by CLC Sequence Viewer software. The comparative result was used to plot the phylogenetic tree by T-rex server and population genetic analysis using DnaSP software. Natural selection at the nucleotide and protein level was performed by the Tajima's D test.

Results: No known mutation at the level of the protein was found in the chronic sequence of the HBx encoder. The results of natural selection indicated neutral mutations in the HBx gene. The phylogenetic results showed that the HBx encoding sequences in the chronic infected individual had a genetic affinity with genotype D and ayw2 subtype.

Conclusion: Neutrality polymorphism takes place in HBx coding region. Also, the phylogenetic results of the present study are consistent with the previous findings of Golestan province and Iran which have reported the prevalence of genotype D and subspecies ayw2.

Keywords: Hepatitis B virus, HBx, Population genetics, DnaSP, Genotype D, Serotype ayw2

* **Corresponding Author:** Tabarraei A (Ph.D), E-mail: tabarraei@goums.ac.ir

Received 23 Jul 2016

Revised 29 Jan 2017

Accepted 19 Feb 2017