نشریه فرهنگ و ارتقای سلامت فرهنگستان علوم پزشکی
سال چهارم، شماره اول، بهار ۹۹، صفحات ۳۱ تا ۳۸

بررسی فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی ویروس مولد کووید-۱۹ (SARS-CoV-2)

نویسندگان:
معصومه جان‌نثار[۱] و سیدمهدی سیدی[۱و۲*]

چکیده

زمینه و هدف: ظهور بیماری کووید-۱۹ توسط کرونا ویروس SARS-CoV-2 با علائم سندرم حاد تنفسی در ماه دسامبر سال ۲۰۱۹ در شهر ووهان کشور چین، با شیوع بسیار سریع همراه بوده و به سرعت به مرحله همه‌گیری جهانی رسید. این مطالعه با هدف بررسی و معرفی تنوعات ژنتیکی ویروس مولد کووید-۱۹ صورت گرفته است.

روش: بررسی فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی ویروس‌های SARS-CoV-2 شیوع یافته در ایران انجام و با شش کشور منتخب مقایسه شد.

یافته‌ها: بررسی فیلوژنتیکی ویروس SARS-CoV-2 نشان داد که تنوع‌های ژنتیکی ایجاد شده در ژنوم ویروس درحال‌حاضر به حدی نیست که بتواند اختلافات فیلوژنتیکی قابل‌توجهی را بین ژنوم ویروس‌های به‌دست‌آمده از مناطق جغرافیایی گوناگون (در مجموع ۱۹ کشور از قاره‌های مختلف) ایجاد کند ولی می‌تواند خوشه‌بندی‌های متنوعی را شکل دهد. بررسی جهش‌های ویروس SARS-CoV-2 نشان داد که ویروس‌های شیوع‌یافته در ایران دارای شش تنوع ژنتیکی تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن‌های غیرساختاری و ساختاری و یک اضافه شدن (Insertion) شش نوکلئوتیدی در ناحیه ژن RNA-dependent RNA polymerase می‌باشند. مقایسه تنوع‌های ژنتیکی ویروس‌های ایران با شش کشور منتخب مورد بررسی (هند، آمریکا، نپال، ایتالیا، اسپانیا و فرانسه) نشان از منحصربه‌فرد بودن تنوعات ژنتیکی ویروس‌های شیوع‌یافته در ایران دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعات نشان می‌دهد که ارتباط مستقیمی بین جهش‌های رخ داده در ژنوم ویروس SARS-CoV-2 و تغییر در بیماری‌زایی ویروس وجود دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بررسی منظم تنوع ژنتیکی ویروس در هر کشور در طول زمان شیوع این بیماری همه‌گیر می‌تواند داده‌های ارزشمندی را برای ساخت واکسن و دارو در اختیار قرار دهد.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنتیکی، سندرم حاد تنفسی، کووید-۱۹

مقدمه

کرونا ویروس‌ها (CoVs) در پستانداران و پرندگان به‌طورگسترده دیده می‌شوند و به‌طور کلی باعث بروز بیماری‌های تنفسی،گوارشی و گاه بیماری‌های عصبی و یا هپاتیت می‌شوند. کرونا ویروس‌ها معمولاً میزبان خود را به صورت درون‌گونه‌ای آلوده می‌کنند و عفونت‌های حادث شده می‌توانند حاد یا مزمن باشند. عفونت‌ها معمولاً ازطریق مسیر تنفسی و یا از طریق مدفوع و مسیر دهان منتقل می‌شوند(۱).

از جنبه تاریخی، کروناویروس‌ها به عنوان یک خانواده ویروسی جدید در دهه ۱۹۶۰، در پی کشف چندین پاتوژن جدید تنفسی انسان، به‌طور رسمی شناسایی و معرفی شدند(۲). این ویروس‌ها توسط حاشیه (Fringe) مربوط به ساختارهایی در سطح خود به نام اسپایک (Spikes) شناخته می‌شوند(۳). به‌طور تقریبی چهار دهه بعد از شناخت اولیه این ویروس‌ها، ویروسی با مورفولوژی مشابه، جهان را با ظهور پاتوژن جدید تنفسی در انسان روبه‌رو کرد.این کروناویروس، عامل شیوع ویرانگر سندرم حاد تنفسی (SARS) درسال ۲۰۰۲-۲۰۰۳ بود. ظهور ناگهانی SARS باعث شد تا تحقیقات جدیدی برای درک مکانیسم‌های اصلی تکثیر و بیماری‌زایی اعضای این خانواده با هدف کنترل این ویروس‌ها در جهان آغاز شود(۴). شیوع SARS-CoV باعث ابتلای ۸۰۹۶ نفر و مرگ ۷۹۴ نفر شد که درصد مرگ‌ومیر این ویروس ۹/۸ درصد اعلام شد. پس از آن در سال ۲۰۱۲، MERS-CoV شیوع پیدا کرد و در کشورهای خاورمیانه، ۲۲۶۰ نفر را آلوده کرد و میزان مرگ‌ومیر ۳۵/۵ درصد را در انسان موجب شد(۵). هفت سال پس از ظهور بیماری MERS، ظهور بیماری کووید-۱۹ توسط RNA-ویروس SARS-CoV-2، در ماه دسامبر سال ۲۰۱۹ در شهر ووهان استان هوبی، کشور چین با علایم سندرم حاد تنفسی و شیوع گسترده و

۱. عضو کارگروه مرجعیت علمی فرهنگستان علوم پزشکی
۲. *دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

سریع همراه بوده و طی چند ماه با آلوده کردن ۲۱۰ کشور همراه با غافلگیر کردن کشورهای درگیر به مرحله همه‌گیری جهانی رسید. کرونا ویروس‌ها متعلق به راسته Nidovirales و خانواده Coronaviridae و زیرخانواده Orthocoronavirinae هستند و درچهار جنس شامل Alphacoronaviruses، Betacoronaviruses، Gammacoronaviruses و Deltacoronaviruses طبقه‌بندی می‌شوند. همه ویروس‌های راسته Nidovirales پوشش‌دار و دارای ژنوم RNA رشته مثبت بدون تقسیم و همه آن‌ها دارای ژنوم‌های بسیار بزرگی هستند. کرونا ویروس‌ها دارای ژنوم تک رشته مثبت RNA با طولی در حدود ۲۶ تا ۳۲ هزار جفت باز هستند. یکی از بارزترین ویژگی این خانواده ویروسی اندازه ژنوم آن‌ها است. کروناویروس‌ها دارای بزرگ‌ترین اندازه ژنوم در بین تمامی ویروس‌های RNAدار هستند. ژنوم حاوی یک ساختار کلاهک در سر ′۵ و یک دمپلی (A) در سر ′۳ است که به آن اجازه می‌دهد تا به عنوان mRNA برای ترجمه پلی‌پروتیین‌های همانندسازی عمل کند. ژن‌هایreplicase که پروتیین‌های غیرساختاری (nsps) را رمزگذاری می کنند، برخلاف پروتیین‌های ساختاری و جانبی، که فقط حدود kb ۱۰ از ژنوم را تشکیل می‌دهند، دوسوم ژنوم، یعنی اندازه‌ای در حدود kb ۲۰، دارند. ژنوم ویروسی درانتهای ′۵ حاوی توالی leader و ناحیه‌ای غیرکدکننده (UTR) است که شامل چندین ساختار ساقه - حلقه مورد نیاز برای تکثیر و رونویسی RNA است. علاوه بر این، در ابتدای هر ژن ساختاری یا جانبی، توالی‌های تنظیم‌کننده رونویسی (TRSs) قرار دارند که برای بیان و نیز تنظیم بیان هر یک از این ژن‌ها ضروری هستند. UTR ′۳ دارای ساختارهای RNA مورد نیاز برای تکثیر و سنتز RNA ویروسی است. به‌طور کلی سازمان‌بندی ژنوم کرونا ویروس‌ها به صورت زیر است(۱):

5′-leader-UTR-replicase-S (Spike)–E (Envelope)-M (Membrane)-N (Nucleocapsid)-3′UTR-poly (A)

کروناویروس‌ها همچنین دارای تعدادی ژن جانبی (Accessory) پخش‌شده بین ژن‌های ساختاری هستند که پروتیین‌های حاصل از این ژن‌ها به طور تقریبی برای تکثیر در کشت بافت غیرضروری هستند. با این حال نشان داده شده است که بعضی از آن‌ها نقش مهمی در بیماری‌زایی ویروس دارند. تعداد این ژن‌ها در ویروس‌های مختلف متفاوت است[۲]. ویروس نوظهور SARS-CoV-2 گونه جدید از بتا کرونا ویروس‌ها است که ساختار ژنومی معمول کرونا ویروس‌ها را شامل پروتیین‌های ساختاری اسپایک (S)، پوششی (E)، غشایی (M) و نوکلئوکپسید (N) و همچنین چندین پروتیین غیرساختاری و پروتیین‌های جانبی منحصربه‌فرد را دارا می‌باشد (۶).

دانشمندان چینی درحال‌حاضر برای بررسی طیف جهشی ژنوم ویروس مولد کووید-۱۹، توالی یابی بسیار عمیق ژنوم ۱۱ ویروس جدا شده از ۱۱ فرد بیمار را انجام دادند. آن‌ها ۳۳ جهش را شناسایی کردند که از میان آن‌ها ۱۹ جهش به‌طور کامل جدید بوده است. نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی SNPها در ژنوم ویروس مولد کووید-۱۹ بالاست ولی با این حال هنوز ارتباط مستقیم بین هر جهش و تغییر قدرت بیماریزایی ویروس مشخص نشده است. علاوه بر این، آن‌ها شواهدی را ارائه کردند که نشان می‌دهد جهش‌های ویروس SARS-CoV-2 قادر به ایجاد تغییرات قابل توجهی در قدرت بیماری‌زایی آن‌هاست(۷). برآورد دقیق میزان، نوع و محل تنوع ژنتیکی در ژنوم ویروس برای درک تکامل ویروس‌ها و مبارزه با آن‌ها به‌ویژه در زمان مواجهه با یک بیماری همه‌گیر و همچنین ویروسی با خصوصیات ناشناخته بسیار مهم است. در پژوهش حاضر بررسی‌های فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی بر روی ویروس‌های شیوع‌یافته در ایران و مقایسه آن‌ها با سایر کشورهای جهان با هدف روشن نمودن اهمیت و ضرورت چنین مطالعاتی هم در حوزه درمانی و هم در حوزه تولید واکسن صورت گرفته است.

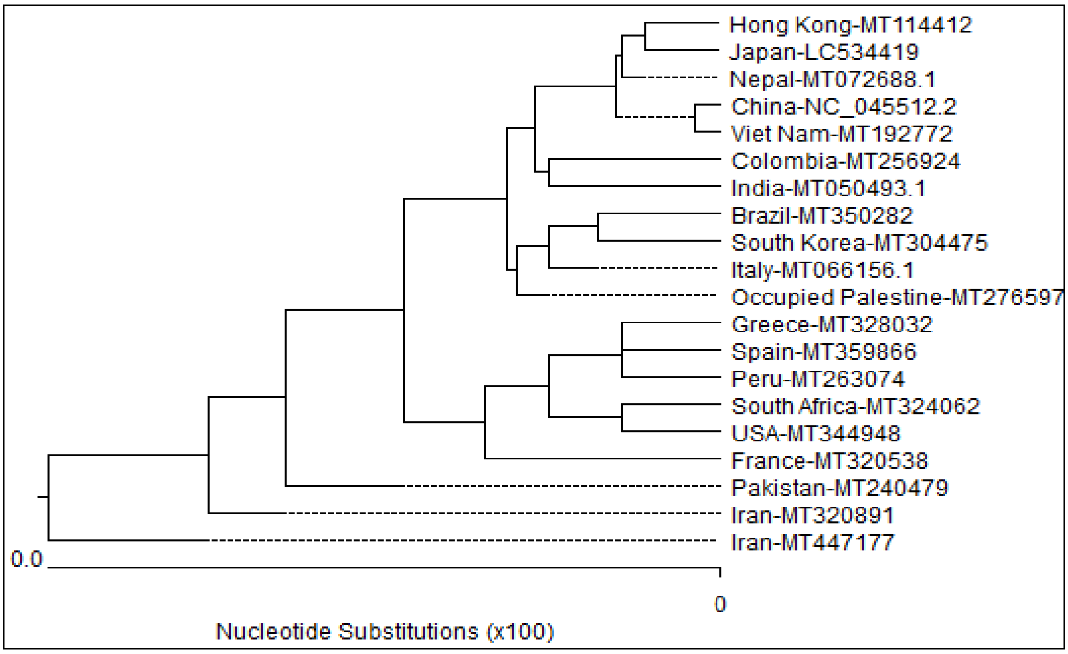
روش کار

جمع‌آوری داده‌ها

توالی ژنوم دو ویروس مولد کووید-۱۹ ثبت شده در بانک ژن NCBI توسط جمهوری اسلامی ایران در تاریخ‌های ۱۳۹۹/۱/۲۲ (ویروس اول) و ۱۳۹۹/۲/۱۹ (ویروس دوم) به ترتیب با شماره دسترسی‌های MT320891 و MT447177 دانلود و ذخیره شد. توالی‌های ژنوم ویروس SARS-CoV-2 ثبت شده در بانک ژن شامل کشورهای چین، هند، ایتالیا، آمریکا، نپال، فرانسه، اسپانیا، ژاپن، هنگ کنگ، ویتنام، کلمبیا، برزیل، کره جنوبی، فلسطین اشغالی، پاکستان، یونان، پرو و آفریقای جنوبی به ترتیب با شماره دسترسی‌های NC_045512.2، MT050493.1، MT066156.1، .MT344948، MT072688.1، MT320538 و MT359866، LC534419، MT114412، MT192772، MT256924، MT350282، MT304475، MT276597، MT240479، MT328032، MT263074 و MT324062 از پایگاه داده NCBI Virus به دست آمد. ژنوم ویروس SARS-CoV-2 به دست آمده از شهر ووهان کشور چین به عنوان رفرنس برای بررسی واگرایی ژنتیکی و تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. توالی ژن‌ها و پروتیین‌های ویروس SARS-CoV-2 از پایگاه داده ViPR(۸) به دست آمد.

آنالیزفیلوژنتیک ویروس مولد کووید-۱۹

برای بررسی تنوع و واگرایی ژنتیکی ژنوم‌های ویروسی به دست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف در مقایسه با ژنوم رفرنس (ژنوم ویروس به دست آمده از شهر ووهان کشور چین)، آنالیز فیلوژنتیک انجام گرفت. درخت فیلوژنتیک با استفاده از توالی تمام ژنوم‌های ویروسی ثبت شده در بانک ژن از طریق نرم افزار DNASTAR MegAlign Version 8.1.2 با استفاده از روش ClustalW ترسیم شد. برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف فاکتور همزمانی نمونه‌های مورد استفاده برای آنالیز تا حد ممکن رعایت شد.



شکل ۱- **درخت فیلوژنتیک حاصل از آنالیز و مقایسه ژنوم ویروس SARS-CoV-2 جدا شده از ۱۹ کشور جهان که در بانک ژن NCBI ثبت شده‌اند**

بررسی تنوع ژنتیکی ویروس کووید-۱۹

برای بررسی تنوع ژنتیکی ویروس‌های کووید-۱۹ شیوع یافته در ایران و مقایسه آن با سایر کشورهای جهان از توالی‌های ژنومی ویروس SARS-CoV-2 مربوط به کشورهای ایران، هند، ایتالیا، آمریکا، نپال، فرانسه و اسپانیا استفاده شد. ژنوم‌ها در فرمت FASTA با استفاده از نرم‌افزار Genome Detective Coronavirus Typing Tool (version 1.1.3)(۹) مورد آنالیز قرار گرفته و جهش‌های آن‌ها در مقایسه با ژنوم ویروس به دست آمده از شهر ووهان کشور چین مورد شناسایی و ارزیابی قرار گرفت.

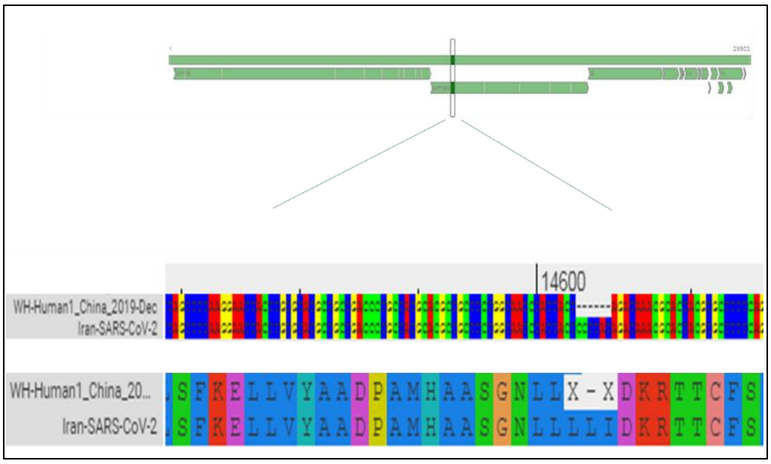
به منظور ارزیابی تأثیر SNPها (تنوعات ژنتیکی تک نوکلئوتیدی) بر پایداری پروتیین های ویروسی، از دو روش پیش‌بینی پایداری پروتیین استفاده شد. در روش اول از سرور I-MUTANT server(۱۰) برای پیش‌بینی پایداری توالی پروتیین در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در روش پیش‌بینی دوم از سرور MuPro(۱۱) استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی فیلوژنتیک

با شیوع بیماری کرونا در جهان، کشورهای مختلف درگیر با این بیماری برای شناسایی بهتر ویروس و نیز در دست داشتن توالی ژنتیکی آن، اقدام به توالی یابی این ویروس از بیماران کشور خود کردند. بسیاری از کشورها توالی ویروس‌های خود را در بانک ژن NCBI ثبت نموده تا مورد استفاده سایر کشورها نیز قرار گیرد. برخی کشورها به توالی یابی ویروس جدا شده از یک فرد بسنده نکرده و اقدام به توالی یابی تعداد زیادی ویروس کرونا نموده‌اند که از جمله می‌توان به آمریکا و چین اشاره داشت. از دلایل مهم توالی‌یابی ویروس مولد کووید-۱۹ (SARS-CoV2) می‌توان به شناسایی منشأ ویروس، ساختار ژنومی آن، و نیز اختلافاتی که با ویروس‌های منتشر شده در سایر کشورهای جهان دارد، اشاره کرد. با توجه به اینکه ساختار ژنومی ویروس‌ها در معرض دو پدیده جهش (mutation) و نوترکیبی (recombination) قرار دارد؛ لذا می‌توان انتظار داشت که شرایط محیطی کشورها و نیز ژنوم افراد درگیر با ویروس بتواند بر این دو پدیده تأثیرگذار باشد. نکته بسیار مهم از جنبه کاربردی مکان‌یابی بروز این دو پدیده از طریق مقایسه توالی با ژنوم ویروس مرجع، (که در اینجا توالی ویروس جدا شده از بیمار ساکن ووهان چین است) می‌باشد. با توجه به اینکه اهمیت تمامی ژن‌های ویروس مولد بیماری کووید-۱۹ در بیماری‌زایی یکسان نیست، لذا مکان‌یابی ژن‌های جهش یافته از جنبه بیماری‌زایی ویروس و نیز مسیرهای درمانی از اهمیت خاصی برخوردار است.

به منظور بررسی فیلوژنتیک ویروس‌ها SARS-CoV-2 تعیین توالی شده از جمهوری اسلامی ایران، توالی کامل ژنوم ویروس مولد کووید-۱۹ ثبت شده از کشورمان و همه کشورهایی که تاکنون توالی این ویروس را در بانک ژن ثبت کرده‌اند که شامل چین، هند، ایتالیا، آمریکا، نپال، فرانسه، اسپانیا، ژاپن، هنگ کنگ، ویتنام، کلمبیا، برزیل، کره جنوبی، فلسطین اشغالی، پاکستان، یونان، پرو و آفریقای جنوبی است، استخراج و برای رسم درخت فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گرفت که نتیجه در شکل ۱ نشان داده شده است. درخت فیلوژنتیک رسم شده در شکل ۱ نشان می‌دهد که تمامی ژنوم‌های مورد استفاده در آنالیز تحت کلاد (clade) SARS-CoV-2 قرارمی‌گیرند. این امر بدین معنی است که شباهت توالی ژنتیکی بین این ژنوم‌ها به حدی زیاد است که نمی‌تواند موجب



شکل ۲- **هم‌ردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ژنوم ویروس (ویروس اول) مولد بیماری کووید-۱۹ شیوع یافته در ایران با ویروس ووهان، جایگاه Insertion شش نوکلئوتیدی و تغییرات آمینو اسیدی احتمالی را در توالی ژنوم ویروس ایران نشان می‌دهد.**

جدایی فیلوژنتیکی براساس مبدأ جغرافیایی آن‌ها شود، ولی گروه‌بندی‌های متنوعی بین کشورهای همسایه و غیرهمسایه قابل مشاهده است. به عنوان مثال، دو توالی متعلق به ایران و توالی پاکستان به عنوان دو کشور همسایه شاخه‌های نزدیک به یکدیگر را در درخت تشکیل داده‌اند. از طرف دیگر، آمریکا و آفریقای جنوبی به عنوان دو کشور غیرهمسایه موجود در دو قاره مجزا در یک خوشه قرار گرفته‌اند. علاوه براین، درخت فیلوژنتیک واگرایی ژنتیکی ویروس SARS-CoV-2 منتشر شده در کشورهای مختلف نسبت به ویروس ووهان را نشان می‌دهد.

بررسی تنوع ژنتیکی

به منظور بررسی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی ویروس، ژنوم ویروس‌های SARS-CoV-2 از جمهوری اسلامی ایران در مقایسه با ویروس ووهان (کشور چین) آنالیز شد. نتایج این بررسی نشان داد که هر دو ویروس توالی‌یابی شده از کشورمان ۹۹/۹ درصد با ویروس ووهان شباهت دارد. با این حال، آنالیز بیشتر ویروس توالی‌یابی شده از جمهوری اسلامی ایران در مقایسه با ویروس ووهان نشان داد که ژن‌های orf1ab polyprotein، nsp2، nsp6، 3'-to-5'exonuclease و orf1a polyprotein در ویروس اول و ژن‌های orf1ab polyprotein، nsp2، 2′-O-ribose، Surface glycoprotein، Nucleocapsid phosphoprotein در ویروس دوم دارای SNP هستند (جدول ۱). ژن‌های ساختاری و غیر ساختاری فوق‌الذکر در فرآیند های حیاتی ویروس، مانند تکثیر، همانندسازی و ویرولانس آن، نقش اساسی دارند. به عنوان نمونه، گلیکوپروتیین اسپایک (Surface glycoprotein) موجود بر روی سطح بیرونی کرونا ویروس‌ها مسئول اتصال و ورود ویروس به سلول‌های میزبان است. برهم‌کنش پروتیین اسپایک و گیرنده سلول میزبان نقش تعیین‌کننده در آلوده کردن یک گونه میزبانی خاص و همچنین کنترل تروپیسم بافتی ویروس دارد (۱۷). بنابراین جهش در این ژن‌ها می‌تواند بر میزان ویرولانس ویروس مولد بیماری کووید-۱۹ تاثیر گذار باشند. علاوه براین، orf1ab بزرگ‌ترین ژن SARS-CoV-2 بوده که پلی‌پروتیین pp1ab و ۱۵ nsp را رمزگذاری می‌کند. RNA-dependent RNA polymerase یک پروتیین ویروسی با نقش آنزیمی است که در تکثیر ویروس نقش اساسی دارد. علاوه بر جهش‌های تک نوکلئوتیدی، مقایسه ژنوم ویروس اول به دست آمده از جمهوری اسلامی ایران با ژنوم ویروس ووهان، اضافه شدن شش نوکلئوتید را به ترتیب در جایگاه های ۴۷۸۱ و ۳۸۹ پلی پروتیین pp1ab و پروتیین RNA-dependent RNA polymerase نشان داد (شکل ۲).

یکی از نکات بسیار مهم در خصوص بیماری کووید-۱۹، سرعت شیوع و بیماری‌زایی این ویروس است که می‌تواند به توالی ژن‌های ویروس ارتباط داشته باشد. با توجه به اینکه سرعت شیوع و بیماری‌زایی این ویروس در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت گزارش شده، شاید بتوان این امر را تا حدودی با تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در ژنوم ویروس طی شیوع بیماری مرتبط دانست. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی وابسته به منشأ جغرافیایی، نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی ویروس‌های مولد کووید-۱۹ با منشأ ایرانی با نتایج به دست آمده از ژنوم‌های ویروسی هند، ایتالیا، آمریکا، نپال، فرانسه واسپانیا مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. در واقع این جدول فهرستی از SNPهای توالی‌های ویروس و تغییراتی که در توالی ژن‌های هر یک و در نتیجه آمینو اسیدهای پروتیین‌ها رخ داده را براساس توالی ثبت شده ویروس در بانک ژن جهانی نشان می‌دهد. نتیجه جالب توجه این است که ویروس‌ها با منشأ جغرافیایی متفاوت، دارای جهش‌های منحصر به فردی می‌باشند. مقایسه تعداد جهش‌ها رخ داده در بین ژنوم ویروس‌های مورد مطالعه (جدول ۱) نشان داد که بیشترین جهش‌ها بدون احتساب جهش‌های

جدول ۱- **مقایسه SNPهای ویروس SAR-CoV2 از جمهوری اسلامی ایران با هند، آمریکا، نپال، ایتالیا، اسپانیا و فرانسه. NA به معنی مشخص نشده می‌باشد**

Proteins	SARS-CoV2/Iran (MT320891)	SARS-CoV2/Iran (MT447177)	SARS-CoV2/India (MT050493.1)	SARS-CoV2/US (MT344948)	SARS-CoV2/Nepal (MT072688.1)	SARS-CoV2/Italy (MT066156.1)	SARS-CoV2/Spain (MT359866)	SARS-CoV2/France (MT320538)
orf1ab polyprotein	V378I (1397G>A), L3606F(11083G>T), T6038I(18377C>T)	V378I (1397G>A), G6875R (20887G>A	I476V(1691A>G), P2079L(6501C>T), T5538I(16877C>T)	P4715L (14408C>T)	NA	L3606X(11083G>N)	P4715L (14408C>T)	Y118C (618A>G) P4715L (14408C>T)
Leader protein	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y118C (618A>G)
nsp2	V198I(1397G>A)	V198I (1397G>A)	I296V(1691A>G)	NA	NA	NA	NA	NA
nsp3	NA	NA	P1261L(6501C>T)	NA	NA	NA	NA	NA
nsp4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3C-like proteinase	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
nsp6	L37F(11083G>T)	NA	NA	NA	NA	L37X(11083G>N)	NA	NA
nsp7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
nsp8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
nsp9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
nsp10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
RNA-dependent RNA polymerase	NA	NA	NA	P323L (14408C>T)	NA	NA	P323L (14408C>T)	P323L (14408C>T)
helicase	NA	NA	T214I(16877C>T)	NA	NA	NA	NA	NA
-3'-to-5'exonuclease	T113I(18377C>T)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
endoRNAse	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2′-O-ribose	NA	G77R (20887G>A)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Methyltransferase	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
orf1a polyprotein	V3781(1397G>A), L3606F(11083G>T)	NA	I476V (1691A>G), P2079L (6501C>T)	NA	NA	L3606X(11083G>N)	NA	Y118C (618A>G)
nsp11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Surface glycoprotein	NA	T22I (21627C>T)	A930V(24351C>T)	D614G (23403A>G)	NA	NA	D614G (23403A>G)	D614G (23403A>G)
ORF3a protein	NA	NA	NA	NA	NA	G251V(26144G>T)	NA	NA
Envelope protein	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Membrane glycoprotein	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ORF6 protein	NA	NA	NA	NA	NA	NA	N34S (27302A>G)	NA
ORF7a protein	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ORF7b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ORF8 protein	NA	NA	L84S(28144T>C)	L84S(28144T>C)	NA	NA	NA	NA
Nucleocapsid phosphoprotein	NA	S186F (28830C>T)	NA	S194L (28854C>T)	NA	NA	R203K (28881G>A 28882G>A), G204R (28883G>C)	NA
ORF10 protein	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

مربوط به orfها به ترتیب متعلق به ویروس به دست آمده از هند، اسپانیا، ایران (ویروس دوم) و آمریکا به ترتیب با ۵، ۵، ۴ و ۴ جهش و سپس فرانسه با ۳ جهش و کمترین جهش ها متعلق به ایتالیا (۲ جهش) می‌باشد. ویروس نپال فاقد جهش است و لذا شباهت ۱۰۰ درصدی به ویروس ووهان را نشان می‌دهد.

علاوه بر SNP، وجود تنوعات ژنتیکی چند نوکلئوتیدی به صورت حذف یا اضافه نیز در ژنوم‌های مورد مطالعه بررسی و مقایسه شد. از میان این ۷ ژنوم ویروسی مربوط به کشورهای مختلف فقط ایران (ویروس اول) و فرانسه به ترتیب هر کدام دارای یک تنوع ژنتیکی شامل اضافه شدن ۶ نوکلئوتید ((X389L (14606_14607insCCTTAT) در ناحیه ژن polymeraseRNA-dependent RNA و حذف شدن ۳ نوکلئوتید ((G107del (21881_21883delGGT) در ناحیه ژن surface glycoprotein بودند. تنوعات ژنتیکی مشاهده شده در ژنوم ویروس‌های شیوع یافته در ایران منحصربه فرد بوده و در ژنوم های ویروسی مربوط به ۶ کشور دیگر مشابه آن یافت نمی‌شود. وجود SNP در ژن‌های 3'-to-5'exonuclease (ویروس اول) و 2′-O-ribose (ویروس دوم) به صورت اختصاصی فقط در ژنوم‌های ویروسی کشورمان قابل مشاهده می‌باشد.

بررسی تأثیر جهش بر پایداری پروتیین

تأثیر تنوعات ژنتیکی تک نوکلئوتیدی در پایداری پلی‌پروتیین‌ها و

جدول ۲- پیش‌بینی اثر جهش‌های تک نوکلئوتیدی بر پایداری پروتیین‌های ویروس اول SARS-CoV-2 شیوع‌یافته در جمهوری اسلامی ایران با شماره دسترسی MT320891

Proteins	Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	Protein stability
orf1ab polyprotein	V378I (1397G>A)	Decrease (G= -0.479)
	L3606F(11083G>T)	Decrease (G= -1.292)
	T6038I(18377C>T)	Decrease (G= -0.114)
nsp2	V1981(1397G>A)	Decrease (G= -0.479)
nsp6	L37F(11083G>T)	Decrease (G= -1.292)
3′-to-5'exonuclease3	T113I(18377C>T)	Decrease (G= -0.114)
orf1a polyprotein	V3781(1397G>A)	Decrease (G= -0.479)
	L3606F(11083G>T)	Decrease (G= -1.292)

جدول ۳- پیش‌بینی اثر جهش‌های تک نوکلئوتیدی بر پایداری پروتیین‌های ویروس دوم SARS-CoV-2 شیوع‌یافته در جمهوری اسلامی ایران با شماره دسترسی MT447177

Proteins	Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	Protein stability
orf1ab polyprotein	V378I (1397G>A)	Decrease (G= -0.479)
	G6875R (20887G>A)	Decrease (G= -0.587)
nsp2	V378I (1397G>A)	Decrease (G= -0.479)
2′-O-ribose	G6875R (20887G>A)	Decrease (G= -0.587)
Surface glycoprotein	T22I (21627C>T)	Decrease (G= -0.320)
Nucleocapsid phosphoprotein	S186F (28830C>T)	Decrease (G= -0.47)

پروتیین‌های ویروسی با استفاده از روش محاسباتی و نرم افزاری، مورد بررسی و پیش‌بینی قرار گرفت. تجزیه‌وتحلیل جهش‌های تک نوکلئوتیدی همان‌طور که در جدول ۲ و ۳ قابل مشاهده است نشان داد که تمام جهش‌های تک نوکلئوتیدی ویروس‌های SARS-CoV-2 شیوع‌یافته در ایران می‌تواند پایداری پلی‌پروتیین ها و پروتیین‌های ویروسی را کاهش دهد. بنابراین، ادامه این جهش‌ها طی زمان شاید بتواند بر عملکرد پروتئین بیشتر تأثیرگذار باشد.

نتیجه‌گیری

توجه به این نکته ضروری است که سرعت جهش در ویروس‌های RNA (۱۲) از جمله SARS-CoV-2 بالاست. میزان جهش ویروس SARS-CoV-2، $۱۰^{-۳}$ × ۱/۱۹ تا $۱۰^{-۳}$× ۱/۳۱ تعویض در هر سایت در هر سال، محاسبه شده است که تقریباً با میزان جهش تخمین زده شده برای ویروس مولد بیماری مرس (MERS-CoV) مشابه است (۱۳ و ۱۴) که این امر می‌تواند از ویروس SARS-CoV-2 شیوع یافته اولیه یک جمعیت ویروسی بزرگ با ژنوم‌های تغییر یافته را ایجاد کند. میانگین جهش‌های SNP این هفت کشور مورد مطالعه در پژوهش حاضر ۳/۲۵ جهش است. این نتیجه با نتایج دانشمندان چینی که ۳۳ جهش را در ۱۱ نمونه ویروسی به دست آمده از بیماران مختلف یعنی به‌طور میانگین ۳ جهش برای هر ژنوم ویروسی گزارش کردند مشابه است (۷). با توجه به اینکه ارتباط زیادی بین زمان نمونه گیری و میزان تنوع ژنتیکی در ژنوم ویروس کووید-۱۹ وجود دارد، مطابقت میانگین تعداد جهش‌های محاسبه شده در پژوهش حاضر و پژوهش یاد شده احتمالا می‌تواند به همزمانی تقریبی نمونه‌ها در این دو پژوهش مربوط باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که دو ژن ساختاری اسپایک (S) و نوکلئوکپسید (N) در انتقال ویروس بسیار مهم هستند به نحوی که جهش در این ژن‌ها می‌تواند در پایداری و بیماری‌زایی ویروس مؤثر باشد (۱۵). در میان هفت کشور مورد بررسی در این مطالعه، ایران (ویروس دوم) و آمریکا دارای یک جهش و اسپانیا دارای دو جهش در ژن نوکلئوکپسید است. در مورد ژن اسپایک نیز، ایران (ویروس دوم)، هند، آمریکا، اسپانیا و فرانسه دارای جهش می‌باشند. با توجه به نقش اساسی پروتیین اسپایک در اتصال به گیرنده سلول میزبان و تعیین تروپیسم بافتی ویروس و در نتیجه بیماری‌زایی ویروس، برخی از محققان هندی بر این باورند که دلیل پایین بودن بیماری‌زایی این ویروس در هند می‌تواند به این جهش منحصر به فرد ژن اسپایک ویروس هند وابستگی داشته باشد. بررسی Anti-viral-miRNAها و بر هم‌کنش آن‌ها با ژنوم ویروس SARS-CoV-2در هند نشان داد که به‌طور ویژه hsa-mir-27b تنها به ژنوم ویروس هندی و به‌طور اختصاصی به ناحیه جهش‌یافته در پروتیین اسپایک اتصال می‌یابد. در مطالعات قبلی اثر بازدارنده این miRNA بر همانندسازی ویروس HIV به اثبات رسیده بود که شاید روشن‌کننده دلیل مؤثر بودن تیمارهای ضد HIV برای درمان بیماری کووید-۱۹ در هند باشد(۱۶).

مطالعه الگو و نوع جهش‌ها به منشأیابی ویروس، کمک زیادی می‌کند. SNP (V198I(1397G>A)) مربوط به پروتیین nsp2 مشترک بین نمونه‌های ویروسی اول و دوم از کشورمان، منشأ مشترک این دو ویروس را نشان

می‌دهد. علاوه براین، SNPهای (P323L (14408C>T)) مربوط به پروتیین RNA-dependent RNA polymerase و D614G (23403A>G) مربوط به پروتیین اسپایک بین نمونه‌های ژنوم ویروسی فرانسه، اسپانیا و آمریکا کاملاً مشترک هستند. با توجه به اینکه طبق گزارش‌های WHO (۱۷) اولین گزارش بیماری کووید-۱۹ قاره اروپا به این سازمان از فرانسه در تاریخ ۲۴ ژانویه مربوط به سه بیمار سفر کرده به ووهان بوده است، می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از ویروس شیوع یافته در اسپانیا از فرانسه منشأ گرفته است. از طرف دیگر می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از ویروس شیوع یافته در آمریکا از اروپا منشأ گرفته و به‌طور مستقیم منشأ آن به چین باز نمی‌گردد.

نتایج مطالعات دانشمندان چینی نشان می‌دهد که شواهد مستقیمی بین جهش‌های رخ داده در ژنوم ویروس SARS-CoV-2 و تغییر در بیماری‌زایی ویروس وجود دارد (۷). الگوی جهش‌ها و فراوانی آن‌ها در میزبان‌ها، کشورها و زمان‌های مختلف می‌توانند بسیار متفاوت باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بررسی منظم و دقیق تنوع ژنتیکی ویروس در هر کشور یا منطقه جغرافیایی در طول زمان شیوع این بیماری پاندمیک می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را از تغییرات ژنتیکی وابسته به زمان شیوع در اختیار قرار دهد که مطمئناً این تغییرات با قدرت بیماری‌زایی و سرعت شیوع ویروس مطابقت خواهد داشت. از طرف دیگر این داده‌ها برای ساخت واکسن و دارو و حتی برای تجویز داروی مناسب نیز بسیار ضروری و سودمند هستند.

Phylogenetic and Genetic Diversity of SARS-CoV-2 Virus

Masoomeh Jannesar[1], Seyed Mahdi Seyedi[1,2]*

Abstract

Background: The incidence of COVID-19 by the coronavirus SARS-CoV-2 with symptoms of acute respiratory syndrome in December 2019 in Wuhan, China, has spread rapidly and change to a global epidemics.

Methods: SARS-CoV-2 virus phylogenetic study performed to identify the genetic diversity of the prevalent viruses in Iran and compared with 6 selected countries.

Results: Phylogenetic study of SARS-CoV-2 virus showed the genetic variations generated in the virus genome are not currently sufficient to distinguish significant phylogenetic differences between the genome of viruses obtained from different geographical areas (19 countries from different continents) but can form variety of clusters. A study of the SARS-CoV-2 virus mutations showed that the prevalent viruses in Iran had six single-nucleotide (SNP) genetic variations in non-structural and structural genes and one insertion of six nucleotides in the RNA-dependent RNA polymerase gene region. Comparing the genetic variations of viruses in Iran with the six selected countries (India, the United States, Nepal, Italy, Spain and France) indicate the uniqueness of genetic variations of the prevalent viruses in Iran.

Conclusion: Studies show that is a direct connection between mutations in the SARS-CoV-2 virus genome and changes in pathogenesis. Therefore, regular assessment of the virus genetic diversity in each country can provide valuable data for the development of vaccines and drugs.

Keywords: Acute Respiratory Syndrome, COVID-19, Genetic Variation

منابع

1. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Coronaviruses 2015; 1282: 1-23.
2. Almeida JD, Tyrrell D. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. Journal of General Virology 1967; 1(2): 175-178.
3. Berry D, Cruickshank J, Chu H, Wells R. The structure of infectious bronchitis virus. Virology 1964; 23(3): 403-407.
4. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. New England journal of medicine 2003; 348(20): 1953-1966.
5. Kim K, Tandi T, Choi JW, Moon J, Kim M. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) outbreak in South Korea, 2015: epidemiology ,characteristics and public health implications. Journal of Hospital Infection 2017; 95(2): 207-213.
6. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. Journal of Advanced Research 2020; 24: 91-98.
7. Yao H, Lu X, Chen Q, Xu K, Chen Y, Cheng L, et al. Patient-derived mutations impact pathogenicity of SARS-CoV-2. 2020. Available at: medrxiv.org
8. Pickett BE, Sadat EL, Zhang Y, Noronha JM, Squires RB, Hunt V, et al. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. Nucleic acids research 2012; 40(D1): D593-D598.
9. Cleemput S, Dumon W, Fonseca V, Karim WA, Giovanetti M, Alcantara LC, et al. Genome Detective Coronavirus Typing Tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. Bioinformatics 2020.
10. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2. 0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. Nucleic acids research 2005; 33(suppl_2): W306-W310.

1. Member of Scientific Leadership Working Group, Academy of Medical Sciences, IR Iran
2. *National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, IR Iran

11. Cheng J, Randall A, Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2006; 62(4): 1125-1132.
12. Leaf-nosed bat. Encyclopædia Britannica: Encyclopædia Britannica Online. 2009. Available at: britannica.com.
13. Cotten M, Watson SJ, Zumla AI, Makhdoom HQ, Palser AL, Ong SH, et al. Spread, circulation, and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. MBio 2014; 5(1): e01062-13.
14. Li X, Zai J, Zhao Q, Nie Q, Li Y, Foley BT, et al. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. Journal of medical virology 2020; 92: 602-611.
15. Baric RS, Yount B, Hensley L, Peel SA, Chen W. Episodic evolution mediates interspecies transfer of a murine coronavirus. Journal of virology 1997; 71(3): 1946-1955.
16. Sardar R, Satish D, Birla S, Gupta D. Comparative analyses of SAR-CoV2 genomes from different geographical locations and other coronavirus family genomes reveals unique features potentially consequential to host-virus interaction and pathogenesis. 2020. Available at: biorxiv.org.
17. Fehr, A.R., Perlman S., Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Methods Mol Biol 2015; 1282: 1-23.
18. http://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/ coronavirus-covid19/news/news/ 2020/01/2019-ncov-outbreak-first-cases-confirmed-in-europe