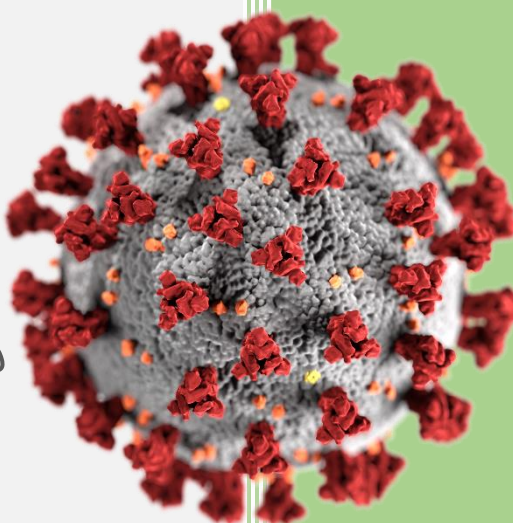


دانشگاه تربیت مدرس



دیده‌بانی علمی بیماری کووید ۱۹

گزارش علمی



Scientific Report

کووید ۱۹؛ حاصل دستکاری‌های ژنتیکی یا انتخاب طبیعی؟

دکتر صادق باباشاه^۱، ملاحظ داودی مقدم^۲، نسترن رکن‌آبادی^۳، سیده سائنا سیف‌زاده^۴

استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی

babashah@modares.ac.ir

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی

دانشگاه تربیت مدرس

فضای مجازی آمیخته از اطلاعات علمی و شبه علمی است که ممکن است باعث سردرگمی استفاده‌کنندگان شود. هدف از این سلسله مباحث علمی، ارائه اطلاعات معتبر، دارای شناسنامه و تهیه شده توسط اساتید درباره کووید ۱۹ می‌باشد.

۱۱ خرداد ۱۳۹۹

برای دسترسی به آرشیو گزارش‌ها به لینک زیر مراجعه فرمایید:

<https://modares.ac.ir/~covid>

گروه مطالعات علم و فناوری - ۳۵

کروناویروس سندرم حاد تنفسی ۲ (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) که برای اولین بار، دسامبر ۲۰۱۹ در ووهان چین کشف شده است، عضو خانواده کروناویروس می‌باشد. این خانواده شامل ۴ جنس آلفا، بتا، گاما و دلتا بوده و SARS-CoV-2 متعلق به دسته‌ی بتاکروناویروس است. قطر این ویروس ۱۲۵-۶۵ نانومتر می‌باشد و هفتمین کروناویروس شناخته شده است که باعث ایجاد عفونت در انسان می‌شود. ژنوم آن RNA تک‌رشته مثبت بوده و اندازه‌ی آن تقریباً ۳۰ کیلوباز می‌باشد [۱، ۲].

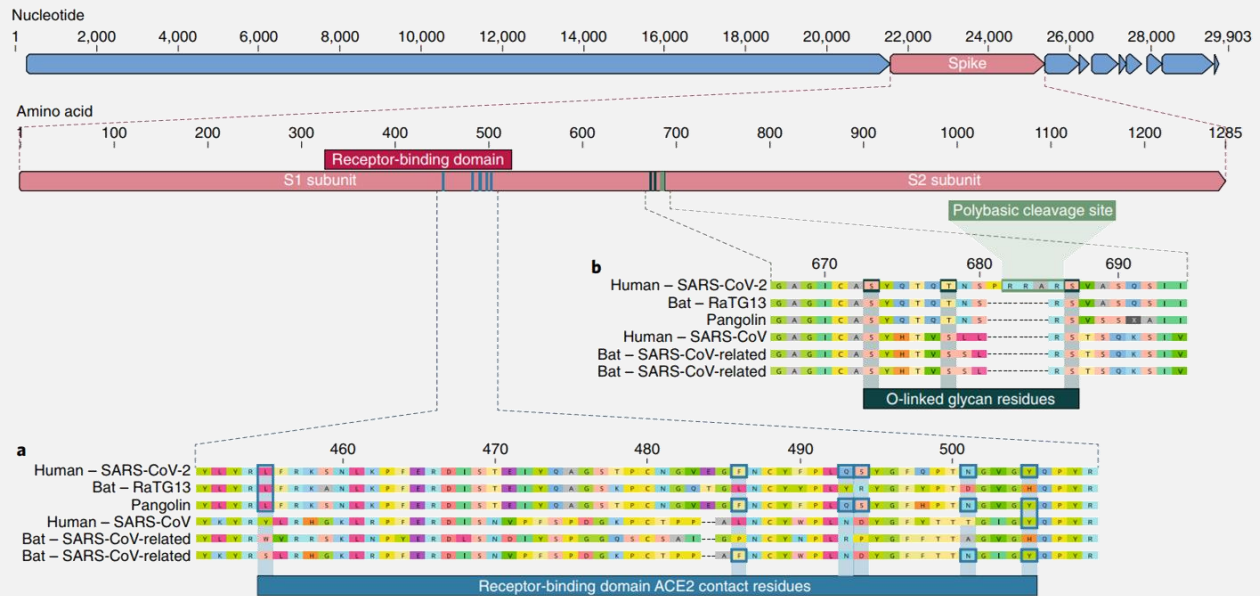
به طور کلی در کروناویروس‌ها، ژن‌های خاصی در ناحیه پایین دست ORF1 وجود دارند. این ژن‌ها پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در همانندسازی ویروسی، ساخت نوکلئوکپسید و Spike نقش دارند [۳]. ویروس SARS-CoV-2 دارای پروتئین ساختاری مهمی در سطح غشا خود به نام Spike است که این پروتئین دارای دو زیرواحد S1 و S2 می‌باشد. زیرواحد S1 با حدود ۱۹۳ آمینواسید از طریق دومین متصل‌شونده به گیرنده یا RBD (Receptor binding domain) و زیرواحد S2 با اتصال دو دومین پشت سر هم یا Tandem Domains (HR1 و HR2) باعث ایجاد عفونت در میزبان می‌شوند [۴، ۵] (شکل ۱).

RBD با تمایل بالا به گیرنده آنزیم ACE2 یا Angiotensin-Converting Enzyme2 در انسان، موش خرما، گربه و گونه‌هایی که همولوژی بالایی در گیرنده‌شان با گونه‌های ذکر شده دارند، متصل می‌شود. ریشه‌ی گلوتامین ۳۹۴ در RBD ویروس توسط ریشه‌ی لیزین ۳۱ در ACE2 میزبان شناسایی می‌شود. علاوه بر این، تمایل اتصال به ACE2 می‌تواند از طریق یک جهش N501T در پروتئین spike افزایش یابد [۱، ۳].

گزارش شده است که تمایل بالای پروتئین Spike به ACE2 به احتمال زیاد به دلیل انتخاب طبیعی بر روی گیرنده ACE2 انسانی می‌باشد؛ این گفته می‌تواند از زمره شواهد محکمی باشد که این ویروس جدید حاصل یک دستکاری هدفمند نمی‌باشد.

در این ویروس یک ناحیه در محل اتصال زیرواحد S1 و S2، به نام ناحیه برش چندبازی یا RRAR وجود دارد که محلی برای برش آنزیم فورین (Furin) و بقیه پروتئازهاست و در تعیین عفونت‌زایی و محدوده‌ی میزبانی ویروس نقش دارد. به علاوه آزمایشات نشان می‌دهد که الحاق محل برش فورین در ناحیه اتصال S1-S2 باعث افزایش اتصال سلول به سلول، بدون اثر بر روی ورود ویروس به سلول می‌شود [۱]. علی‌رغم اینکه وجود گلیکان‌های O-linked در محل برش این ویروس جدید باعث اختصاصی شدن این ناحیه می‌شود؛ اما عملکرد این گلیکان‌ها هنوز مشخص نشده است ولی پیش‌بینی می‌شود که دومینی شبه‌موسینی ایجاد می‌کند که باعث محافظت از اپی‌توپ‌ها یا ریشه‌های کلیدی پروتئین Spike می‌شود [۱].

پروتئین Spike در SARS-CoV-2 در ناحیه RBD ساختاری سه‌بعدی به خود گرفته است تا با حداکثر نیروی واندروالس، خود را حفظ کند. این پروتئین در ویروس SARS-CoV-2 دچار نوترکیبی همولوگوس شده و تبدیل به گلیکوپروتئینی ترکیبی، از یک SARS-CoV و BETA-CoV ناشناخته شده است [۳].



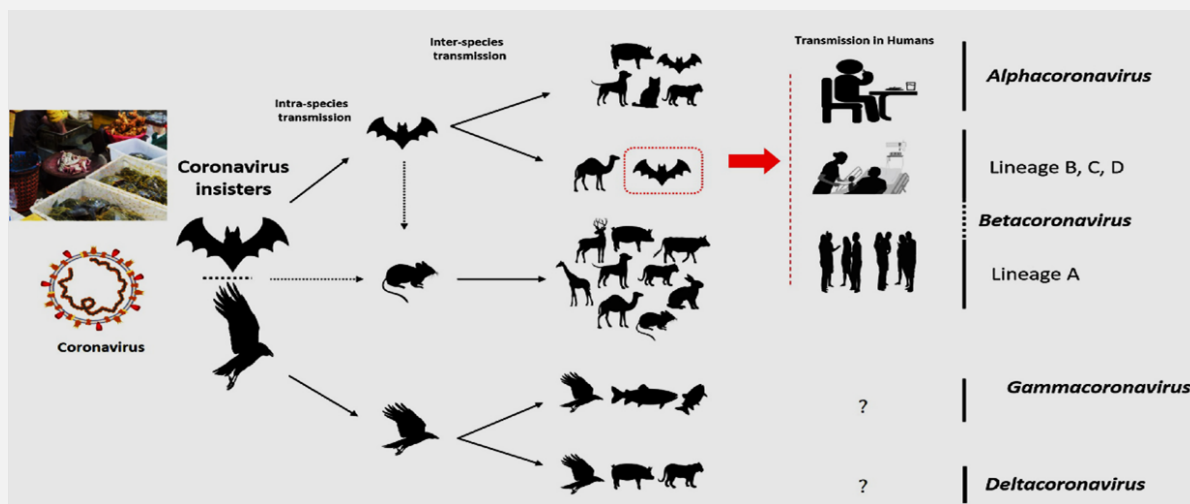
شکل ۱. خصوصیات پروتئین Spike. جایگاه برش چندبازی و گلیکان O-linked در کروناویروس انسانی و کروناویروس‌های مرتبط با آن نشان داده شده‌اند [۱].

مخازن اولیه و میزبان‌های کروناویروس‌ها

شناسایی منشأ شکل‌گیری و انتقال ویروس، اهمیت زیادی در ایجاد استراتژی‌های پیشگیرانه در راستای مهار عفونت دارد. در مطالعات در مورد ویروس SARS-CoV، ابتدا محققان بر روی سگ‌های راکون (Raccoon Dogs) و گربه‌های زیاد نخلی (Palm Civets)، به عنوان مخزن کلیدی عفونت، تمرکز کردند. با این حال، مثبت بودن نتایج تشخیص RNA ویروسی تنها در نمونه‌های جدا شده از زبادهای بازار مواد غذایی، حاکی از آن بود که زیاد نخلی ممکن است که یک میزبان ثانویه باشد. در سال ۲۰۰۱، در کشور هنگ‌کنگ، از افراد سالم نمونه‌گیری شد و ارزیابی‌های مولکولی به میزان ۲٫۵٪ فراوانی آنتی‌بادی علیه ویروس کرونا SARS را نشان داد. این نتایج، نشان‌دهنده آن بود که احتمالاً قبل از شیوع بیماری در سال ۲۰۰۳، ویروس کرونا در بین انسان‌ها در حال گردش بوده‌است. بعدها، با پیدا شدن آنتی‌بادی anti-SARS-CoV در خفاش‌های رینولوفوس، نشان داده شد که خفاش‌ها می‌توانند منبع تکثیر ویروسی باشند. کروناویروس سندروم تنفسی

خاورمیانه (MERS)، در سال ۲۰۱۲ برای اولین بار در عربستان سعودی پدیدار شد. این ویروس متعلق به گروه بتاکروناویروس بوده و منبع یا میزبان اولیه جانوری آن، شتر می‌باشد. در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شد، کروناویروس MERS در خفاش‌های پیپسترلوس و پرمیوتیس نیز یافت شد. این موارد پیشنهاد می‌کند که خفاش‌ها میزبان کلیدی و واسطه انتقال ویروس هستند [۳].

در ابتدای مطالعه بر روی کروناویروس جدید، گروهی از محققان اظهار کردند که ماها می‌توانند یک میزبان احتمالی باشند اما پس از کشف تشابهات ژنتیکی بین کروناویروس جدید و ویروس شبه‌کروناوی خفاش‌ها، این فرضیه که خفاش‌ها میزبان این ویروس هستند تقویت شد. آنالیزهای نوترکیبی همولوگ نشان داد که Spike در کروناویروس جدید از یک SARS-CoV (CoVZXC21 یا CoVZC45) و یک Beta-CoV ناشناخته تکامل یافته است [۳] (شکل ۲).



شکل ۲. این شکل میزبان‌های اصلی کروناویروس را نشان می‌دهد. تنها کروناویروس بتا و آلفا می‌توانند باعث عفونت‌زایی در انسان شوند [۳].

مقایسه پروتئین و ژنوم ویروس‌های کرونا

در مطالعات متعددی محققان به بررسی میزان شباهت SARS-CoV-2 و دیگر کروناویروس‌ها پرداختند. هنگامی که محققان SARS-CoV-2 و SARS-CoV را در سطح آمینواسید مقایسه کردند، دریافتند که SARS-CoV-2 نسبتاً شبیه به SARS-CoV بوده اما تفاوت‌های قابل توجهی در پروتئین‌های 8a، 8b و 3b مشاهده شد. همچنین مقایسه SARS-CoV-2 و MERS-CoV نشان داد که این دو ویروس کمتر بهم مرتبط هستند [۶]. داده‌های درخت فیلوژنتیکی که براساس کل

ژنوم ترسیم شده بود نیز نشان داد که SARS-CoV-2 به موازات کروناویروس‌های شبه SARS خفاش قرار گرفته‌است؛ در حالی که SARS-CoV از دودمان کروناویروس‌های شبه SARS خفاش حاصل شده‌است. این مسأله نشان می‌دهد که براساس توالی‌یابی کل ژنوم، SARS-CoV-2 به کروناویروس‌های شبه SARS خفاش نسبت به SARS-CoV شباهت بیشتری دارد [۶].

آنالیز ژنومی نمونه‌های گرفته شده از ۹ بیمار نیز تأیید کرد که SARS-CoV-2 شباهت بیشتری به دو کروناویروس شبه SARS خفاش (bat-SL-CoVZC45 و bat-SL-CoVZXC21)، نسبت به SARS-CoV و MERS-CoV دارد. در سطح کل ژنوم، SARS-CoV-2 به میزان ۸۷٫۹۹٪ دارای تشابه توالی با bat-SL-CoVZC45 و ۸۷٫۲۳٪ تشابه توالی با bat-SL-CoVZXC21 بوده و از نظر ژنتیکی تشابه کمتری با SARS-CoV (حدود ۷۹٪) و MERS-CoV (حدود ۵۰٪) دارد [۶]. در سطح پروتئین، طول بیشتر پروتئین‌های کدشده توسط SARS-CoV-2، bat-SL-CoVZC45 و bat-SL-CoVZXC21، با تفاوت در تنها تعداد اندکی اضافه و حذف‌های کوچک، با هم مشابه بودند. با وجود آن که SARS-CoV-2 در سطح کل ژنوم به bat-SL-CoVZC45 و bat-SL-CoVZXC21 بیشتر نزدیک بود اما دومین متصل‌شونده به گیرنده در SARS-CoV-2، واقع در دودمان B به SARS-CoV نزدیک‌تر بود [۶].

ناحیه کوتاهی از RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) ویروس SARS-coV-2 و نوعی ویروس کرونا در خفاش BatCoV (RaTG13) که قبلاً در خفاش‌های رینولوفوس پیدا شده بود، شباهت زیادی داشتند. پس از توالی‌یابی RNA ژنومی این ویروس و مقایسه آن با ژنوم SARS-CoV-2، ۹۶٫۲٪ شباهت ژنومی بین این دو مشاهده شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی بر روی کل طول ژنوم RdRp و Spike نشان داد که RaTG13 نزدیک‌ترین خویشاوند SARS-CoV-2 بوده و این دو ویروس از دودمانی متمایز از دیگر SARS-CoV‌ها منشأ گرفته‌اند. ارتباط فیلوژنتیکی نزدیک SARS-CoV-2 و RaTG13 می‌تواند شاهی باشد مبنی بر آن که خفاش‌ها منشأ SARS-CoV-2 می‌باشند [۷].

در مطالعه‌ای محققان شواهد ژنومی و تکاملی وقوع ویروس، کروناویروس شبه SARS-CoV-2 (که Pangolin-CoV نامیده می‌شود) را در مورچه‌خوارهای مرده مالایی پیدا کردند. این ویروس به ترتیب ۹۱٫۰۲٪ و ۹۰٫۵۵٪ به SARS-CoV-2 و BatCoV RaTG13، در سطح ژنومی، شباهت دارد. پس از RaTG13، Pangolin-CoV بیشترین شباهت را به SARS-CoV-2 دارد. پروتئین S1 در Pangolin-CoV نسبت به RaTG13، به SARS-CoV-2 شباهت بیشتری دارد. ۵ ریشه‌ی آمینواسید کلیدی که در میان‌گنش با ACE2 در انسان نقش دارند، بین Pangolin-CoV و SARS-CoV-2 کاملاً ثابت بوده اما ۴ جهش در آمینواسیدهای RaTG13 وجود داشت [۴].

فرضیاتی پیرامون منشأ SARS-CoV-2

به وجود آمدن SARS-CoV-2 از دستکاری‌های آزمایشگاهی SARS-CoV غیرمحمتمل است. دومین متصل‌شونده SARS-CoV-2 برای اتصال به ACE2 کارایی متفاوتی دارد. علاوه بر این اگر دستکاری‌های ژنتیکی اتفاق افتاده باشد، به احتمال زیاد از یکی از چندین سیستم ژنتیکی معکوس برای بتاکروناویروس‌ها استفاده شده‌است. اما داده‌های ژنتیکی نشان می‌دهد که SARS-CoV-2 از Backbone ویروس‌هایی که قبلاً استفاده شده‌اند، منشاء نگرفته است؛ در عوض دو سناریو برای ریشه‌یابی ویروس SARS-CoV-2 پیشنهاد شده‌است. همچنین درباره احتمال تکامل SARS-CoV-2 در طی پاساژ سلولی و حیوانی بحث خواهد شد [۱].

انتخاب طبیعی در میزبان حیوانی قبل از انتقال ویروس از حیوان به انسان

از آنجا که بسیاری از موارد اولیه ابتلا به کووید ۱۹ با بازار هونان در ووهان مرتبط بودند، ممکن است که یک منبع حیوانی در این مکان وجود داشته باشد. شباهت SARS-CoV-2 با ویروس شبه SARS-CoV خفاش این احتمال را ایجاد می‌کند که این خفاش‌ها میزبان نیای ویروس SARS-CoV-2 بوده‌اند.

اگرچه RaTG13 نمونه‌برداری شده از خفاش رینولوفوس افینیس با SARS-CoV-2 ۹۶٪ شباهت دارد اما Spike آن در دومین متصل‌شونده به گیرنده سلولی متفاوت بوده و ممکن است به طور مؤثر به ACE2 انسان متصل نشود. همچنین مورچه‌خوارهای مالایی (*Manis javanica*) که به طور غیرقانونی به استان گوانگدونگ وارد می‌شوند حاوی کروناویروس‌های شبیه SARS-CoV-2 بودند.

هر چند ویروس RaTG13 خفاش نزدیکترین ساختار ژنومی به SARS-CoV-2 را دارد، اما برخی از ویروس‌های مورچه‌خوار شباهت زیادی با SARS-CoV-2 در دومین متصل‌شونده به گیرنده دارند و این به وضوح نشان می‌دهد که Spike در SARS-CoV-2 برای اتصال به ACE2 انسان در نتیجه انتخاب طبیعی حاصل شده‌است. همچنین ممکن است جهش، حذف یا اضافه شدن نوکلئوتیدی در نزدیکی محل اتصال S1-S2 در ژنوم کروناویروس رخ دهد، که نشان‌دهنده یک فرآیند تکاملی طبیعی است و باعث بوجود آمدن ناحیه برش چندبازی می‌گردد. همچنین برای اینکه انتخاب طبیعی بتواند به طور مؤثری به وقوع بپیوندد، احتمالاً باید تراکم بالایی از جمعیت میزبان حیوانی وجود داشته باشد تا یک ویروس اولیه، جهش در Spike و جایگاه برش چندبازی را بدست آورد [۱].

انتخاب طبیعی در انسان به دنبال انتقال ویروس از حیوان به انسان

این امکان وجود دارد که یک نیای SARS-CoV-2 در نتیجه‌ی انتقال نامشخص از فردی به فرد دیگر، ویژگی‌های ذکر شده برای ایجاد بیماری را بدست آورده و موجب همه‌گیری شده باشد. تمام ژنوم‌های توالی‌یابی شده‌ی SARS-CoV-2 دارای ویژگی‌های ژنومی فوق هستند، بنابراین آن را از یک نیای مشترک با این خصوصیات دریافت کرده‌اند. با توجه به شباهت زیاد دومین متصل‌شونده به گیرنده در مورچه‌خوارها با ساختار مشابهش در انسان می‌توانیم استنباط کنیم که ویروس منتقل شده از حیوان به انسان این ویژگی را داشته‌است و خصوصیت جایگاه برش چندبازی، طی انتقال از انسان به انسان کسب شده‌است. زمان بوجود آمدن جدیدترین نیای مشترک SARS-CoV-2 با توجه به داده‌های توالی‌یابی منتشر شده، برآورد شده‌است و نشانگر ظهور ویروس در اواخر نوامبر ۲۰۱۹ تا اوایل دسامبر ۲۰۱۹ است که این مسأله سازگار با اولین موارد تأیید شده از ابتلا به این بیماری می‌باشد. از این رو این سناریو، یک دوره انتقال ناشناخته را در انسان‌ها (پس از انتقال اولیه از حیوان به انسان) متصور می‌شود که در آن ویژگی جایگاه برش چندبازی بدست می‌آید. فرصت مناسب، زمانی می‌توانسته محقق شود که تعداد زیادی انتقال حیوان به انسان منجر به ایجاد زنجیره‌های کوتاه انتقال انسان به انسان در درازمدت شده باشد. این در اصل وضعیت MERS-CoV است که همه‌ی موارد انسانی در نتیجه‌ی انتقال ویروس از شتر به انسان بوده که منجر به عفونت فردی یا شکل‌گیری زنجیره‌ی کوتاه انتقال می‌گردد و انتقال پایدار شکل نمی‌گیرد [۱].

انتخاب در طی پاساژ

سال‌ها بررسی‌های پایه شامل پاساژ ویروس شبه SARS-CoV خفاش در کشت سلولی و مدل‌های حیوانی در آزمایشگاه‌هایی با سطح ایمنی ۲ صورت گرفته‌است و مستندات دربارهِ فرار آزمایشگاهی SARS-CoV نیز وجود دارد. بنابراین باید احتمال انتشار ناخواسته SARS-CoV-2 را بررسی کنیم. از لحاظ تئوری، ممکن است که SARS-CoV-2 جهش‌های دومین متصل‌شونده به گیرنده را طی سازگاری با پاساژهای کشت سلولی بدست آورده باشد. سایت‌های برش چندبازی در آنفولانزای مرغی با قدرت بیماری‌زایی پایین، تنها بعد از پاساژهای طولانی‌مدت آن دیده شده‌است. بنابراین تئوری ایجاد SARS-CoV-2 توسط پاساژهای سلولی یا حیوانی نیازمند جداسازی اولیه از یک نیای ویروسی با شباهت ژنتیکی بسیار زیاد است که گزارش نشده‌است. ایجاد سایت برش چندبازی نیازمند پاساژهای متعدد در محیط کشت سلولی یا حیوانی بوده، که دارای گیرنده ACE2 مشابه انسان هستند که چنین کاری نیز گزارش نشده‌است. همچنین

بعید است که تغییر در گلیکان O-linked در طی پاساژهای سلولی به وجود آید زیرا این اتفاق نیازمند دخالت سیستم ایمنی می‌باشد [۱].

پیام برای مردم

اطلاعات بیان شده در این گزارش، براساس آخرین یافته‌های اخیر می‌باشد. با توجه به نوظهوری این ویروس، تحقیقات علمی در جهت شناسایی دقیق منشأ آن همچنان در حال انجام است.

پیام برای سیاست‌گذاران

مطالعات در زمینه شناسایی منشأ شکل‌گیری و انتقال ویروس‌های نوظهور، اهمیت زیادی در ایجاد استراتژی‌های پیشگیرانه در راستای مهار عفونت و حفاظت از سلامت عموم افراد جامعه دارد.

منابع

1. Andersen, K.G., et al., *The proximal origin of SARS-CoV-2*. Nature medicine, 2020. **26**(4): p. 450-452.
2. Zhang, T., Q. Wu, and Z. Zhang, *Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak*. Current Biology, 2020.
3. Sen, S., et al., *Coronaviruses: origin and evolution*. Medical Journal, Armed Forces India, 2020.
4. Guo, Y.-R., et al., *The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status*. Military Medical Research, 2020. **7**(1): p. 1-10.
5. Shereen, M.A., et al., *COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses*. Journal of Advanced Research, 2020.
6. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
7. Wang, H., et al., *The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2020: p. 1.