

Review Paper

A Review of Bioinformatics Studies on the Function of Structural and Non-structural Proteins and the Level of Glycoprotein Inhibiting Heme Metabolism by SARS-CoV-2 Virus



\*Tohid Piri-Gharaghie<sup>1</sup>, Sheida Beiranvand<sup>1</sup>, Amirhossein Ghadiri<sup>2</sup>, Sameh Hajimohammadi<sup>3</sup>

1. Department of Biotechnology, Faculty of basic science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
3. Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, University of Eyvanakey, Eyvanakey, Iran.



**Citation** Gharaghie T, Beiranvand Sh, Ghadiri A, Hajimohammadi S. [A Review of Bio-informatics Studies on the Function of Structural and Non-structural Proteins and the Level of Glycoprotein Inhibiting Heme Metabolism by SARS-CoV-2 Virus (Persian)]. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2022; 21(2):176-193. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2164>

**doi** <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2164>



**ABSTRACT**

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an acute respiratory infection. Its virus called SARS-COV-2 which is an RNA virus with high homology to the bat coronavirus. In this review study, first the molecular and cellular characteristics and the proliferation and replication of SARS-COV-2 are investigated. Then, by reviewing bioinformatics studies regarding protected domain analysis, homology modeling, and molecular docking, the biological role of some specific SARS-COV-2 proteins are examined. The results showed that the open reading frame 8 (ORF8) and surface glycoprotein could bind to porphyrin. At the same time, ORF1ab, ORF10, and ORF3a can attack the heme part of hemoglobin to dissociate iron and form porphyrin. This attack reduces hemoglobin ability to carry oxygen and carbon dioxide. As a result, lung cells become severely inflamed due to their inability to exchange carbon dioxide and oxygen, which leads to large ground-glass opacities on CT scan images. Based on the bioinformatics results, chloroquine can prevent ORF1ab, ORF3a, and ORF10 from attacking hemoglobin to form porphyrin and avoid the binding of ORF8 and surface glycoprotein to porphyrin, which effectively relieves the symptoms of acute respiratory syndrome. In the current pandemic, bioinformatics studies are of great importance for preventing the spread of COVID-19, developing drugs and vaccines, and clinical practice.

**Keywords** SARS-COV-2, Nonstructural protein, Glycoprotein, ORF8, bioinformatics

Received: 01 Aug 2020

Accepted: 30 Dec 2020

Available Online: 01 Jun 2022

**\* Corresponding Author:**

Tohid Piri-Gharaghie

Address: Department of Biotechnology, Faculty of basic science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Tel: +98 (0919) 2812671

E-Mail: [tohidpirie@yahoo.com](mailto:tohidpirie@yahoo.com)

## Extended Abstract

### Introduction

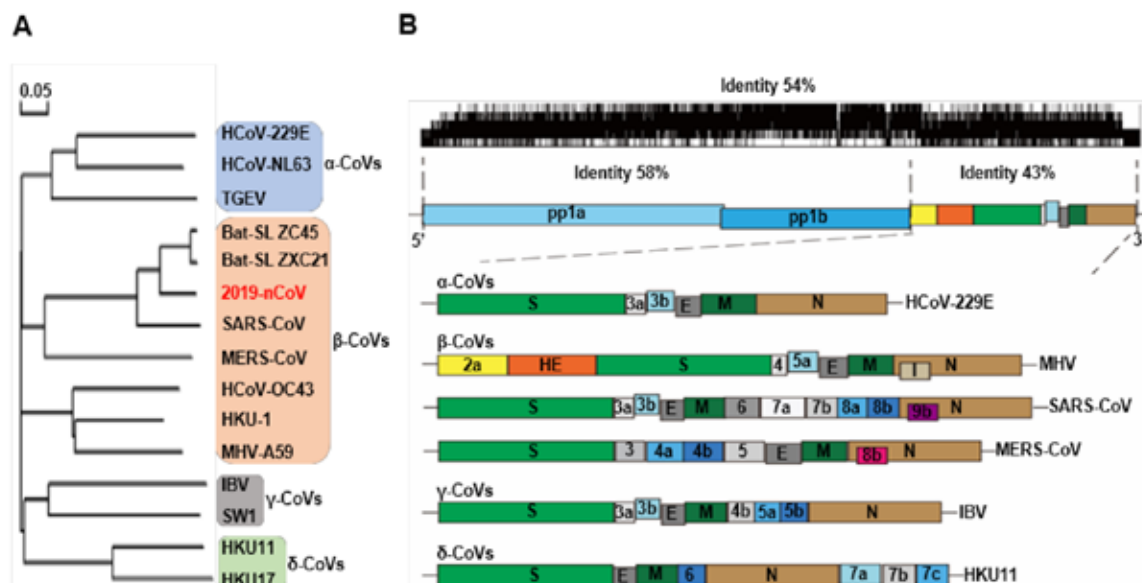
**O**n December 31, 2019, an unknown coronavirus disease was reported from China that cause acute respiratory syndrome which was named COVID-19. This virus was highly contagious and turned into a pandemic in just 3 months. It seems that the high tendency to evolve and the similarity to other viruses of the beta-coronavirus family are the main factors in the susceptibility of this virus to mutation. In all genomes of this virus, the tendency of the virus to spread are varied. However, they are common in human-to-human transmission. The virus can infect one person quickly but not infect others. It can be said that this virus is selective in choosing its host, but the reports have indicated that it has a high rate of 90% in accepting a new host. The angiotensin converting enzyme-2 (ACE-2) receptor is the receptor of SARS-COV-2 to enter human cells. Since the expression level of ACE2 in men living in East Asian countries is higher than in other countries, this population is more susceptible to the virus. In this review study, first the molecular and cellular characteristics, proliferation, and replication of SARS-COV-2 are investigated. Then, by reviewing bioinformatics studies conducted regarding the analysis of conserved domain and homology and molecular docking, the biological roles of some specific proteins SARS-COV-2 are investigated.

## Methods

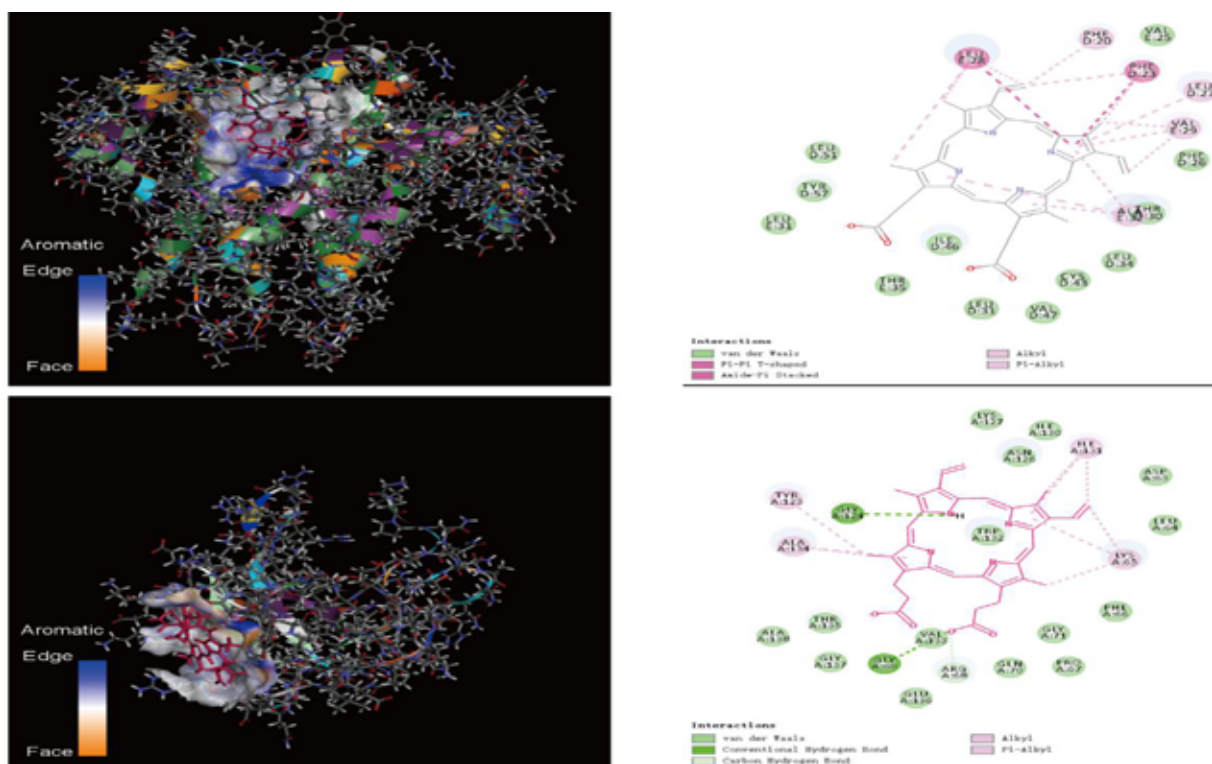
In this study, 60 related articles were reviewed. Then, the information extracted from them were categorized including the types of SARS-COV-2 genomes in different parts of the world and the identified proteins and structural components of these viruses. In this regard, we first reviewed the studies conducted on the genome structure of the SARS-COV-2 and the genetic affinity of SARS-COV-2 to the known coronaviruses. Then, the function of structural and non-structural proteins of coronaviruses was reviewed. Finally, the bioinformatics studies on open reading frames (ORFs) of the virus and the possible origin of SARS-COV-2 were reviewed to know whether it is possible that this virus was created in laboratory or not. This section subdivided into two sections: (a) Bioinformatic study regarding that ORF8 and glycoprotein inhibit Heme metabolism by binding to porphyrin, and (b) bioinformatic study of the genome structure of SARS-COV-2 by examining the mutation in the receptor-binding domain of SARS-COV-2 and the polybasic cleavage site and O-glycan linkage.

## Results

Analysis of SARS-COV-2 sequences showed that this virus had a typical genomic structure of beta-coronaviruses, including: Bat SARS-like-ZC45, Bat SARS-like-ZXC21, SARS-CoV and MERS-CoV. According to the phylogenetic tree of coronaviruses (Figure 1), SARS-

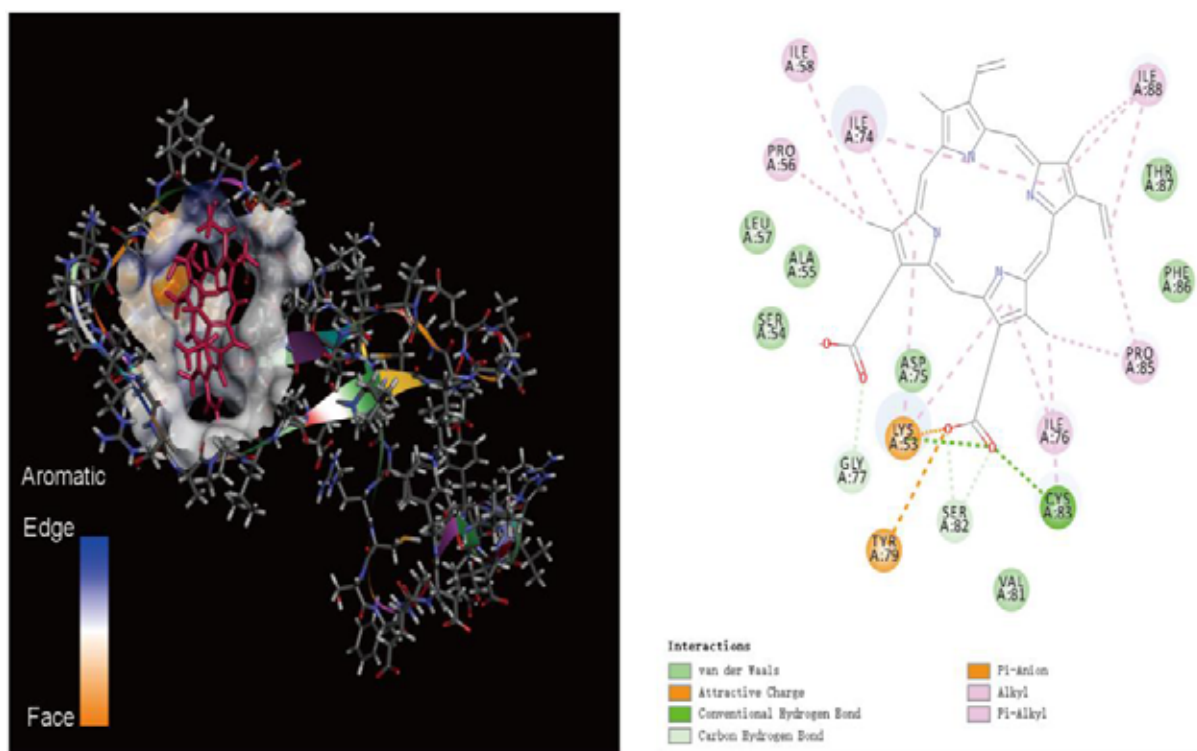


**Figure 1.** Genetic affinity of SARS-COV-2 to different types of coronaviruses. (A) Phylogenetic tree of coronaviruses where the new coronavirus is highlighted in red, (B) Genome structure of four genera of coronaviruses [5]



Jundishapur  
Scientific Medical Journal

Figure 2. Two-dimensional view of the binding sections of envelope protein and nucleocapsid phosphoprotein with human porphyrin



Jundishapur  
Scientific Medical Journal

Figure 3. Two-dimensional view of the binding sections of viral non-structural protein ORF8 with human porphyrin

COV-2 had a high genetic similarity to Bat SARS-like-ZC45 and Bat SARS-like-ZXC21, while SARS-CoV had the lowest similarity to them.

In this study, it was found that ORF8 and surface glycoprotein can bind to porphyrin, and ORF1ab, ORF10 and ORF3a can attack the heme part of hemoglobin to dissociate iron and form porphyrin. This attack causes a decrease in the hemoglobin to carry oxygen and carbon dioxide. Lung cells become inflamed due to the inability to exchange carbon dioxide and oxygen, which leads to large ground-glass opacities in CT scan images.

The three-dimensional image of the structures of three viral proteins (surface glycoprotein, envelope protein, and nucleocapsid phosphoprotein) was downloaded from the PDB database. The structural model indicated the inability of the surface glycoprotein to bind to the porphyrin in Heme, while the envelope protein could bind to porphyrin. For the phosphoprotein nucleocapsid, the results indicated the ability of this protein to bind to porphyrin with the highest possible binding energy (5206.53 kcal/mol). [Figure 2](#) shows the docking results, a two-dimensional view of the binding sections of the envelope protein and nucleocapsid phosphoprotein with human porphyrin. [Figure 3](#) illustrated the two-dimensional view of the binding sections of viral non-structural protein ORF8 with human porphyrin.

## Discussion

Based on the structural studies performed on SARS-COV-2, it seems that this virus can bind to the human cell receptor ACE-2. The S protein of SARS-COV-2 has a functional polybasic cleavage site called "Furin" at the S1/S2 boundary, which is formed by 12 nucleotides, resulting in three O-glycan binding sites around this polybasic cleavage site. Since the COVID-19 pandemic is a global problem, predictive methods to search for the protected domains of the virus are very important. Achieving the structure of protein molecules including ORF8 and nucleocapsid phosphoproteins (surface proteins) using bioinformatics study and analyzing the possibility and the method of their binding to human porphyrin in the heme part of hemoglobin is needed. According to the review of the bioinformatics studies, chloroquine can prevent ORF1ab, ORF10 and ORF3a from attacking hemoglobin to form porphyrin, and avoid the binding of ORF8 and surface glycoproteins to porphyrin to a certain extent, which effectively relieves acute respiratory symptoms. The results of bioinformatics studies are of high value in preventing the spread of COVID-19, developing drugs and vaccines, and clinical practice.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This research was written in accordance with the principles of research ethics approved by [Islamic Azad University, Shahrekord Branch](#).

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Authors' contributions

Conceptualization: Tohid Piri-Gharaghie; Research and review: Sheida Beiranvand; Editing and finalization written by: Sameh Haji Mohammadi; Amirhossein Ghadiri

### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the staff members of the Biotechnology Research Center of the [Islamic Azad University of Shahrekord Branch](#) in Iran for their help and support.

This Page Intentionally Left Blank

## مقاله مروری

## مروری بر بررسی‌های بیوانفورماتیکی عملکرد پروتئین‌های ساختاری، غیر ساختاری و سطح گلیکو- پروتئین مهارکننده متابولیسم پروتئین هم توسط کروناویروس

\*توحید پیری قراقیه<sup>۱</sup>، شیدا بیرانوند<sup>۱</sup>، امیرحسین قدیری<sup>۲</sup>، سامه حاجی محمدی<sup>۲</sup>

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

۳. گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد ایوانکی، دانشگاه ایوانکی، ایوانکی، ایران.

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Gharaghie T, Beiranvand Sh, Ghadiri A, Hajimohammadi S. [A Review of Bio-informatics Studies on the Function of Structural and Non-structural Proteins and the Level of Glycoprotein Inhibiting Heme Metabolism by SARS-CoV-2 Virus (Persian)]. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2022; 21(2):176-193. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2164>

<https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.2.2164>

## چکیده



**زمینه و هدف:** ذات‌الریه کووید-۱۹ یک عفونت حاد تنفسی ناشی از ویروس کرونای جدید است. این ویروس، یک RNA ویروس با همولوژی بالا با کرونا-ویروس خفاش است.

**روش بررسی:** در این مطالعه مروری، ابتدا ویژگی‌های سلولی مولکولی، تکثیر و همانندسازی ویروس کرونای جدید بررسی شده و سپس به کمک مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شده در خصوص تحلیل دامین حفاظت شده ویروس، مدل‌سازی همولوژی، داکینگ مولکولی و نقش‌های زیستی برخی از پروتئین‌های خاص ویروس کرونای جدید بررسی شد. ORF8 و گلیکوپروتئین سطحی به ترتیب می‌توانند به پورفرین متصل شوند. ORF10، ORF1ab و ORF3a می‌توانند با پروتئین هم روی زنجیره ۱ - بتا در هموگلوبین هماهنگ شوند تا آهن را تجزیه و پورفرین را شکل دهند. این حمله باعث کاهش هموگلوبینی که اکسیژن و دی‌اکسید کربن را حمل می‌کند می‌شود و در نتیجه سلول‌های ریه به‌علت ناتوانی در مبادله کربن دی‌اکسید و اکسیژن ملتهب می‌شود. التهاب سلول‌های ریه منجر به تصاویر بزرگ توده مانند در تصویربرداری سی-تی اسکن می‌شوند.

**یافته‌ها:** باتوجه به تحلیل نتایج بیوانفورماتیکی، کلروکین می‌تواند از عملکرد ORF10، ORF1ab و ORF3a برای حمله به هموگلوبین (برای تشکیل پورفرین) جلوگیری کند. در نتیجه، تا حد معینی مانع از اتصال ORF8 و گلیکوپروتئین‌های سطحی به پورفرین می‌شود. بدین ترتیب، کلروکین می‌تواند به‌طور مؤثر علائم حاد تنفسی را تسکین دهد.

**نتیجه‌گیری:** باتوجه به همه‌گیری کنونی، پژوهندگان بر این باور هستند که نتایج تحقیقات بیوانفورماتیکی در پیشگیری از شیوع ذات‌الریه ویروس کرونا، توسعه داروها و واکسن‌ها و درمان بالینی، ارزش بالایی دارند.

**کلیدواژه‌ها:** ویروس کرونا، روتئین غیر ساختاری، گلیکوپروتئین، ORF8، بیوانفورماتیک

تاریخ دریافت: ۱۱ مرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۱۰ دی ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۱ خرداد ۱۴۰۱

\* نویسنده مسئول:

توحید پیری قراقیه

نشانی: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، گروه بیوتکنولوژی.

تلفن: ۲۸۱۲۶۷۱ (۰۹۱۹) ۹۸+

رایانامه: tohidpirie@yahoo.com

## مقدمه

اختصاصی آنزیماسین ۲ به‌عنوان گیرنده ویروس کرونا جهت ورود به سلول‌های انسانی وجود دارد. از آنجایی که میزان بیان آنزیماسین ۲ در مردان شرقی، بیشتر از دیگر جمعیت‌های انسانی است، از این رو این جمعیت برای ورود ویروس به بدن بسیار مستعد هستند [۴].

## ساختار ژنوم ویروس کرونا جدید

ظهور ویروس کرونای جدید به نام SARS-COV-2 که باعث شیوع پنومونی ذات‌الریه غیرمعمول در دنیا شده است، چالش بزرگی را پیش روی محققان قرار داد. چن و همکاران باتوجه به جهش این ویروس و جدید بودن آن، به تشریح ساختار ژنوم این ویروس پرداختند و مشخص کردند SARS-COV-2 مربوط به زیرخانواده کرونویرینا از خانواده کرونویریده از زیر رده نیدوویرالس است و این زیرخانواده شامل ۴ جنس: گاماکرونوویروس<sup>۴</sup>، بتاکرونوویروس، آلفاکرونوویروس<sup>۵</sup> و دلتا کرونوویروس<sup>۶</sup> است [۵].

ژنوم ویروس کرونا RNA تک رشته سنس<sup>۷</sup> تقریباً ۲۴ تا ۳۴ کیلو بازی با ساختار سر ۵' cap و دم ۳' پلی A است. RNA ژنومی، در فرایند ترجمه مستقیماً برای ترجمه پلی پروتئین 1a/1ab مورد استفاده قرار می‌گیرد که پروتئین‌های غیرساختاری<sup>۸</sup> را برای تشکیل کمپلکس همانندسازی-رونویسی<sup>۹</sup> در یک ویزیکول<sup>۲</sup> غشایی<sup>۱۰</sup> کد می‌کند [۶]. به دنبال آن، مجموعه‌ای از RNAهای سابژنومیک<sup>۱۱</sup> توسط کمپلکس همانندسازی-رونویسی به شکل درون‌زا به روش رونویسی ناپیوسته سنتز می‌شوند. این mRNAهای سابژنومیک توالی‌های ۵' پیشرو و انتهاهای ۳' مشترک دارند. خاتمه رونویسی و

در ۳۱ دسامبر ۲۰۱۹، یک ویروس کرونا ناشناخته، از چین به‌عنوان عامل ایجاد عفونت‌های حاد تنفسی گزارش شد. این ویروس، قدرت سرایت بسیار بالایی داشت، به‌طوری‌که تنها در مدت ۳ ماه، به یک همه‌گیری بزرگ جهانی تبدیل شد [۱]. ویروس کرونایی که به تازگی کشف شده است، از نظر ژنتیکی با دیگر کرونوویروس‌ها مثل سارس<sup>۱</sup> و مرس<sup>۲</sup> قرابت ژنتیکی دارد. به‌طور ساده‌تر، می‌توان گفت که این ویروس، از خانواده بتاکرونوویروس‌ها<sup>۳</sup> است. تعدادی از ژنوم‌های مهم شناسایی شده از این گروه جدید، ایزوله و جدا شده است که در جدول شماره ۱ انواع ژنوم مهم ویروس کرونا که تا امروز گزارش شده، نشان داده شده است [۲]. به نظر می‌رسد تمایل بالا برای به تکامل رسیدن و شباهت داشتن به دیگر ویروس‌های خانواده، به‌عنوان عوامل اصلی مستعد بودن این ویروس برای جهش باشد که به دنبال آن، تمایل ویروس به انجام تغییرات در اثر جهش، باعث بروز و شکل‌گیری این ویروس جدید شده است [۳].

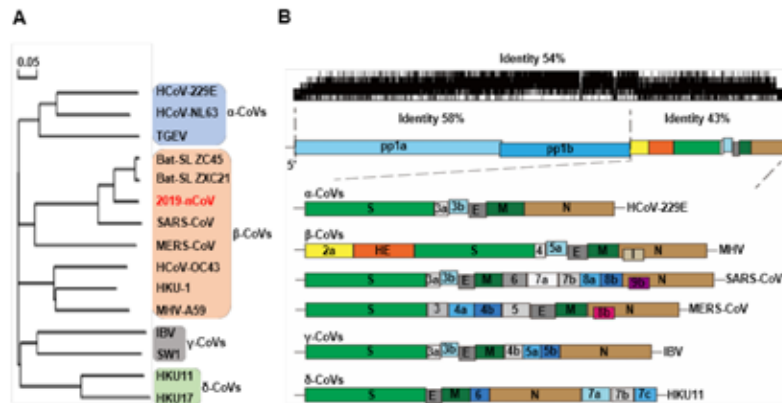
در تمامی این ژنوم‌های یافت‌شده، تمایل ویروس به سرایت از یک انسان به انسان دیگر متغیر بوده است. البته مواردی نیز وجود داشته است که افراد ناقل، ویروس را به دیگران منتقل نکرده‌اند؛ در مواردی هم انتقال فوق‌العاده بالای عفونت از فردی به فرد دیگر مشاهده شده است. بنابراین می‌توان گفت ویروس از نظر انتقال از انسان به انسان، در هر دو حالت افراط دارد. این بدان معنی است که این ویروس می‌تواند یک فرد را به سرعت آلوده کند، اما فرد دیگری را مبتلا نکند. از این رو شاید بتوان گفت که این ویروس، در انتخاب میزبان خود، گزینشی عمل می‌کند. گزارش‌ها حاکی از آن است که ویروس، نرخ بالایی ۹۰ درصد را در پذیرش میزبان جدید از خود نشان می‌دهد و این به‌معنای همه‌گیری آن است [۳]. یک توافق کلی در مورد گیرنده

4. Gammacoronavirus
5. Alphacoronavirus
6. Deltacoronavirus
7. ssRNA+
8. . nsps
9. RTC
10. DMVs
11. sgrNAs

1. SARS
2. MERS
3. Betacoronavirus

جدول ۱. انواع ژنوم یافت‌شده از COVID-19

Different genomes of SARS-COV-2	Number of predicted proteins	Orf1a poly-protein (pp1a)	E2 glyco-protein precursor	Hypothetical protein sars3a, sars6, sars7a	Matrix protein	Nucleocapsid protein
Beta CoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019	9	+	+	+	+	+
BetaCoV/Wuhan/IPBCAMS-WH-01/2019	9	+	+	+	+	+
BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019	9	+	+	+	+	+
Beta CoV/Wuhan/IVDC-HB-05/2019	10	+	+	+	+	+
Beta CoV/Wuhan/IVDC-HB-04/2020	15	+	+	+	+	+
BetaCoV/Wuhan_1. MN908947.3	9	+	+	+	+	+



### جندی شاپور

تصویر ۱. قرابت ژنتیکی SARS-CoV-2 با انواع ویروس کروناهای جدید. (قسمت A: ویروس کرونا جدید در درخت فیلوژنی با رنگ قرمز هایلایت شده است. قسمت B: ساختار ژنوم ۴ جنس ویروس کرونا را نشان می‌دهد) [۵]

در ویروس‌های RNA دار، نگهداری ژنومی با این سایز بزرگ، نیازمند ویژگی‌هایی خاص است که در ویروس کروناها کمیپلکس<sup>۱۷</sup> با چندین RNA آنزیم‌هایی پردازش‌کننده مانند<sup>۳</sup> و<sup>۵</sup> آگزوریبونوکلوتاز از nsp14 را بیان می‌کند که مسئول این عملکرد است. آنزیم<sup>۳</sup> و<sup>۵</sup> آگزوریبونوکلوتاز در بین تمام ویروس‌های RNA دار مختص کروناویروس‌ها بوده که به‌عنوان بخشی از قسمت تصحیح‌کننده<sup>۱۸</sup> از RTC عمل می‌کند [۶]. تجزیه و تحلیل توالی‌های SARS-CoV-2 توسط چن و همکاران، نشان داد که این ویروس دارای یک ساختار ژنومی معمولی از ویروس کروناها متعلق به بتاکروناویروس‌ها است که از Bat-SARS-like (SL)-ZC45، Bat-SL ZXC21، SARS-CoV و MERS-CoV تشکیل شده است. مطابق با درخت فیلوژنی کروناویروس‌ها، SARS-CoV-2 شباهت بسیار زیاد ژنتیکی به Bat-SL-CoV ZXC21 و SL-CoV ZC45 کمترین شباهت را به SARS-CoV دارد. تصویر شماره ۱ درخت فیلوژنی، قرابت ژنی این نمونه‌ها را به‌وضوح نشان می‌دهد [۵، ۶].

### عملکرد پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری ویروس‌های کرونا با تأکید بر SARS-CoV-2

اکثر پروتئین‌های غیرساختاری که در همانندسازی کروناویروس‌ها نقش کلیدی دارند، گزارش شده‌اند. باین‌حال، عملکرد برخی از nspها هنوز ناشناخته هستند یا کاملاً مشخص نشده‌اند [۷]. چن و همکاران به‌طور خلاصه، عملکرد پروتئین‌های غیرساختاری کروناویروس‌ها را توضیح داده‌اند که در جدول شماره ۲ نمایش داده شده است. علاوه‌براین، ۴ پروتئین ساختاری برای مونتاژ و ایجاد ویروئید و عفونت ویروس‌های کرونا ضروری است [۵]. هموتریم‌هایی از S پروتئین‌ها باعث افزایش پروتئین‌های اسپایک در سطح ذرات ویروس می‌شود و این به‌عنوان کلید اتصال ویروس به گیرنده‌های

متعاقباً ایجاد یک RNA پیشرو در توالی نظارتی رونویسی<sup>۱۲</sup> که در بین ORFها قرار دارد، رخ می‌دهد. این RNAهای سابژنومیک رشته منفی به‌عنوان الگو برای تولید mRNAهای سابژنومیک عمل می‌کنند. ژنوم و زیرژنوم SARS-CoV-2 حداقل ۶ نوع بازخوانی یا ORF دارد [۵، ۶]. اولین ORF که ORF1a/b است، حدود دوسوم طول ژنوم بوده که ۱۶ پروتئین غیرساختاری یا nsp1-16 را کد می‌کند. یک جهش نقطه‌ای بین ORF1a و ORF1b منجر به تولید دو پلی‌پپتید pp1a و pp1ab می‌شود. این پلی‌پپتیدها به روش ویروسی توسط پروتئازهای شبه کیموتریپسین<sup>۱۳</sup> یا پروتئازهای اصلی<sup>۱۴</sup> و یک یا دو عدد پروتئاز شبه‌پاپائین<sup>۱۵</sup> در nsp16 پردازش می‌شوند.

ORFهای دیگر، در یک‌سوم ژنوم که در نزدیکی انتهای<sup>۳</sup> قرار گرفته است، حداقل ۴ پروتئین ساختاری اصلی را کدگذاری می‌کند که شامل پروتئین‌های اسپایک<sup>۱۶</sup>، غشا (M)، پوشش (E)، و پروتئین‌های نوکلئوکپسید است. علاوه‌براین، ۴ پروتئین ساختاری اصلی، پروتئین‌های ساختاری خاص و همچنین پروتئین‌های جانبی دیگر مانند پروتئین HE، پروتئین 3a/b، پروتئین 4a/b و دیگر پروتئین‌ها را کد می‌کنند [۶]. تمام پروتئین‌های ساختاری و جانبی از RNAهای سابژنومیک SARS-CoV-2 ترجمه شده است [۵]. نرخ جهش در همانندسازی ویروس‌های RNA دار بسیار بیشتر از ویروس‌های DNA دار است و ژنوم ویروس‌های RNA دار معمولاً کمتر از ۱۰K نوکلئوتید است. اندازه ژنوم این ویروس 30Kb بوده که در بین ویروس‌های RNA دار دارای بزرگترین ژنوم هستند. اندازه این ژنوم، تقریباً ۲ برابر بزرگتر از سایر ویروس‌های RNA دار است و دومین ویروس RNA دار بزرگ از نظر اندازه ژنوم به‌شمار می‌رود.

12. .Transcription regulatory sequences (TRS)
13. 3CLpro
14. Mpro
15. PLPs
16. SPIKE

17. RTC
18. Proofreading



## جدول ۲: شانزده پروتئین غیر ساختاری SARS-COV-2 و عملکرد آن‌ها

پروتئین غیر ساختاری	عملکرد	رفرنس
Nsp1	تخریب mRNA سلولی، مهار سیگنالینگ IFN	[۲۳، ۲۲]
Nsp2	ناشناخته	[۲۵، ۲۴]
Nsp3	PLP، شکستن پلی‌پپتیدها، مسلود کردن پاسخ ایمنی ذاتی میزبان، ترویج بیان سیتوکین	[۲۷، ۲۶]
Nsp4	تشکیل DMV	[۲۹، ۲۸]
Nsp5	3CL pro، M pro، شکستن پلی‌پپتیدها، مهار سیگنالینگ IFN	[۳۱، ۳۰]
Nsp6	تشکیل DMV، محدود کردن گسترش اتوفاگوزوم	[۳۳، ۳۲]
Nsp7	کوفاکتور nsp8 و nsp12	[۳۵، ۳۴]
Nsp8	کوفاکتور nsp7 و nsp12، پرایماز	[۳۶، ۳۳]
Nsp9	نقش در دیمریزاسیون و اتصال RNA	[۳۸، ۳۷]
Nsp10	پروتئین داریستی برای nsp14 و nsp16	[۴۰، ۳۹]
Nsp11	ناشناخته	[۴۱]
Nsp12	پرایمر وابسته به RdRp	[۴۳، ۴۲، ۲۹]
Nsp13	RNA هلیکاز، ۵' تری فسفاتاز	[۴۵، ۴۴]
Nsp14	اگزوریبونوکلئاز، N7-MTase	[۴۸، ۴۷، ۴۶]
Nsp15	اندوریبونوکلئاز، فرار از سنسورهای dsRNA	[۵۰، ۴۹]
Nsp16	O-MTase، تنظیم منفی ایمنی ذاتی، جلوگیری از تشخیص MDA5	[۵۳، ۵۲، ۵۱]

مجله علمی پزشکی

## جندی شاپور

جیهووا و همکاران در مطالعه‌ای چنین عنوان کردند که SARS-COV-2 نسبت به سارس تمایل بیشتری به آنژیوناسین ۲ دارد که این موضوع، بیانگر میزان بیشتر آلودگی و درصد بالاتر انتقال SARS-COV-2 نسبت به سارس است. همچنین پروتئین‌های اسپایک SARS-COV-2 نسبت به سارس انرژی کمتری دارد که نشان از پایداری بیشتر SARS-COV-2 دارد و ممکن است توانایی زنده ماندن در دماهای بالاتری نسبت به سارس داشته باشد. همچنین این امر می‌تواند بیانگر منشأ احتمالی SARS-COV-2 از خفاش باشد، زیرا خفاش‌ها دمای بدن بالاتری نسبت به انسان دارند. علاوه بر این، RBD پروتئین SARS-COV-2 انعطاف‌پذیری بسیار بالاتری به‌ویژه در نزدیکی سایت اتصال، نسبت به سارس دارد. این نشان می‌دهد که SARS-COV-2 برای اتصال به آنژیوناسین ۲ باید بر آنتروپی بالا غلبه کند [۷]. بنابراین نسبت به سارس، در دمای بالا فعالیت کمتری دارد و با افزایش دما، بسیار کمتر از سارس باعث مرگ‌ومیر می‌شود. برخلاف سارس که پس از سال ۲۰۰۳ از بین رفت، ممکن است SARS-COV-2 به‌علت مطابقت آن با دمای بالاتر از دمای بدن انسان، توانایی زنده ماندن بالاتری در تابستان\_ که اکثر ویروس‌ها فعال نیستند\_ داشته باشد که این امر به‌علت انعطاف‌پذیری پروتئین RBD ویروس SARS-COV-2 است. به همین دلیل SARS-COV-2 حتی

سلول میزبان عمل می‌کند. پروتئین ۳ M دامین انتقال غشایی دارد که باعث شکل‌گیری ویرون‌ها و خمیدگی غشایی می‌شود و به نوکلئوکسپید متصل می‌شود. پروتئین E در مونتاژ و رهاسازی ویروس نقش دارد و برای پاتوژنز ویروس لازم است. پروتئین N شامل ۲ دامین است که هر دوی آن‌ها با مکانیسم‌های مختلف به ژنوم RNA ویروس متصل می‌شوند [۸].

همچنین گزارش شده که پروتئین N می‌تواند با اتصال به پروتئین غیرساختاری ۳ و کمپلکس، همانندسازی-رونویسی را فعال کند و به بسته‌بندی ژنوم درون ویرون کمک کند. N همچنین یک آنتاگونیست اینترفرون است که سرکوبگر کدشده ویروسی<sup>۱۹</sup> یا از RNA اینترفرون<sup>۲۰</sup> است که تکثیر و همانندسازی ویروسی را تسریع می‌بخشد. به احتمال زیاد، این پروتئین‌های ساختاری در SARS-COV-2 به اتصال به رسپتورهای آنژیوناسین ۲ کمک می‌کنند و باعث تسهیل این اتصال می‌شوند. در نتیجه به ورود ویروس به سلول میزبان کمک می‌کنند و باعث بالا رفتن نرخ آلودگی و انتقال می‌شوند [۵].

19. Viral encoded repressor (VSR)  
20. RNAi

را اثبات شده خواهد کرد که باعث التهاب در بدن می‌شود و پروتئین واکنشی C و آلبومین را افزایش خواهد داد [۱۰]. سلول‌ها به وجود التهاب واکنش نشان می‌دهند و حجم زیادی از فریتین سرم را تولید می‌کنند تا یون‌های آهن آزاد را جذب کنند و به این ترتیب آسیب ناشی از آن را کاهش دهند [۱۰].

هموگلوبین شامل ۴ زیرواحد:  $2\alpha$  و  $2\beta$  است و هر زیرواحد دارای یک قسمت هم متصل به آهن است. هم یکی از اجزای مهم هموگلوبین و یک پورفیرین آهن است. ساختار بدون آهن آن، پورفیرین نامیده می‌شود. وقتی آهن دو ظرفیتی است، هموگلوبین ممکن است دی‌اکسیدکربن را آزاد کند و اتم‌های اکسیژن را در سلول‌های آلوئولار جذب کند و باعث اکسید شدن آهن و ۳ ظرفیتی شدن آن شود [۱۱]. وقتی هموگلوبین در بدن از طریق جریان خون در دسترس سلول‌ها قرار می‌گیرد، اتم‌های اکسیژن را آزاد می‌کند. سپس دی‌اکسیدکربن را جذب می‌کند و آهن ۲ ظرفیتی می‌شود. هیچ دارویی در حال حاضر برای درمان بیماری کووید-۱۹ وجود ندارد.

باین حال چند داروی قدیمی می‌توانند برخی از توابع ویروس را مهار کنند [۱۱]. برای مثال، کلروکین فسفات، تأثیر مشخصی بر ذات‌الریه کووید-۱۹ دارد. این دارو، یکی از داروهای ضد مالاریا است. اثرات درمانی کلروکین فسفات بر ذات‌الریه کووید-۱۹ حاکی از آن است که ذات‌الریه این ویروس، ممکن است ارتباط نزدیکی با متابولیسم هموگلوبین غیرعادی در انسان داشته باشد [۱۱، ۱۲]. کلروکین، یک داروی رایج برای درمان پورفیریا<sup>۱۱</sup> است. بنابراین، این عقیده وجود دارد که ترکیب پروتئین‌های ویروسی و پورفیرین‌ها منجر به یک سری واکنش‌های پاتولوژیکال انسان مانند کاهش

در تابستان نیز عفونی است [۷]. اما شواهد نشان می‌دهد که افزایش درجه حرارت بالاتر از ۶۰ درجه باعث نابودی این ویروس می‌شود [۵، ۹].

### بررسی مطالعات بیوانفورماتیکی

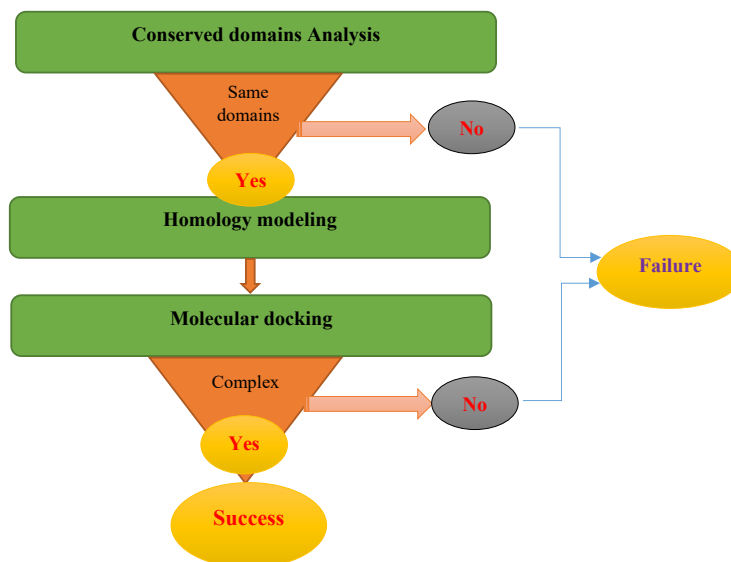
در اینجا مروری بر مطالعات بیوانفورماتیک در مورد ORF‌های ویروس و منشأ احتمالی SARS-COV-2 می‌شود که آیا امکان آزمایشگاهی بودن این ویروس وجود دارد یا خیر و بدین منظور، سناریوهای مختلف ارائه شده مورد بحث قرار می‌گیرد. تجزیه و تحلیل به دست آمده به لزوم مطالعات بیشتر در خصوص آزمایشگاهی بودن SARS-COV-2 اشاره می‌کند.

### بررسی بیوانفورماتیکی ORF8 و سطح گلیکوپروتئین مهارکننده متابولیسم هم توسط اتصال به پورفیرین

باتوجه به محدودیت‌های موجود در تجهیزات آزمایشگاهی، بسیاری از نقش‌های پروتئینی SARS-COV-2 از جمله ORF8 هنوز نامشخص است. بنابراین در صحنه همه‌گیری اخیر، پیش‌بینی نقش بیولوژیک پروتئین‌های ویروسی از طریق بیوانفورماتیک از اهمیت علمی بالایی برخوردار است [۹]. ونژانگ لیو و همکاران نیز در مطالعه‌ای بیوانفورماتیکی به پیش‌بینی نقش ORF8 این ویروس پرداختند [۱۰].

اکثر آزمایش‌های برگرفته از بیماران دارای کووید-۱۹ نشان می‌دهد که تعداد نوتروفیل‌ها در بیماران کاهش می‌یابد و مقادیر شاخص فریتین سرم، سرعت رسوب اریتروسیت، پروتئین واکنشی C، آلبومین و دهیدروژن از بیماران به‌طور معناداری افزایش می‌یابد [۴]. این، نشان‌دهنده کاهش میزان هموگلوبین در بیماران و افزایش میزان هم است. با این اوصاف، بدن بسیاری از یون‌های آهن مضر

21. Porphyrin



تصویر ۲. نمودار تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

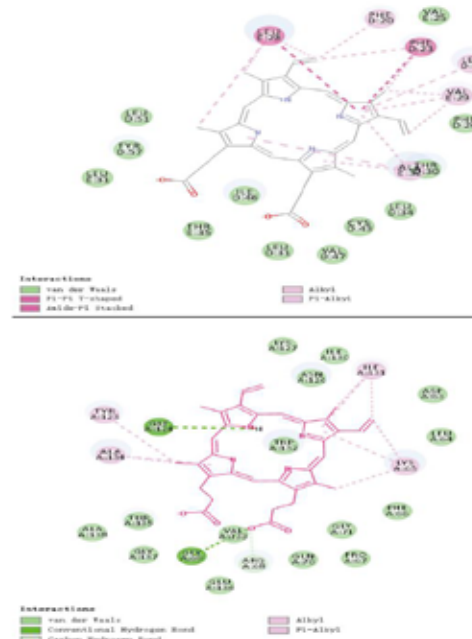
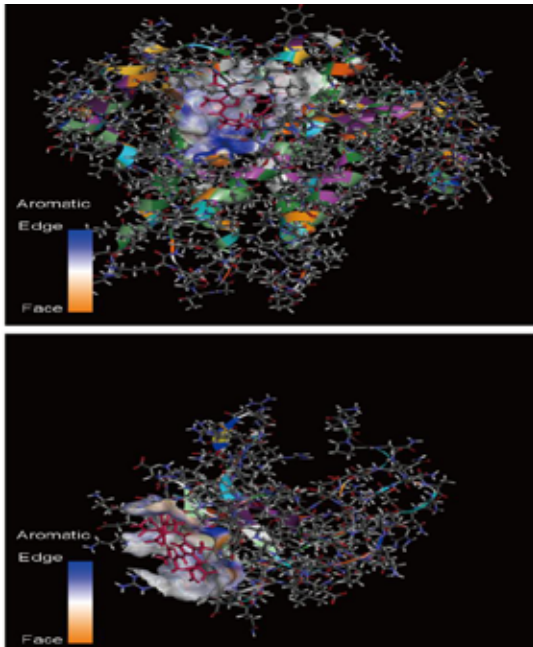
**MeMe** یک وبسایت آنلاین است که بسیاری از ابزارهای پیش‌بینی و موتیف‌ها را با هم ادغام می‌کند. موتیف یک دامین حفاظت‌شده از یک توالی کوچک در یک پروتئین است. مدل‌های مبتنی بر موتیف می‌توانند قابلیت اطمینان تحلیل فیلوزنیکی را ارزیابی کنند. پس از باز کردن ابزار آنلاین **MeMe**، توالی‌های پروتئینی موردنظر، در یک فایل متنی ادغام می‌شوند و فرمت فایل به صورت FASTA باقی می‌ماند. سپس تعداد موتیف‌هایی که قرار است پیدا شوند، انتخاب می‌شوند و با کلیک بر دکمه GO نتایج لازم به دست می‌آید [۱۰]. در پایان تحلیل دامین‌های حفاظت‌شده پس از کلیک بر روی لینک نمایش داده می‌شود.

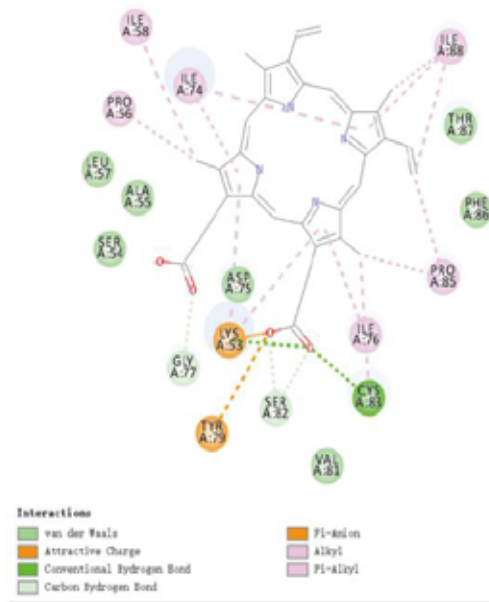
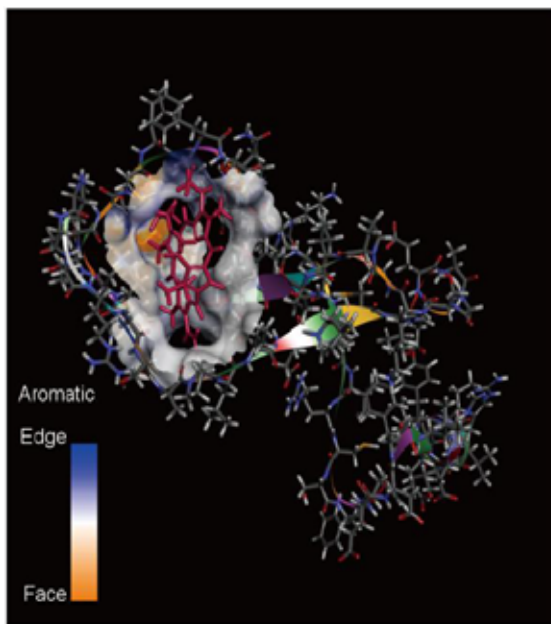
سوئیس مدل، یک سرور مدل‌سازی کاملاً خودکار برای ساخت مدلینگ همولوژی از ساختار پروتئین است. پس از ورود به نرم‌افزار و وارد کردن توالی روی Search Template کلیک می‌شود و پس از تکمیل جست‌وجو، الگو برای مدل‌سازی انتخاب می‌شود [۱۰، ۱۱]. سپس جست‌وجوی الگو با کلیک بر Build Model انجام می‌شود و یک مدل الگو به‌طور خودکار انتخاب می‌شود. نرم‌افزار، چندین الگو را جست‌وجو می‌کند و مدل‌های مختلف را ارائه می‌دهد. سپس مدل در قالب PDB دانلود می‌شود و در VMD شبیه‌سازی می‌شود. سپس داکینگ مولکولی طبق مراحل به پیش می‌رود. بدین گونه که ابتدا یک مدل لیگاند آماده‌سازی می‌شود. یک فایل لیگاند از قبیل هم باز می‌شود و روی Prepare Ligands در زیر منوی Dock Ligands از Receptor-Ligand interactions کلیک می‌شود تا یک مدل لیگاند هم برای اتصال وجود آید.

هموگلوبین می‌شود [۱۲].

گروه ونژانگ لیو با استفاده از توالی‌های پروتئینی موجود در پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری<sup>۲۲</sup>، تمام پروتئین‌های ویروس کرونای جدید، پروتئین‌های متصل‌شونده به هم و هموکسیداز و توالی پروتئینی را برای تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار دادند. همچنین از تمامی پروتئین‌های ویروس کرونای جدید چینی برای ساخت سازه‌های ۳ بعدی با استفاده از مدل‌سازی همولوژی استفاده شده است [۱۰]. در مطالعه این گروه، مجموعه‌ای از تحلیل بیوانفورماتیکی بر پایه توالی پروتئین زیستی منتشر شد که نتایج در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. در این تصویر، دامین‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های ویروسی توسط سرور آنلاین **MeMe** تحلیل شده است. دامین‌های حفاظت‌شده برای پیش‌بینی تفاوت‌های عملکرد پروتئین ویروسی و انسانی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین ساختار ۳ بعدی پروتئین ویروسی با استفاده از همولوژی مدلینگ سوئیس مدل<sup>۲۴</sup> ساخته شد [۱۰]. چون طول توالی بیش از ۵۰۰۰ نوکلئوتید بود، ابزار مدلینگ همولوژی Discovery-Studio ۲۰۱۶ انتخاب شد. در انتها با استفاده از تکنولوژی داکینگ مولکولی (Lib-Dock tool) از Discovery-Studio ۲۰۱۶ اتصال گیرنده لیگاند پروتئین ویروسی با پروتئین هم انسان شبیه‌سازی شد. روند این کار، مبتنی بر اصول تکاملی است. اگر چه مشخصه توالی بیولوژیکی شکل‌های زیستی پیشرفته و ویروسی متفاوت است، اما مولکول‌های با ساختار مشابه همیشه می‌توانند به نقش‌های زیستی مشابه دست یابند [۱۰].

- 22. National Center for Biotechnology Information (NCBI)
- 23. Multiple Em for Motif Elicitation (MeMe)
- 24. Swiss-MODEL





جندی شاپور

تصویر ۴. نمای ۲ بعدی مقطع اتصال از پروتئین‌های پوششی و نوکلئوکپسید فسفو پروتئین ویروس با پورفیرین انسانی

می‌شود، سپس محاسبه انرژی اتصال آغاز می‌شود.

در نهایت با مقایسه انرژی اتصال بزرگترین انرژی اتصال انتخاب می‌شود. هرچه پایداری کمپلکس بیشتر باشد، انرژی اتصال بیشتر خواهد بود. سپس باید بخش مشترک را نمایش داد. پس از تنظیم استایل نمایشی از منطقه اتصال، روی دکمه 2D Map از زیرمنوی Receptor-Ligand interactions موجود در View Interaction در pop up the view of binding section کلیک می‌شود. این شکل به عنوان فایل تصویری قابل ذخیره شدن است [۱۰]. اما به عنوان نتایج حاصل از این کار می‌توان چنین گفت که در انسان‌ها هموگلوبین را می‌توان به ۲ بخش گلوبین و هم تجزیه کرد. قسمت هم از پورفیرین و یون آهن تشکیل می‌شود و یون آهن در میان پورفیرین قرار دارد [۱۲، ۱۳]. همچنین در آب نامحلول است و با پروتئین‌های اتصال هم ترکیب می‌شود تا یک کمپلکس را تشکیل دهد و به کبد منتقل شود.

پورفیرین به صورت بیلروبین تغییر شکل می‌یابد و از مجرای صفراوی خارج می‌شود و آهن موجود در مولکول می‌تواند توسط بدن مورد مصرف قرار گیرد [۱۳]. اگر پروتئین‌های ویروس بتوانند به قسمت پورفیرین از هم متصل شوند باید توانایی اتصال مشابهی را برای Heme-binding protein انسانی داشته باشند، یعنی پروتئین‌های ویروسی و Heme-binding protein انسانی باید دامین‌های حفاظت‌شده مشابهی داشته باشند [۱۳].

روش‌های گفته شده بالا برای پروتئین‌های مشابه ویروسی انجام شد و ۳ پروتئین ویروسی گلیکوپروتئین سطحی، پروتئین پوششی و نوکلئوکپسید فسفو پروتئین مورد استفاده قرار گرفت و دامین‌های ۳ پروتئین p کوچکی داشتند و متفاوت بودند که نشان می‌دهد توانایی

در ابتدا تم آهن از هم حذف می‌شود. سپس با کلیک بر Prepare Ligands مدل پورفیرین تولید می‌شود. با استفاده از OXT باز شده باید دست آوردن مدل لیگاند پروتئین، باید فایل‌های PDB به دست آمده از همولوژی مدل گیرنده باز کرد و روی Prepare Protein Dock Ligands در زیر منوی Receptor-Ligand interactions کلیک کرد تا یک مدل گیرنده پروتئین جهت داکینگ استفاده شود. سپس باید پارامترهای داکینگ را برای به دست آوردن داکینگ تنظیم کرد. برای این کار در generated protein receptor model انتخاب می‌شود و از Define and Edit Binding Site در زیر منوی Receptor-Ligand interactions روی Receptor Cavities کلیک می‌شود و با این کار، دایره قرمز روی نمودار مدل گیرنده پروتئین ظاهر می‌شود. پس از راست کلیک کردن، می‌توان شعاع دایره قرمز را تغییر داد.

در منوی Receptor-Ligand interactions و زیرمنوی Dock Ligands، گزینه Dock Ligand (LibDock)، انتخاب می‌شود و از قسمت pop-up box تمام لیگاندهای جدید پیش‌بینی شده به عنوان newly established receptor model-ALL گیرنده، سایت‌های دایره به عنوان مختصات دایره انتخاب می‌شود. در نهایت برای شروع اتصال روی Run کلیک می‌شود. پس از تکمیل اتصال، با محاسبه انرژی پیوندی و انتخاب بهترین انرژی اتصال به عنوان لیگاند، مکان‌های زیادی به نمایش گذاشته می‌شود [۱۰] که بدین منظور با باز کردن Docked view و کلیک روی دکمه Caculate Binding Energies از Dock Ligands منوی Receptor-Ligand interactions در pop-up box گیرنده به عنوان docked model-ALL لیگاند به عنوان

هم انسانی حمله می کنند تا آهن را برای تشکیل پورفیرین جدا کنند. پس از جدا شدن آهن از هم و تشکیل پورفیرین دو پروتئین ORF8 و گلیکوپروتئین های سطحی ویروس SARS-COV-2 با پورفیرین یک کمپلکس قوی تشکیل می دهند که مانع از باند شدن آهن به پورفیرین و در نهایت هموگلوبین می شوند که این امر باعث کاهش شدید اکسیژن رسانی به اندام ها می شود [۱۰]. از آنجا که ۲ کمپلکس پورفیرین تولید شده در بدن انسان، مسیرهای آنابولیک هم را مهار می کند، می تواند باعث ایجاد طیف وسیعی از بیماری های عفونی شود. با این یافته می توان چنین تصور کرد که کلروکین می تواند از پروتئین های ORF10، ORF1ab، ORF3a برای حمله به هم جلوگیری کند و مانع از ایجاد پورفیرین شود. به همین دلیل بین دو پروتئین ORF8 و گلیکوپروتئین سطحی کروناویروس، با پورفیرین بدن شخص بیمار، کمپلکس تشکیل می شود [۱۰، ۱۱].

#### بررسی بیوانفورماتیکی ساختار ژنوم SARS-COV-2

مقایسه ژنوم آلفا و بتا کروناویروس با هم دو نکته قابل توجه در مورد SARS-COV-2 را مشخص می کند: در ابتدا بر اساس مطالعات ساختاری که روی SARS-COV-2 انجام شده است، به نظر می رسد که این ویروس برای اتصال به گیرنده سلول انسانی آنژیوناسین ۲ بهینه شده است. در ثانی، پروتئین S از SARS-COV-2 یک محل کلیواژ عملکردی polybasic به نام فارین در مرز S1-S2 دارد که از طریق وارد شدن ۱۲ نوکلئوتید به وجود آمده است که منجر به ایجاد سه سایت پیوندی O-گلیکان در اطراف این سایت شده است [۱۴].

#### موتاسیون در دامین اتصال به گیرنده SARS-COV-2

دامین اتصال به گیرنده<sup>۲۶</sup> در پروتئین S یک بخش بسیار متغیر در ژنوم SARS-COV-2 است. یافته ها نشان می دهند که ۶ آمینواسید RBD برای اتصال به گیرنده های آنژیوناسین ۲ و تأمین دامنه میزبان از ویروس های شبه سارس بسیار حیاتی هستند. مطابق با تحلیل های انجام شده که در مجله پزشکی طبیعی<sup>۲۷</sup> چاپ شد، این ۶ آمینواسید در سارس به ترتیب ۷۴۴۲، ۴۷۲، ۴۷۹، ۴۸۰، ۴۸۷، ۴۹۱۱ و ۴۹۹۴ است که دقیقاً با آمینواسیدهای ۴۴۸۶، ۴۵۵، ۴۹۳، ۴۹۴، ۵۰۱ و ۵۰۵ از SARS-COV-2 از نظر محل قرارگیری مطابقت دارد [۱۴]. اما ۵ مورد از این ۶ رزیدو بین SARS-COV-2 و سارس متفاوت است (تصویر شماره ۵).

بر اساس مطالعات ساختاری و آزمایشات بیوشیمیایی SARS-COV-2 به نظر می رسد که قسمت RBD از SARS-COV-2 توانایی اتصال با همولوژی بالا به گیرنده های آنژیوناسین ۲ از انسان، سمور، گربه و دیگر گونه ها دارد. در حالی که تجزیه و تحلیل بالا نشان می دهد SARS-COV-2 ممکن است میل ترکیبی بالایی با آنژیوناسین ۲ انسانی داشته باشد، اما تجزیه و تحلیل محاسباتی پیش بینی می کند

پروتئین ساختاری برای اتصال به پورفیرین کمی متفاوت است. علاوه بر این، گلیکوپروتئین غشایی نمی تواند به پورفیرین متصل شود. سپس سرور آنالین سوئیس مدل سطح گلیکوپروتئین ها را برای ایجاد یک ساختار ۳ بعدی مدل سازی کرد و دو نوع فایل بر اساس مدل پروتئین اسپایک و نمونه E2 انتخاب شد [۱۰]. سپس فایل ساختاری 3D از بانک اطلاعات پروتئین<sup>۲۵</sup> دانلود شد. مدل ساختاری، حاکی از عدم توانایی گلیکوپروتئین سطحی به قسمت پورفیرین از هم بود، اما همین اقدامات برای پروتئین پوششی، حاکی از توانایی اتصال پروتئین پوششی به پورفیرین است. تصویر شماره ۳، نمای ۲ بعدی مقطع اتصال است که در آن تعداد ۱۸ آمینواسید از پروتئین های پوششی ویروس با پورفیرین انسانی تعامل دارد. اما همین اقدامات برای نوکلئوکسپید فسفوپروتئین نیز انجام شد که نتایج حاکی از توانایی اتصال نوکلئوکسپید فسفوپروتئین به پورفیرین با بالاترین انرژی اتصال ممکن یعنی 5206.53 kcal/mol است. تصویر شماره ۴ نمای داکینگ را نشان می دهد که نمای ۲ بعدی مقطع اتصال از نوکلئوکسپید فسفوپروتئین ویروس با پورفیرین انسانی است [۱۰-۱۳].

اگر پروتئین های غیرساختاری بتوانند به قسمت پورفیرین هم متصل شوند، باید توانایی اتصال مشابهی با پروتئین اتصال انسانی داشته باشند. سپس سرور آنالین MEME برای جست و جوی دامین های حفاظت شده بین پروتئین های غیرساختاری ویروس و Heme binding protein انسانی مورد استفاده قرار می گیرد. برای مطالعه خصوصیات اتصال پروتئین ORF8 به هم همان مراحل تجزیه و تحلیل همانند پروتئین های ساختاری انجام می شود. چندین نوع شکل ساختاری متصل کردن پروتئین ORF8 به پورفیرین نشان از داشتن بالاترین سطح انرژی یعنی kcal/mol ۸۵۹/۲۵ بود. ضمن اینکه نتایج داکینگ مولکولی نیز تاGتیدکننده اتصال مناسب پروتئین ORF8 به پورفیرین و اشتراک آن ها در ۱۸ آمینو اسید دارد. تصویر شماره ۳ نمای ۲ بعدی مقطع اتصال از پروتئین های غیرساختاری ORF8 ویروس با پورفیرین انسانی است [۱۰].

از آنجا که همه گیری SARS-COV-2 به عنوان یک معضل جهانی مطرح است، روش های پیش بینی برای جست و جوی دامین های حفاظت شده بسیار حائز اهمیت است. دست یابی به ساختار مولکول های پروتئین از جمله ORF8 و نوکلئوکسپید فسفوپروتئین ها (پروتئین های سطحی) با استفاده از روش های مدل سازی بیوانفورماتیکی و تجزیه و تحلیل امکان و نحوه اتصال آن به پورفیرین انسانی از قسمت هم در هموگلوبین بسیار حائز اهمیت است.

مطالعات وزنانگ ليو و همکاران نشان داد ORF8 و گلیکوپروتئین های سطحی ویروس می توانند به صورت یک کمپلکس با پورفیرین انسانی ترکیب شوند [۱۰]. همچنین این گروه نشان دادند که به ترتیب پروتئین های ORF10، ORF1ab، ORF3a به قسمت

26. RBD

27. NATURE MEDICINE

25. Worldwide Protein Data Bank (PDB)



تصویر ۵. ویژگی‌های پروتئین S از SARS-CoV-2 انسانی و مقایسه آن با دیگر کروناویروس‌ها

### جندی شاپور

اتصال S1-S2، فیوژن سلولی را بدون تأثیر بر ورود ویروس افزایش می‌دهد. در ویروس آنفولانزای مرغی، تکثیر و انتقال سریع در جمعیت‌های به شدت متراکم مرغ برای به دست آوردن محل کلیواژ polybasic در پروتئین هم‌گلوپتینین<sup>۲۸</sup> انتخاب می‌شود [۱۷، ۱۸] که عملکردی مشابه با پروتئین S ویروس کرونا دارد.

دریافت محل کلیواژ polybasic به روش الحاق یا رونویسی، ویروس آنفولانزای مرغی را به شدت بیماری‌زا می‌کند [۱۸]. این موضوع همچنین پس از ورود محل کلیواژ polybasic توسط پروتئین هم‌گلوپتینین در محیط کشت سلولی و سپس در حیوانات مشاهده شده است. عملکرد پیوند O-گلیکان مشخص نیست، اما این پیوندها می‌توانند یک دامین شبه‌موسین ایجاد کنند که اپی‌توپ‌ها را محافظت می‌کند و یا می‌توانند کلیدی برای رزیدوهای پروتئین S از SARS-CoV-2 باشد [۱۹]. بسیاری از ویروس‌ها از دامین‌های شبه‌موسین به‌عنوان سپرهای دفاعی استفاده می‌کنند. اگرچه به نظر می‌رسد که پیوند O-گلیکوزیلاسیون قوی است، اما مطالعات تجربی برای تعیین اینکه آیا این سایت‌ها در SARS-CoV-2 استفاده می‌شود، مورد نیاز است. در رابطه با امکان دست‌کاری آزمایشگاهی SARS-CoV-2 همان‌طور که در سطور قبل اشاره شد قسمت RBD از SARS-CoV-2 متفاوت‌تر از آنچه که از قبل بوده، برای اتصال به آنژیوناسین ۲ انسانی بهینه شده است [۲۰]. علاوه‌براین اگر دست‌کاری ژنتیکی انجام شده باشد، یکی از چند سیستم ژنتیکی موجود برای بتاکروناویروس‌ها احتمالاً باید مورد استفاده قرار گرفته باشد. با این حال داده‌های ژنتیکی نشان می‌دهد که SARS-CoV-2 از هیچ‌یک از ویروس‌های استفاده‌شده قبلی مشتق نشده است [۲۱]، اما دو سناریو برای احتمال وجود SARS-CoV-2 وجود دارد:

که این برهم‌کنش‌ها ایده‌آل نیست و توالی RBD با توالی سارس که یک توالی بهینه است، تفاوت دارد. در اقع این توالی در سارس نسبت به SARS-CoV-2 تعاملات بهینه‌تری دارد [۱۴]. بنابراین کارایی بالای اتصال پروتئین S از SARS-CoV-2 به آنژیوناسین ۲ انسانی، به احتمال زیاد، ناشی از انتخاب طبیعی روی یک انسان یا موجوداتی است که گیرنده آنژیوناسین ۲ شبه‌انسانی که اجازه اتصال بهینه را به ویروس می‌دهند، این، یک مدرک کاملاً معتبر بر آزمایشگاهی نبودن ویروس SARS-CoV-2 است، اما تأیید آن نیازمند مطالعات موشکافانه بیشتر است [۱۴].

### محل کلیواژ polybasic فارین و پیوند O-گلیکان

دومین قسمت قابل‌توجه از SARS-CoV-2 یک محل کلیواژ polybasic (RRAR) در نقطه اتصال S1-S2 یعنی ۲ زیر واحد S است. این کار، امکان تقسیم مؤثر توسط فارین و پروتئازهای دیگر را فراهم می‌کند و در تعیین دامنه آلودگی ویروس و دامنه میزبانی نقش دارد [۱۵]. علاوه‌براین یک پرولین نیز در این محل از SARS-CoV-2 وجود دارد. بنابراین توالی واردشده به‌صورت PRRA است. تغییرات ایجادشده توسط پرولین به نظر می‌رسد که منجر به اضافه شدن پیوند O-گلیکان‌ها به S۶۷۳، T۶۷۸ و S۶۸۶ شود که محل تقسیم و کلیواژ و انحصاری SARS-CoV-2 است [۱۶]. محل‌های کلیواژ polybasic در اصل در دودمان B از بتاکروناویروس‌ها وجود ندارند. اگرچه در دیگر کروناویروس‌های انسانی نظیر HKU1 از دودمان A این سایت‌ها و پیوند O-گلیکان وجود دارد [۱۵].

باتوجه به سطح تنوع ژنتیکی بالا در اسپایک، این احتمال وجود دارد که ویروس SARS-CoV-2 با جایگاه‌های کاتالیتیک کامل در گونه‌های دیگر نیز کشف شود. همچنین عملکرد محل کلیواژ polybasic که برای تشخیص انتقال و بیماری‌زایی ویروس در مدل‌های حیوانی تعیین‌کننده است، مشخص نیست [۱۴]. آزمایش‌هایی با ویروس سارس نشان داد که الحاق یک محل کلیواژ فارین در نقطه

آهن را تجزیه کرده و porphyrin را شکل دهند. این حمله منجر به کاهش میزان هموگلوبین در دسترس برای حمل اکسیژن و دی‌اکسید کربن می‌شود.

سلول‌های ریه به علت ناتوانی در مبادله کربن دی‌اکسید و اکسیژن به شدت التهاب دارند که در نهایت منجر به تصاویر ground مانند در سی‌تی‌اسکن می‌شوند. با این یافته‌های بیوانفورماتیکی و تجزیه و تحلیل بیشتر می‌توان فهمید که کلروکین ممکن است از حمله به هموگلوبین برای تشکیل porphyrin جلوگیری کند و مانع از اتصال ORF8 و سطحی به porphyrins تا حد معینی شود و به‌طور مؤثر علائم حاد تنفسی را تسکین دهد. در حال حاضر جنگ سختی بین ماده ژنتیکی و هوش و بیروسی با عقل و هوش انسانی در جریان است و برای پیروزی در این نبرد، علاوه بر شناخت کافی از این ویروس مهاجم و مسری، نیاز به اتخاذ تصمیمات کنترلی صحیح و بموقع از سوی کشورها و اهتمام به انجام اقدامات محافظتی و بهداشتی شخصی است. با توجه به همه‌گیری کنونی، اعتقاد بر این است که نتایج تحقیقات بیوانفورماتیکی از ارزش بالایی در پیش‌گیری از شیوع ذات‌الریه ویروس کرونا، توسعه داروها و واکسن‌ها و درمان بالینی برخوردارند.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش مطابق با اصول اخلاق پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، نگارش شده است.

#### حامی مالی

این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی خاصی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

#### مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: توحید پیری قراقیه؛ تحقیق و بررسی: شیدا بیرانوند؛ ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته: سامه حاجی محمدی و امیرحسین قدیری.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، در این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی را ندارند.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان از کمک و حمایت کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در ایران تشکر می‌کنند.

مورد اول: انتخاب طبیعی در یک میزبان حیوانی قبل از انتقال Zoonotic

مورد دوم: انتخاب طبیعی در انسان‌ها پس از انتقال Zoonotic است [۱۴]. نتایج این مطالعات به لزوم مطالعات بیوانفورماتیکی بیشتر در خصوص سناریوی آزمایشگاهی بودن ویروس دلالت دارد.

### نتیجه‌گیری

در دو دهه اخیر دو ویروس کرونا از جنس بتاکروناویروس‌ها به نام‌های سارس و مرس باعث وحشت عمومی مداوم شدند و به مهم‌ترین وقایع بهداشت عمومی تبدیل شدند تا اینکه ویروس کرونای جدید ۲۰۱۹ با پنومونی وسیعی از وهان چین گسترش یافت [۵۴]. در این مطالعه به جمع‌آوری مجموعه اطلاعات حاصل از پژوهش‌های انجام شده در خصوص کووید-۱۹ پرداخته شد. بررسی ویژگی‌های ویروس نشان داد همانندسازی SARS-COV-2 توسط اتصال پروتئین S به گیرنده سطح سلول شروع می‌شود. SARS-COV-2 آنزیم سطح سلولی آنژیوناسین ۲ را به‌عنوان گیرنده اختصاصی جهت ورود به سلول استفاده می‌کند. از آنجایی که میزان بیان این آنزیم در جوامع آسیای شرقی بیشتر از سایر جوامع است، لذا شیوع آن در این جوامع بیشتر از سایرین بوده است [۵۵]. با توجه به خصوصیات منحصربه‌فرد ماده ژنتیکی کروناویروس‌ها و همچنین مکانیسم تکثیر آن‌ها، ظهور ویروس کرونای جدید برای ویروس‌شناسان دور از انتظار نبوده است. از جمله این ویژگی‌های خاص می‌توان به میزان بالای نوترکیبی ژنتیکی این ویروس اشاره کرد که هر چند سال یک‌بار منجر به پدیدار شدن سویه‌های جدید و ناشناخته می‌شود. دلیل این مقدار بالای نوترکیبی را می‌توان به طول بسیار بلند ماده ژنتیکی این ویروس در مقایسه با سایر ویروس‌ها، تکثیر پیچیده و میزان بالای خطای آنزیم همانندسازی این ویروس و در نهایت، به دامنه میزبانی وسیع این ویروس‌ها در انسان‌ها و حیوانات مختلف نسبت داد [۵۶]. از زمان شیوع بیماری همه‌گیر کووید-۱۹، استفاده از بیوانفورماتیک برای تجزیه و تحلیل نقش پروتئین‌های کروناویروس جدید (مانند ORF8 و گلیکوپروتئین<sup>۲۹</sup> سطحی) اهمیت علمی بالایی خود را یادآور شد [۵۷].

در این مطالعه، چگونگی بررسی بیوانفورماتیکی و روش‌های پیش‌بینی دامنه برای جست‌وجوی دامنه‌های حفاظت‌شده بیان شدند. مطالعات بیوانفورماتیکی مختلف در خصوص ساختار مولکول‌های پروتئینی مانند ORF8 و گلیکوپروتئین سطحی با استفاده از روش‌های مدل‌سازی همولوژی و تکنولوژی داکینگ مولکولی برای تجزیه و تحلیل بخش اتصال پروتئین ویروسی به پورفرین بررسی شد [۵۸]. جمع‌بندی نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که ORF8 و گلیکوپروتئین سطحی می‌توانند به ترتیب با هم ترکیب شوند تا یک کمپلکس را شکل دهند. همچنین، ORFهای دیگر می‌توانند روی زنجیره ۱- بتا در هموگلوبین حمله کنند تا

29. Glycoproteins

### References

- [1] Corman VM, Lienau J, Witzentrath M. [Coronaviruses as the cause of respiratory infections]. *Internist (German)*. 2019; 60(11):1136-45. [DOI:10.1007/s00108-019-00671-5] [PMID] [PMCID]
- [2] Guo Q, Li M, Wang C, Wang P, Fang Z, Wu S, et al. Host and infectivity prediction of Wuhan 2019 novel coronavirus using deep learning algorithm. *Biorxiv preprint*. 2020; 1-10. [Unpublished]. [Link]
- [3] Sironi M, Hasnain SE, Rosenthal B, Phan T, Luciani F, Shaw MA, et al. SARS-COV-2 and covid-19: A genetic, epidemiological, and evolutionary perspective. *Infect Genet Evol*. 2020; 84:104384. [DOI:10.1016/j.meegid.2020.104384] [PMID] [PMCID]
- [4] Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798):270-3. [DOI:10.1038/s41586-020-2012-7] [PMID] [PMCID]
- [5] Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020; 92(4):418-23. [DOI:10.1002/jmv.25681] [PMID] [PMCID]
- [6] He J, Tao H, Yan Y, Huang SY, Xiao Y. Molecular mechanism of evolution and human infection with SARS-COV-2. *Viruses*. 2020; 12(4):428. [DOI:10.3390/v12040428] [PMID] [PMCID]
- [7] He J, Tao H, Yan Y, Huang S, Xiao Y. Molecular mechanism of evolution and human infection with the novel coronavirus (2019-nCoV). *Biorxiv preprint*. 2020; 1-19. [Unpublished] [DOI:10.1101/2020.02.17.952903]
- [8] Mycroft-West C, Su D, Elli S, Li Y, Guimond S, Miller G, et al. The 2019 coronavirus (SARS-COV-2) surface protein (Spike) S1 receptor binding domain undergoes conformational change upon heparin binding. *Biorxiv preprint*. 2020; 1-9. [Unpublished] [DOI:10.1101/2020.02.29.971093]
- [9] Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-COV-2. *Nat Med*. 2020; 26(4):450-2. [DOI:10.1038/s41591-020-0820-9] [PMID] [PMCID]
- [10] Liu W, Li H. Covid-19 disease: ORF8 and surface glycoprotein inhibit heme metabolism by binding to porphyrin. *Biological and Medicinal Chemistry*. 2020; 1-23. [DOI:10.26434/chemrxiv.11938173.v3]
- [11] Diao K, Han P, Pang T, Li Y, Yang Z. HRCT imaging features in representative imported cases of 2019 novel coronavirus pneumonia. *Precision Clinical Medicine*. 2020; 3(1):9-13. [DOI:10.1093/pccmedi/pbaa004] [PMCID]
- [12] Quiros Roldan E, Biasiotto G, Magro P, Zanella I. The possible mechanisms of action of 4-aminoquinolines (chloroquine/hydroxychloroquine) against SARS-COV-2 infection (covid-19): A role for iron homeostasis? *Pharmacol Res*. 2020; 158:104904. [DOI:10.1016/j.phrs.2020.104904] [PMID] [PMCID]
- [13] Liu W, Li H. Covid-19: Attacks the 1-beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism. *Biological and Medicinal Chemistry*. 2020; 1-28. [DOI:10.26434/chemrxiv.11938173]
- [14] Chaw SM, Tai JH, Chen SL, Hsieh CH, Chang SY, Yeh SH, et al. The origin and underlying driving forces of the SARS-COV-2 outbreak. *J Biomed Sci*. 2020; 27(1):73. [DOI:10.1186/s12929-020-00665-8] [PMID] [PMCID]
- [15] Örd M, Faustova I, Loog M. The sequence at Spike S1/S2 site enables cleavage by furin and phospho-regulation in SARS-CoV2 but not in SARS-CoV1 or MERS-CoV. *Sci Reports*. 2020; 10(1):1-0. [DOI:10.1038/s41598-020-74101-0]
- [16] Chan CM, Woo PC, Lau SK, Tse H, Chen HL, Li F, Zheng BJ, Chen L, Huang JD, Yuen KY. Spike protein, S, of human coronavirus HKU1: role in viral life cycle and application in antibody detection. *Experimental Biology Med*. 2008; 233(12):1527-36. [DOI:10.3181/0806-RM-197]
- [17] Elrashdy F, Redwan EM, Uversky VN. Why covid-19 transmission is more efficient and aggressive than viral transmission in previous coronavirus epidemics? *Biomolecules*. 2020; 10(9):1312. [DOI:10.3390/biom10091312] [PMID] [PMCID]
- [18] +++Stech O, Veits J, Weber S, Deckers D, Schröder D, Vahlenkamp TW, et al. Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *J Virol*. 2009; 83(11):5864-8. [DOI:10.1128/JVI.02649-08] [PMID] [PMCID]
- [19] Johnson BA, Graham RL, Menachery VD. Viral metagenomics, protein structure, and reverse genetics: Key strategies for investigating coronaviruses. *Virology*. 2018; 517:30-7. [DOI:10.1016/j.virol.2017.12.009]
- [20] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Rev Microbiol*. 2019; 17(3):181-92. [DOI:10.1038/s41579-018-0118-9]
- [21] Ranjha MI, Mooneeb Ali M. Covid 19 infodemic: An analysis of myths and realities. *Euro J Nat Soc Sci*. 2020; 9(4):773-97.
- [22] Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: Viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *Plos Pathog*. 2011; 7(12):e1002433. [DOI:10.1371/journal.ppat.1002433] [PMID] [PMCID]
- [23] Tanaka T, Kamitani W, DeDiego ML, Enjuanes L, Matsuura Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. *J Virol*. 2012; 86(20):11128-37 [DOI:10.1128/JVI.01700-12] [PMID] [PMCID]
- [24] Graham RL, Sims AC, Brockway SM, Baric RS, Denison MR. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J Virol*. 2005; 79(21):13399-411. [DOI:10.1128/JVI.79.21.13399-13411.2005] [PMID] [PMCID]
- [25] Gadlage MJ, Graham RL, Denison MR. Murine coronaviruses encoding nsp2 at different genomic loci have altered replication, protein expression, and localization. *J Virol*. 2008; 82(23):11964-9. [DOI:10.1128/JVI.01126-07] [PMID] [PMCID]



- [26] Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res.* 2018; 149:58-74. [DOI:10.1016/j.antiviral.2017.11.001] [PMID] [PMCID]
- [27] Serrano P, Johnson MA, Chatterjee A, Neuman BW, Joseph JS, Buchmeier MJ, et al. Nuclear magnetic resonance structure of the nucleic acid-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 3. *J Virol.* 2009; 83(24):12998-3008. [DOI:10.1128/JVI.01253-09] [PMID] [PMCID]
- [28] Beachboard DC, Anderson-Daniels JM, Denison MR. Mutations across murine hepatitis virus nsp4 alter virus fitness and membrane modifications. *J Virol.* 2015; 89(4):2080-9. [DOI:10.1128/JVI.02776-14] [PMID] [PMCID]
- [29] Gadlage MJ, Sparks JS, Beachboard DC, Cox RG, Doyle JD, Stobart CC, et al. Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J Virol.* 2010; 84(1):280-90. [DOI:10.1128/JVI.01772-09] [PMID] [PMCID]
- [30] Stobart CC, Sexton NR, Munjal H, Lu X, Molland KL, Tomar S, et al. Chimeric exchange of coronavirus nsp5 proteases (3CLpro) identifies common and divergent regulatory determinants of protease activity. *J Virol.* 2013; 87(23):12611-8. [DOI:10.1128/JVI.02050-13] [PMID] [PMCID]
- [31] Zhu X, Wang D, Zhou J, Pan T, Chen J, Yang Y, et al. Porcine delatocoronavirus nsp5 antagonizes type I interferon signaling by cleaving STAT2. *J Virol.* 2017; 91(10):e00003-17. [DOI:10.1128/JVI.00003-17] [PMID] [PMCID]
- [32] Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio.* 2013; 4(4):e00524-13. [DOI:10.1128/mBio.00524-13] [PMID] [PMCID]
- [33] Cottam EM, Whelband MC, Wileman T. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy.* 2014; 10(8):1426-41. [DOI:10.4161/auto.29309] [PMID] [PMCID]
- [34] Kirchdoerfer RN, Ward AB. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun.* 2019; 10(1):2342. [DOI:10.1038/s41467-019-10280-3] [PMID] [PMCID]
- [35] Zhai Y, Sun F, Li X, Pang H, Xu X, Bartlam M, et al. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol.* 2005; 12(11):980-6. [DOI:10.1038/nsmb999] [PMID] [PMCID]
- [36] te Velhuis AJ, van den Worm SH, Snijder EJ. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(4):1737-47. [DOI:10.1093/nar/gkr893] [PMID] [PMCID]
- [37] Egloff MP, Ferron F, Campanacci V, Longhi S, Rancurel C, Durtartre H, et al. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(11):3792-6. [DOI:10.1073/pnas.0307877101] [PMID] [PMCID]
- [38] Zeng Z, Deng F, Shi K, Ye G, Wang G, Fang L, et al. Dimerization of coronavirus nsp9 with diverse modes enhances its nucleic acid binding affinity. *J Virol.* 2018; 92(17):e00692-18. [DOI:10.1128/JVI.00692-18] [PMID] [PMCID]
- [39] Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, Zevenhoven JC, Bernard S, Betzi S, et al. Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J Biol Chem.* 2014; 289(37):25783-96. [DOI:10.1074/jbc.M114.577353] [PMID] [PMCID]
- [40] Ma Y, Wu L, Shaw N, Gao Y, Wang J, Sun Y, et al. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 112(30):9436-41. [DOI:10.1073/pnas.1508686112] [PMID] [PMCID]
- [41] Fang SG, Shen H, Wang J, Tay FP, Liu DX. Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology.* 2008; 379(2):175-80. [DOI:10.1016/j.virol.2008.06.038] [PMID] [PMCID]
- [42] Ahn DG, Choi JK, Taylor DR, Oh JW. Biochemical characterization of a recombinant SARS coronavirus nsp12 RNA-dependent RNA polymerase capable of copying viral RNA templates. *Arch Virol.* 2012; 157(11):2095-104. [DOI:10.1007/s00705-012-1404-x] [PMID] [PMCID]
- [43] te Velhuis AJ, Arnold JJ, Cameron CE, van den Worm SH, Snijder EJ. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(1):203-14. [DOI:10.1093/nar/gkp904] [PMID] [PMCID]
- [44] Adedeji AO, Lazarus H. Biochemical characterization of middle east respiratory syndrome coronavirus helicase. *mSphere.* 2016; 1(5):e00235-16. [DOI:10.1128/mSphere.00235-16] [PMID] [PMCID]
- [45] Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, et al. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog.* 2010; 6(5):e1000896. [DOI:10.1371/journal.ppat.1000896] [PMID] [PMCID]
- [46] Jia Z, Yan L, Ren Z, Wu L, Wang J, Guo J, et al. Delicate structural coordination of the severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(12):6538-50. [DOI:10.1093/nar/gkz409] [PMID] [PMCID]
- [47] Bouvet M, Imbert I, Subissi L, Gluais L, Canard B, Decroly E. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Jun 12;109(24):9372-7. [DOI:10.1073/pnas.1201130109] [PMID] [PMCID]
- [48] Minskaia E, Hertzog T, Gorbalenya AE, Campanacci V, Cambillau C, Canard B, et al. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(13):5108-13. [DOI:10.1073/pnas.0508200103] [PMID] [PMCID]
- [49] Bhardwaj K, Sun J, Holzenburg A, Guarino LA, Kao CC. RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J Mol Biol.* 2006; 361(2):243-56. [DOI:10.1016/j.jmb.2006.06.021] [PMID] [PMCID]

- [50] Zhang L, Li L, Yan L, Ming Z, Jia Z, Lou Z, Rao Z. Structural and biochemical characterization of endoribonuclease Nsp15 encoded by Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 2018; 92(22):e00893-18. [DOI:10.1128/JVI.00893-18] [PMID] [PMCID]
- [51] Chen Y, Su C, Ke M, Jin X, Xu L, Zhang Z, et al. Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *Plos Pathog.* 2011; 7(10):e1002294. [DOI:10.1371/journal.ppat.1002294] [PMID] [PMCID]
- [52] Decroly E, Debarnot C, Ferron F, Bouvet M, Coutard B, Imbert I, et al. Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *Plos Pathog.* 2011; 7(5):e1002059. [DOI:10.1371/journal.ppat.1002059] [PMID] [PMCID]
- [53] Shi P, Su Y, Li R, Liang Z, Dong S, Huang J. PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation. *Virus Res.* 2019; 265:57-66. [DOI:10.1016/j.virusres.2019.03.005]
- [54] Singhal T. A review of coronavirus disease-2019 (covid-19). *Indian J Pediatr.* 2020 Apr;87(4):281-86. [DOI:10.1007/s12098-020-03263-6] [PMID] [PMCID]
- [55] Zamorano Cuervo N, Grandvaux N. ACE2: Evidence of role as entry receptor for SARS-CoV-2 and implications in comorbidities. *Elife.* 2020; 9:e61390. [DOI:10.7554/eLife.61390] [PMID] [PMCID]
- [56] Lam TT, Jia N, Zhang YW, Shum MH, Jiang JF, Zhu HC, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature.* 2020; 583(7815):282-85. [DOI:10.1038/s41586-020-2169-0] [PMID]
- [57] Islam MR, Hoque MN, Rahman MS, Alam ASMRU, Akther M, Puspo JA, et al. Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. *Sci Rep.* 2020; 10(1):14004. [DOI:10.1038/s41598-020-70812-6] [PMID] [PMCID]
- [58] Piri Gharaghie T, Beiranvand S, Doosti A, Ghadiri AH, Haji Mohammadi S. A review of the epidemiology and clinical signs of SARS-COV-2. *New Cell Mol Biotechnol J.* 2020; 11(41):103-20. [Doi:20.1001.1.22285458.1399.11.41.4.8]