

همبستگی بین فراوانی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن TYK2 با بیماری کووید-۱۹

نویسندگان:

هدیه تمیمی^۱، فلورا فروزش^۱، پونه رحیمی^{۲*}

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- بخش هیپاتیت، ایدز و بیماری‌های منتقله از خون، انستیتو پاستور تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.3, Fall 2023

چکیده:

مقدمه: گوناگونی در پیامدهای ابتلا به بیماری کووید-۱۹ و درک چرایی آن به یک چالش جهانی در حوزه سلامت منجر شده است. ویژگی‌های ژنتیکی به ویژه تفاوت در ژن‌های سیستم ایمنی به عنوان یکی از عوامل مهم در گوناگونی پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با ویروس‌هایی همچون ویروس SARS-CoV-2 در نظر گرفته می‌شود.

روش کار: در این مطالعه پس از استخراج DNA از نمونه خون ۲۲۰ بیمار مبتلا به کووید-۱۹، از روش PCR-RFLP برای شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی مورد نظر در ژن تیروزین کیناز ۲ (TYK2) استفاده شد. پس از انجام واکنش PCR، محصولات PCR مورد هضم آنزیمی با آنزیم AluI قرار گرفتند و قطعات ایجاد شده با کمک ژل الکتروفورز از یکدیگر جدا شدند. با بررسی قطعات حاصل، فنوتیپ هر بیمار مشخص و به منظور تأیید نهایی، تعدادی از نمونه‌ها برای تعیین توالی ارسال شدند.

یافته‌ها: جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش شامل ۱۰۲ بیمار بهبودیافته مبتلا به شکل خفیف کووید-۱۹ و ۱۱۸ بیمار فوت شده مبتلا به نوع شدید بیماری بود. فراوانی چندشکلی rs11085727 در ژن TYK2 در گروه فوت شدگان به صورت معناداری نسبت به گروه بهبود یافتگان بالاتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: بررسی عوامل ژنتیکی و تنوع آن‌ها به ویژه بررسی چندشکلی‌های موجود در ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی می‌تواند نقش مهمی در برآورد پیش‌آگهی برای ابتلا به کووید-۱۹ و اتخاذ روش‌های درمانی ویژه براساس ژنتیک بیماران داشته باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، چندشکلی rs11085727 در ژن TYK2 احتمالاً با شدت بیماری کووید-۱۹ در ارتباط است.

واژگان کلیدی: چندشکلی تک نوکلئوتیدی، تیروزین کیناز، SARS CoV-2، بیماری کووید-۱۹

Pars J Med Sci 2023;21(3):64-72

مقدمه:

ژنوم RNA تک رشته‌ای سنس مثبت به همراه پوشش و دارای نوکلئوکپسید ماریپچی است. این ویروس همچنین جزو یکی از بزرگترین ویروس‌های RNA شناخته شده است [۳]. ژنوم این ویروس شامل چهار پروتئین ساختاری (N,E,S,M)، شانزده پروتئین غیرساختاری (NSP1-16) و هشت پروتئین فرعی (3a,3b,6,7a,7b,8b,9b,ORF14) است [۴]. ویروس مذکور علاوه بر آلوده کردن حیوانات، توانایی آلوده کردن انسان را نیز دارد [۲]. این ویروس عامل بیماری تنفسی کووید-۱۹ بوده که سرعت انتشار بالایی دارد و اولین بار در وهان چین در سال ۲۰۱۹

ویروس Severe Acute respiratory SARS-CoV-2 (Syndrome-Corona virus-2) از ویروس‌های ایجاد کننده سندرم حاد تنفسی است [۲، ۱]. این ویروس در خانواده Corona Viridae، زیرگروه Ortho Corona Virinae و در جنس Beta Corona Virus قرار می‌گیرد که دو عضو دیگر آن به نام‌های SARS-CoV-1 و MERS (The Middle East Respiratory Syndrome) از Corona Virus مدت‌ها پیش به عنوان ویروس‌های تنفسی شناخته شده‌اند که منجر به درگیر شدن ریه‌ها می‌شوند [۲، ۱]. ویروس SARS-CoV-2 یک ویروس کروی شکل است که دارای

* نویسنده مسئول، نشانی: بخش هیپاتیت، ایدز و بیماری‌های منتقله از خون، انستیتو پاستور تهران، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۱۲۱۳۶۳۶۴۳ پست الکترونیک: Prahimi @ pasteur.ac.ir , pooneh5376 @ yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸ اصلاح: ۱۴۰۲/۱۰/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

روش کار:

انتخاب جمعیت مطالعه

بر اساس مطالعات مشابه و با در نظر گرفتن نسبت شانس ۲/۵ و لحاظ کردن خطای نوع اول ۰/۰۵ و توان ۸۰ درصد، حجم نمونه برای هر یک از گروه‌های مورد مطالعه ۱۱۰ نفر برآورد شد. در این پژوهش ۲۲۰ نمونه خون محیطی به حجم ۵ سی سی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA از ۲۲۰ بیمار مبتلا به عفونت SARS-CoV-2 از دانشگاه علوم پزشکی ایلام جمع‌آوری شد. تعداد ۱۰۲ بیمار در گروه بیماران بهبودیافته با علائم خفیف که به صورت سرپایی درمان و مرخص شده بودند و ۱۱۸ بیمار در گروه بیماران فوت شده در اثر بیماری کوید-۱۹ به عنوان گروه‌های مورد مطالعه در نظر گرفته شدند. افراد بدون سابقه بیماری‌های مزمن ریوی، آسم و آلرژی، بیماری‌های قلبی، دیابت و سرطان وارد مطالعه شدند. افراد بیمار از هر دو جنسیت و در گروه سنی ۶۰-۲۰ سال قرار داشتند و تا زمان نمونه‌گیری هیچ دارویی دریافت نکردند. شدت بیماری بر اساس مراجعه بیمار به بیمارستان و دریافت خدمات درمانی به صورت سرپایی و یا بستری شدن در بخش مراقبت‌های ویژه که در نهایت یا به بهبودی و یا به فوت وی انجامیده بود، مشخص شد.

فرم‌های رضایت‌نامه برای نمونه‌گیری و انجام مطالعه روی نمونه‌ها توسط هر یک از بیماران امضا شد. این پژوهش در کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران با کد اخلاق IR.PII.REC.1400.042 تصویب شده‌است.

روش PCR-RFLP

برای شناسایی و بررسی فراوانی چندشکلی‌های نوکلئوتیدی ژن TYK2 از روش PCR-RFLP استفاده شد. بدین منظور طراحی پرایمرهای اختصاصی با استفاده از برنامه AlleID6 انجام و ساختار پرایمر از نظر عدم وجود ساختار ثانویه، پرایمر دایمر و تعیین دمای ذوب در برنامه آنلاین Oligo Analyzer نیز دوباره بررسی شد. سپس پرایمرها به کمک نرم افزارهای موجود در پایگاه اطلاع‌رسانی بانک ژن NCBI در دیتابیس‌های Refseq genomes تجزیه و تحلیل شدند تا احتمال تکثیر غیراختصاصی با ژن‌های دیگر نیز بررسی و کاملاً از بین برود (جدول ۱).

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج از DNA شرکت سیناژن (CinnaPure RNA kit, cat.No: PR881612, Iran) و طبق راهنمای شرکت سازنده کیت انجام شد. انتخاب آنزیم با اثر محدود AluI (Thermo#ER001) با استفاده از برنامه NEB-Cutter انتخاب شد. همچنین پرایمرها طوری طراحی شدند که قطعه تکثیر شونده پس از برش با آنزیم‌ها، در صورت حضور و یا عدم حضور SNP، نوارهایی با

گزارش شد [۵]. بیماری کووید-۱۹ از راه انتشار قطرات تنفسی در هنگام سرفه، عطسه، صحبت کردن و تماس با سطوح آلوده منتقل می‌شود [۶]. برای جلوگیری از انتقال بیماری استفاده از ماسک، شست و شوی مرتب دست‌ها، حفظ فاصله اجتماعی و انجام واکسیناسیون از اهمیت به سزایی دارد [۷]. کووید-۱۹ یک بیماری سیستمیک است که باعث بروز مشکلات قلبی، عروقی، تنفسی، گوارشی، مغز و اعصاب شده و سیستم ایمنی بدن را درگیر می‌کند. تظاهرات بالینی در مبتلایان از عفونت بدون علامت تا خفیف، متوسط و شدید مشاهده شده‌است [۵]. عواملی مانند دیابت، سرطان، سن بالا، فشار خون، کشیدن سیگار و بیماری‌های قلبی، ریوی و کلیوی در شدت بیماری کووید-۱۹ موثر هستند.

علاوه بر موارد ذکر شده، واریانت‌های ژنتیکی میزبان نیز نقش مهمی در این زمینه بازی می‌کنند [۵]. در مطالعه حاضر تأثیر چندشکلی‌های ژن TYK2 در شدت علائم بیماری کووید-۱۹ بررسی شد. این ژن در خانواده تیروزین کینازها قرار می‌گیرد و در بیان INFAR1 در سطح سلول دخالت دارد [۸]. ژن مذکور در مسیر پیام‌رسانی اینترفرون نوع ۱ و اینترلوکین (IL-12, IL-23)، تمایز سلول‌های Th17 و Th1 و بلوغ سلول‌های NK (natural killer cell) و B دخالت می‌کند [۹]. ژن TYK2 به عنوان یک ژن مهم در بیماری‌های التهابی و خودایمنی گزارش شده‌است و نقش مهمی در پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی و بروز التهابات ریوی دارد [۱۰-۱۲]. همچنین این ژن نقش حیاتی در ترشح اینترفرون در فاز اولیه بیماری دارد [۸]. تأخیر در ترشح اینترفرون و یا ترشح بیش از حد آن می‌تواند یکی از عوامل اصلی تشدید بیماری و بروز التهاب در مبتلایان به کووید-۱۹ به شمار آید [۱۳]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که به دلیل نقش TYK2 در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، ژنوتایپ‌های متفاوت این ژن در تمایل به ابتلا به نوع شدید بیماری کووید-۱۹ همراه هستند [۱۴]. همچنین مشخص شده‌است که چندشکلی‌های نوکلئوتیدی در نواحی تنظیمی این ژن مانند rs74956615 بر میزان بیان این ژن تأثیر داشته و با نوع شدید بیماری کووید-۱۹ در ارتباط است [۱۴، ۱۵]. در این مطالعه چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs11085727 در ژن تیروزین کیناز بررسی شده‌است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که rs11085727 با افزایش بیان ژن تیروزین کیناز در ارتباط است [۱۶]. از آن جایی که مهار این ژن به عنوان یک پتانسیل درمانی برای بیماری‌های خودایمنی در نظر گرفته می‌شود، از این رو افزایش بیان آن در بافت‌های مختلف می‌تواند دلیلی برای التهاب بالا و طوفان سیتوکینی در بیماران مبتلا به نوع شدید بیماری کووید-۱۹ باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی این واریانت ژن تیروزین کیناز در جمعیت بیماران مبتلا به کووید-۱۹ و بررسی ارتباط آن با شدت بیماری بود.

جنسیت در بین گروه‌ها تفاوت معناداری نداشت ($P=0/187$). درباره توزیع جنسیتی، نسبت مرد به زن در بیماران با بیماری خفیف ۵۷/۴/۴۲/۶ درصد و در بیماران با بیماری شدید ۴۶/۵/۵۳/۵ درصد بود، اما این تفاوت آماری معنادار نبود.

نتایج PCR-RFLP

نتایج حاصل از هضم آنزیم محصولات PCR روی ژل آگارز مطابق تصویر ۱ به دست آمد. طول محصول PCR به دست آمده قبل از هضم آنزیمی ۴۴۲ جفت نوکلئوتید بود که بعد از هضم آنزیمی به ترتیب برای حالت وحشی هموزیگوت، نوارهایی به اندازه‌های ۱۶۹، ۲۴۱ و ۳۲ جفت نوکلئوتید، برای حالت موتانت هموزیگوت، نوارهایی به اندازه‌های ۱۹۲، ۱۶۹، ۴۹ و ۳۲ جفت نوکلئوتید و برای حالت هتروزیگوت نوارهایی به اندازه‌های ۲۴۱، ۱۹۲، ۱۶۹، ۴۹ و ۳۲ جفت نوکلئوتید ایجاد شد. نوارهای کمتر از ۵۰ جفت نوکلئوتیدی روی ژل آگارز ۲ درصد به وضوح قابل دیدن نبودند.

بررسی فراوانی ژنوتایپی

فراوانی ژنوتیپی rs11085727 در ژن TYK2 محاسبه و نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است. به طور کلی ۴۸ درصد موارد ژنوتیپ CC، ۳۱ درصد ژنوتیپ CT و ۲۱ درصد ژنوتیپ TT داشتند. به تفکیک شدت بیماری، ۲۸ درصد افراد بهبودیافته دارای ژنوتیپ CC، ۴۱ درصد ژنوتیپ CT و ۳۰ درصد ژنوتیپ TT بودند. از سوی دیگر، در افراد فوت شده، ۶۵ درصد ژنوتیپ CC، ۲۲ درصد ژنوتیپ CT و ۱۳ درصد ژنوتیپ TT مشاهده شد.

بررسی تأثیر چندشکلی rs11085727 در ژن TYK2 در

شدت بیماری کووید-۱۹

در بررسی ارتباط بین rs11085727 و شدت بیماری کووید-۱۹ مقدار نسبت شانس (Odds Ratio) برای ژنوتیپ CC مقدار ۱ گزارش شده که نشانگر نداشتن تأثیر این ژنوتیپ در شدت بیماری است. از طرف دیگر، میزان فراوانی الل جهش یافته T در افراد بهبودیافته بیشتر گزارش شده است و کمترین نسبت شانس برای تأثیر الل T در مدل هم غالب و به مقدار ۰/۱۸ معنادار به دست آمده است (جدول ۴).

بررسی تعادل هاردی-واینبرگ

تعادل هاردی-واینبرگ برای ژن TYK2 در جمعیت مورد مطالعه بر اساس الل‌های مورد انتظار و الل‌های مشاهده شده، محاسبه شد. بر اساس نتایج حاصل مقدار $P < 0/05$ بوده که نشان دهنده

اندازه‌های متفاوت و قابل تشخیصی روی ژل آگارز ایجاد کنند. با توجه به نتایج حاصل، تعدادی از نمونه‌ها از هر سه ژنوتایپ به صورت تصادفی انتخاب و برای تحلیل ژنتیکی و تعیین توالی ارسال شدند.

واکنش PCR برای شناسایی پلی مورفیسم‌های مورد نظر در ژن TYK2 در حجم کلی ۱۳ میکرولیتر طبق جدول ۲ انجام شد. حجم موارد استفاده شده برای واکنش PCR به مقادیر ۱۰ pmol از پرایمرهای پیشرو و برگشتی، ۱۰۰ ng DNA استخراج شده، ۶/۵ میکرولیتر مسترمیکس (PCR Master Mix 2X، Ampliqon) و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در نظر گرفته شد و طبق برنامه دمایی مربوط به مسترمیکس مورد استفاده: ۱۵ دقیقه دمای 95°C برای جداسازی اولیه، ۲۵ ثانیه دمای 95°C ، ۲۵ ثانیه دمای 59°C برای اتصال پرایمر، ۳۰ ثانیه دمای 72°C و ۱۰ دقیقه دمای 72°C برای طولی شدن نهایی در نظر گرفته شد که به تعداد ۳۵ چرخه تکرار شدند.

واکنش هضم آنزیمی روی یک میکروگرم از محصول PCR، یک واحد از آنزیم AluI، ۲ میکرولیتر بافر اختصاصی آنزیم (10X) و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر به مدت ۱۸ ساعت در دمای 37°C انجام شد. پس از هضم آنزیمی، نمونه‌ها در ژل آگارز ۲٪ قرار داده شدند و در دستگاه الکتروفورز بررسی شدند. اندازه نوارهای حاصل از هضم آنزیمی طبق جدول ۵ برای هر ژنوتایپ محاسبه شد که شامل ژنوتایپ وحشی هموزیگوت با الل CC و اندازه‌های ۳۲/۱۶۹/۲۴۱ جفت نوکلئوتید، ژنوتایپ موتانت هموزیگوت با الل TT و اندازه‌های ۳۲/۴۹/۱۶۹/۱۹۲ و ژنوتایپ هتروزیگوت با الل CT و اندازه‌های ۳۲/۴۹/۱۶۹/۱۹۲/۲۴۱ جفت نوکلئوتید بودند.

تحلیل آماری

از آزمون مربع کای برای بررسی ارتباط فراوانی پلی مورفیسم مورد مطالعه با مقاومت یا حساسیت به کووید-۱۹ استفاده شد. $P < 0.05$ value به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار IBM SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) و عدم تعادل پیوستگی برای متغیرهای انتخابی با استفاده از برنامه آنلاین SNPStats محاسبه شد.

یافته‌ها:

مشخصات جمعیت شناختی بیماران

میانگین سن بیماران گروه بیماری شدید ($61/2 \pm 12/8$) در مقایسه با بیماران گروه بیماری خفیف ($53/7 \pm 11/7$) بیشتر بود، اما این تفاوت آماری معنادار نبود ($P=0/219$). همچنین توزیع

توالی یابی شدند و با توالی مرجع به دست آمده از پایگاه داده NCBI مورد هم‌ترازی قرار گرفتند. نتایج هم‌ترازی، صحت ژنوتایپ‌های تعیین شده در روش PCR-RFLP را تأیید کردند (تصویر ۲).

عدم تعادل هاردی-واینبرگ در کل جمعیت مورد مطالعه است (جدول ۵).

هم‌ترازی توالی‌های ژنوتایپ‌ها

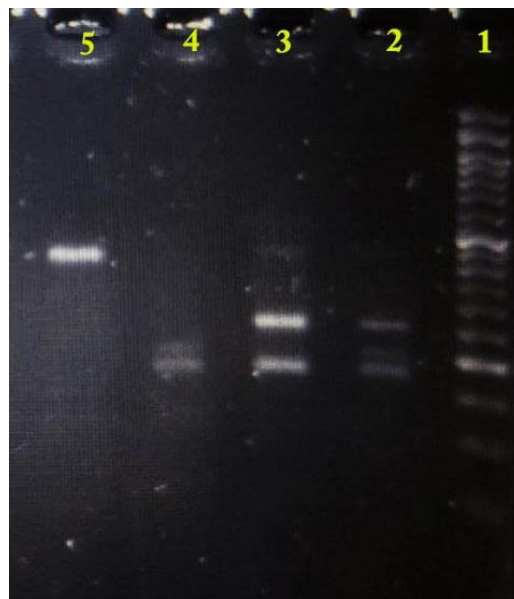
پس از هضم آنزیمی، برای تأیید نتایج، محصولات PCR با ژنوتایپ‌های مختلف مشخص شده توسط روش PCR-RFLP

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی برای لوکوس rs11085727 استفاده شده در واکنش PCR

ژن	توالی پرایمر	طول نوار (جفت باز)
TYK2	5'-TGAATAACCACCACACTCCT-3' پیشرو 3'-CACTGCGCCTGACCTATT-5' برگشتی	442bp

جدول ۲: طول نوارهای حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم AluI

ال ژنتیکی	ژنوتایپ	اندازه نوارها (جفت نوکلئوتید)
CC	وحشی هموزیگوت	۳۲/۱۶۹/۲۴۱
TT	موتانت هموزیگوت	۳۲/۴۹/۱۶۹/۱۹۲
CT	هتروزیگوت	۳۲/۴۹/۱۶۹/۱۹۲/۲۴۱



تصویر ۱: نوارهای حاصل از واکنش هضم آنزیمی لوکوس rs11085727 در ژن TYK2 با آنزیم AluI (راست به چپ): چاهک اول Ladder 50bp. چاهک دوم سه نوار به اندازه‌های ۱۶۹، ۱۹۲، ۲۴۱ جفت نوکلئوتید نشان دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت. چاهک سوم دو نوار به اندازه‌های ۱۶۹، ۲۴۱ جفت نوکلئوتید نشان دهنده ژنوتیپ وحشی. ستون چهارم دو نوار به اندازه‌های ۱۶۹، ۱۹۲ جفت نوکلئوتید مربوط به ژنوتیپ جهش یافته است. چاهک پنجم محصول PCR هضم نشده به اندازه ۴۴۲ جفت نوکلئوتید است.

جدول ۳: فراوانی ژنوتیپی rs11085727 در ژن TYK2 در گروه بیماران بهبودیافته و فوت شده (تعداد = ۲۲۰ نفر)

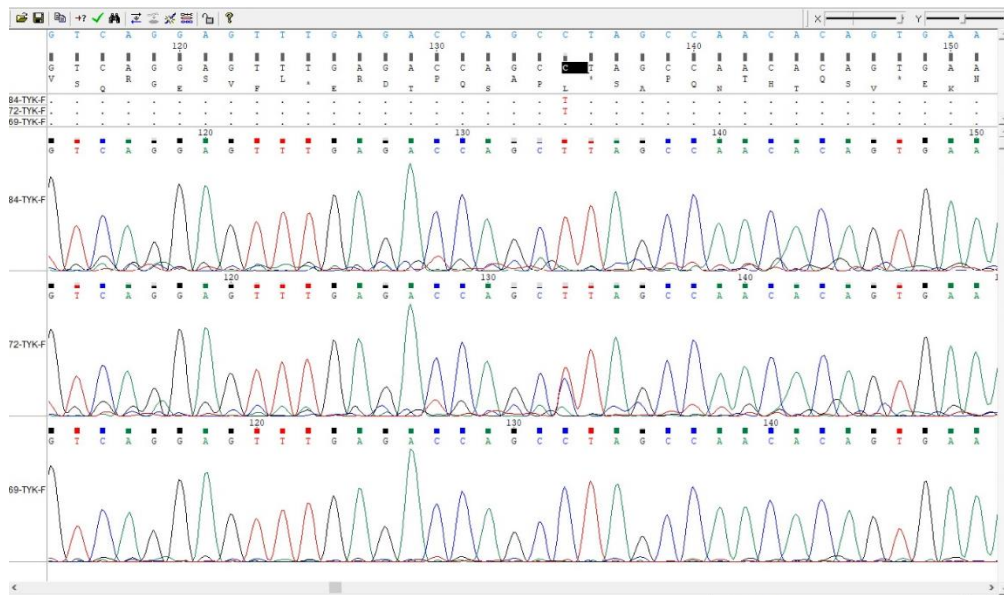
ژنوتایپ	بیماران فوت شده		بیماران بهبود یافته		فراوانی کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
CC	۶۵	۷۷	۲۹	۲۸	۹۴	۴۸
CT	۲۲	۲۶	۴۲	۴۱	۶۴	۳۱
TT	۱۳	۱۵	۳۱	۳۰	۴۴	۲۱

جدول ۴: همبستگی چندشکلی rs11085727 در ژن TYK2 با شدت بیماری کووید-۱۹ (تعداد = ۲۲۰ نفر، تنظیم شده بر اساس جنسیت)

مدل	ژنوتایپ	بهبود یافته	فوت شده	نسبت شانس	P-value
هم غالب	CC	(۲۸,۴٪) ۲۹	۷۷ (۴۵,۲٪)	۱	<۰,۰۰۰۱
	CT	(۴۱,۲٪) ۴۲	۲۶ (۲۲٪)	۰,۲۳	
	TT	(۳۰,۴٪) ۳۱	۱۵ (۱۲,۷٪)	۰,۱۸	
غالب	CC	(۲۸,۴٪) ۲۹	۷۷ (۴۵,۲٪)	۱	<۰,۰۰۰۱
	CT-TT	(۷۱,۶٪) ۷۳	(۳۴,۰۸٪) ۴۱	۰,۲۱	
مغلوب	CC-CT	(۶۹,۶٪) ۷۱	(۸۷,۳٪) ۱۰۳	۱	<۰,۰۰۱۴
	TT	(۳۰,۴٪) ۳۱	۱۵ (۱۲,۷٪)	۰,۳۴	
فوق غالب	CC-TT	(۵۸,۸٪) ۶۰	۹۲ (۷۸٪)	۱	<۰,۰۰۱۹
	CT	(۴۱,۲٪) ۴۲	۲۶ (۲۲٪)	۰,۴۰	

جدول ۵: بررسی تعادل هاردی-واینبرگ (تعداد = ۲۲۰)

P-value	مجموع ال ال	مجموع ال C	TT	CT	CC	
<۰,۰۰۰۱	۱۶۰	۲۸۰	۴۶	۶۸	۱۰۶	کل جمعیت
۰,۰۷۷	۱۰۴	۱۰۰	۳۱	۴۲	۲۹	جمعیت بهبود یافته
<۰,۰۰۰۱	۵۶	۸۰	۱۵	۲۶	۷۷	جمعیت فوت شده



تصویر ۲: نتیجه هم‌ترازی توالی‌های با ژنوتایپ موتانت هموزیگوت (84-TYK-F)، هتروزیگوت (72-TYK-F) و وحشی هموزیگوت (69-TYK-F). نوکلئوتید مشخص شده در تصویر، نوکلئوتید تغییر یافته است.

بحث:

درصد ژنوتایپ TT بودند. فراوانی ال T در افراد بهبودیافته بیشتر از افراد فوت شده گزارش شده است.

بر اساس پژوهش‌های انجام شده، افرادی که نقص در ژن TYK2 دارند، نسبت به عفونت‌های باکتریایی از قبیل مایکوباکتریوم، سالمونلا، بروسلا و عفونت‌های ویروسی از جمله هرپس سیمپلکس حساس‌تر هستند. همچنین پژوهش‌ها نشان داده که افراد مبتلا به عفونت مایکوباکتریال و ویروسی دارای جهش در اگزون هشت ژن TYK2 هستند. این مورد اولین دفعه در یک بیمار ژاپنی مبتلا به عفونت مایکوباکتریال دیده شده که سندرم هایپر IgE داشت [۱۷، ۱۸]. در افراد دارای جهش C.2395G>A در ژن TYK2 عفونت‌های باکتریایی توبرکلوزیس و بروسلا به طور مکرر دیده شده است و این افراد به عفونت‌های باکتریایی حساس‌تر هستند [۱۹، ۲۰]. همچنین نقص ژنی TYK2 در بیماران باعث اختلال در مسیر سیگنالینگ اینترفرون آلفا، بتا و گاما شده و در نتیجه این افراد بیشتر به عفونت‌های ویروسی مبتلا شده‌اند [۲۱]. همین طور در بیماران مبتلا به توبرکلوزیس شناسایی دو جهش C.3083A>G و C.2590C>T در ژن TYK2 در روند درمان این بیماری تأثیر گذار بوده است. برای درمان این افراد علاوه بر تجویز آنتی بیوتیک، از اینترفرون تراپی نیز استفاده شده که تأثیر مثبتی در روند درمان داشته است [۲۲].

در مطالعه دیگری ولوان و همکارانش نشان دادند که بین افزایش بیان ژن TYK2 و تشدید بیماری کووید-۱۹ ارتباط وجود دارد. ژن TYK2 در خانواده JAK-کینازها قرار دارد و در تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی همچون اینترفرون گاما و IL-12 نقش ایفا می‌کند. هرچه بیان این ژن کمتر باشد، تولید

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که علاوه بر شرایط محیطی و تغییرات ژنتیکی ویروس SARS-CoV-2، تغییرات ژنتیکی ژن‌های میزبان ویروس نیز می‌تواند در علائم بیماری و شدت آن در افراد مختلف تأثیرگذار باشند. از میان عوامل ژنتیکی میزبان، تغییرات چندشکلی یا پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های دخیل در پاسخ ایمنی علیه ویروس اهمیت به سزایی دارند. در این مطالعه ارتباط بین پلی مورفیسم rs11085727 در ژن TYK2 و شدت بیماری کووید-۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. از آن جا که این ژن نقش کلیدی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارد، پلی مورفیسم‌های این ژن که قادرند روی عملکرد و یا میزان بیان آن مؤثر باشند می‌توانند نقش مهمی در یافتن علت تظاهرات متفاوت این بیماری در افراد و جمعیت‌های مختلف در کنار سایر عوامل شناخته و ناشناخته بازی کنند. به طور کلی ژن‌هایی همچون TYK2 که در مسیر پاسخ اینترفرون نقش دارند، می‌توانند روی شدت پاسخ‌های ایمنی به ویروسی که باعث بروز التهاب و طوفان سیتوکینی در بیماران می‌شود، تأثیرگذار باشند. تغییرات ژنتیکی در این ژن‌ها که منجر به تغییرات بیانی آن‌ها شود باعث ایجاد تداخل در تنظیم پاسخ‌های ایمنی می‌شود. از این رو، شناسایی تغییرات ژنتیکی مذکور دارای اهمیت خاصی است. در مطالعه حاضر تعداد ۲۲۰ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ بررسی شدند که ۱۰۲ نفر از آن‌ها بهبودیافته و ۱۱۸ نفر به دلیل ابتلا به نوع شدید بیماری فوت شده بودند. پلی مورفیسم rs11085727 باعث تغییر نوکلئوتیدی C به T می‌شود. بر اساس نتایج حاصل، ۴۸ درصد افراد دارای ژنوتایپ CC، ۳۱ درصد ژنوتایپ CT و ۲۱

خطر برای بیماری‌های خودایمنی شناسایی می‌شوند. در این بررسی الل T در پلی مورفیسم rs11085727 TYK2 در جمعیت اروپا در کاهش شدت بیماری SLE و افزایش میزان علائم در بیماری کووید-۱۹ نقش داشته‌است. این جهش در افزایش بیان ژن TYK2 نیز تاثیر گذار بوده‌است [۱۶، ۲۰]. علاوه بر بیماری لوپوس، الل T در کاهش میزان التهاب در بیماری‌های خودایمنی دیگری از جمله پسوریازیس نیز موثر بوده‌است [۲۷، ۲۸].

پایه‌زوان هونگ و همکارانش در بررسی پلی مورفیسم rs11085727 TYK2 در افراد مبتلا به کووید-۱۹ و استئوآرتریت در نژاد اروپایی متوجه شدند که الل T در افزایش شدت بیماری کووید-۱۹ و استئوآرتریت و افزایش تعداد مرگ‌ومیر تأثیرگذار بوده‌است [۲۹].

پایه‌زوان هونگ و همکارانش نشان دادند که الل T در پلی مورفیسم rs11085727 TYK2 در نژاد اروپایی با افزایش شدت بیماری کووید-۱۹ و مرگ‌ومیر در ارتباط است. این در حالی است که الل T در پلی مورفیسم rs11085727 TYK2 در نژاد ایرانی در افراد بهبودیافته بیشتر گزارش شده‌است. تفاوت‌های ژنتیکی در نژادهای ایرانی و اروپایی می‌تواند دلیل اصلی عدم تطابق نتایج به دست آمده باشد [۳۰-۳۲].

در مطالعه حاضر فراوانی الل T مربوط به TYK2 rs11085727 در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ در ایران و همچنین ارتباط آن با شدت بیماری بررسی شد. نتایج نشان داد که الل T با کاهش شدت بیماری کووید-۱۹ و مرگ‌ومیر همراه است. این در حالی است که در مطالعه پایرو و همکارانش الل T در rs11085727 TYK2 در جمعیت اروپا با افزایش مرگ‌ومیر بیماران مبتلا به کووید-۱۹ همراه بوده‌است [۳۰]. وجود تفاوت‌های ژنتیکی در نژادهای مختلف می‌تواند توجیهی برای این نتایج باشد. برخلاف نتایج به دست آمده در این پژوهش، ورما آنوراگ و همکارانش گزارش کرده‌اند که الل T در TYK2 rs11085727 در نژادهای آسیایی، اروپایی، آفریقایی و اسپانیایی منجر به تشدید علائم بیماری در مبتلایان کووید-۱۹ می‌شود [۲۰]. جمعیت بیماران آسیایی در مطالعه ورما آنوراگ و همکارانش ۸۳۲۹ نفر بوده‌است و این افراد دارای بیماری‌های زمینه‌ای از قبیل دیابت، چاقی و فشار خون بوده‌اند [۲۰]. در حالی که جمعیت مورد مطالعه پژوهش حاضر کمتر (۲۲۰ نفر) و فاقد هر گونه بیماری زمینه‌ای بوده‌اند که می‌تواند دو دلیل قابل قبول برای عدم تطابق نتایج باشد. در بررسی‌های دیگری روی نژاد اروپایی در TYK2 rs11085727، الل T در کاهش حساسیت افراد به بیماری‌های خودایمنی و افزایش حساسیت و شدت بیماری کووید-۱۹ تأثیرگذار بوده‌است [۲۸، ۲۷، ۲۰].

سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و همینطور احتمال تشدید بیماری کاهش می‌یابد. در این بررسی الل T در rs74956615 در تشدید بیماری دخالت داشته‌است [۱، ۲۳].

براساس مطالعه انجام شده دیگری در ایران، واریانت‌های ژن TYK2 و ACE2 و تاثیر آن‌ها در شدت بیماری کووید-۱۹ بررسی شد. نتایج حاکی از شناسایی پلی مورفیسم‌های rs12720270، rs2304255، rs12720354 و rs2304256 در ژن TYK2 بود. الل A در rs2304256 و rs12720270 با کاهش شدت بیماری، الل A در rs12720354 و الل T در rs2304255 با افزایش شدت بیماری کووید-۱۹ در ارتباط بودند [۱۴]. از آن‌جا که ژن TYK2 در تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی نقش مهمی ایفا می‌کند، فاطمه ظیبحی و همکاران گزارش کردند که کاهش بیان این ژن در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ با پلی مورفیسم‌های rs12720354 و rs2304255 موجب نقص در عملکرد سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش شدت بیماری می‌شود [۱۴]. همچنین در مطالعه دیگری میزان بیان ژن TYK2 در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان این ژن در مردان مبتلا نسبت به زنان بیشتر گزارش شد. با این وجود، محمد آرین و همکارانش معتقدند با توجه به این که سطح بیان ژن TYK2 در بیماران مراقبت‌های ویژه و سایر بیماران یکسان گزارش شده، در نتیجه میزان بیان این ژن در شدت بیماری کووید-۱۹ نمی‌تواند تأثیر داشته باشد [۲۴].

با توجه به این که مهار IL-17 به عنوان راهی برای مهار سندرم حاد تنفسی در بیماری کووید-۱۹ معرفی شده‌است، در بیماران دارای rs2304255 در ژن TYK2 درمان با آنتی IL-17 تأثیر درمانی بیشتری خواهد داشت [۱۴]. در پلی مورفیسم rs2304255 الل T با افزایش شدت بیماری کووید-۱۹ مرتبط بوده‌است [۱۴]. کریستین دیترو و همکاران نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که الل C در پلی مورفیسم rs1990760 TYK2 در جمعیت برزیل با افزایش شدت بیماری کووید-۱۹ و افزایش مرگ‌ومیر همراه است [۲۵]. در مطالعه دیگری در ویتنام، ۲۰۰ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ و ۱۰۰ داوطلب سالم از نظر پلی مورفیسم rs2304255 در ژن TYK2 مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که الل T در افزایش شدت بیماری کووید-۱۹ و مرگ‌ومیر آن‌ها نقش داشته‌است. همچنین در پلی مورفیسم TYK2 rs2304256 (الل A) همراه با پلی مورفیسم‌های rs1990760/IFIH1 (الل T) و rs12329760/TMPRSS2 (الل C) به عنوان عامل‌های خطر در مرگ‌ومیر بیماران مبتلا به کووید-۱۹ شناسایی شده‌اند [۲۶].

در تحقیقات یوکسوان وانگ و همکارانش مشاهده شد که الل‌هایی در ژنوم انسان وجود دارد که نقش محافظت کننده در برابر عفونت‌های ویروسی دارند و در عین حال به عنوان عامل

گسترده‌ای از پاسخ‌های ایمنی در برابر عفونت و تغییرات ژنتیکی در سیستم ایمنی هر فرد از جمعیت‌های انسانی، برای درک بهتر ارتباط ویروس و میزبان انجام مطالعات بیشتری در این زمینه پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری:

داده‌های به دست آمده نشان می‌دهند که بین مرگ‌ومیر ناشی از بیماری کووید-۱۹ و پلی مورفیسم rs11085727 ارتباط وجود دارد. به طوری که افراد با ژنوتیپ TT نسبت به CT در ژن TYK2 rs11085727 با خطر کمتری در صورت ابتلا به بیماری کووید-۱۹ مواجه هستند.

در این مطالعه افراد با ژنوتیپ TT نسبت به CT در ژن TYK2 rs11085727 با بروز علائم خفیف تر بیماری و حتی احتمال فوت کمتر در مقایسه با افراد با ژنوتایپ CC در پی ابتلا به بیماری کووید-۱۹ قرار داشتند. طبق نتایج به دست آمده جهش مزبور در افراد بهبودیافته بیشتر گزارش شده‌است که ممکن است با روند بهبود بیماری کووید-۱۹ در ارتباط باشد. این موضوع اهمیت نقش ژن‌ها در پاسخ‌های التهابی سیستم ایمنی و تاثیر واریانت‌های ژنتیکی در شدت بیماری کووید-۱۹ را نشان می‌دهد. درک تأثیر واریانت‌های ژنتیکی در کووید-۱۹ در درمان این بیماری بسیار کمک کننده‌است. هم چنین بررسی ژنتیک افراد می‌تواند غربالگری بیمارانی که احتمال بروز علائم شدید یا پاسخ به یک درمان معین را دارند تسهیل کند. با توجه به وجود طیف

References:

- Velavan TP, Pallerla SR, Rüter J, Augustin Y, Kremsner PG, Krishna S, et al. Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. *EBioMedicine*. 2021;72.
- Pal M, Berhanu G, Desalegn C, Kandi V. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): an update. *Cureus*. 2020;12.(۳)
- Rajpal VR, Sharma S, Sehgal D, Singh A, Kumar A, Vaishnavi S, et al. A comprehensive account of SARS-CoV-2 genome structure, incurred mutations, lineages and COVID-19 vaccination program. *JVI* . 2022;17(9):687-706.
- Hardenbrook NJ, Zhang P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *COVIRO* . 2022;52:123-34.
- Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol* . 2022;23(1):3-20.
- Rodrigues L, Bento Cunha R, Vassilevskaia T, Viveiros M, Cunha C. Drug repurposing for COVID-19: A review and a novel strategy to identify new targets and potential drug candidates. *Mol*. 2022;27(9):272.۳
- Islam MJ, Islam NN, Alom MS, Kabir M, Halim MA. A Review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites. *Immunobiology*. 2022:152302.
- V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat.Microbiol* . 2021;19(3):155-70.
- Ortiz-Fernández L, López-Mejias R, Carmona FD, Castaño-Núñez AL, Lyons PA, Caruz A, et al. The role of a functional variant of Tyk2 in vasculitides and infections. *Clin.Exp.Rheumatol* , 2020, vol 38, num 5, p 949-955. 2020.
- Zhao X, Chen D, Li X, Griffith L, Chang J, An P, et al. Interferon control of human coronavirus infection and viral evasion: mechanistic insights and implications for antiviral drug and vaccine development. *J.Mol.Biol*. 2022;434(6):167438.
- Yassine HM, Emarat M, Mbarek H, Marr N, Haddad-Boubaker S. Personalized medicine and infectious disease management: *Front.Med SA*; 2023.
- Tran NV, Nguyen LTA, Lim KW, Phan AT. Potent and selective knockdown of tyrosine kinase 2 by antisense oligonucleotides. *Immunohorizons*. 2021;5(2):70-80.
- Duan L, Zheng Q, Zhang H, Niu Y, Lou Y, Wang H. The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: implications for the design of spike-based vaccine immunogens. *Front.Immunol* . 2020;11:576622.
- Zabihi Rizi F, Ghorbani A, Zahtab P, Darbaghshahi NN, Ataee N, Pourhamzeh P, et al. TYK2 single-nucleotide variants associated with the severity of COVID-19 disease. *Arch. Virol* . 2023;168(4):119.
- Ragimbeau J, Dondi E, Alcover A, Eid P, Uzé G, Pellegrini S. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *EMBO J*. 2003 Feb 3;20(3):۵۳۷-۴۷.(۳) PubMed PMID: 12554654. Pubmed Central PMCID: PMC140723. Epub 2003/01/30. eng.
- Wang Y, Guga S, Wu K, Khaw Z, Tzoumikas K, Tomblinson P, et al. COVID-19 and systemic lupus erythematosus genetics: A balance between autoimmune disease risk and protection against infection. *PLoS Genet* . 2022;18(11):e1010253.
- Sarrafzadeh SA, Mahloojirad M, Casanova J-L, Badalzadeh M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, et al. A new patient with inherited TYK2 deficiency. *Clin.Immunol* . 2020;40:۲۳۲-۵.
- Boisson-Dupuis S, Ramirez-Alejo N, Li Z, Patin E, Rao G, Kerner G, et al. Tuberculosis and impaired IL-23-dependent IFN- γ immunity in humans homozygous for a common TYK2 missense variant. *Sci.immunol* . 2018;3(30):eaau8714.
- Wu P, Chen S, Wu B, Chen J, Lv G. A TYK2 gene mutation c. 2395G> A leads to TYK2 deficiency: a case report and literature review. *J.Pediatr* . 2020;8:253.
- Verma A, Tsao NL, Thomann LO, Ho Y-L, Iyengar SK, Luoh S-W, et al. A Phenome-Wide Association Study of genes associated with COVID-19 severity reveals shared genetics with complex diseases in the Million Veteran Program. *PLoS genet* . 2022;18(4):e1010113.
- Moncada Vélez M, Kreins AY, Ciancanelli M, Okada S, Kong X-F, Ramírez Alejo N, et al. Human TYK2 Deficiency: Mycobacterial and Viral Infections without Hyper-IgE Syndrome. 2015.

22. Guo W, Feng X, Yang M, Shangguan Y, Shi P, Wang S, et al. Mycobacterium intracellulare infection associated with TYK2 deficiency: a case report and review of the literature. *Infect. Drug Resist.* 2020;4347-53.
23. Steffen BT, Pankow JS, Lutsey PL, Demmer RT, Misialek JR, Guan W, et al. Proteomic profiling identifies novel proteins for genetic risk of severe COVID-19: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Hum. Mol. Genet.* 2022;31(14):2452-61.
24. Akbari M, Akhavan-Bahabadi M, Shafiqh N, Taheriazam A, Hussen BM, Sayad A, et al. Expression analysis of IFNAR1 and TYK2 transcripts in COVID-19 patients. *Cytokine.* 2022;153:155849.
25. Dieter C, de Almeida Brondani L, Lemos NE, Schaeffer AF, Zanotto C, Ramos DT, et al. Polymorphisms in ACE1, TMPRSS2, IFIH1, IFNAR2, and TYK2 genes are associated with worse clinical outcomes in COVID-19. *Genes.* 2022;14(1):29.
26. Benmansour R, Tagajdid M, Elkochri S, Aabi R, Elannaz H, Laraqui A, et al. Genetic Susceptibility to Severe Forms of COVID-19: What we Learned in 2022. *Saudi J. Pathol. Microbiol.* 2023;8(4):90-8.
27. Diogo D, Bastarache L, Liao KP, Graham RR, Fulton RS, Greenberg JD, et al. TYK2 protein-coding variants protect against rheumatoid arthritis and autoimmunity, with no evidence of major pleiotropic effects on non-autoimmune complex traits. *PLoS one.* 2015;10(4):e0122271.
28. Dendrou CA, Cortes A, Shipman L, Evans HG, Attfield KE, Jostins L, et al. Resolving TYK2 locus genotype-to-phenotype differences in autoimmunity. *Sci. Transl. Med.* 2016;8(363):363ra149-363ra149.
29. Huang Y-X, Tian T, Huang J-X, Wang J, Sui C, Ni J. A shared genetic contribution to osteoarthritis and COVID-19 outcomes: a large-scale genome-wide cross-trait analysis. *Front. Immunol.* 2023;14:1184958.
30. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature.* 2021;591(7848):421-428.
31. Ji X-S, Chen B, Ze B, Zhou W-H. Human genetic basis of severe or critical illness in COVID-19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:963239.
32. Boutin S, Hildebrand D, Pankow JS, Kuznetsov M, Dittmann J, Pallerla SR, et al. Genetic susceptibility to SARS-CoV-2 virus infection and replication in the lungs. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021;78:5953-76.

Original Article

Study on the correlation between single nucleotide polymorphism frequency in TYK2 gene with COVID-19 disease

Hediyeh Tamimi¹, Flora Forouzesh¹, Pooneh Rahimi²

Received: 2023.11.29

Revised: 2024.01.19

Accepted: 2024.01.21

1. Department of Genetics, Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Hepatitis and AIDS and Blood Transmitted Diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.3, Fall 2023

Abstract:

Introduction:

The diversity in outcomes of COVID-19 infection and understanding its underlying reasons have led to a global health challenge. Genetic features, especially variations in immune system genes, are considered as crucial factors contributing to the clinical diversity resulting from infections with viruses such as SARS-CoV-2.

Materials and Methods:

In this study, DNA was extracted from blood samples of 220 COVID-19 patients. The PCR-RFLP method was employed to identify single nucleotide polymorphisms in the Tyrosine Kinase 2 (TYK2) gene. After PCR amplification, the PCR products were enzymatically digested with AluI enzyme, and the resulting fragments were separated using gel electrophoresis. Phenotypes of each patient were determined by analyzing the created fragments, and for final confirmation, some samples were sent for sequencing.

Results:

The study population included 102 recovered patients with mild COVID-19 and 118 deceased patients with severe disease. The frequency of the rs11085727 polymorphism in the TYK2 gene was statistically examined in both patient groups, revealing a significantly higher frequency in the deceased group compared to the recovered group ($p < 0.05$).

Conclusion:

Examining genetic factors and their variations, especially investigating single nucleotide polymorphisms in genes related to the innate immune system, can play a significant role in predicting susceptibility to COVID-19 and adopting personalized therapeutic approaches based on patients' genetics. According to the results obtained in this research, the rs11085727 polymorphism in the TYK2 gene is likely associated with the severity of COVID-19.

Keywords: Single Nucleotide Polymorphism, Tyrosine Kinase, SARS CoV-2, COVID-19