

# Genomic Analysis of E1A and E1B Regions of Human Adenovirus Type 8 in Patients with Adenoviral Keratoconjunctivitis in Ahvaz City

Shahram Jalilian<sup>1\*</sup>, Nahid Omid<sup>2</sup>, Azarakhsh Azaran<sup>3</sup>, Manoochehr Makvandi<sup>4</sup>, Gholamreza Khataminia<sup>5</sup>, Kambiz Ahmadi Angali<sup>6</sup>

1. PhD, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2. MSc, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
3. PhD, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4. PhD, Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
5. MD, Department of Ophthalmology, Infectious Ophthalmologic Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
6. PhD, Department of Biostatistics and Epidemiology Division, Health School, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 2023/08/23

Accepted: 2023/11/07

## Abstract

**Introduction:** Epidemic Keratoconjunctivitis is an acute ocular infectious disorder often associated with Human Adenovirus Type D8 (HAdV-D8). E1A and E1B are adenoviral proteins that play a crucial role in initiating adenoviral infection and binding to cellular p53. This study aimed to analyze genomic diversity in E1A and HAdV-D8 E1B genes in patients with adenoviral Keratoconjunctivitis.

**Materials and Methods:** Samples of 5 patients with adenoviral Keratoconjunctivitis were cultured on A549 cell line for 48 to 72 hours until the appearance of CPE. The E1 gene region was amplified by PCR and sequenced to investigate mutations.

**Results:** The Ahvaz strain showed the highest similarity to Japanese and American HAdV-D8 and HAdV-D54 strains in E1A and E1B genes. No significant mutation was found in the E1A gene. However, in the E1B gene, an amino acid substitution of serine to phenylalanine occurred. Another mutation converting CTG to GTG in E1B 55KD was observed only in two samples. The analysis with BLOSUM62 matrix confirmed that the replacement of valine with leucine is more likely than the substitution of serine and phenylalanine, which have hydrophobic properties and higher molecular weight.

**Conclusion:** In this study, E1A and E1B gene sequences of HAdV-D8 strain exhibited high conservation. Investigating these strains and their mutations in the human population could be valuable for determining the evolutionary capacity and pathogenicity of the virus.

**\*Corresponding Author:** Shahram Jalilian

**Address:** Golestan Blvd., Esfand St., Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Department of Medical Virology, Ahvaz, 1579461357, Khuzestan province, Iran. Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

**Tel:** +989038470332

**E-mail:** norovirus2009@gmail.com

## Keywords:

Keratoconjunctivitis, Human adenovirus, PCR, Phylogenetic tree

**How to cite this article:** Jalilian S, Omid N, Azaran A, Makvandi M, Khataminia G, Ahmadi Angali K. Genomic Analysis of E1A and E1B Regions of Human Adenovirus Type 8 in Patients with Adenoviral Keratoconjunctivitis in Ahvaz City, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2024; 30(6):681-690.

## Introduction

Keratoconjunctivitis, characterized by simultaneous inflammation of the cornea and conjunctiva, constitutes a significant ocular condition with diverse etiological factors. Among these factors, adenoviruses have emerged as prominent contributors, being responsible for a considerable portion of Keratoconjunctivitis cases. Adenoviruses, belonging to the family Adenoviridae and the genus Mastadenovirus, possess a distinctive genomic and structural profile. Understanding the role of adenoviruses, particularly their genotypic diversity, in the pathogenesis of Keratoconjunctivitis has garnered substantial attention within the medical and virological communities.

The global impact of Keratoconjunctivitis epidemics, often linked to specific adenovirus serotypes, underscores the clinical significance of these viruses. Notably, serotypes like HAdV D8, D19, and D37 have been implicated in the rapid onset of Keratoconjunctivitis symptoms, contributing to its widespread prevalence.

A central player in adenoviral infection and replication is the E1A protein. This protein, encoded within the viral genome, exerts intricate control over cellular mechanisms, facilitating viral propagation. The interplay between viral E1A and cellular factors underpins various facets of adenovirus-mediated infections, ranging from transcriptional regulation to host cell transformation.

Similarly, the E1B gene region encodes proteins pivotal for viral success. The interaction between E1B proteins and cellular p53 protein not only modulates gene expression but also contributes to mitigating cellular mRNA accumulation following infection. The preservation of viral DNA integrity, vital for efficient replication, hinges on the E1B 18.3-KD protein.

This study aims to delve into the genomic variations within the E1A and E1B genes of human adenovirus type 8 (HAdV 8) among patients diagnosed with adenoviral Keratoconjunctivitis. By unraveling the molecular intricacies of these genes and their adaptability within different viral genotypes, we seek to enhance our comprehension of the dynamic evolution of HAdV D8 and its implications for the clinical manifestation of Keratoconjunctivitis. Through this investigation, we aspire to contribute to the broader understanding of adenovirus-associated ocular diseases, fostering

potential avenues for therapeutic interventions and management strategies.

## Methodology

Following the acquisition of ethical code from the research committee of the university with the reference number IR.AJUMS.REC.1397.362, and within the framework of the approved project with code OG 9726, a randomized selection of samples was carried out. Five ocular swab samples were collected from patients suffering from adenovirus induced Keratoconjunctivitis with HAdV 8 subtype resulting from previous tests. These patients were admitted to Imam (RA) Hospital in Ahvaz, with sample numbers 23, 28, 33, 47, and 85. The genotypes of these samples were previously determined as HAdV D8 based on the viral fiber, penton, and hexon sequences. The samples were retrieved by  $-70^{\circ}\text{C}$  from the Virology Department of Ahvaz University of Medical Sciences.

Upon observing cytopathic effects (CPEs) and cell detachment, a low-speed centrifugation (3000 rpm) was performed. DNA extraction was carried out using the Roche high purity viral DNA extraction kit according to the manufacturer's instructions. The extracted viral DNA was stored at  $70^{\circ}\text{C}$  until PCR analysis.

PCR amplification of E1A and E1B genes was conducted using a PeqLab thermocycler. The gene sequences were obtained by performing a Blast search against the NCBI gene bank. Subsequently, the sequences were aligned using MEGA 7 software. Oligo V7.60 software was employed for primer design. For the E1A gene, two overlapping primers were designed, and for the E1B gene, three overlapping primers were designed. The designed primers were evaluated for specificity using the Primer Blast tool. Several PCR products of E1A and E1B genes in both directions were sequenced using the Sanger method and the 3730xl DNA Analyzer (Bioneer, South Korea).

Sequence analysis of nucleotide and amino acid sequences of E1A (considering Alternative splicing in this region) and E1B regions was performed using SnapGene version 3.2.1 software. BLAST was used to identify homologous nucleotide sequences in the GenBank database. Alignment of E1A and E1B sequences and phylogenetic tree construction were accomplished using MEGA software (version 7) with the Tamura Nei maximum likelihood model, followed by Kimura's two parameter evolutionary

distances evaluation. RDP4 and SIMPLOT software were used to assess recombination probabilities. BLUSUM62 matrix analysis was employed to study amino acid variations.

## Results

A Comparative Analysis of E1A and E1B Gene Sequences with Isolates Found in the Gene Bank Upon receipt of sequence determination results, the sequences of E1A and E1B genes were BLASTed on the NCBI website and compared with isolates present in the gene bank. This comparison confirmed that all 5 samples belong to human adenovirus group D8. Subsequently, gene registration was performed for some of these samples from the NCBI databank (MH802133.1, MH802132.1, MH802131, MH802130.1).

A phylogenetic tree based on E1A and E1B genes was constructed using the MEGA.7 software, employing the Maximum Likelihood method with 1000 Bootstraps. This analysis revealed that all five E1A samples shared 100% homology with human adenovirus type D8, Japan strain, with access code AB448768.1. No insertions or mutations were observed for the five E1A samples in relation to the pattern with access code AB448768.1, showing a 100% homology.

Moreover, concerning the E1B gene, all five samples showed up to 99% similarity in terms of evolution with the E1B gene of human adenovirus type 8 with accession number LC312462.1.

In terms of physicochemical properties, the amino acid phenylalanine differs significantly from serine and is placed farther in the BLOSUM62 table compared to serine. Therefore, the occurrence of an amino acid substitution in the obtained sequence could potentially entail changes in the functional properties of the E1B protein. However, the substitution of leucine with valine is also expected due to the similarity between these two amino acids

## Discussion

In the present study, Phylogenetic analysis of the E1A gene revealed that all five samples shared the highest evolutionary proximity with human Adenovirus type 54 E1A sequences with the accession code DQ923122.2 in the United States. Similarly, for the E1B gene, the five samples

exhibited the highest evolutionary similarity with human Adenovirus type 8 E1B gene sequences with accession number AB746853.1 in Japan and Adenovirus type 54 E1B gene sequences with accession number LC215446.1 in Japan.

No amino acid substitution was observed in the E1A gene, whereas an amino acid substitution of serine with phenylalanine occurred in the E1B gene. Notably, the mutation that converted CTG to GTG in E1B 55KD and replaced valine with leucine at nucleotide position 1490 was observed only in samples 47 and 85, absent in other samples. Further assessment of the normal or unusual nature of these amino acid substitutions was conducted using the BLOSUM62 matrix, indicating that valine leucine substitutions were significantly more probable than serine phenylalanine substitutions according to the BLOSUM62 scale. It's worth noting that phenylalanine is more hydrophobic and has a higher molecular weight.

## Conclusion

The studied samples demonstrated high resemblance to HAdV D8 and HAdV D54 strains in Japan and the United States, particularly in the E1A and E1B genes. These results indicate that all examined strains in this study exhibited substantial conservation with HAdV D8 strain in their E1A and E1B gene sequences.

## Acknowledgment

This manuscript is the result of a project approved with the code OG-9726 of Infectious and Tropical Diseases Research Center, Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran, which is a part of the thesis of Ms. Nahid Omid, a master's student in the field of virology of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. Here, we need to express our gratitude and appreciation for the cooperation of Dr. Chiman Karami, the assistant professor of Ardabil University of Medical Sciences, for her sincere cooperation.

**Conflict of Interest:** The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript

## تجزیه و تحلیل نواحی ژنی E1A و E1B از آدنووایروس انسانی نوع ۸ در بیماران مبتلا به کراتوکونژونکتیویت آدنووایروسی در شهر اهواز

شهرام جلیلیان<sup>۱\*</sup>، ناهید امیدی<sup>۲</sup>، آذرخش آذران<sup>۳</sup>، منوچهر مکوندی<sup>۴</sup>، غلامرضا خاتمی نیا<sup>۵</sup>، کامبیز احمدی انگالی<sup>۶</sup>

۱. دکتری تخصصی ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیمارهای عفونی و گرمسیری خلیج فارس، پژوهشکده سلامت. دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲. کارشناس ارشد ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیمارهای عفونی و گرمسیری خلیج فارس، پژوهشکده سلامت. دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. دکتری تخصصی ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیمارهای عفونی و گرمسیری خلیج فارس، پژوهشکده سلامت. دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴. دکتری تخصصی ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیمارهای عفونی و گرمسیری خلیج فارس، پژوهشکده سلامت. دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۵. متخصص چشم‌پزشکی، گروه چشم‌پزشکی، مرکز تحقیقات چشم‌پزشکی عفونی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۶. دکتری تخصصی آمار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** کراتوکونژونکتیویت اپیدمیک یک اختلال عفونی حاد چشمی است که اغلب با آدنووایروس انسانی نوع D8 (HAdV-D8) مرتبط می‌باشد. E1A و E1B آدنووایروسی به ترتیب از پروتئین‌های ضروری برای شروع عفونت آدنووایروسی و اتصال به p53 سلولی می‌باشند. این مطالعه با هدف تجزیه و تحلیل تنوع ژنومی در ژن‌های E1A و E1B در بیماران مبتلا به کراتوکونژونکتیویت آدنووایروسی انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** نمونه ۵ بیمار مبتلا به کراتوکونژونکتیویت آدنووایروسی بر روی رده سلولی A549 به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت تا ظهور CPE، کشت داده شد. ناحیه ژنی E1 با روش PCR تکثیر شد و برای بررسی‌های موتاسیون‌ها توالی‌یابی شدند.

**یافته‌ها:** سویه‌های E1A و E1B بیشترین شباهت را به سویه‌های ژاپنی و آمریکایی HAdV-D8 و HAdV-D54 دارد. در ژن E1A، جهش مؤثری یافت نشد اما در ژن E1B، جابه‌جایی اسید آمینه سرین به فنیل آلانین رخ داد. موتاسیون دیگری که باعث تبدیل CTG به GTG در E1B 55KD شد، فقط در دو نمونه مشاهده گردید. تحلیل با ماتریکس BLOSUM62 مؤید آن بود که جابه‌جایی والین و لوسین محتمل‌تر از جابه‌جایی سرین و فنیل آلانین دارای خاصیت هیدروفوبیکی و وزن مولکولی بالاتر می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه، توالی ژن‌های E1A و E1B سویه HAdV-D8 حفاظت بالایی داشتند. بررسی این سویه‌ها و موتاسیون‌های در گردش آنها در جامعه بشری می‌تواند برای تعیین ظرفیت تکاملی ویروس و بیماری‌زایی آن مفید باشد.

\* نویسنده مسئول: دکتر شهرام جلیلیان

نشانی: مرکز تحقیقات بیمارهای عفونی و گرمسیری خلیج فارس، پژوهشکده سلامت. دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: +۹۸۹۰۳۸۴۷۰۳۳۲

راینامه: norovirus2009@gmail.com

شناسه ORCID:

۰۰۰-۰۰۰۲-۱۸۲۷-۲۹۹۰

شناسه ORCID نویسنده اول:

۰۰۰۰-۰۰۰۲-۱۸۲۷-۲۹۹۰

### کلیدواژه‌ها:

کراتوکونژونکتیویت، آدنووایروس انسانی، PCR، درخت فیلوژنتیک.

## ۱. مقدمه

18.3 کیلو دالتون (۱۹ KD) برای حفظ یکپارچگی DNA ویروسی ضروری است. علاوه بر این، ژن‌های E1A و E1B با یکدیگر می‌توانند باعث ایجاد دگرگونی در کشت سلولی اولیه جوندگان شوند [۱۴]. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنومی در ژن‌های E1A و E1B HAdV 8 در بیماران مبتلا به کراتوکونژونکتیویت آدنوویروسی است. این تجزیه و تحلیل توالی‌های DNA باید به ما کمک کند تا تکامل مولکولی HAdV D8 را با جزئیات بیشتری درک کنیم و نشان دهیم که ژن‌های E1A و E1B می‌توانند در میان ژنوتایپ‌های ویروسی تغییر کنند.

## ۲. مواد و روش‌ها

پس از کسب کد اخلاق از کارگروه پژوهش دانشگاه با شماره IR.AJUMS.REC.1397.362 و طی طرح مصوب با کد OG-9726، به صورت تصادفی نمونه‌های سواب چشمی پنج بیمار مبتلا به کراتوکونژونکتیویت آدنوویروسی ناشی از HAdV-8 در بیمارستان امام (ره) شهر اهواز با شماره‌های ۲۳، ۲۸، ۳۳، ۴۷ و ۸۵ که در آزمایش‌های قبلی ژنوتایپ آنها با توجه به توالی‌های فیبر، پنتون و هگزون ویروسی، HAdV-8 تعیین شده بود، از آرشیو فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد گروه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز جمع‌آوری گردید.

کشت سلولی رده سلولی A549 در محیط DMEM همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاو و پن استرپ (غلظت ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر لیتر محیط کشت سلول) انجام گردید. ۵ نمونه ویروسی به پلیت‌های ۶ چاهکی کشت سلولی حاوی سلول‌های A549 که به صورت تک‌لایه رشد کرده بودند تلقیح شدند. پلیت‌های تلقیح‌شده به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای جذب ویروس نگهداری و سپس محیط DMEM اضافه شد. صفحات ۶ چاهکی کشت تلقیح‌شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوبه و تا زمان ظهور اثرات سیتوپاتیک (CPEs) بررسی شدند.

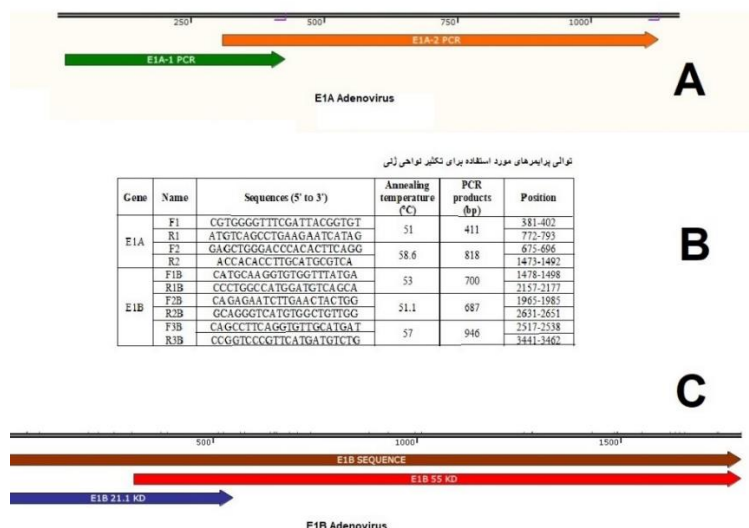
پس از مشاهده CPE و جداسازی سلول‌ها، سانتریفیوژ با سرعت کم (۳۰۰۰ rpm) انجام گردید. استخراج DNA توسط کیت استخراج DNA ویروسی با خلوص بالا Roche (روش، آلمان) طبق دستورالعمل سازنده انجام و DNA ویروسی استخراج شد تا زمان انجام آنالیز PCR در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

یکی از علل اصلی کراتوکونژونکتیویت یا التهاب هم‌زمان قرنیه و ملتحمه چشم، آدنوویروس‌ها هستند. این ویروس‌ها مسئول حدود ۱۵ تا ۷۰ درصد موارد کلی کراتوکونژونکتیویت چشمی هستند. آدنوویروس‌ها ویروس‌های DNA دو رشته‌ای بدون پوشش و خطی با کپسیدهای بیست وجهی هستند که ژنوم این ویروس‌ها عموماً از ۲۶ تا ۴۵ کیلوباز متغیر هستند و ۲۰ تا ۵۰ پروتئین مختلف را کد می‌کنند [۱]. ژنوتیپ‌های آدنوویروس انسانی (HAdV) متعلق به جنس Mastadenovirus و خانواده Adenoviridae هستند که به هفت گروه (A تا G) و ۱۱۱ ژنوتایپ (تا ۲۱ آگوست ۲۰۲۳ در پایگاه <http://hadv.wg.gmu.edu>) طبقه‌بندی می‌شوند. تقریباً نیمی از این ژنوتایپ‌ها در گروه D آدنوویروسی قرار دارند [۳،۲]. اپیدمی کراتوکونژونکتیویت اغلب با سروتیپ‌های آدنوویروس D8، D19، D37 و D37 ایجاد می‌شود. با این حال سروتیپ‌های دیگری مانند C2، B3، E4، C5، B7، D10، B11، B21، D22، D29، B34، D53، D54 و D56 نیز با این بیماری مرتبط هستند [۴-۸]. کراتوکونژونکتیویت با التهاب قرنیه و ملتحمه که شروع ناگهانی کراتیت استرومایی و ورم ملتحمه فولیکولی حاد را ایجاد می‌کند، تعریف می‌شود که یک مشکل جهانی است [۵]. عامل اصلی اپیدمی کراتوکونژونکتیویت آدنوویروس انسانی D8 است [۹].

برای اولین بار در سال ۱۹۵۵، آدنوویروس انسانی نوع ۸ (HAdV-8) در ایالات متحده آمریکا جدا گردید [۹]. HAdV 8 بر اساس همسانی توالی ژنوم و ویژگی‌های مختلف بیولوژیکی در گونه D گنجانده شده است. این ویروس دارای پروتئین فیبری با طول حدود ۹ تا ۱۱ نانومتر است که در مراحل اولیه عفونت به گیرنده‌های سلول‌های ملتحمه و قرنیه متصل می‌شود. [۱۰]. E1A یکی از پروتئین‌های آدنوویروسی است که برای شروع عفونت ویروسی، تنظیم‌زدایی چرخه سلولی و ماشین رونویسی به نفع شرایط مطلوب برای تکثیر ویروس، حیاتی است [۱۱]. ژن E1A در انتهای ۵ ژنوم ویروسی کدگذاری شده است و شامل دو اگزون می‌شود که اگزون دوم E1A به فعالیت‌های متنوعی از جمله تنظیم بیان ژن سلولی و ویروسی، تبدیل و جاودانگی کمک می‌کند [۱۲]. در ناحیه ژن E1B، دو ORF برای پروتئین‌های پیش‌بینی‌شده کدگذاری شدند [۱۳]. پروتئین E1B 53.1 کیلو دالتون (۵۵ KD) به پروتئین سلولی p53 متصل می‌شود و همچنین دیده شده است که برای کاهش تجمع mRNAهای سلولی پس از عفونت مهم است. پروتئین E1B

تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتید و اسید آمینه ایی نواحی E1A (با توجه به وجود پیرایش دگرسان در این ناحیه) و E1B توسط نرم افزارهای SnapGene نسخه ۳.۲.۱ انجام شد. برای شناسایی توالی‌های نوکلئوتیدی همولوگ در بانک اطلاعاتی GenBank، از BLAST استفاده شد. هم‌راستایی توالی‌های E1A و E1B و درخت فیلوژنتیک توسط نرم افزار MEGA (نسخه ۷) با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی با مدل Tamura-Nei رسم و سپس فواصل تکاملی بر اساس روش دو پارامتری کیمورا ارزیابی گردید (شکل ۲). نرم افزارهای RDP4 و SIMPLOT برای بررسی احتمال نوترکیبی استفاده گردید و آنالیز ماتریکس بلوسام ۶۲ برای تغییرات اسید آمینه ایی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش PCR ژن‌های E1A و E1B (شکل ۱) توسط ترموسایکلر شرکت PeqLab انجام شد. با مراجعه به بانک ژن در NCBI، توالی ژن‌های E1A و E1B با استفاده از روش Blast گرفته شد. سپس توالی‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA 7 هم‌ردیف شدند. به منظور طراحی از نرم افزار Oligo V7.60 استفاده شد. برای ژن E1A، دو پرایمر به صورت هم‌پوشان و برای ژن E1B، سه پرایمر به صورت هم‌پوشان برای نواحی مشخص شده در تصویر شماره ۱ طراحی گردید. پرایمرها پس از طراحی توسط Primer blast تعیین اختصاصی بودن بررسی شدند. تعدادی از محصولات PCR ژن‌های E1A و E1B در هر دو جهت خوانش به روش سانگر و توسط ۳۷۳۰ xl DNA Analyzer (Bioneer، کره جنوبی) توالی‌یابی شدند.



شکل ۱. طراحی آزمایش PCR برای ژن‌های E1A و E1B. A- نواحی ژنی کدکننده پروتئین در E1A (۸۵۷ نوکلئوتید) و دو ناحیه تکثیرشده در PCR با مجموع طول ۱۱۱۲ نوکلئوتید. B- جدول پرایمرهای طراحی شده در آزمایش‌های PCR- ناحیه ژنی تکثیرشده با مجموع طول ۱۹۸۵ نوکلئوتید جهت E1B (۱۷۹۳ نوکلئوتید) و تعیین نواحی ژنی کدکننده پروتئین‌های ۲۱ و ۵۵ کیلودالتونی.

دریافت MH802132.1, MH802131, MH802130.1) گردید.

### نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک

درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن‌های E1A و E1B با نرم افزار MEGA.7 با استفاده از روش Maximum likelihood و با Bootstrapp1000 ترسیم شد (شکل ۲). توالی ژن‌های E1A و E1B در سایت NCBI بلاست شد و با ایزوله‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید که نشان داده شد هر ۵ نمونه E1A، ۱۰۰ درصد با آدنوویروس انسانی تایپ ژنی D8 کشور ژاپن و با

### ۳. یافته‌ها

#### مقایسه نتایج توالی ژن‌های E1A و E1B با ایزوله‌های موجود در بانک ژن

پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی ژن‌های E1A و E1B در سایت NCBI بلاست شد و با ایزوله‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید که تأییدی بر آن بود که هر ۵ نمونه از نوع آدنوویروس انسانی گروه D8 می‌باشند. سپس با ثبت ژن برای تعدادی از آنها کد دسترسی از سایت NCBI (MH802133.1, سایت

همچنین از نظر ژن E1B پنج نمونه از نظر تکاملی با ژن E1B آدنوویروس انسانی تایپ ۸ با شماره دسترسی LC312462.1 تا ۹۹ درصد شباهت داشت. بررسی‌های بیشتر نشان داد که برای ۵ نمونه E1B تغییرات غالب اسید آمینه‌ها نسبت به الگو با شماره دسترسی LC312462.1 به شرح جدول ۱ می‌باشد:

جدول ۱. تغییرات غالب اسید آمینه‌ها نسبت به الگو برای E1B

آمینواسید در سکانس الگو	آمینواسید در سکانس به دست آمده
E1B 19KD LEU(343 nt)-CTG	LEU-TTG
E1B 55KD SER(342 nt)-TCT	PHE-TTT
E1B 55KD ALA(947 nt)-GCC	ALA-GCC
E1B 55KD GLU(1031 nt)-GAG	GLU-GAA
E1B 55K VAL(1241 nt)-GTC	VAL-GTT
*E1B 55KD LEU(1490nt)-CTG	*VAL-GTG

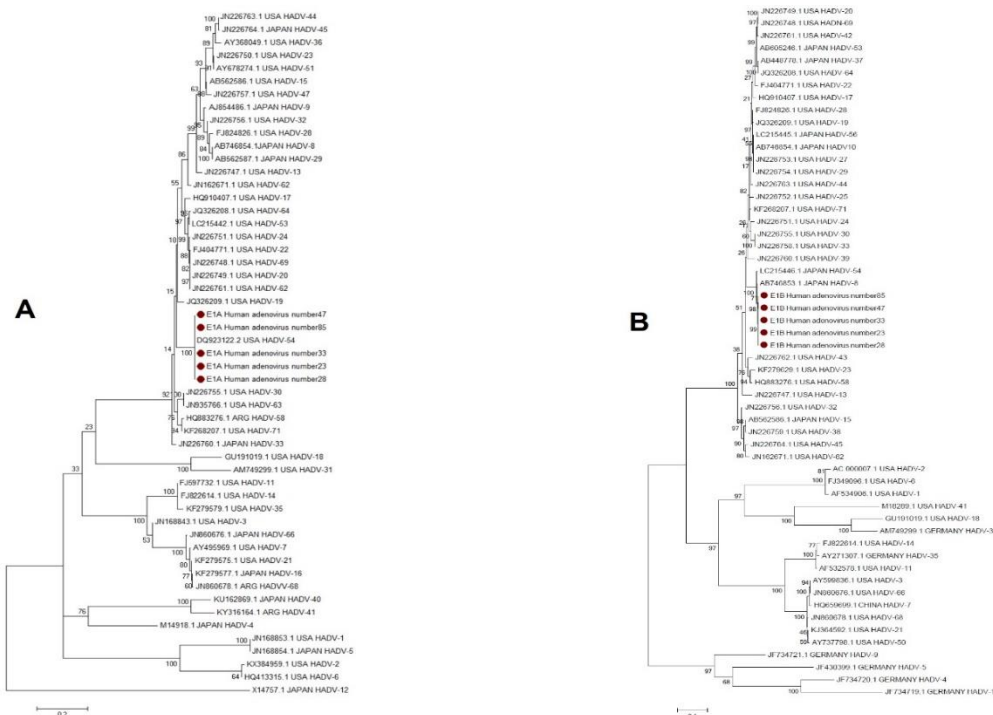
\*تغییرات غالب اسید آمینه‌ها نسبت به الگو در E1B در نمونه‌های ۸۵ و ۴۷

دورتری نسبت به اسید آمینه سرین قرار گرفته است از این رو جابه‌جایی رخ داده در سکانس به دست آمده احتمال تغییر در خصوصیات عملکردی پروتئین E1B را می‌تواند به همراه داشته باشد. البته جابه‌جایی اسید آمینه لوسین با والین نیز به دلیل شباهت این دو اسید آمینه به هم محتمل و مورد انتظار بود.

بررسی‌ها توسط نرم‌افزارهای RDP4 و SIMPLOT هیچ‌گونه ریکامینیشن را نشان نداد و رسم درخت فیلوژنی توسط نرم‌افزار MEG7 انجام شد (شکل ۲). هیچ‌گونه Gap در نتایج سکانس ما مشاهده نگردید.

### نتایج حاصل از آنالیز ماتریکس بلوسام ۶۲

از لحاظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اسید آمینه فنیل آلانین با سرین تفاوت بسیاری دارد و در جدول بلوسام ۶۲ در فاصله



شکل ۲. درخت فیلوژنتیک مربوط به ژن‌های E1A و E1B در ۵ بیمار مبتلا به التهاب همزمان قرنیه و ملتحمه چشم شهر اهواز که با برنامه MEGA V.7 رسم شده است. A- درخت فیلوژنتیک بر اساس ۵۳ ژن E1A آدنوویروس انسانی B- درخت فیلوژنتیک بر اساس ۵۶ ژن E1B آدنوویروس انسانی

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار در ایران، کل توالی ژن E1 در مجموع با تکثیر ناحیه ایی بالغ بر ۳۰۸۲ نوکلئوتید در واکنش PCR، برای هر ۵ نمونه و متعاقب آن تعیین توالی و آنالیز نتایج به منظور مشخص کردن دقیق نواحی E1A و E1B بررسی شد. ماهیت های توالی نوکلئوتیدی E1A و E1B و اسیدهای آمینه آنها در سویه های HAdV-D8 که منجر به التهاب همزمان قرنیه و ملتحمه چشم می شود را بررسی کردیم و به تجزیه و تحلیل و تغییرات و موتاسیون های موجود در E1A و E1B و اسیدهای آمینه های منتج از آنها پرداختیم.

ژن E1A دارای دو اگزون می باشد؛ اگزون دوم یعنی ناحیه C-terminal، نقش کلیدی در انتقال اطلاعات ژنی و ویروسی و برخی از ژن های سلولی، به ویژه در فرایندهای نامیرایی و ترانسفورماسیون سلولی دارد [۱۵]. پروتئین E1A قادر به مهار رونویسی ژن IFN-1 می باشد که در نتیجه پاسخ ایمنی سلول به ویروس را کاهش می دهد [۱۶]. این پروتئین از طریق مکانیسم های گوناگون، شامل تداخل با پروتئین P53، در فرایند آپوپتوز تداخل ایجاد می کند. افزون بر این، E1A باعث کاهش سطح بیان MHC-1 دارد و در نتیجه به عنوان عاملی با توانایی تومورزایی در بعضی جانداران شناخته می شود [۱۷، ۱۸]. به طور مشابه، ژن E1B به کدگذاری دو پروتئین با وزن های مولکولی ۵۵ و ۱۹ کیلودالتون می پردازد که در مهار آپوپتوز نقش دارند [۱۹]. موتاسیون در توالی ژنی این پروتئین می تواند منجر به تخریب گسترده تر سلول های Hela شود و در نتیجه تأثیرات سیتوتوکسیک بیشتری در سلول های انسانی ایجاد کند [۲۰]. از این رو، بررسی دقیق توالی ژن های آدنووایروس و شناخت ممکن ترین تغییرات در آنها جهت دهنده مهمی در فهم فرایندهای سلولی و ویروسی می باشد.

در مطالعه حاضر همه سکانس های ارسالی شرکت توسط نرم افزار Snap Gene تحلیل شد و BLAST انجام شده توسط پایگاه داده NCBI تأیید کرد که سکانس ها متعلق به گروه D آدنووایروس هستند. در این مطالعه از نظر ژن E1A پنج نمونه از نظر تکاملی و با رسم درخت فیلوژنتیکی با ژن E1A آدنووایروس انسانی تایپ ۵۴ با کد دسترسی DQ923122.2 در کشور آمریکا بیشترین نزدیکی را داشتند. همچنین از نظر ژن E1B پنج نمونه از نظر تکاملی با ژن E1B آدنووایروس انسانی تایپ ۸ با شماره AB746853.1 در کشور ژاپن و ژن E1B آدنووایروس انسانی تایپ ۵۴ با شماره LC215446.1 در کشور ژاپن بیشترین قرابت تکاملی را داشتند.

این سویه ها بسیار شبیه به سویه مرجع HAdV-D8 بودند. جابه جایی ها و موتاسیون ها نقطه ای انجام شده جز در دو مورد، موجب تغییر خاصی در نوع آمینواسید نگردید. در ژن E1A جابه جایی اسید آمینه ایی مشاهده نگردید ولیکن در ژن E1B جابه جایی اسید آمینه سرین با فنیل آلانین صورت گرفته بود. البته موتاسیون هایی که باعث تبدیل CTG به GTG در E1B 55KD شده بود و آمینواسید والین را جایگزین لوسین در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۴۹۰ کرده بود فقط در نمونه های ۴۷ و ۸۵ مشاهده گردید و در سایر نمونه ها این موتاسیون وجود نداشت. بررسی های بیشتر از لحاظ معمول یا غیرمعمول بودن این جابه جایی های اسید آمینه توسط ماتریکس BLOSUM62 انجام شد و نتایج حاکی از آن بود که جابه جایی والین و لوسین و بالعکس بسیار محتمل تر از جابه جایی سرین و فنیل آلانین در مقیاس BLOSUM62 می باشد. شایان ذکر است که فنیل آلانین هیدروفوبیک تر است و دارای وزن مولکولی بیشتری نیز می باشد.

پروتئین آدنووایروس E1B 55K نقش مهمی در عفونت آدنووایروس مولد و ترانسفورماسیون سلولی دارد. فعالیت های E1B 55K از طریق SUMOylation و فسفوریلاسیون و از طریق تعامل با پروتئین های متعدد سلولی و ویروسی از نظر مکانی - زمانی تنظیم می شوند. E1B 55K در تشکیل محفظه های تکثیر ویروسی نقش دارد و تکثیر و رونویسی ژنوم ویروسی، سرکوب رونویسی، تخریب پروتئین های سلولی و چندین مرحله درون هسته ای بیوژنز دیررس mRNA ویروسی را تنظیم می کند (۲۰).

جهش در ساختار اولیه پروتئین می تواند عواقب گسترده ای بر سایر ساختارهای آن داشته باشد که به نوبه خود بر عملکرد پروتئین تأثیر می گذارد. تأثیرات دقیق یک جهش به مکان، ماهیت و خواص خاص اسیدهای آمینه درگیر بستگی دارد. این تغییرات در ساختار و عملکرد، در زمینه زیست شناسی مولکولی و ویروس شناسی پزشکی از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا می تواند زمینه ساز فرایندهای سلولی مختلف باشد و به مکانیسم های بیماری زایی کمک کند.

از لحاظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، اسید آمینه فنیل آلانین با سرین تفاوت زیادی دارد. از این رو جابه جایی رخ داده در سکانس به دست آمده احتمال تغییر در خصوصیات عملکردی پروتئین E1B-55kd را می تواند به همراه داشته باشد. موتاسیون های در ژن E1B آدنووایروس منتج به ایجاد گونه هایی خواهد شد که از مکانیسم های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی فرار می کنند.



تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌های HAdV-D جدادیده در کشورهای دیگر نیز با HAdV-D8 جدادیده از بیماران ما مرتبط است. از سوی دیگر، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در این مطالعه همسانی بالایی با همان‌طور که اشاره شد ژن E1A نقش کلیدی در انتقال اطلاعات ژنی ویروسی و برخی از ژن‌های سلولی را بازی می‌کند. پروتئین E1A توانایی مهار رونویسی ژن IFN-1 را دارد و در فرایندهای آپوپتوز و ترانسفورمسیون سلولی نیز دخالت دارد. ژن E1B نیز دو پروتئین با تأثیر در عفونت مولد آدنوویروسی و مهار آپوپتوزیس را کدگذاری می‌کند و جهش در این ژن‌ها ممکن است منجر به ایجاد توانایی فرار از سیستم‌های دفاعی بدن یا تغییر در روند تکثیر ویروس شود از این رو با توجه به اهمیت ژن‌های اشاره‌شده در بالا، بررسی توالی کامل این ژن‌های آدنوویروسی و موتاسیون احتمالی آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد.

با تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، نشان داده شد که ویژگی‌های ژنتیکی سویه‌های HAdV-D در کشورهای مختلف نیز با سویه مرجع HAdV-D8 ترتیب مشابه دارند. همچنین، نمونه‌های مورد مطالعه با سویه‌های HAdV-D8 و HAdV-D54 در ژاپن و ایالات متحده تشابه زیادی دارند، به‌ویژه در ژن‌های E1A و E1B. این نتایج نشان می‌دهند که تمامی جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه در ژن‌های E1A و E1B سویه HAdV-D8 حفاظت بالایی دارند.

### ملاحظات اخلاقی

انجام نمونه‌گیری و کارهای عملی و آزمایشگاهی این مطالعه پس از کسب کد اخلاق از کارگروه اخلاق در پژوهش دانشگاه با شماره IR.AJUMS.REC.1397.362 و طی طرح مصوب با کد OG-9726 انجام گرفت.

### مشارکت نویسندگان

شهرام جلیلیان به‌عنوان مجری مسئول، طرح اصلی مقاله و ویرایش نهایی مقاله، ناهید امید؛ انجام تکنیک‌ها و کارهای آزمایشگاهی، آذرخش آذران؛ نوشتن مقاله، منوچهر مکوندی؛ ایده مقاله و بررسی صحت نتایج آزمایش، غلامرضا خاتمی نیا؛ معاینه و انتخاب بیمار مناسب برای انجام آزمایش و نگارش اولیه مقاله، کامبیز احمدی انگالی؛ آنالیز بیوانفورماتیک و نتایج تحقیق را برعهده داشته‌اند.

### حمایت مالی

دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز حامی مالی این مطالعه مستخرج از پایان‌نامه با کد طرح OG-9726 می‌باشد.

### تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی در مورد انتشار این دست‌نوشته وجود ندارد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح مصوب با کد OG-9726 مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری خلیج فارس، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران می‌باشد که قسمتی از پایان‌نامه خانم ناهید امید دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز است. در اینجا لازم است از همکاری خانم دکتر کرمی استادیار محترم

### References

- [1]. Shafiei K, Makvandi M, Teimoori A, Samarbazfzadeh A, Khataminia G, Jalilian S, et al. Frequency of adenovirus serotype 8 in patients with Keratoconjunctivitis, in Ahvaz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2019 Apr;11(2):129. doi.org/10.18502/ijm.v11i2.1074
- [2]. Ismail AM, Lee JS, Lee JY, Singh G, Dyer DW, Seto D, et al. Adenoviromics: mining the human adenovirus species D genome. *Frontiers in microbiology*. 2018 Sep 11;9:2178. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02178
- [3]. Liu L, Qian Y, Han Z, Jia L, Dong H, Zhao L, et al. Genetic Evolution and Variation of Human Adenovirus Serotype 31 Epidemic Strains in Beijing, China, during 2010–2022. *Viruses*. 2023 May 25;15(6):1240. doi.org/10.3390/v15061240
- [4]. Omid N, Azaran A, Makvandi M, Khataminia G, Angali KA, Jalilian S. Characterization of the conserved regions of E1A protein from human adenovirus for reinforcement of cytotoxic T lymphocytes responses to the all genogroups causes ocular manifestation through an in silico approach. *Iranian Journal of Microbiology*. 2022 Oct;14(5):746. doi.org/10.18502/ijm.v14i5.10971
- [5]. Jonas RA, Ung L, Rajaiya J, Chodosh J. Mystery eye: Human adenovirus and the enigma of epidemic keratoconjunctivitis. *Progress in retinal and eye research*. 2020 May 1;76:100826. doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100826
- [6]. Seo JW, Lee SK, Hong IH, Choi SH, Lee JY, Kim HS, et al. Molecular Epidemiology of Adenoviral Keratoconjunctivitis in

- Korea. *Annals of Laboratory Medicine*. 2022 Nov 1;42(6):683-7. doi.org/10.3343/alm.2022.42.6.683
- [7]. Li J, Lu X, Jiang B, Du Y, Yang Y, Qian H, et al. Adenovirus-associated acute conjunctivitis in Beijing, China, 2011–2013. *BMC infectious diseases*. 2018 Dec;18:1-8. doi.org/10.1186/s12879-018-3014-z
- [8]. Kuo IC. Adenoviral keratoconjunctivitis: diagnosis, management, and prevention. *Current Ophthalmology Reports*. 2019 Jun 15;7:118-27. doi.org/10.1007/s40135-019-00207-y
- [9]. Wang J, Ning X, Xu Y, Wang R, Guo X, Xu J, et al. Etiological Study of Acute Conjunctivitis Caused by Human Adenovirus in Shanxi Province, China, between 2016 and 2019. *Microbiology Spectrum*. 2023 Jul 24:e00159-23. doi.org/10.1128/spectrum.00159-23
- [10]. Chandra N, Frängsmyr L, Imhof S, Caraballo R, Elofsson M, Arnberg N. Sialic acid-containing glycans as cellular receptors for ocular human adenoviruses: implications for tropism and treatment. *Viruses*. 2019 Apr 27;11(5):395. doi.org/10.3390/v11050395
- [11]. Liu X, Hong T, Parameswaran S, Ernst K, Marazzi I, Weirauch MT, et al. Human virus transcriptional regulators. *Cell*. 2020 Jul 9;182(1):24-37. doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.023
- [12]. Costa R, Akkerman N, Graves D, Crisostomo L, Bachus S, Pelka P. Characterization of adenovirus 5 E1A exon 1 deletion mutants in the viral replicative cycle. *Viruses*. 2020 Feb 14;12(2):213. doi.org/10.3390/v12020213
- [13]. Price AM, Steinbock RT, Lauman R, Charman M, Hayer KE, Kumar N, et al. Novel viral splicing events and open reading frames revealed by long-read direct RNA sequencing of adenovirus transcripts. *PLoS pathogens*. 2022 Sep 12;18(9):e1010797. doi.org/10.1101/2019.12.13.876037
- [14]. Ip WH, Dobner T. Cell transformation by the adenovirus oncogenes E1 and E4. *FEBS letters*. 2020 Jun;594(12):1848-60. doi.org/10.1002/1873-3468.13717
- [15]. Tessier TM, Dodge MJ, MacNeil KM, Evans AM, Prusinkiewicz MA, Mymryk JS. Almost famous: Human adenoviruses (and what they have taught us about cancer). *Tumour Virus Research*. 2021 Dec 1;12:200225. doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200225
- [16]. Yang L, Gu X, Yu J, Ge S, Fan X. Oncolytic virotherapy: From bench to bedside. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021 Nov 26;9:790150. doi.org/10.3389/fcell.2021.790150
- [17]. Oliveira ER, Bouvier M. Immune evasion by adenoviruses: a window into host–virus adaptation. *FEBS letters*. 2019 Dec;593(24):3496-503. doi.org/10.1002/1873-3468.13682
- [18]. Nestić D, Božinović K, Pehar I, Wallace R, Parker AL, Majhen D. The revolving door of adenovirus cell entry: not all pathways are equal. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 29;13(10):1585. doi.org/10.3390/pharmaceutics13101585
- [19]. Degenhardt K, Perez D, White E. Pathways used by adenovirus E1B 19K to inhibit apoptosis. *Programmed Cell Death in Animals and Plants*. 2021 Dec 24:241-51. doi.org/10.1201/9781003076889-18
- [20]. Hidalgo P, Ip WH, Dobner T, Gonzalez RA. The biology of the adenovirus E1B 55K protein. *FEBS letters*. 2019 Dec;593(24):3504-17. doi.org/10.1002/1873-3468.13694