

Variation and Phylogenetic Analysis of the ORF9b Genes of SARS-CoV-2 Isolated from Iran

Shirin Jalili^{1*}, Jamal Sarvari^{2,3}, Seyed Mohammad Ali Hashemi²

¹*Institute of Police Equipment and Technologies, Policing Sciences and Social Studies Research Institute, Tehran, Iran*

²*Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*

³*Gastroenterohepatology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*

Abstract

Introduction: The open reading frame 9 (ORF9b) proteins, which is an accessory protein of SARS-CoV-2, can play a role in the virulence of the virus through mechanisms. Mutations in this coding gene region can affect protein function. Therefore, the present study investigated mutations in the ORF9b gene of SARS-CoV-2 isolated from Iran.

Methods and Materials: ORF9b sequences of SARS-CoV-2 viruses isolated from Iran, which were submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database; moreover, the ORF9b sequence of the Wuhan strain were extracted as a reference strain. The amino acid changes were investigated and the phylogenetic tree of the extracted sequences with Wuhan reference strain was drawn using Mega software version 7 and neighbor-joining (NJ) algorithm.

Results: Finally, 24 complete genome sequences of SARS-CoV-2 were extracted from NCBI. Analysis at the amino acid level showed that ORF9b related to newly isolated viruses has undergone changes compared to the Wuhan reference strain. Three of these changes were in the binding region of this protein to Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 70(TOM70). Furthermore, the drawing of the phylogenetic tree showed that the ORF9b gene of SARS-CoV-2 has become different over time in the isolated strains.

Discussion and Conclusion: Considering the role that the ORF9b protein has in the pathogenesis of SARS-CoV-2 and mutation occurs in this protein, it is suggested to monitor the changes in this viral protein in new variants that were detected.

Keywords: SARS-CoV-2, ORF9b, Iran

*(Corresponding Author) Shirin Jalili, Institute of Police Equipment and Technologies, Policing Sciences and Social Studies Research Institute, Tehran, Iran.

Email: jalili.shirin@yahoo.com

بررسی تغییرات فیلوژنتیکی در ژن ORF9b ویروس‌های SARS-CoV-2 جداسازی شده در ایران

شیرین جلیلی^{۱*}، جمال سروری^۲، سید محمد علی هاشمی^۳^۱ پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، پژوهشکده تجهیزات و فناوری‌های انتظامی، تهران، ایران^۲ گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران^۳ مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

چکیده

مقدمه: پروتئین ORF9b که یک پروتئین جانبی ویروس سارس-۲ (SARS-CoV-2) می‌باشد از طریق مکانیسم‌هایی می‌تواند در بیماری‌زایی ویروس نقش داشته باشد. جهش در این ناحیه ژنی کد کننده می‌تواند بر عملکرد پروتئین و شدت بیماری اثر بگذارد. بنابراین در این مطالعه به بررسی جهش‌ها در ژن ORF9b ویروس‌های سارس-۲ جداسازی در ایران می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها: توالی‌های ORF9b مربوط به ویروس‌های سارس-۲ جداسازی شده در ایران که در پایگاه اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (National Center for Biotechnology Information) یا به اختصار NCBI ثبت شده بودند و همچنین توالی ORF9b سویه ووهان به عنوان سویه مرجع استخراج گردید. تغییرات اسید آمینه‌ای بررسی و همچنین درخت فیلوژنتیکی توالی‌های استخراج شده با سویه مرجع ووهان با استفاده از نرم افزار مگا ورژن ۷ و روش نیبرجونیگ رسم گردید.

یافته‌ها: در نهایت تعداد ۲۴ توالی کامل ژنوم ویروس سارس-۲ از NCBI استخراج گردید. بررسی در سطح اسید آمینه نشان داد که ORF9b مربوط به ویروس‌هایی که به تازگی جداسازی شده‌اند نسبت به سویه مرجع ووهان دچار تغییراتی شده‌اند. ۳ تا از این تغییرات، در ناحیه اتصال این پروتئین به TOM70 (Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane) بود. همچنین رسم درخت فیلوژنتیکی نشان داد با گذر زمان در سویه‌های جداسازی شده، ژن ORF9b ویروس سارس-۲ متفاوت‌تر شده است.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نقشی که پروتئین ORF9b در پاتوژن سارس-۲ دارد و جهش‌هایی که در این پروتئین رخ می‌دهد، پیشنهاد می‌شود تغییرات در این پروتئین ویروسی در انواع جدیدی که شناسایی شده اند، پایش شود.

کلمات کلیدی: SARS-CoV-2، ORF9b، ایران

مقدمه

گرفت) که همه‌ی آن‌ها متعلق به خانواده Coronaviridae هستند (۱).

بعد از ظهور عفونت ویروس کرونا جدید ۲۰۱۹ در ووهان چین، در دسامبر ۲۰۱۹، این ویروس به سرعت در سراسر چین و سراسر جهان گسترش یافت (۴-۲). در ۱۱ فوریه ۲۰۲۰، سازمان بهداشت جهانی (WHO) World Health Organization نام جدیدی را برای بیماری همه گیر ناشی از کرونا جدید ۲۰۱۹ انتخاب کرد و این بیماری را بیماری کووید - Coronavirus disease 2019

قرن بیست و یکم اپیدمی سه کروناویروس جدید را تجربه کرده است که عبارتند از: ویروس کرونا سندرم تنفسی حاد شدید (SARS-CoV) Severe acute respiratory syndrome coronavirus در سال ۲۰۰۳، سندرم تنفسی خاورمیانه Middle East respiratory syndrome (MERS) در سال ۲۰۱۲ و ویروس کرونا جدید ۲۰۱۹ (که بعدها به طور رسمی SARS-CoV-2) Severe acute respiratory syndrome coronavirus ۲ نام

* (نویسنده مسئول) دکتر شیرین جلیلی، دکترای تخصصی شیمی، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، پژوهشکده تجهیزات و فناوری‌های انتظامی، تهران، ایران.

آدرس الکترونیکی: jalili.shirin@yahoo.com

می‌کنند (۱۵). یک مطالعه نشان داد mtDNA در گردش می‌تواند به عنوان نشان‌گر زیستی برای سنجش پاسخ‌های پیش التهابی و شدت کووید-۱۹ باشد (۱۶). سطح mtDNA در حال گردش در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ با شدت بیماری همبستگی مثبت دارد (۱۸، ۱۷).

ویروس‌های کرونا مانند سایر ویروس‌ها در طول تکثیرهای متعدد، دچار یکسری تغییرات در توالی ژنوم خود می‌شوند و گاهی اوقات این تغییرات می‌تواند بر انتقال ویروس، همچنین شدت بیماری و کارایی واکسن تأثیر بگذارد (۱۲). مطالعات توالی‌یابی ژنتیکی، جهش‌های متعددی را نشان داده‌اند که به طور عمده خنثی یا خفیف هستند، با این حال، درصد کمی از جهش‌ها می‌تواند قطبیت پپتید را تغییر داده و بر ساختار و عملکرد پروتئین‌های ویروسی درگیر در شدت بیماری‌زایی، قدرت انتقال / عفونت‌زایی و آنتی‌ژنیسیته تأثیر بگذارند. همه جهش‌های سارس-۲ توسط WHO ردیابی می‌شوند، برخی از آن‌ها همان طور که ذکر شد به دلیل شدت بیماری بر سلامت عمومی به عنوان انواع variants of concern (VoC) شناسایی شده‌اند. اهمیت فراوانی و نوع جهش‌ها در ژن ORF9b با توجه به نقشی که این پروتئین در بیمارزایی دارد کم تر مورد مطالعه قرار گرفته است، بنابراین در این مطالعه ما به بررسی جهش‌ها در ژن ORF9b در ویروس‌های سارس-۲ جداسازی در ایران می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توالی‌های ORF9b مربوط به ویروس‌های سارس-۲ جداسازی شده در ایران که در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شده بودند استخراج گردید. (MT646036.1، ON024064.1، ON024063.1، ON024062.1، MW898809.1، MW307301.1، MT380727.1، MT380726.1، MT281530.2، MT186682.1، OQ152808.1، OQ152122.1، MT459928.1، MT994881.1، MT994849.1، MT994632.1، MT994286.1، MT889692.1، MZ359830.1، MZ314348.1، MZ314345.1، MZ314342.1، MW737421.1، MT447177.1، MT320891.2، MT240479.1). توالی سویه ووهان به عنوان سویه مرجع (NC_045512.2) جهت بررسی تغییرات اسید آمینه‌ای استفاده

۲۰۱۹ (COVID-19) نام گذاری کرد. کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها نیز کرونا ی جدید را که از قبل موقتی نام گذاری شده بود را به ویروس کرونا ۲ سندرم حاد تنفسی Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) تغییر نام داد (۵). این ویروس دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای پلاریته مثبت و پوشش‌دار می باشد که در خانواده کرونا ویریده (Coronaviridae) و جنس بتا ویروس کرونا طبقه‌بندی می‌شود (۷، ۶). ویروس کروناها بر اساس عملکرد، دو نوع پروتئین دارند که شامل: پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری می‌باشد. ژنوم سارس-۲ شامل تعدادی چارچوب خواندن باز open reading frame (ORF) برای کدگذاری پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری درگیر در چرخه زندگی ویروسی و مکانیسم‌های بیماری‌زایی آن می باشد (۸).

ORF9b یک پروتئین جانبی منحصر به فرد سارس-۱ و سارس-۲ است و گزارش شده است که ORF9b در سارس-۱ توسط یک چارچوب خواندن باز متناوب در ژن نوکلئوکپسید (N) کدگذاری شده است (۹). این پروتئین در سارس-۲ دارای ۹۷ اسید آمینه می باشد. آنتی بادی علیه ORF9b در سرم بیمارانی که از سارس-۱ یا سارس-۲ بهبود یافته بودند یافت شده است (۱۱، ۱۰). گزارش شده است که از میان ۲۲ جهش مضر شناسایی شده در ORF9b، پنج جهش در مناطق آنتی ژنی ممکن است به کاهش احتمال اتصال به سلول‌های B کمک کنند (۱۲). این پروتئین می‌تواند با تعامل با آداپتور (TOM70) Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 70 در میتوکندری، تولید IFN-I Type-I interferon را به شدت مهار کند. Orf9b روی غشای میتوکندری قرار می‌گیرد و پاسخ‌های اینترفرون نوع IFN-I را از طریق ارتباط با TOM70 سرکوب می‌کند و بیان بیش از حد TOM70 می‌تواند تا حد زیادی این مهار را نجات دهد و پیشنهاد دادند که هدف قرار دادن تعامل Orf9b-TOM70 می‌تواند به عنوان یک استراتژی درمانی جدید برای کووید-۱۹ نشان دهد (۱۳). علاوه بر این، گزارش شده است که NSP4 و ORF9b ویروس سارس-۲ با هم کار می‌کنند تا به طور هم افزایی باعث آزادسازی DNA میتوکندری (mtDNA) شوند (۱۴). میتوکندری‌ها در تقاطع مسیرهای حیاتی هستند که پاسخ پیش التهابی و سیگنال دهی ضد ویروسی را کنترل

شده‌اند که نسبت به سوویه ووهان رخ داده است، این تغییرات در جدول ۱ آورده شده است. ۳ تا از این تغییرات، در ناحیه اتصال این پروتئین به TOM70 بود. همچنین رسم درخت فیلوژنتیکی نشان داد که عمده ویروس‌های جداسازی شده در سال‌های ۲۰۲۰-۲۰۱۹ دارای ORF9b مشابه می‌باشند؛ اما با گذر زمان و در سوویه‌های جداسازی شده در حال حاضر تغییراتی به وجود آمده است. (شکل ۱)

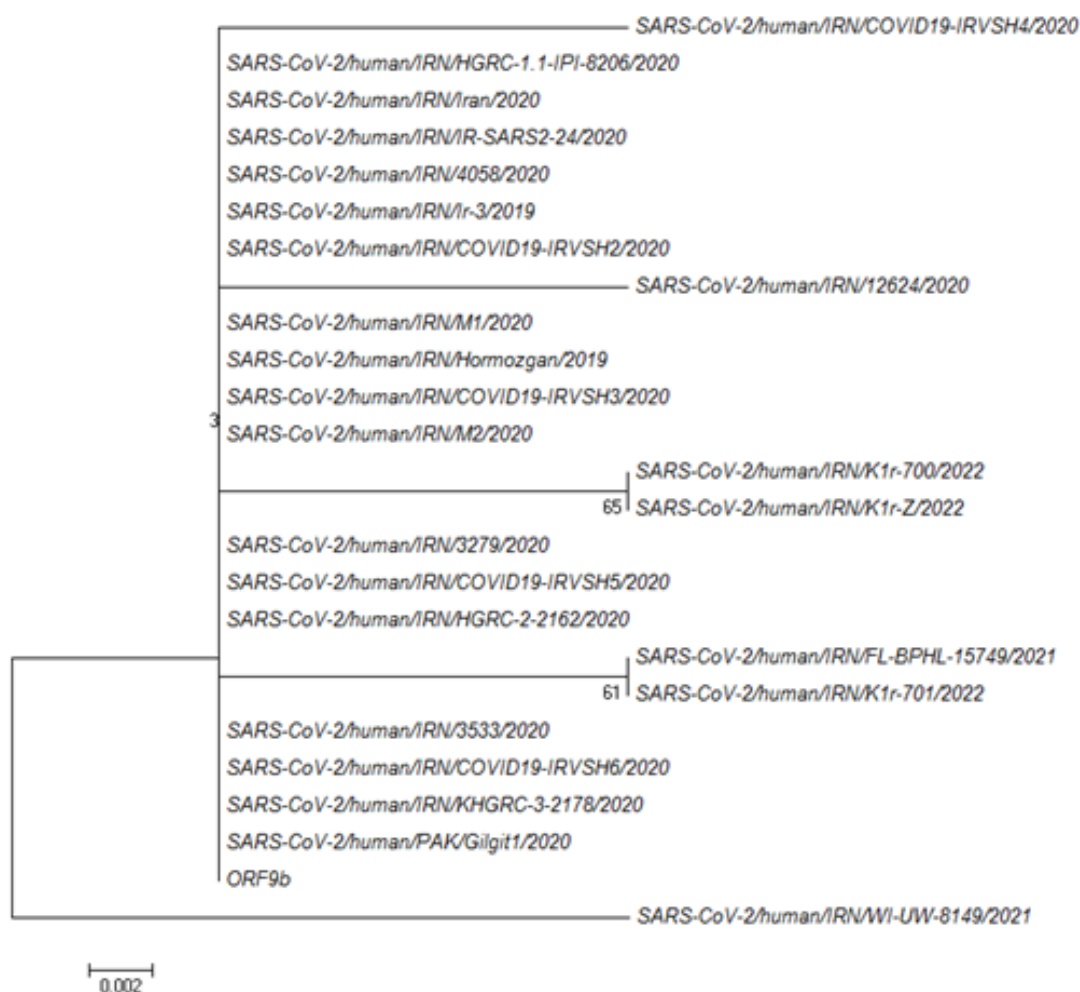
گردید. درخت فیلوژنتیکی این توالی‌ها با سوویه مرجع ووهان با استفاده از نرم افزار مگا ورژن ۱۰ و روش نیبرجورینگ رسم گردید.

یافته‌ها

در نهایت تعداد ۲۴ توالی کامل ژنوم ویروس سارس-۲ از NCBI استخراج گردید. بررسی تغییرات اسید آمینه‌ای نشان داد که تغییراتی در ژن ORF9b ویروس‌هایی به تازگی جداسازی

جدول ۱- تغییرات اسید آمینه ای در ژن ORF9b ویروس سارس-۲ جداسازی شده

تغییرات در سایر نواحی	تغییرات در ناحیه TOM70	سال جداسازی ویروس
-	-	۲۰۱۹
R32S	R58S	۲۰۲۰
P10S, G38D و Glu27_Ala29del	T60A	۲۰۲۱
P10S	Q77E	۲۰۲۲



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی ژن ORF9b ویروس سارس-۲

بحث و نتیجه گیری

ویروس سارس-۲ که دارای ژنوم RNA است به طور کلی در حال جهش و تکامل است و انواع جدیدی در طول زمان ظاهر می‌شود. تنها تعداد کمی از این گونه‌ها می‌توانند به دلیل قدرت بالای انتقال، بیماری‌زایی شدید یا توانایی فرار از پاسخ‌های ایمنی اکتسابی، سلامت عمومی در انسان را به خطر بی‌اندازند (۱). پنج دودمان B.1.1.7 (آلفا)، B.1.351 (بتا)، P.1 (گاما)، B.1.617.2 (دلتا) و B.1.529 (اومیکرون) گروه‌های مختلف را تشکیل می‌دهند (۱۲، ۱۹، ۲۰). ژنوم سارس-۲ برخی از پروتئین‌های جانبی را رمزگذاری می‌کند که برای عفونت ضروری هستند. قابل ذکر است که پروتئین‌های کمکی (جانبی) سارس-۲ نقش مهمی در فرار ایمنی و پاتوژنز ویروسی دارند. بنابراین، پروتئین‌های کمکی سارس-۲ را می‌توان اهداف دارویی احتمالی در نظر گرفت. جهش در پروتئین‌های کمکی ویروس سارس-۲ ممکن است که بر عملکرد این پروتئین‌ها تأثیر منفی بگذارد. در این مطالعه نتایج ما نشان داد که تغییرات اسید آمینه‌ای در ژن ORF9b ویروس‌هایی به تازگی جداسازی نسبت به سویه ووهان رخ داده است. یکی از دومین‌های با اهمیت در پروتئین ORF9b، دومین متصل شونده به TOM70 می‌باشد. ORF9b روی غشای میتوکندری قرار می‌گیرد و پاسخ‌های اینترفرون نوع I را از طریق ارتباط با TOM70 سرکوب می‌کند (۲۱). آسیب میتوکندری ناشی از SARS-CoV2 در بیماران کووید-۱۹ گزارش شده است (۲۲، ۲۳). تغییرات فراساختاری گسترده میتوکندری و اختلالات عملکردی اغلب در سلول‌های اپیتلیال راه هوایی آلوده رخ می‌دهد (۲۴، ۲۵). علاوه بر سلول‌های اندوتلیال، این تغییرات در مونوسیت‌ها و سلول‌های T و ... مشاهده می‌شود. در یک مطالعه، mtDNA یافت شده در بیماران مبتلا به کووید-۱۹، با پاسخ پیش التهابی و مرگ سلولی در سلول‌های اپیتلیال مجرای هوایی انسان مرتبط بود (۱۴). ORF9b از طریق واکنش با پروتئین TOM70 در انتشار mtDNA ناشی از عفونت سارس-۲ نقش دارد. دومین ORF9b که با TOM70 واکنش می‌دهد در موقعیت اسید آمینه‌ای ۷۸-۴۳ واقع شده است و انتهای آمینی این پروتئین در تثبیت ساختار TOM70-ORF9b نقش دارد (۲۱). در این مطالعه ما تغییرات R58S، T60A و Q77E را در ناحیه TOM70 سویه‌های جداسازی شده مشاهده کردیم. بنابراین

جهش در ناحیه اتصال ORF9b به پروتئین TOM70 می‌تواند در روند بیماری نقش داشته باشد. یک‌سری واریانت‌های طبیعی از ژن ORF9b ویروس سارس-۲ گزارش شده است. یکی از تغییرات، تغییر missense در اسید آمینه شماره ۱۰ (P>S) این پروتئین می‌باشد که در سویه‌های Omicron/BA.1، Omicron/BA.2 Omicron/BA.2.12.1، Omicron/BA.4، Omicron/BA.5، Omicron/XBB.1.5 مشاهده شده است (۲۶). در مطالعه ما همین تغییر در سویه جداسازی شده در سال ۲۰۲۲ مشاهده شد. واریانت حذفی Glu27_Ala29del که در استرین‌های Omicron/BA.1، Omicron/BA.2، Omicron/BA.2.12.1، Omicron/BA.4، Omicron/BA.5، Omicron/XBB.1.5 گزارش شده است (۲۶). این تغییر را نیز ما در یکی از سویه‌های جداسازی شده یافتیم. واریانت طبیعی Thr60Ala و Gln77Glu به ترتیب در سویه‌ی Delta/B.1.617.2 و Gamma/P.1 گزارش شده است (۲۶). این دو تغییر نیز به ترتیب در دو سویه جداسازی شده در سال‌های ۲۰۲۱ و ۲۰۲۲ مشاهده گردید. در مطالعه Islam و همکاران در سال ۲۰۲۳ گزارش شده که از میان ۲۲ جهش مضر شناسایی شده در ORF9b، پنج جهش در مناطق آنتی ژنی ممکن است به کاهش احتمال اتصال به سلول‌های B کمک کنند. این پنج جهش شامل V76F، P3S، A11S، L14F، I45T، L52P می‌شود (۱۲). این جهش‌ها در مطالعه ما مشاهده نشد. بالاترین میزان جهش در ORF9b تبدیل ترئونین به آلانین با نرخ ۶۱/۴ درصد در فرانسه است و سایر جهش در اروپا تبدیل والین به لوسین با نرخ ۰/۶ درصد در روسیه و گلیسین به اسید آسپارتیک با نرخ ۰/۴ درصد در انگلستان است. دو جهش در کانادا یافت شد، تبدیل سرین به سیستئین با نرخ ۴/۲٪ و سرین به لوسین با نرخ ۰/۸٪. یک جهش در آسیا با تبدیل پرولین به لوسین با نرخ ۰/۲٪ در فوشان یافت شد (۲۷). نقش دیگری که پروتئین ORF9b دارد ارتباط آن با مسیر مولکولی درگیر در انتشار mtDNA ناشی از عفونت سارس-۲ می‌باشد. گزارش شده است پروتئین‌های NSP4 و ORF9b رمزگذاری شده توسط سارس-۲ به طور هم‌افزایی باعث انتشار mtDNA می‌شوند (۱۴). همچنین گزارش شده است که پروتئین ORF9b توانایی تحریک پاسخ‌های فیبروتیک را دارد (۲۸). در

در این فرآیند نامشخص است.

در نهایت رسم درخت فیلوژنتیکی ما نیز نشان داد که عمده ویروس‌های جداسازی شده در سال‌های ۲۰۱۹-۲۰۲۰ دارای ORF9b با توالی مشابه می‌باشند اما با گذر زمان و در سوبه‌های جداسازی شده اخیر تغییراتی به وجود آمده است. بنابراین با توجه به نقشی که پروتئین ORF9b در پاتوژن ویروس سارس-۲ دارد، پیشنهاد می‌گردد که پایش تغییرات و بررسی نقش این تغییرات در این پروتئین ویروسی به طور مداوم صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نتایج حاصل از این مطالعه مستخرج از پروژه جایگزین خدمت سید محمد علی هاشمی در پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی می‌باشد. از گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی علوم پزشکی شیراز و پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی که در انجام این پروژه همکاری داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

یک مطالعه، که برای اولین بار مسیر مولکولی درگیر در انتشار mtDNA ناشی از عفونت SARS-CoV-2 را روشن کرد گزارش شد که پروتئین‌های NSP4 و ORF9b رمزگذاری شده توسط SARS-CoV-2 به طور هم‌افزایی باعث انتشار mtDNA می‌شوند (۱۴). NSP4 از طریق تعامل مستقیم، BAK را روی غشای خارجی تثبیت می‌کند. متعاقباً BAX، BAK را برای القای تشکیل درشت منافذ غشای خارجی به کار می‌گیرد. این درشت منافذ BAX/BAK قبلاً گزارش شده بود که در مواجهه با محرک‌های آپوپتوز، اغلب تحت شرایط مهار کاسپاز، تشکیل می‌شوند (۲۹، ۳۰). به طور مشابه، عفونت‌هایی مانند تب شدید همراه با عفونت‌های ویروسی سندرم ترومبوسیتوپنی، می‌توانند باعث آزادسازی mtDNA وابسته به BAX/BAK شوند (۳۱). این اولین مطالعه‌ای است که نشان می‌دهد SARS-CoV-2 واسطه تشکیل این درشت منافذ در سلول‌های اپیتلیال راه هوایی است. برخی دیگر نیز رابطه پیچیده‌ای بین SARS-CoV-2 و عملکرد میتوکندری نشان داده‌اند. بنابراین با توجه به نامشخص بودن مکانیسم دقیق این فرآیند، اهمیت هر کدام از جهش‌های ORF9b

References

1. Tu Y-F, Chien C-S, Yarmishyn AA, Lin Y-Y, Luo Y-H, Lin Y-T, et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(7):2657.
2. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of medical virology*. 2020;92(4):401.
3. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New England journal of medicine*. 2020;382(13):1199-207.
4. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *New England journal of medicine*. 2020;382(10):929-36.
5. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. *BioRxiv*. 2020.
6. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*. 2020;382(8):727-33.
7. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*. 2020;395(10224):565-74.
8. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns. *Frontiers in Immunology*. 2021:2698.
9. Xu K, Zheng B-J, Zeng R, Lu W, Lin Y-P, Xue L, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus accessory protein 9b is a virion-associated protein. *Virology*. 2009;388(2):279-85.
10. Guo J-P, Petric M, Campbell W, McGeer PL. SARS corona virus peptides recognized by antibodies in the sera of convalescent cases. *Virology*. 2004;324(2):251-6.
11. Wu J, Shi Y, Pan X, Wu S, Hou R, Zhang Y, et al. SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. *Cell reports*. 2021;34(7).
12. Islam MA, Shahi S, Marzan AA, Amin MR, Hasan MN, Hoque MN, et al. Variant-specific deleterious mutations in the SARS-CoV-2 genome reveal immune responses and potentials for prophylactic vaccine development. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1090717.
13. Jiang H-w, Zhang H-n, Meng Q-f, Xie J, Li Y, Chen H, et al. SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. *Cellular & molecular immunology*. 2020;17(9):998-1000.
14. Faizan MI, Chaudhuri R, Sagar S, Albogami S, Chaudhary N, Azmi I, et al. NSP4 and ORF9B of SARS-CoV-2 induce pro-inflammatory mitochondrial DNA release in inner membrane-derived vesicles. *Cells*. 2022;11(19):2969.
15. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*.

- 2011;11(6):389-402.
16. Zhong F, Liang S, Zhong Z. Emerging role of mitochondrial DNA as a major driver of inflammation and disease progression. *Trends in immunology*. 2019;40(12):1120-33.
 17. Scozzi D, Cano M, Ma L, Zhou D, Zhu JH, O'Halloran JA, et al. Circulating mitochondrial DNA is an early indicator of severe illness and mortality from COVID-19. *JCI insight*. 2021;6(4).
 18. Andargie TE, Tsuji N, Seifuddin F, Jang MK, Yuen PS, Kong H, et al. Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury. *JCI insight*. 2021;6(7).
 19. Ahmed F, Islam MA, Kumar M, Hossain M, Bhattacharya P, Islam MT, et al. First detection of SARS-CoV-2 genetic material in the vicinity of COVID-19 isolation Centre in Bangladesh: Variation along the sewer network. *Science of the total environment*. 2021;776:145724.
 20. Chakraborty C, Bhattacharya M, Sharma AR, Roy SS, Islam MA, Chakraborty S, et al. Deep learning research should be encouraged for diagnosis and treatment of antibiotic resistance of microbial infections in treatment associated emergencies in hospitals. *International Journal of Surgery*. 2022;105:106857.
 21. Gao X, Zhu K, Qin B, Olieric V, Wang M, Cui S. Crystal structure of SARS-CoV-2 Orf9b in complex with human TOM70 suggests unusual virus-host interactions. *Nature communications*. 2021;12(1):2843.
 22. Domizio JD, Gulen MF, Saidoune F, Thacker VV, Yatim A, Sharma K, et al. The cGAS-STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19. *Nature*. 2022;603(7899):145-51.
 23. Tian M, Liu W, Li X, Zhao P, Shereen MA, Zhu C, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):308.
 24. Cortese M, Lee J-Y, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VM, Köhrer S, et al. Integrative imaging reveals SARS-CoV-2-induced reshaping of subcellular morphologies. *Cell host & microbe*. 2020;28(6):853-66. e5.
 25. Yang Y, Wu Y, Meng X, Wang Z, Younis M, Liu Y, et al. SARS-CoV-2 membrane protein causes the mitochondrial apoptosis and pulmonary edema via targeting BOK. *Cell Death & Differentiation*. 2022;29(7):1395-408.
 26. Uniprot. OR9b Available from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DTD2/entry>.
 27. Mahmanzar M, Houseini ST, Rahimian K, Mikaeili Namini A, Gholamzad A, Tokhanbigli S, et al. The First Geographic Identification by Country of Sustainable Mutations of SARS-CoV-2 Sequence Samples: Worldwide Natural Selection Trends. *bioRxiv*. 2022;2022.07.18.500565.
 28. López-Ayllón BD, de Lucas-Rius A, Mendoza-García L, García-García T, Fernández-Rodríguez R, Suárez-Cárdenas JM, et al. SARS-CoV-2 accessory proteins involvement in inflammatory and profibrotic processes through IL11 signaling. *Frontiers in Immunology*. 2023;14.
 29. Riley JS, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O'Prey J, Pearson M, et al. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mt DNA release during apoptosis. *The EMBO journal*. 2018;37(17):e99238.
 30. McArthur K, Whitehead LW, Heddlestone JM, Li L, Padman BS, Oorschot V, et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science*. 2018;359(6378):eaao6047.
 31. Li S, Li H, Zhang Y-L, Xin Q-L, Guan Z-Q, Chen X, et al. SFTSV infection induces BAK/BAX-dependent mitochondrial DNA release to trigger NLRP3 inflammasome activation. *Cell Reports*. 2020;30(13):4370-85. e7.