

پروتئین VP ۳۵ یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا

وحیده السادات ناظمی^{۱*}، محمد رضا دایر^۲، سیده الهام رضا توفیقی^۳

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

۳- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

vahidehnazemi@gmail.com

چکیده

خانواده فیلوویروس‌ها از راسته مونونگاویرال از دو جنس ابولا ویروس و ماربرگ ویروس تشکیل شده است. گونه زئیر از میان ابولا ویروس‌ها سبب مرگ‌ومیر حدود ۹۰ درصد و یکی از کشنده‌ترین ویروس‌های شناخته شده است و موجب تب خونریزی‌دهنده شدید در انسان‌ها و پرمات‌های غیر انسان می‌شود. از هفت پروتئینی که توسط ویروس ابولا کد می‌شوند، VP۲۴، گلیکوپروتئین و VP۳۵ فاکتورهای بیماری‌زا هستند. پروتئین ویروسی ۳۵ یا VP۳۵ یک پروتئین چند کاره است که در چندین مرحله از چرخه همانندسازی ویروس عمل می‌کند. VP۳۵ به‌عنوان آنتاگونیست اجزای مختلف مسیر القا و پیام‌رسانی اینترفرون شامل گیرنده‌های RLR به‌ویژه RIG-1، کینازهای IRF-3، IRF-7، پروتئین کیناز R، و فعال‌کننده پروتئین کیناز R یعنی PACT شناخته شده است. VP۳۵ همچنین به‌عنوان یک مهارکننده مسیر خاموش‌سازی آر.ان.ا، یک کوفاکتور برای پلیمراز و یک جزء ساختاری نوکلئوکپسید ویروس عمل می‌کند. بنابراین VP۳۵ برای همانندسازی و بیماری‌زایی ویروس لازم است. مطالعات نشان داده‌اند که دو ناحیه بسیار حفاظت‌شده با عناوین ناحیه بازی اول (FBS) و ناحیه بازی مرکزی (CBP) در دومین مهارکننده اینترفرون با انتهای کربوکسیلی پروتئین VP ۳۵ (IID) وجود دارد. با توجه به اهمیت این پروتئین در بیماری‌زایی ویروس ابولا، VP۳۵ یک هدف قوی برای درمان ضد ویروسی است. در این پژوهش، بخش‌های مهم این پروتئین از جنبه‌های ساختاری و عملکردی شرح داده خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: VP۳۵، ابولا، پروتئین کیناز R، اپتامر، RNAi.

مقدمه

خانواده فیلوویروس‌ها از راسته مونونگاویرال از دو جنس ابولاویروس و ماربرگ‌ویروس تشکیل شده است (۱). به دلیل عدم وجود واکسن‌های تایید شده و یا داروهای ضدویروسی، هر دو ویروس ابولا و ماربرگ جزء عوامل بیماری‌زای درجه چهار طبقه‌بندی می‌شوند (۲). گونه زئیر از میان ابولا ویروس‌ها مرگ و میر حدود ۹۰ درصد را سبب می‌شود و یکی از کشنده‌ترین ویروس‌های شناخته شده است. در میان پنج گونه ابولاویروس، رستون تنها گونه‌ای است که سبب بیماری در انسان نمی‌شود ولی در سایر پرمات‌ها بسیار بیماری‌زا است (۱). VP۳۵ ابولاویروس یک آنتاگونیست ایمنی چندکاره است که در چندین مرحله چرخه همانندسازی ویروس عمل می‌کند. این پروتئین به‌عنوان یک آنتاگونیست مسیر القا و سیگنال‌دهی اینترفرون شامل گیرنده‌های RLR به‌ویژه RIG-1، کینازهای IRF-3 و IRF-7 شامل IKK ϵ و TBK-1، پروتئین‌کیناز وابسته به آر.ان.ا. (پروتئین‌کیناز R) و فعال‌کننده پروتئین

کیناز R یعنی PACT شناخته شده است. VP۳۵ همچنین به‌عنوان یک مهارکننده خاموش‌سازی آر.ان.ا.، یک کوفاکتور برای پلیمراز ویروس و یک جزء ساختاری نوکلئوکپسید ویروس است. VP۳۵ مانع بلوغ سلول دندریتی نیز می‌شود (۴ و ۳ و ۱).

میانکنش VP۳۵ با آر.ان.ای دو رشته‌ای و

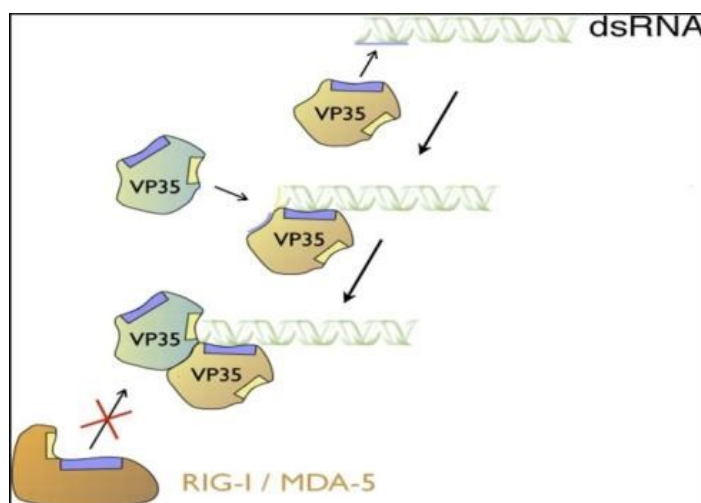
مهار تولید اینترفرون

پروتئین VP۳۵ با ۳۴۰ اسید آمینه از یک دومین الیگومریزه‌شونده (انتهای آمینی) و یک دومین مهارکننده اینترفرون (IID) (انتهای کربوکسیلی) تشکیل شده است. IID یا همان دومین اتصالی به آر.ان.ای دو رشته‌ای از دو زیردومین مارپیچ آلفا با انتهای آمینی و صفحه بتا با انتهای کربوکسیلی تشکیل شده است. VP۳۵ ابولاویروس به خانواده پروتئین‌های اتصالی به آر.ان.ای دو رشته‌ای شامل E3L، NS1 واکسینیاویروس، σ^3 رئوویروس و pTRS1 سیتومگالو ویروس تعلق دارد (۵). VP۳۵ در میان گونه‌های ابولاویروس دو ناحیه بسیار حفاظت شده دارد: ناحیه بازی اول (FBP) و ناحیه

"ناظمی، پروتئین VP ۳۵ یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"

VP۳۵ گونه‌های زئیر و رستون، دو کپی از دومین اتصال آران.ای دو رشته‌ای یک دimer نامتقارن تشکیل می‌دهند که به هر کدام از انتهای آران.ای دو رشته‌ای متصل می‌شوند. یک دومین اتصال آران.ای پروتئین VP۳۵ که مولکول پوشاننده انتهایی گفته می‌شود، با بازهای انتهایی اتصال برقرار می‌کند. در حالیکه دومین اتصال دیگر که مولکول اتصال ستون فقرات گفته می‌شود با مولکول پوشاننده انتهایی تشکیل دimer می‌دهد و با ستون فقرات قند فسفات تماس حاصل می‌کند (شکل ۱) (۶).

بازی دوم یا مرکزی (CBP). باقیمانده‌های ناحیه بازی مرکزی در توالی IID که در میان ماربرگ ویروس و ابولا ویروس بسیار حفظ شده‌اند، شامل آرژنین ۳۱۲، لیزین ۳۰۹، آرژنین ۳۰۵، لیزین ۳۳۹، آرژنین ۳۲۲ و لیزین ۳۱۹ هستند که در زیردومین صفحه بتا قرار دارند و باقیمانده‌های مهم برای مهار تولید اینترفرون محسوب می‌شوند. این باقیمانده‌ها با آران.ای دو رشته‌ای میانکنش کرده و پاسخ‌های ایمنی میزبان را مهار می‌کنند (۵ و ۱). ناحیه بازی مرکزی VP۳۵ گونه زئیر به صورت غیراختصاصی به ۸ جفت باز آران.ای دو رشته‌ای متصل می‌شود. در ساختارهای



شکل ۱- مکانیسم سرهم شدن دimerی دومین اتصال آران.ای دو رشته‌ای VP۳۵ (۳۵).

علت تفاوت در بیماریزایی دو گونه از ابولاویروس

مطالعات نشان می‌دهد که گونه رستون از ابولاویروس نسبت به گونه زئیر توانایی کمتری برای مهار پاسخ‌های ایمنی ذاتی میزبان دارد. مطالعه تطابق توالی نشان می‌دهد که این دو پروتئین در ناحیه IID تنها در ۱۴ اسید آمینه اختلاف دارند (۳). باقیمانده‌های ۲۰۴ تا ۳۲۹ از VP۳۵ رستون با باقیمانده‌های ۲۱۵ تا ۳۴۰ گونه زئیر مطابقت دارد. هر دو VP۳۵ به هشت جفت باز آر.ان.ای دو رشته متصل می‌شوند. نسبت آر.ان.ای دو رشته به IID VP۳۵، ۱ به ۴ است. هر چند مقایسه ثابت‌های اتصال آشکار کرد که IID VP۳۵ رستون در مقایسه با VP۳۵ زئیر با دو تا سه فولد کمتر به آر.ان.ای دو رشته‌ای مشابه متصل می‌شود. میانگین دمای ذوب (T_m) برای VP۳۵ رستون 63.4 ± 0.3 °C است. در حالی که برای گونه زئیر 57.0 ± 0.1 °C است. این نتایج نشان می‌دهد که VP۳۵ رستون نسبت به زئیر از نظر دمایی پایدارتر است. این دو پروتئین تنها در ۱۴ باقیمانده

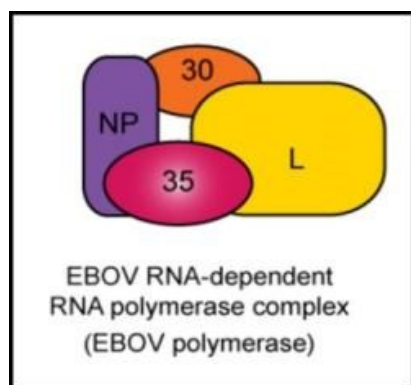
تفاوت دارند ولی علت تفاوت در پایداری دمایی کاملاً مشخص نشده است. گرمای نسبی که از اتصال حاصل می‌شود در مورد IID گونه رستون ۲۵ درصد کمتر از گونه زئیر است. در ساختار VP۳۵ گونه رستون بین زیر دومین مارپیچ آلفا و صفحه بتا یک مارپیچ آلفا با ۵ باقیمانده ($\alpha 4b$) وجود دارد. این مارپیچ در ساختار IID VP۳۵ زئیر وجود ندارد و به جای آن یک لوپ قرار دارد. احتمالاً حضور مارپیچ $\alpha 4b$ موجب پایداری بیشتر IID VP۳۵ رستون در برابر گرما شده است. به دلیل وجود این مارپیچ جهت‌گیری نسبی بین زیر دومین مارپیچ آلفا و صفحه بتا $0.1-0.4$ درجه است. علی‌رغم توالی نخستین مشابه به ویژه نزدیک ناحیه بازی مرکزی، میانکنش IID با آر.ان.ای دو رشته‌ای در دو گونه رستون و زئیر یکسان نیست (۳).

مقدار RMSD ستون فقرات $64/0$ آنگستروم است. به‌طور کلی ساختار IID VP۳۵ رستون مانند زئیر است و دو زیر واحد مارپیچ آلفا و صفحه بتا دارد. مقدار RMSD برای زیر واحد مارپیچ آلفا

"ناظمی، پروتئین VP ۳۵ یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"

نقش VP۳۵ در همانندسازی و رونویسی ویروس

کمپلکس آر.ان.ای پلیمراز وابسته به آر.ان.ای ابولا ویروس از چهار پروتئین NP، VP۳۵، VP۳۰ و پلیمراز L تشکیل شده است (۱). ناحیه بازی اول در میانکنش VP۳۵ و NP نقش دارد البته همه باقیمانده‌های بازی که برای همانندسازی مهم هستند، برای اتصال نوکلئوپروتئین لازم نیستند. چندین نمونه دارای جهش در باقیمانده‌های بازی که کاهش همانندسازی را نشان می‌دهند، می‌توانند به نوکلئوپروتئین متصل شوند. این نتایج نشان می‌دهد که VP۳۵ بین نوکلئوپروتئین و L پل می‌زند شکل (۲).



شکل ۲- کمپلکس آر.ان.ای پلیمراز ویروس (۱).

۳/۰ آنگستروم و برای زیر واحد صفحه بتا ۵/۰ آنگستروم است (۵).

این نتایج نشان می‌دهد که VP۳۵ IID در سایر فیلوویروس‌ها احتمالاً دارای یک فولد مشابه است و مهم‌تر اینکه IID VP۳۵ اساساً متفاوت از فولد معیار $\alpha\beta\beta\beta$ موجود در دومین‌های اتصال آر.ان.ای دو رشته‌ای موجود در سایر پروتئین‌ها است (۵ و ۳).

مقایسه الکتروستاتیک سطحی ساختارهای VP۳۵ IID رستون و زئیر نشان می‌دهد که باقیمانده‌هایی که برای اتصال آر.ان.ای دو رشته‌ای در IID در زئیر مهم هستند، سطح باردار مشابهی را در زئیر تشکیل می‌دهند. اضافه بر این مشاهده شده است که VP۳۵ IID گونه زئیر می‌تواند هم به ستون فقرات و هم به انتهای پهن آر.ان.ای دو رشته‌ای متصل شود و یک کلاهدک انتهائی را تشکیل دهد. این میانکنش همچنین به توانایی لیزین یکی مانده به آخر (لیزین ۳۲۸ در رستون یا لیزین ۳۳۹ در زئیر) بستگی دارد که با گروه کربوکسیلات انتهایی هماهنگ شود (۳).

این توضیحات اهمیت باقیمانده‌های بازی حفظ شده ناحیه انتهای کربوکسیلی VP۳۵ IID را نشان می‌دهد و همچنین بیانگر اهمیت VP۳۵ IID به عنوان یک هدف درمانی قوی است. VP۳۵ با NP و L میانکنش می‌کند. هر دوی میانکنش NP با VP۳۵ و VP۳۵ با L برای سنتز آر.ان.ای ویروسی ضروری هستند (۷ و ۱). جهش باقیمانده‌های ناحیه بازی اول (لیزین ۲۲۲، آرژینین ۲۲۵، لیزین ۲۴۸ یا لیزین ۲۵۱) به آلانین روی عمل آنتاگونیستی اینترفرون اثری ندارد (۸ و ۱). وقتی توانایی VP۳۵ IID برای اتصال به نوکلئوپروتئین در حضور و غیاب آر.ان.ای دو رشته‌ای بررسی شد، این نتیجه حاصل شد که عمل اتصال VP۳۵ به آر.ان.ای دو رشته می‌تواند تحت تاثیر میانکنش VP۳۵ و NP قرار بگیرد. این دو میانکنش اتصال به‌طور هماهنگ رخ نمی‌دهند. جهش باقیمانده‌های بازی مرکزی یا باقیمانده‌های سرپوش انتهایی روی عمل آنتاگونیستی اینترفرون اثر منفی دارند ولی اثر کمی روی عمل کوفاکتوری VP۳۵ دارند. ناحیه بازی اول بر خلاف

ناحیه بازی مرکزی برای اتصال به آر.ان.ای دو رشته‌ای یا مهار تولید اینترفرون بتا لازم نیست (۸ و ۱). جهش‌های جانشینی آلانین یا گلوتامیک اسید باقیمانده‌های آرژینین ۲۲۵، لیزین ۲۴۸ و لیزین ۲۵۱ منجر به از دست رفتن فعالیت مینی‌ژنوم می‌شود. در مقابل جهش‌های لیزین به آرژینین یا آرژینین به لیزین اثری روی فعالیت مینی‌ژنوم ندارد و این نشان می‌دهد که طبیعت بازی باقیمانده‌ها برای حمایت از عمل کوفاکتوری VP۳۵ ابولاویروس کافی است (۱). جهش‌های VP۳۵ که موجب از دست رفتن فعالیت مینی‌ژنوم می‌شوند، در واقع توانایی میانکنش با نوکلئوپروتئین را ندارند. تنها پروتئین ویروس که خاصیت آنزیمی دارد پلیمراز است. مشخص شده که جهش‌یافته‌های ناحیه بازی اول که نقص در همانندسازی دارند، توانایی میانکنش با نوکلئوپروتئین را ندارند اما توانایی میانکنش با پلیمراز را دارند. باقیمانده‌های لیزین ۲۲۲، آرژینین ۲۲۵، لیزین ۲۴۸ و لیزین ۲۵۱ از ناحیه بازی اول در زیر دومین مارپیچ آلفا قرار دارند و

باقیمانده‌های ناحیه بازی مرکزی روی دومین صفحه بتا قرار دارند. نمونه‌های دارای جهش آرژنین ۲۲۵، لیزین ۲۴۸ و لیزین ۲۵۱ مانع عمل کوفاکتوری VP۳۵ برای پلیمراز ویروس می‌شوند. نمونه‌های دارای جهش آرژنین ۲۲۵ به آلانین و لیزین ۲۴۸ به آلانین مربوط به ناحیه بازی اول هیچ میانکنش قابل تشخیصی با نوکلئوپروتئین نشان نداده‌اند. این در حالی است که نمونه‌های دارای جهش لیزین ۲۵۱ به آلانین توانایی کمی برای میانکنش با نوکلئوپروتئین نشان می‌دهند و مشابه با جهش یافته‌های آرژنین ۲۲۵ به آلانین و لیزین ۲۴۸ به آلانین و هیستیدین ۲۴۰ به آلانین یک الگوی حرکتی غیرمعمولی روی ژل SDS-PAGE نشان می‌دهند. جهش هیستیدین ۲۴۰ به آلانین VP۳۵ IID ابولا ویروس را ناپایدار می‌کند و موجب عدم توانایی میانکنش با نوکلئو پروتئین می‌شود. فقدان فعالیت مینی ژنوم در نمونه‌های دارای جهش آرژنین ۲۲۵ به آلانین، لیزین ۲۴۸ به آلانین و لیزین ۲۵۱ به آلانین به دنبال از دست دادن تماس‌های حیاتی با نوکلئوپروتئین است.

VP۳۵ چندین میانکنش را در زمینه مبارزه با ایمنی میزبان و همانندسازی ویروسی انجام می‌دهد. اینکه VP۳۵ این دو میانکنش را به‌طور همزمان انجام می‌دهد یا بین این دو عمل حد و مرزی قرار می‌دهد، مشخص نشده است (۱). بررسی‌ها نشان داده است که باقیمانده‌های ۱ تا ۵۰۳ از انتهای آمینی پلیمراز ماربرگ ویروس برای میانکنش با VP۳۵ ماربرگ ویروس کافی است. همچنین باقیمانده‌های ۱ تا ۵۰۵ از پلیمراز ابولا ویروس برای میانکنش با VP۳۵ ابولا ویروس کافی هستند. همه جهش یافته‌هایی که توانایی میانکنش با پلیمراز را حفظ کردند نشان دادند که باقیمانده‌های ناحیه بازی اول، ناحیه بازی مرکزی، باقیمانده‌های بازی کناری و باقیمانده‌های پوشاننده انتها برای میانکنش VP۳۵ با پلیمراز مهم نیستند. اضافه بر این نشان داده شده است که هموالیگومریزاسیون VP۳۵ ابولا ویروس از طریق انتهای آمینی برای میانکنش VP۳۵ با پلیمراز ابولا ویروس لازم است (۹ و ۱). احتمالاً میانکنش VP۳۵ با پلیمراز از

طریق انتهای آمینی VP۳۵ و با شرکت کم یا عدم شرکت انتهای کربوکسیلی همراه است. در یک بررسی نشان داده شد که ترکیباتی که شامل pyrrolidinone scaffold هستند به VP۳۵ زئیر متصل می شوند. همه ترکیبات پیرولیدینون به نزدیک پاکتی که به وسیله باقیمانده‌هایی از زیر دومین‌های مارپیچ آلفا و صفحه بتا (شامل آلانین ۲۲۱، آرژینین ۲۲۵، گلايسين ۲۴۱، لوسين ۲۴۲، لیزین ۲۴۸، لیزین ۲۵۱، پرولین ۲۹۳، ایزولوسین ۲۹۵، ایزولوسین ۲۹۷، آسپاراتات ۳۰۲، فنیل آلانین ۳۲۸) شکل گرفته است متصل می شوند. در کل حدود ۲۰ باقیمانده از IID پروتئین زئیر پاکت را می سازند. این ۲۰ باقیمانده بین زیردومین‌های مارپیچ آلفا و صفحه بتا توزیع شده‌اند (۱۰). بررسی ترکیبات متصل به VP۳۵ زئیر شامل VPL60، VPL42، GA017 نشان می دهد که باقیمانده‌های هیدروفوب حفاظت شده شامل والین ۲۴۵، ایزولوسین ۲۹۵، فنیل آلانین ۳۲۸ برای میانکنش با این ترکیبات ضروری هستند. لیزین ۲۵۱ در عمل کوفاکتوری VP۳۵ نقش دارد

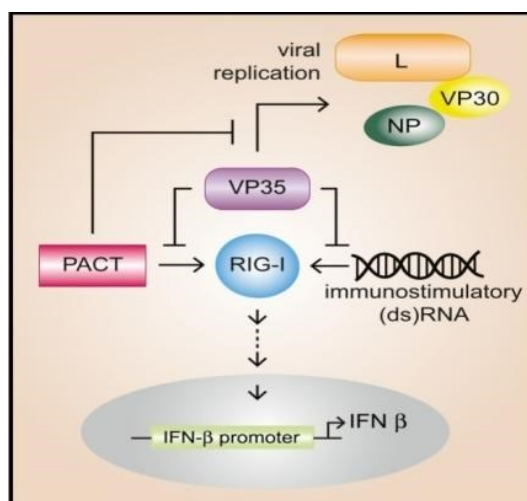
به طوری که جهش در آن موجب از دست رفتن فعالیت آن می شود (۱۱ و ۱۰). IID دارای جهش لیزین ۲۴۸ به آلانین و ایزولوسین ۲۹۵ به آلانین توانایی اتصال به این ترکیبات را ندارد. در حالی که باقیمانده‌های بیرون پاکت اتصالی اثری روی اتصال لیگاند ندارند (۱۰).

کاهش تولید اینترفرون توسط VP۳۵ از طریق میانکنش با PACT

PACT پاسخ‌های اینترفرون آلفا و بتا را به عفونت ویروسی و آر.ان.ای دو رشته‌ای افزایش می دهد. PACT این وظیفه را از طریق میانکنش با گیرنده RIG-1 انجام می دهد و باعث تحریک فعالیت ATP آزی آن و آغاز مسیر سیگنالی می شود. سلول‌هایی که فاقد PACT هستند، تولید اینترفرون در آنها کاهش می یابد (۱۲). فعال شدن RIG-1 توسط PACT به وسیله میانکنش VP۳۵ ابولاویروس با PACT مهار می شود (شکل ۳). جهش‌های ناحیه بازی مرکزی IID که مانع اتصال VP۳۵ به PACT می شوند مانع این اثر مهاری می شوند. میانکنش PACT-VP۳۵ کمپلکس

"ناظمی، پروتئین ۳۵ VP یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"

همانندسازی آر.ان.ای ویروسی را احتمالاً
از طریق اتصال به VP۳۵ دچار آسیب
می‌کند. نشان داده شده است که PACT
هر دوی پاسخ‌های ایمنی ذاتی میزبان و
همانندسازی ویروس در سلول‌های آلوده
را تنظیم می‌کند (۱۲).



شکل ۳- تاثیر متقابل VP۳۵ و PACT روی تولید اینترفرون و کمپلکس همانند سازی ویروس (۱۲)

میانکنش VP۳۵ با DRBP76 از طریق IID

VP۳۵ از طریق IID به DRBP76 که با عناوین TCP80، MPP-4، NFAR-1 یا NF90 نیز شناخته می‌شود، همراه می‌شود. این پروتئین یکی از چندین ایزوform مشتق‌شده از ژن ILF3 است. پروتئین DRBP76 با میانکنش با پروتئین‌ها و آر.ان.ای‌های ویروسی و پروتئین‌کیناز R القاشده توسط اینترفرون همانندسازی چندین ویروس را مهار می‌کند (۱۴). DRBP76 عمل پلیمراز ابولاویروس را مهار می‌کند. جهش‌یافته‌های ناحیه بازی

VP۳۵ مانع فسفریلاسیون یا فعال‌شدن فاکتور IRF-3 می‌شود (۱۳). نمونه‌های دو جهشی لیزین ۳۱۹ و آرژینین ۳۲۲ به آلانین و یا جهش آرژینین ۳۱۲ و فنیل آلانین ۲۳۹ به آلانین توانایی مهار میانکنش PACT-RIG-1 را ندارند. بنابراین توانایی VP۳۵ برای مهار فعال کردن مسیر سیگنالی RIG-1 توسط PACT به یک ناحیه بازی مرکزی و باقیمانده‌های کلاک انتهائی بی‌نقص نیاز دارد که برای اتصال به آر.ان.ای دو رشته‌ای نیز مهم هستند (۱۲).

اول (آرژنینین ۲۲۵ به آلانین، لیزین ۲۴۸ به آلانین، لیزین ۲۵۱ به آلانین) که توانایی اتصال به آر.ان.ای دو رشته را دارند، توانایی میانکنش با DRBP76 را حفظ می کنند. نمونه های دارای جهش آرژنینین ۳۱۲ به آلانین هنوز توانایی اتصال به DRBP76 را دارند. دو جهش یافته ناحیه بازی اول شامل آرژنینین ۳۲۲ به آلانین و لیزین ۳۳۹ به آلانین یا با DRBP76 همراه نمی شوند یا همراهی کمی دارند. اتصال آر.ان.ای دو رشته ای احتمالاً در این میانکنش نقش دارد. آمینواسیدهای ۵۶ تا ۳۴۰ پروتئین در غیاب آر.ان.ای دو رشته به DRBP76 متصل می شوند (۱۵).

DRBP76 همان طور که به آر.ان.ای دو رشته ای متصل می شود، به آر.ان.ای تک رشته ای با ساختار دوم و ترجیحاً به آر.ان.ای با عناصر غنی از AU متصل می شود (۱۶ و ۱۴). ساختار VP۳۵ با IID قادر به دیمریزاسیون نیست زیرا که IID خالص در محلول به صورت مونومری است. اگرچه مطالعات در محیط غیرزنده نشان می دهد که IID تترامرهایی روی آر.ان.ای دو رشته ای تشکیل می دهد (۱۷).

بنابراین ممکن است آر.ان.ای دو رشته میانکنش های IID VP۳۵ و DRBP76 را از طریق الیگومریزه شدن ارتقا دهد. با توجه به این که به طور کلی ابولاویروس در سیتوپلاسم میانکنش می کند، اینکه VP۳۵ چگونه با یک پروتئین هسته ای میانکنش می کند یک موضوع قابل توجهی است. بر اساس مدل Harashima و همکاران، پروتئین کیناز R فعال شده، DRBP76 و NFAR-2 را فسفریله می کند و این باعث رها شدن از دست NF45 در هسته و انتقال آن به سیتوپلاسم می شود (۱۴).

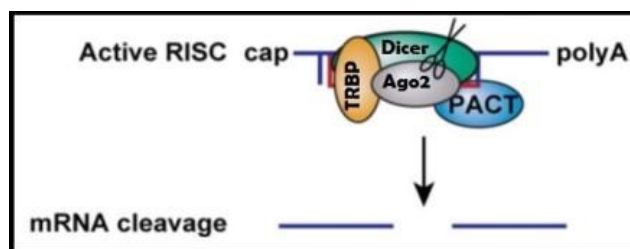
VP۳۵ به عنوان یک مهارکننده مسیر RNAi

RNAi یک مسیر تنظیم ژن با توالی ویژه است که به طور گسترده ای در میان گیاهان و پستانداران حفظ شده است و یک پاسخ طبیعی سلول به عفونت ویروسی است. اولین مرحله مکانیسمی مسیر RNAi، یک RNA از نوع سوم به نام Dicer است که آر.ان.ای دو رشته ای را به آر.ان.ای تداخل گر کوچک (siRNA) با ۱۹ تا ۲۱ نوکلئوتید در طول که ۲ باز از انتهای ۳' آن آویزان است

"ناظمی، پروتئین ۳۵ VP یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"

کمپلکس فعال شامل Dicer، Ago2، TRBP و PACT است. دو پروتئین اتصالی آر.ان.ای دو رشته‌ای هستند که به عنوان پارتنرهای Dicer یک کمپلکس با Dicer و Ago2 تشکیل می‌دهند تا شکست mRNA با واسطه siRNA را به انجام برسانند و سنتز miRNA را تسهیل کنند (شکل ۴) (۱۸ و ۱۹).

تبدیل می‌کند. کمپلکس خاموش سازی آر.ان.ای دو رشته siRNA را از هم باز می‌کند و به طور انتخابی یک رشته از دو رشته را ضمیمه می‌کند که رشته رهبر گفته می‌شود. در کمپلکس فعال رشته رهبر mRNA هدف را که به طور کامل مکمل خودش است، شناسایی می‌کند و سپس اندونوکلاز Ago2 mRNA هدف را می‌شکند.



شکل ۴- کمپلکس فعال خاموش سازی آر.ان.ای (۱۸).

خاموش سازی آر.ان.ای را کد می‌کنند (۲۰ و ۱۸). فاکتور Tat نوع یک ویروس نقص ایمنی انسان، پروتئین NS1 ویروس آنفولانزای A و E3L واکسینیاویروس نمونه‌هایی از مهارکننده‌های خاموش سازی آر.ان.ای پستانداران هستند (۲۱). VP۳۵ ابولاویروس نیز به عنوان یک مهارکننده این مسیر بر دو ویژگی اتصال به آر.ان.ای دو رشته‌ای و آنتاگونیستی اینترفرون

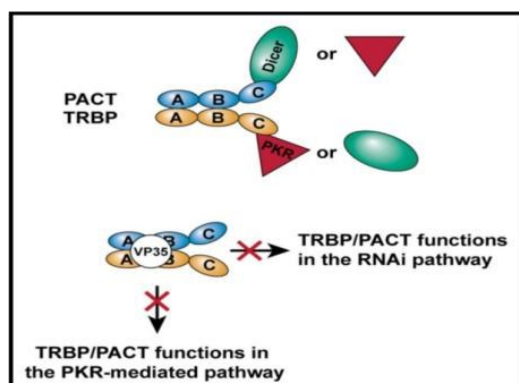
TRBP و PACT همچنین به پروتئین کیناز R متصل می‌شوند. پروتئین کیناز R فاکتور رونویسی eIF-2a را فسفریله می‌کند و موجب مهار سنتز پروتئین و فعال کردن پاسخ اینترفرون به آر.ان.ای دو رشته‌ای می‌شود. TRBP مهارکننده پروتئین کیناز R و PACT فعال کننده آن است. ویروس‌های گیاهی و حیوانی مهارکننده‌های پروتئینی

استوار است (۱۸). اگر چه ناحیه با انتهای کربوکسیلی IID تنها یک سوم VP۳۵ را تشکیل می دهد، این دومین در چندین میانکنش مهم از جمله با آر.ان.ای دو رشته ای، NP، PACT و L شرکت می کند. PACT با TRBP و Dicer، ترکیباتی از کمپلکس خاموش سازی آر.ان.ا که توسط آر.ان.ا القا می شوند، میانکنش کرده و عمل Dicer را تحریک می کند (۱۲). VP۳۵ مستقیماً با پارتنرهای Dicer یعنی TRBP و PACT بطور مستقل از siRNA و بدون اثر روی ایتترفرون میانکنش می کند. VP۳۵ از طریق میانکنش با اجزای مسیر RNAi تماس برقرار می کند. به نظر می رسد که عمل مهاری آن نیازی به اتصال siRNA ندارد (۱۸). VP۳۵ به طور فیزیکی در کمپلکس TRBP-PACT تداخل ایجاد می کند. در حقیقت VP۳۵ با پارتنرهای Dicer (TRBP و PACT) نه با Dicer میانکنش می کند. به عبارت دیگر VP۳۵ با پارتنرهای Dicer و پروتئین کیناز R میانکنش می کند. برای

درک اینکه آیا فعالیت اتصال آر.ان.ای دو رشته ای و عمل آنتاگونیستی نقش مهاری VP۳۵ را وساطت می کند یا نه هر دو جهش لیزین ۳۰۹ به آلانین و آرژینین ۳۱۲ به آلانین (R312A،K309A) مورد بررسی قرار گرفتند. همانند نوع وحشی، این جهش یافته ها نیز توانستند با ترکیبات RNAi (PACT و TRBP) میانکنش کنند و این نشان می دهد که این باقیمانده ها برای این میانکنش ها ضروری نیستند و عمل آنتاگونیستی ایتترفرون ارتباطی با عمل مهار کردن خاموش سازی آر.ان.ا ندارد. PACT و TRBP از طریق دومین های A و B مستقل از آر.ان.ای به صورت هترودایمر در می آیند و با Dicer و پروتئین کیناز R از طریق دومین C میانکنش می کنند (۱۹).

VP۳۵ به طور همزمان با PACT و TRBP تماس برقرار می کند و این میانکنش از طریق دومین A و B رخ می دهد و به طور مستقیم در اتصال Dicer و پروتئین کیناز R نقش ندارند (شکل ۵).

"ناظمی، پروتئین VP ۳۵ یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"



شکل ۵- VP۳۵ از طریق میانکشی با TRBP و PACT مسیر RNAi را خاموش می‌کند (۱۸).

eIF-2a جلوگیری می‌کند (۲۴). با توجه به اینکه جهش‌های نقطه‌ای شامل آرژینین ۳۱۲ و لیزین ۳۰۹ به آلانین که VP۳۵ را برای اتصال به آر.ان.ای دو رشته‌ای و خاصیت آنتاگونیستی اینترفرون ناتوان می‌کنند، مانع عمل مهارکنندگی این پروتئین برای مسیر shRNA-RNAi شدند، می‌توان گفت فعالیت مهار خاموش کردن به توانایی VP۳۵ برای اتصال به آر.ان.ای دو رشته‌ای بستگی دارد (۲۵). VP۳۵ ابولا می‌تواند خاموش‌سازی آر.ان.ای در گیاهان را مهار کند و این نشان می‌دهد که مهار خاموش‌سازی آر.ان.ای به‌طور مستقل از پاسخ‌های مسیر اینترفرون رخ می‌دهد. علاوه بر VP۳۵، VP۴۰ و 30VP نیز به‌طور مستقل به‌عنوان مهارکننده‌های خاموش‌سازی

VP۳۵ پروتئین‌های TRBP و PACT، تنظیم‌کننده‌های مثبت و منفی پروتئین‌کیناز R و پارتنرهای Dicer که بین مسیر تشخیصی آر.ان.ای دو رشته‌ای- پروتئین‌کیناز R و RNAi تقسیم می‌شوند را به کار می‌گیرد. VP۳۵ نه تنها روی مرحله‌ای از مسیر RNAi که PACT و TRBP شرکت دارند اثر می‌گذارد (۲۲) و (۱۹) بلکه همچنین مسیر با واسطه پروتئین‌کیناز R را نیز تنظیم می‌کند. پروتئین‌کیناز R به وسیله PACT فعال می‌شود (۲۳). VP۳۵ فعالیت پروتئین‌کیناز R، افکتور دیگر مسیر اینترفرون که توسط آر.ان.ای دو رشته‌ای فعال می‌شود را مهار می‌کند. اثر VP۳۵ روی پروتئین‌کیناز R مستقل از آر.ان.ا است و از فسفریلاسیون و غیرفعال شدن فاکتور مهم رونویسی

آر.ان.ای عمل می‌کنند. حضور سه خاموش‌کننده اهمیت ایمنی ضد ویروسی وابسته به RNAi را در عفونت ابولاویروس و همچنین اهمیت RNAi در تکامل تدریجی ویروس‌های آر.ان.ای دار نشان می‌دهد. ابولاویروس تنها ویروس پستانداران است که بیشتر از یک مهارکننده خاموش‌سازی آر.ان.ا دارد (۲۳). PACT می‌تواند در پاسخ به استرس سلولی فسفریله و فعال شود که آن را از میانکشی با TRBP باز می‌دارد و به آن اجازه می‌دهد تا به پروتئین کیناز R متصل و آن را فعال کند (۲۶). PACT پروتئین کیناز R را فعال می‌کند و VP۳۵ پروتئین کیناز R را غیرفعال می‌کند. تعیین اینکه که آیا میانکشی VP۳۵ با PACT همچنین در مهار VP۳۵-پروتئین کیناز R شرکت می‌کند یا نه موضوع جالبی است (۲۴). جهش‌های ناحیه بازی مرکزی میانکشی با PACT را مهار می‌کنند و مانع تحریک RIG-1 می‌شوند. میانکشی IID با PACT نیازی به آر.ان.ا ندارد. PACT سنتز آر.ان.ای ابولاویروس نوع وحشی را مهار می‌کند. به نظر می‌رسد که PACT

اثرات مهاری خود را از طریق میانکشی با VP۳۵ IID انجام می‌دهد. اطلاعات به دست آمده نشان می‌دهد که PACT هیچ اثری روی میانکشی VP۳۵ با NP ندارد ولی در میانکشی VP۳۵ و L اختلال به وجود می‌آورد. دومین coiled-coil واقع در ناحیه انتهای آمینی VP۳۵ نقش حیاتی در میانکشی با L دارد، VP۳۵ از طریق دومین coiled-coil خود که در ناحیه انتهای آمینی قرار دارد (آمینواسیدهای ۸۲ تا ۱۱۸) الیگومریزه می‌شود (۲۷).

VP۳۵ مانعی برای بلوغ سلول دندریتی

VP۳۵ مانع بلوغ سلول دندریتی می‌شود. VP۳۵ یک مهارکننده معمول RLR است و شروع پیام‌رسانی از گیرنده‌های RIG-1 و MDA5 که باعث القای پاسخ‌های اینترفرون می‌شوند را مهار می‌کنند. دو ویژگی ابولاویروس که احتمالاً در بیماری‌زایی نقش دارد، تداخل با مسیرهای پیام‌رسانی ایمنی ذاتی و مهار بلوغ سلول دندریتی است. هنگامی که VP ۳۵ ویروس ابولا در سلول دندریتی نابالغ موش بیان شد، VP۳۵ مانع بلوغ سلول دندریتی شد (۴). VP۳۵ مانع بیان

"ناظمی، پروتئین VP ۳۵ یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"

تحریک شده CD40، CD80، CD86 و کمپلکس MHC کلاس II می شود. VP۳۵ همچنین مانع القای سیتوکین هایی مانند اینترلوکین ۶ و ۱۲، فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا ($\text{TNF-}\alpha$)، اینترفرون آلفا و بتا می شود. این سیتوکین ها در بلوغ سلول دندریتی شرکت می کنند. VP۳۵ ابولا ویروس موجب کاهش توانایی سلول دندریتی برای تحریک فعال کردن CD4^+ سلول های T می شود. VP۳۵ فعالیت های سلول دندریتی موش که توسط یک لیپوپلی ساکارید (آگونیست گیرنده TLR4) القا می شوند، را مختل می کند. حذف انتهای آمینی VP۳۵ فعالیت آن را مختل می کند. در صورتی که اگر یک جهش در موتیف اتصال آران.ا رخ دهد، هیچ اثری ندارد (۴). احتمالاً VP۳۵ از طریق ایجاد اختلال در عملکرد سلول دندریتی و نقص در عملکرد سلول T در بیماریزایی نقش داشته باشد. ویروس ابولا ابتدا سلول های ماکروفاژ و دندریتی که مربوط به ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند را آلوده می کند. سلول دندریتی نابالغ که در تقریباً همه بافت های محیطی باقی می ماند

می تواند آنتی ژن های ویروسی را شناسایی و دنبال کند. در پاسخ به عفونت ویروسی، سلول دندریتی به سمت گره های لنفاوی می رود و بالغ می شود. ویروس ابولا در سلول دندریتی همانندسازی کرده و مانع بلوغ آن می شود (۲۸). ذرات شبیه ویروس ابولا که فقط از VP۴۰ و گلیکوپروتئین تشکیل شده اند بلوغ سلول دندریتی را تحریک می کنند و سلول های T را همانند سلول های B فعال می کنند (۲۹). VP۳۵ با بلوغ سلول دندریتی القا شده توسط ویروس و پیام رسانی گیرنده TLR تداخل ایجاد می کند و مانع فعال شدن سلول T می شود (۴). به نظر می رسد VP۳۵ با تاثیر بر خاموش سازی آران.ا و فعالیت های پروتئین کیناز R عملکرد سلول دندریتی را مختل می کند. یک جهش با جایگاه ویژه در موتیف اتصال آران.ای پروتئین VP۳۵ روی توانایی آن برای مهار بلوغ سلول دندریتی اثری نداشت. فعال شدن مسیرهای TLR منجر به بلوغ سلول دندریتی می شود (۳۰). در سلول دندریتی نابالغ VP۳۵ مانع القای CD80، CD8، IL-6، IL-12 و اینترفرون بتا توسط

لیپوپلی ساکاریدی می شود که موجب تحریک گیرنده TLR4 می شود. پیام رسانی TLR4 تعدادی از فاکتورهای رونویسی مانند IRF3 و β NF-K و AP1 را فعال می کند. بنابراین اثرات مهارری روی مولکول های سطح سلولی و سیتوکین ها نمی تواند منحصرأ مربوط به توانایی VP۳۵ برای مهار IRF3 باشد (۴).

ویژگی های VP۳۵ بیان شده در سیستم پروکاریوتی

ژن VP۳۵، دومین ژن روی ژنوم ۱۹ کیلوبازی آر.ان.ای ویروس است و ۳۵ نانومتر طول دارد. برای اولین بار در سیستم پروکاریوتی VP۳۵ نو ترکیب گونه زئیر با طول کامل بیان و تخلیص شد. نشان داده شد که VP۳۵ نو ترکیب و بیان شده در سلول های یوکاریوتی خصوصیات مشابهی دارند. VP۳۵ نو ترکیب تهیه شده در تعادل بین فرم های مونومری، دیمری و تریمری - تترامری است. VP۳۵ بیان شده در سلول های یوکاریوتی T293 کمپلکس های هموالیگومری تریمری - تترامری تشکیل می دهد و این توانایی

الیگومریزه شدن برای عمل آنتاگونیستی اینترفرونی آن لازم است. نشان داده شده است که VP۳۵ نو ترکیب بیان شده در باکتری ممکن است هموالیگومرهای همودیمر، هموتریمر و تترامر و حتی کمپلکس های پیچیده تشکیل دهد. همچنین نشان داده شده است که VP۳۵ نو ترکیب مشابه VP۳۵ بیان شده در سلول های یوکاریوتی به آر.ان.ای دو رشته ای با تمایل بیشتری نسبت به آر.ان.ای تک رشته ای متصل می شود در حالی که به DNA متصل نمی شوند (۳۱).

مقایسه توالی VP۳۵ در بین گونه های مختلف فیلو ویروس ها

پروتئین های VP۳۵ فیلو ویروس ها شباهت توالی بالایی در ناحیه IID دارند. همدیف سازی توالی اسید آمینه ای ناحیه IID ابولا و رستون ۹۷/۶ درصد تشابه عملکردی و ۸۸/۹ درصد همسانی نشان داد. همدیف سازی ابولا و ماربرگ نیز ۸۱/۷ درصد تشابه عملکردی و ۲۲/۹ درصد همسانی نشان داد (شکل ۶) (۱).

"ناظمی، پروتئین ۳۵ VP یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"



شکل ۶- هم‌ردیف‌سازی توالی IID VP۳۵ از ابولا، رستون و ماربرگ ویروس را نشان می‌دهد. رنگ سیاه به معنی حفظ شدن در سه گونه و رنگ خاکستری به معنی حفظ شدن در دو گونه است (۱).

و (۱۱). اپتامرها مولکول‌های اسید نوکلئیک انتخابی در محیط غیرزنده هستند که با میل ترکیبی بالا به گستره وسیعی از هدف‌ها متصل می‌شوند. اپتامرهایی از نوع آر.ان.ای ضد VP۳۵ در برابر IID VP۳۵ ابولا ویروس نوع جهش‌یافته و وحشی انتخاب شدند. اپتامرها با میل ترکیبی بالا و به‌طور اختصاصی به IID VP۳۵ متصل و میانکشی VP۳۵ ابولا و NP را مختل می‌کنند و به این ترتیب عملکرد کمپلکس پلیمراز را مهار می‌کنند (۱). اپتامرها می‌توانند به‌طور بالقوه عفونت ویروسی را در هر مرحله از چرخه همانندسازی ویروس مهار و پروتئین‌های ویروسی که باعث کاهش ایمنی بدن می‌شوند را مورد هدف قرار دهند. آر.ان.ای پلیمراز وابسته

هم‌ردیف‌سازی توالی آمینواسیدی VP۳۵ گونه‌های زئیر، رستون و ماربرگ نشان داد که ناحیه انتهای آمینی کاملاً واگراست. نیمه با انتهای کربوکسیلی بیشتر حفاظت شده است. حتی بعضی نواحی بین جنس ابولا و ماربرگ حفاظت کامل را نشان می‌دهند. باقیمانده‌های آرژینین ۳۰۵، آرژینین ۳۱۲، لیزین ۳۰۹ در میان همه توالی‌های شناخته شده VP۳۵ بسیار حفظ شده‌اند (۳۲).

VP۳۵ به‌عنوان یک هدف درمانی

مطالعات نشان داده است که الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس و آر.ان.ای‌های تداخلگر کوچک می‌توانند با هدف قرار دادن VP۳۵ در همانندسازی ابولا ویروس تداخل ایجاد کنند (۲۵ و ۲۴)

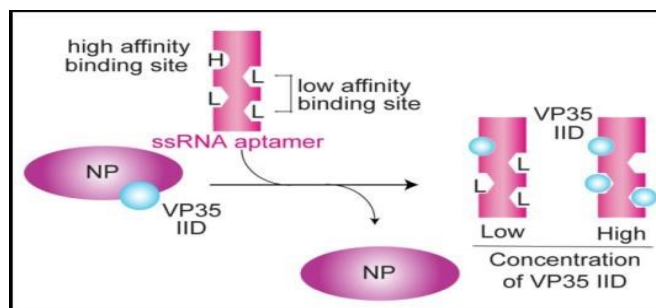
به آر.ان.ای یک هدف معمول اپتامرها است زیرا پلیمراز ویروس از آر.ان.ای به عنوان الگو در طول همانندسازی ژنوم استفاده می‌کند. آن دسته از پروتئین‌های ویروسی که به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند می‌توانند اهدافی برای اپتامرها باشند. دو اپتامر که شیوه‌های اتصال مشخصی نشان می‌دهند، انتخاب شدند. یکی از آن‌ها اپتامر 1G8-14 است که ترجیحاً به IID VP۳۵ ابولا و رستون ویروس متصل می‌شود در حالی که 2F11-14 به IID VP۳۵ ماربرگ و ابولا ویروس متصل می‌شود. جهش باقیمانده‌های تکی آرژینین ۳۰۵، فنیل آلانین ۲۳۹، لیزین ۳۰۹، آرژینین ۳۱۲، آرژینین ۳۲۲ و لیزین ۳۳۹ به آلانین اثر کمی روی اتصال اپتامر 1G8-14 داشتند در صورتی که جهش‌های دوتایی و سه تایی (لیزین ۳۰۹ / آرژینین ۳۱۲ به آلانین، لیزین ۳۱۹ / آرژینین ۳۲۲ به آلانین و ناحیه بازی مرکزی با سه جهش) به طور قابل توجهی اتصال به 1G8-14 را کاهش دادند. جهش باقیمانده‌های ناحیه بازی اول IID VP۳۵ ابولا ویروس با چهار

جهش همچنین به اتصال 1G8-14 آسیب می‌زند (۱). در مجموع این نتایج نشان می‌دهند که چندین باقیمانده در سطح IID VP۳۵ در اتصال اپتامر شرکت دارند و باقیمانده‌های ناحیه بازی مرکزی بیشترین سهم را برای اتصال اپتامر 1G8-14 دارند. برای اپتامر 2F11-14 باقیمانده‌های متفاوتی از آنهایی که در اتصال 1G8-14 نقش دارند، مشاهده شد و این باقیمانده‌ها شامل آرژینین ۲۲۵، لیزین ۲۵۱ و فنیل آلانین ۲۳۹ است که جهش آن‌ها به آلانین منجر به مقداری کاهش در اتصال اپتامر 2F11-14 می‌شود. پروتئین دارای جهش تکی آرژینین ۳۰۵ به آلانین می‌تواند به طور قابل توجهی اتصال به 2F11-14 را کاهش دهد. در مقایسه با 1G8-14، ناحیه بازی مرکزی با سه جهش IID VP۳۵ اثر تخریبی کمی روی اتصال 2F11-14 داشت. به طور ویژه باقیمانده‌ها در ناحیه بازی اول با چهار جهش برای میانکنش NP با IID VP۳۵ ابولا ویروس و فعالیت مینی ژنوم مهم هستند (۱۱). جهش چهار باقیمانده‌ای در ناحیه بازی اول IID VP۳۵ موجب از بین رفتن اتصال

"ناظمی، پروتئین VP ۳۵ یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"

زیرا به نظر می‌رسد که ناحیه بازی اول
برای اتصال 1G8-14 و 2F11-14 مهم
باشد. 1G8-14 و 2F11-14 توانستند
تشکیل کمپلکس VP ۳۵-NP را مهار کنند
(شکل ۷).

NP با VP۳۵ IID می‌شود. در مقابل
جهش باقیمانده‌های ناحیه بازی مرکزی
VP۳۵ IID آرژینین ۳۰۵ به آلانین، لیزین
۳۰۹ به آلانین و ناحیه بازی مرکزی با سه
جهش مانعی برای اتصال VP۳۵
ابولا ویروس با NP به وجود نمی‌آورند.



شکل ۷- اپتامرهای 1G8-14 و 2F11-14 با اتصال به IID مانع میانکشی VP۳۵ با NP می‌شوند (۱).

مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات به
دست آمده نشان داد که 1G8-14 و
2F11-14 می‌توانند به صورت وابسته به
غلظت نقش آنتاگونیستی برای رونویسی و
هماندسازی بازی کنند. اپتامرهای
1G8-14 و 2F11-14 به طور بالقوه
به عنوان مهارکننده‌های رقابتی کمپلکس
هماندسازی فیلوویروسی، میانکشی
VP۳۵ IID و NP را مختل می‌کنند (۱).
پروتئین‌های VP۳۵ فیلوویروسی شباهت
زیادی در IID دارند. نتایج مطالعات نشان

در حالی که اپتامرهای 2B3-10 و
2D1-10 و آر.ان.ای دو رشته‌ای نتوانستند
میانکشی NP-VP۳۵ IID را مختل کنند.
اپتامرهای 2B3-10 و 2D1-10 در برابر
ناحیه بازی مرکزی با سه جهش
VP۳۵ IID انتخاب شدند. از نظر طول
مشابه اپتامرهای 1G8-14 و 2F11-14
هستند، ولی آنها میل ترکیبی اتصال
بالایی برای VP۳۵ IID دارند. توانایی
1G8-14 و 2F11-14 برای مهار سنتز
آر.ان.ای در رونویسی و هماندسازی

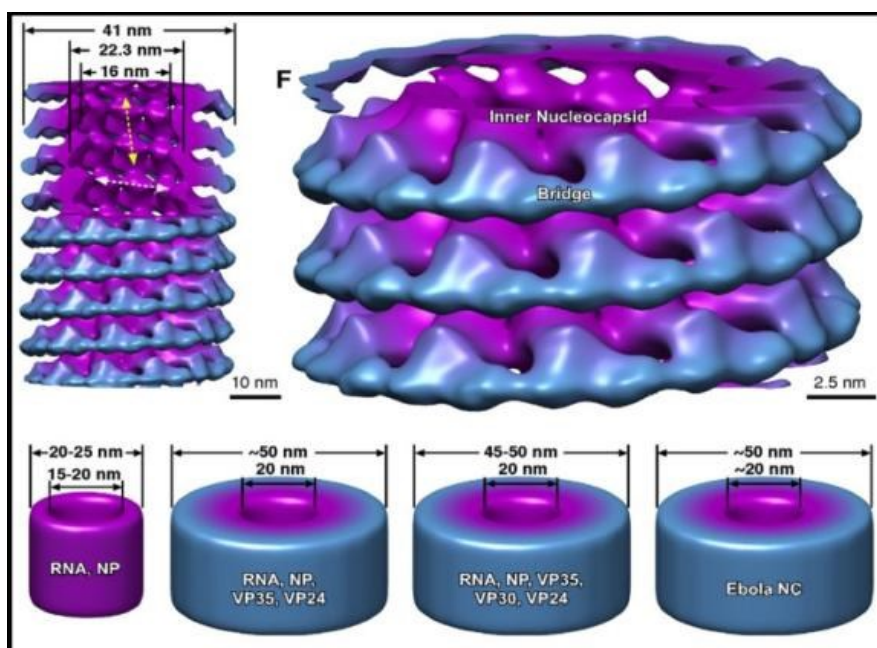
داد که اپتامر 1G8-14 ترجیحاً به VP۳۵ IID ابولا و رستون ویروس متصل می‌شود ولی اپتامر 2F11-14 به هر سه VP۳۵ IID با میل ترکیبی مشابه متصل می‌شود. علت اینکه 1G8-14 بین VP۳۵ IID ابولا و ماربرگ ویروس تفاوت قائل می‌شود، این است که توالی نزدیک ناحیه بازی مرکزی این دو پروتئین متفاوت است. در VP۳۵ IID ابولا ویروس باقیمانده‌های لیزین ۳۱۹ و آرژنین ۳۲۲ به ترتیب مطابق با ترئونین ۳۰۹ و لیزین ۳۱۲ در VP۳۵ IID ماربرگ ویروس است. بنابراین به نظر می‌رسد که حساسیت نسبی به گونه‌های فیلوویروسی متفاوت کاملاً وابسته به شرکت متفاوت ناحیه بازی است. اپتامرهای 1G8-14 و 2F11-14 به عنوان نماینده دو کلاس اپتامر که با میل ترکیبی بالا به VP۳۵ ابولا ویروس متصل می‌شوند و میانکنش NP و VP۳۵ IID ابولا ویروس را مختل می‌کنند، شناخته شده‌اند. این دو اپتامر تفاوت‌های قابل توجهی در سطح نوکلئوتیدی دارند. نشان داده شد که 1G8-14 و 2F11-14 از

طریق میانکنش با باقیمانده‌هایی از ناحیه بازی مرکزی و ناحیه بازی اول به IID VP۳۵ ابولا ویروس متصل می‌شوند (۱).

نقش VP۳۵ در تشکیل نوکلئوکسپید

VP۲۴، VP۳۵ و NP برای تشکیل نوکلئوکسپید ضروری هستند. نوکلئوکسپید ابولا یک مارپیچ دو لایه‌ای راست گرد است که قطر بیرون آن ۴۱ نانومتر و کانال درونی آن ۱۶ نانومتر ضخامت دارد (۳۳). مطالعات نشان داده است که VP۲۴ و VP۳۵ به طور مستقل با NP همراه می‌شوند اما سه پروتئین با هم برای ایجاد ساختارهای شبه نوکلئوکسپید با ضخامت حدود ۵۰ نانومتر لازم هستند (شکل ۸). وقتی VP۲۴، VP۳۵، VP۳۰ و NP با همدیگر باشند، ساختار مارپیچی نوکلئوکسپید با قطر حدود ۵۰ نانومتر تشکیل می‌دهند در صورتی که NP به تنهایی کمپلکس‌های مارپیچی NP - RNA با قطر حدود ۲۰ تا ۲۵ نانومتر تشکیل می‌دهد که حساس به نوکلئاز است (۳۴).

"ناظمی، پروتئین ۳۵ VP یک هدف درمانی موثر برای غلبه بر بیماری ابولا"

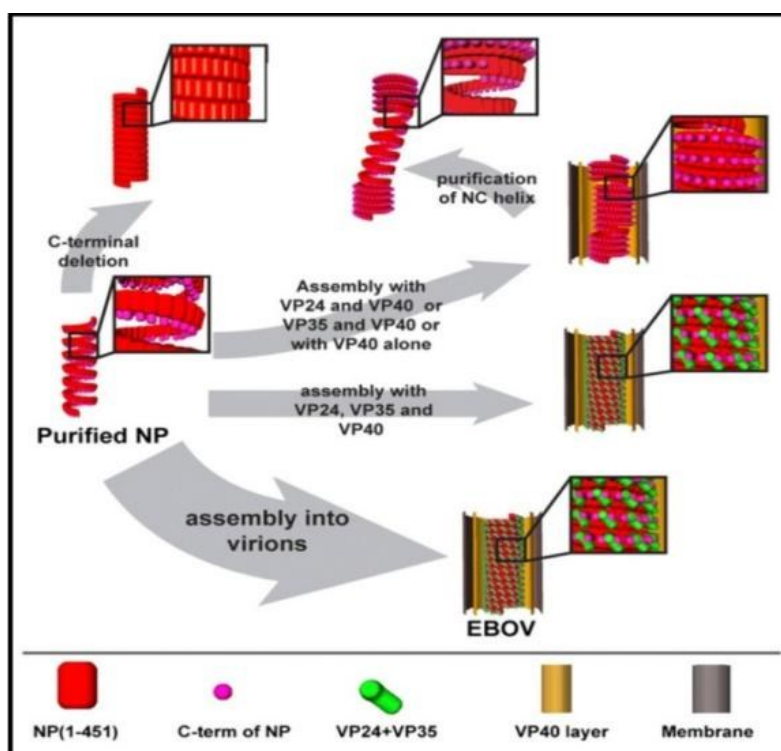


شکل ۸- نمایشی از اجزای تشکیل دهنده نوکلئوکپسید (۳۳).

آمده از نوکلئوکپسید نو ترکیب نشان می‌دهد که هر دو ترکیب NP-VP۲۴-VP۳۰-VP۳۵ و VP۳۵-VP۲۴ NP ساختارهای مارپیچی با قطر تقریباً ۵۰ نانومتر تولید می‌کنند و این نشان می‌دهد که VP۳۰ قطر نوکلئوکپسید را افزایش نمی‌دهد. اتصال NP به تنهایی به آر.ان.ا سبب سرهم شدن یک ساختار NP به سستی مارپیچ شده می‌شود. مارپیچ سست می‌تواند با اتصال VP۴۰ به انتهای کربوکسیلی NP متراکم شود و با اتصال VP۲۴ و VP۳۵ به کپی‌های متناوب NP

VP۲۴ و VP۳۵ اجزای ساختاری پلی هستند که در محیط نوکلئوکپسید قرار دارد. هر پلیمر از یک VP۲۴ و یک VP۳۵ تشکیل یافته است. در واقع هر پل از یک هترو دایمر VP۲۴ و VP۳۵ تشکیل یافته است که مولکول‌های NP مجاور را با هم به صورت عمودی نگه می‌دارند. VP۲۴ و VP۳۵ می‌توانند با همدیگر میانکنش کنند. و هر کدام نیز به طور جداگانه با یک جایگاه متفاوت روی NP برای تشکیل یک ساختار الیگومری میانکنش می‌کند (۳۳). اطلاعات به دست

محکم شود. بیان هم زمان VP۲۴ و VP۳۵ و VP۴۰ و NP برای تشکیل ذرات شبه ویروس دارای نوکلئوکپسید محکم لازم است. اتصال VP۲۴ و VP۳۵ باعث استحکام مارپیچ می شود (۳۳) (شکل ۹).



شکل ۹- مراحل سرهم شدن کپسید ویروس ابولا (۲).

References

فهرست منابع

1. Binning J.M. (2014). Iowa State University Characterization of Ebola virus VP35 first basic patch as a therapeutic target.
2. Bharat T.A., Noda T., Riches J.D., Kraehling V., Kolesnikova L., Becker S. and et al. (2012). Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(11): 4275-4280.
3. Leung D.W., Shabman R.S., Farahbakhsh M., Prins K.C., Borek D.M., Wang T. and et al. (2010). Structural and functional characterization of Reston Ebola virus VP35 interferon inhibitory domain. *J Mol Biol*. 399(3):347-57.
4. Jin H., Yan Z., Prabhakar B.S., Feng Z., Ma Y., Verpooten D. and et al. (2010). The

VP35 protein of Ebola virus impairs dendritic cell maturation induced by virus and lipopolysaccharide. 24. J Gen Virol. 91(Pt 2):352-61.

5. Leung D.W., Ginder N.D., Fulton D.B., Nix J., Basler C.F., Honzatko R.B. and et al. (2009). Structure of the Ebola VP35 interferon inhibitory domain. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 106(2):411-6.

6. Bale S., Julien J.P., Zachary A. Bornholdt, Krois A.S., Wilson I.A. and et al. (2013). Ebolavirus VP35 coats the backbone of double-stranded RNA for interferon antagonism. J. Virol. 87(18): 10385-10388

7. Prins K.C., Binning J.M., Shabman R.S., Leung D.W., Amarasinghe G.K. and Basler C.F. (2010). Basic residues within the ebolavirus VP35 protein are required for its viral polymerase cofactor function. J Virol. 84(20):10581-91.

8. Leung D.W., Prins K.C., Borek D.M., Farahbakhsh M., Tufariello J.M., Ramanan P. and et al. (2010). Structural basis for dsRNA recognition and interferon antagonism by Ebola VP35. Nat. Struct. Mol. Biol. 17(2):165-72

9. Trunschke M., Conrad D., Enterlein S., Olejnik J., Brauburger K., Mühlberger E. and et al. (2013). The L-VP35 and L-L interaction domains reside in the amino terminus of the Ebola virus L protein and are potential targets for antivirals. Virology. 441(2):135-45.

10. Brown C.S., Lee M.S., Leung D.W., Wang T., Xu W., Luthra P., Anantpadma M. and et al. (2014). In silico derived small molecules bind the filovirus VP35 protein and inhibit its polymerase cofactor activity. J Mol Biol. 426(10):2045-58.

11. Prins K.C., Binning J.M., Shabman R.S., Leung D.W., Amarasinghe G.K. and Basler C.F. (2010). Basic residues within the ebolavirus VP35 protein are required for its viral polymerase cofactor function. J Virol. 84(20):10581-91.

12. Luthra P., Ramanan P., Mire C.E., Weisend C., Tsuda Y., Yen B. and et al. (2013). Mutual antagonism between the Ebola virus VP35 protein and the RIG-I activator PACT determines infection outcome. Cell Host Microbe. 14(1):74-84.

13. Basler C.F., Mikulasova A., Martinez-Sobrido L., Paragas J., Muhlberger E., Bray M. and et al. (2003). The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. J. Virol. 77(14):7945-56.

14. Shabman R.S., Leung D.W., Johnson J., Glennon N., Gulcicek E.E., Stone K.L. and et al. (2011). DRBP76 associates with Ebola virus VP35 and suppresses viral polymerase. J Infect Dis. 204(Suppl 3): S911-S918.

15. Harashima A., Guettouche T. and Barber G.N. (2010). Phosphorylation of the NFAR proteins by the dsRNA-dependent protein kinase PKR constitutes a novel mechanism of translational regulation and cellular defense. Genes Dev. 24(23):2640-53.

16. Kuwano Y., Pullmann R.Jr., Marasa B.S., Abdelmohsen K., Lee E.K., Yang X. and et al. (2010). NF90 selectively represses the translation of target mRNAs bearing an AU-rich signature motif. Nucleic Acids Res. 38(1):225-38.

17. Leung D.W., Prins K.C., Borek D.M., Farahbakhsh M., Tufariello J.M., Ramanan P. and et al. (2010). Structural basis for dsRNA recognition and interferon antagonism by Ebola VP35. *Nat Struct Mol Biol.* 17(2):165-72.
18. Fabozzi G., Nabel C.S., Dolan M.A., and Sullivan N.J. (2011). Ebolavirus protein suppress the effects of small interfering RNA by direct interaction with the mammalian RNA interference pathway. *J. Virol.* 85(6):2512-23.
19. Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K. and et al. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 436(7051):740-4.
20. Zamore P.D. (2004). Plant RNAi: How a viral silencing suppressor inactivates siRNA. *Curr Biol.* 14(5):R198-200.
21. Li W.X., Li H., Lu R., Li F., Dus M., Atkinson P. Brydon. and et al. (2004). Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(5):1350-5.
22. Haller O., Kochs G. and Weber F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology.* 344(1):119-30.
23. Li S., Peters G.A., Ding K., Zhang X., Qin J. and Sen G.C. (2006). Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(26):10005-10.
24. Feng Z., Cerveny M., Yan Z. and He B. (2007). The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol.* 81(1):182-92.
25. Haasnoot J., de Vries W., Geutjes E.J., Prins M., de Haan P. and Berkhout B. (2007). The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog.* 3(6):e86.
26. Singh M., Castillo D., Patel C.V. and Patel R.C. (2011). Stress-induced phosphorylation of PACT reduces its interaction with TRBP and leads to PKR activation. *Biochemistry.* 50(21):4550-60.
27. Reid S.P., Cárdenas W.B. and Basler C.F. (2005). Homo-oligomerization facilitates the interferon-antagonist activity of the ebolavirus VP35 protein. *Virology.* 341(2):179-89.
28. Mahanty S., Hutchinson K., Agarwal S., McRae M., Rollin P.E. and Pulendran B. (2003). Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J Immunol.* 170(6):2797-801.
29. Warfield K.L., Olinger G., Deal E.M., Swenson D.L., Bailey M., Negley D.L. and et al. (2005). Induction of humoral and CD8⁺ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol.* 175(2):1184-91.
30. Honda K., Sakaguchi S., Nakajima C., Watanabe A., Yanai H., Matsumoto M.

and et al. (2003). Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(19):10872-7.

31. Zinzula L., Esposito F., Mühlberger E., Trunschke M., Conrad D., Piano D. and Tramontano E. (2009). Purification and functional characterization of the full length recombinant Ebola virus VP35 protein expressed in *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 66(1):113-9.

32. Hartman A.L., Towner J.S. and Nichol S.T. (2004). A C-terminal basic amino acid motif of Zaire ebolavirus VP35 is essential for type I interferon antagonism and displays high identity with the RNA-binding domain of another interferon antagonist, the NS1 protein of influenza A virus. *Virology*. 328(2):177-84.

33. Beniac D.R., Melito P.L., Devarenes S.L., Hiebert S.L., Rabb M.J., Lamboo L.L. and et al. (2012). The organisation of Ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS One*. 7(1):e29608.

34. Noda T., Hagiwara K., Sagara H. and Kawaoka Y. (2010). Characterization of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex. *J Gen Virol*. 91(Pt 6):1478-83.

35. Kimberlin C.R., Bornholdt Z.A., Li S., Woods V.L.Jr., MacRae I.J., Saphire E.O. (2010). Ebolavirus. VP35 uses a bimodal strategy to bind dsRNA for innate immune suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(1):314-9.

VP35 is an Effective Therapeutic Target to Defeat Ebola

Vahideh-Sadat Nazemi, Mohammad Reza Dayer and Seyedeh Elham Rezatofighi

- 1- Master of Science in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
- 2- Associate professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
- 3- Associate Professor of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

vahidehnazemi@gmail.com

Abstract:

The *Filoviridae* family within the order *Mononegavirales* consists of two genera, *Ebolaviruses* and *Marburgviruses*. Zaire strain of ebolavirus as one of the most lethal viruses ever isolated, with nearly a 90% fatality rate that causes severe hemorrhagic fever in humans and nonhuman primates. Of the seven proteins encoded by ebolavirus, VP24, Glycoprotein and VP35 are virulence factors. Viral protein 35 (VP35) is a multifunctional protein that functions at several stages in the viral replication cycle. VP35 is known to antagonize numerous components in the Interferon induction and signaling pathway including RLR receptors, especially RIG-1, IRF-3 and IRF-7 kinases, protein kinase R, and protein kinase R-activator (PACT) are known. VP35 also functions as an RNAi silencing suppressor, a co-factor for the viral polymerase and a structural component of the viral nucleocapsid. Therefore VP35 is required for efficient viral replication and pathogenesis. Studies revealed that there are two highly conserved basic patches termed the first basic patch (FBP) and the central basic patch (CBP) located within the C-terminal interferon inhibitory domain (IID) of VP35. Given the importance of this protein in the pathogenesis of the Ebola virus, VP35 is a potential target for antiviral development. In this regard, we describe the important parts of this protein from Structural and functional aspects.

Keywords: VP35, Ebola, Protein Kinase R, Aptamer, RNAi.