

# بررسی مولکولی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C در پاراکو ویروس انسانی تیپ یک

## چکیده

زمینه و هدف: پاراکو ویروس‌های انسانی، جزء خانواده پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند که از نظر کلینیکی حائز اهمیت هستند. اخیراً بررسی توالی ژنوم پاراکو ویروس تیپ یک نشان داده است که این ویروس، از پیکورنا ویروس‌های دیگر متفاوت بوده و فاقد موتیفی است که در فعالیت پروتئازی 2A دخالت دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C در پاراکو ویروس انسانی تیپ یک می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع بنیادی کاربردی می‌باشد. ناحیه کدکننده پروتئین 3C از cDNA (Complementary DNA) تهیه شده از ژنوم پاراکو ویروس انسانی تیپ یک، با آنزیم لیگاز در پلاسمید pUBS (Expression plasmid vector) وارد شد و پلاسمید نو ترکیب pFG3 (Plasmid Farideh Ghazi) تهیه گردید. پس از انتقال پلاسمید و تکثیر آن در باکتری E.coli MC10.22، به طریق استخراج با فنل، DNA جدا شد و سپس در سیستم پروکاریوتی (E.coli BL21) و روش درون لوله‌ای (In vitro)، تحت پروموتور T7 بیان گردید. نتایج با SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid gel electrophoresis) بررسی شد.

یافته‌ها: با بررسی محصول بیان پلاسمید نو ترکیب فاقد ژن 3C در هر دو سیستم پروکاریوتی و In vitro، فقط یک باند بزرگ در حدود ۹۰ کیلو دالتون مشاهده گردید. در صورتی که وقتی محصول بیان پلاسمید نو ترکیب حاوی 3C در هر دو سیستم توسط پلی‌آکریل آمید ژل بررسی شد، بجای یک باند بزرگ، چندین باند کوچک مشاهده شد که دلالت بر خاصیت پروتئازی پروتئین 3C می‌کند. در ضمن وقتی آنتی پروتئاز به محصول پلاسمید حاوی ژن 3C اضافه گردید، نتیجه، مشابه محصولات حاصل از بیان پلاسمید فاقد ژن 3C بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پاراکو ویروس‌های انسانی تیپ یک، از نظر فعالیت پروتئولیتیکی، متفاوت از دیگر پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند و در این ویروس‌ها، فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئازی بوده و کلیه کلیوآزهای پلی پروتئین اولیه ویروس توسط این پروتئاز انجام می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ۱- پیکورنا ویروس‌ها ۲- پاراکو ویروس‌های انسانی ۳- پروتئاز 3C ۴- بیان ژن

\*دکتر فریده قاضی I

علی‌اکبر گرزین II

دکتر محمود شمس شهرآبادی III

بهاره دبیرمنش IV

تاریخ دریافت: ۸۴/۶/۲۸، تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۵

## مقدمه

پاراکو ویروس‌های انسانی، یکی از جنسهای پیکورنا ویروس‌ها هستند که شامل دو پاتوژن پاراکو ویروس انسانی تیپ یک و دو می‌باشند.<sup>(۱-۳)</sup> این ویروس‌ها در سال ۱۹۵۶ در یک اپیدمی اسهال تابستانی، جدا شده و قبلاً به نام اکو ویروس ۲۲ و ۲۳ در گروه اینترو ویروس‌ها قرار

خانواده پیکورنا ویریده، شامل ویروس‌های بدون پوشش با ژنوم RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت می‌باشند. طول ژنوم این ویروس‌ها ۷۰۰۰-۹۵۰۰ نوکلئوتید است که در داخل کپسیدی که از ۶۰ کپی از پروتئین‌های کپسیدی VPI-VP4 (Virus capsid proteins) تشکیل شده است، قرار دارد.<sup>(۱-۳)</sup>

- I) دانشیار و دکترای (phD) بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (\*مؤلف مسئول).
- II) کارشناس ارشد ویروس‌شناسی.
- III) استاد و دکترای ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.
- IV) کارشناس ارشد بیوشیمی.

3C، مشخص شد که این پروتئین مشابه کیموتریپسین و جزء سرین پروتئازها می‌باشد.<sup>(۱۴)</sup> هدف از انجام این مطالعه، بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C در پاراکوویروس انسانی تیپ یک می‌باشد.

#### روش بررسی

cDNA ژنوم پاراکوویروس انسانی تیپ یک (سویه Harris)، توسط آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase=RT) و با استفاده از پرایمر dt17 Polymerase chain reaction) PCR) تهیه گردید و سپس توسط (plasmid Bluescript) pBS استفاده از آنزیم‌های محدود کننده که محل برش آنها در روی پرایمر تعبیه شده بود، کلون گردید.<sup>(۱۵)</sup>

برای بررسی فعالیت پروتئازی پروتئین 3C در پاراکوویروس انسانی تیپ یک (HPEV1 = Human parechovirus type 1)، سه پلاسمید (pFG1.1) (Farideh Ghazi) و pFG3 و pFG1 مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید pFG1 به طول ۵۵۰۰ جفت باز حاوی cDNA کد کننده پروتئین 2A و قسمتی از VP0، VP1 و 5' UTR (untranslated region) (ناحیه ۲۰۰-۲۷۰) از ژنوم پاراکوویروس انسانی تیپ یک می‌باشد. برای تهیه پلاسمید pFG1، بخشی از cDNA پاراکوویروس که واجد ژن 2A و VP1 بود، با آنزیم‌های محدود کننده EcoRI و Hind III بریده شد، پس از تخلیص با فنل و جدا کردن DNA، در پلاسمید pUBSVP0 (حاوی ژن 5'-UTR و قسمتی از VP0)، با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده HindIII و Smal وارد (Ligate) گردید.

پلاسمید pFG1.1 به طول ۴۸۲۸ جفت باز می‌باشد. به علت اینکه تجربیات گذشته با ویروس‌های دیگر نشان داده بود که کوتاه کردن ناحیه غیرقابل ترجمه 5'-UTR، باعث زیاد شدن سنتز پروتئین می‌شود، پلاسمید pFG1 با آنزیم BamHI هضم شد و در وکتور pUBS که با BamHI بریده شده بود،

داده شدند، اما اخیراً با تعیین توالی ژنوم و مطالعه خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی، در جنس جدیدی به نام پاراکوویروس‌های انسانی طبقه‌بندی شدند.<sup>(۱۶)</sup> این ویروس‌ها، عامل گاستروانتریت، بیماری‌های دستگاه تنفسی و بندرت عامل عفونت سیستم عصبی مرکزی می‌باشند. عفونت با این ویروس‌ها، معمولاً در سالهای اولیه زندگی و با شیوع فصلی بیش‌تر در اواخر تابستان و اوایل پاییز دیده می‌شود.<sup>(۱)</sup> اسهال، مهم‌ترین عارضه کلینیکی در عفونت‌های پاراکوویروس‌ها می‌باشد.

ترتیب ژنوم پاراکوویروس‌ها شبیه پیکورنا ویروس‌های دیگر می‌باشد، اما از نظر خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی، اختلافاتی با اعضای دیگر این خانواده دارند (عدم برش پروتئین کپسیدی VP0 به VP4 و VP2، عدم ممانعت از سنتز پروتئین سلول میزبان و مقاومت نسبت به گوانیدین هیدروکلراید).<sup>(۷-۹)</sup>

ژنوم پیکورنا ویروس‌ها، پس از آلوده نمودن سلول، در سیتوپلاسم به صورت یک پلی پروتئین بزرگ ترجمه می‌شود، سپس توسط پروتئازهای ویروسی، به پروتئین‌های ساختمانی و غیر ساختمانی می‌شکند.<sup>(۱۰ و ۱۱)</sup> این عمل کلیواژ توسط پروتئازها، برای چرخه تکثیر ویروس ضروری می‌باشد.

تاکنون سه پروتئاز در پیکورنا ویروس‌ها شناسایی شده که عبارتند از 2A، 3C و L (leader protein).<sup>(۱۰ و ۱۱)</sup> پروتئین L فقط در آفتو ویروس‌ها وجود دارد و پاراکوویروس‌ها فاقد پروتئین L می‌باشند.<sup>(۱۲ و ۱۳)</sup> در اغلب پیکورنا ویروس‌ها، کلیواژ اولیه پلی پروتئین، توسط پروتئاز 2A و بقیه کلیواژها، توسط پروتئاز 3C انجام می‌شود. در این ویروس‌ها، پروتئین 2A یک سیستمین پروتئاز شبیه تریپسین می‌باشد که برای پردازش اولیه پلی پروتئین ضروری است. در بین پیکورنا ویروس‌ها، عمل این پروتئین، متفاوت می‌باشد. در هیاتو ویروس‌ها، پروتئین 2A فاقد فعالیت پروتئازی بوده و در پردازش پلی پروتئین ویروس دخالتی ندارد و تمام کلیواژها، توسط پروتئاز 3C انجام می‌گیرد.<sup>(۱۳)</sup> با تعیین توالی اسیدهای آمینه پروتئین

(sulfur oxidizing bacteria) حاوی کلرور منیزیم و کلرور پتاسیم، به مرحله لگاریتمی رشد وارد شد (۲ تا ۳ ساعت)، سپس پلاسمیدهای نو ترکیب، در باکتری ترانسفورم شدند و توسط IPTG (Isopropyl B-D-Thiogolactoside) با غلظت ۰/۱ میلی مولار، بیان ژن القا گردید. (۲۰ و ۲۱)

از این باکتری‌ها، در زمان‌های صفر، ۱، ۲ و ۳ ساعت پس از اقیاء با IPTG، نمونه برداری صورت گرفت. سپس نمونه سانتریفوژ شد و رسوب حاصل، در بافر لیز کننده محتوی SDS به حالت سوسپانسیون در آمد و نمونه‌های لیز شده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، تا همه نمونه‌ها جمع‌آوری گردد. این پلاسمیدها در سیستم درون لوله‌ای و با استفاده از کیت In vitro Cell Free T7/SP6 Transcription Translation محصول شرکت Roche آلمان، تحت پروموتور T7 بیان شدند. (۲۲-۲۰)

پس از بیان پلاسمیدها، محصولات پروتئینی در SDS-PAGE، بررسی و مقایسه گردیدند.

پرایمرهای استفاده شده در PCR، عبارت بودند از:

Forward Primer:

5'GGTGTAAATAACGGTACCAGCTGG3'

Reverse Primer:

5'GATTTATAAACTCAGTGGTGATCATC3'

#### یافته‌ها

جهت بررسی خاصیت پروتئولیتیکی ژن 3C، پلاسمیدهای نو ترکیب بدون ژن 3C (pFG1.1 و pFG1) و واجد ژن 3C (pFG3) مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسمید pFG1 دارای بخش‌های 2C، 2A، VP1، VP0 و 5' UTR بود و ۵۵۰۰ نوکلئوتید، طول داشت. پلاسمید pFG1.1 مشابه pFG1 بود، با این تفاوت که بخش 5' UTR آن، ۶۷۲ نوکلئوتید کوتاه‌تر از pFG1 بود. این پلاسمید، ۴۸۲۸ نوکلئوتید طول داشت. پلاسمید pFG3، واجد همان بخش‌های pFG1، بعلاوه بخش کد کننده 3C و یک دنباله poly A بود. این پلاسمید ۸۰۰۰ نوکلئوتید طول داشت (شکل شماره ۱).

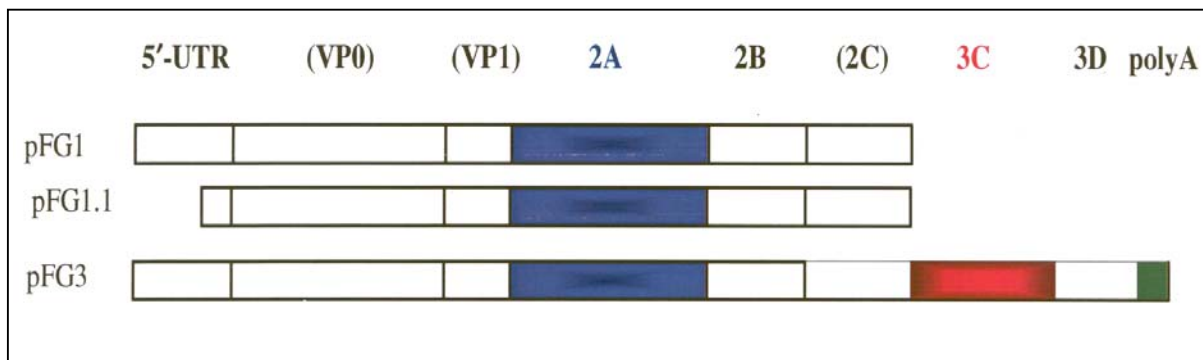
متصل (Ligate) گردید؛ در نتیجه پلاسمید pFG1.1 که به اندازه ۶۷۲ نوکلئوتید کوتاه‌تر از پلاسمید pFG1 بود، تهیه شد.

پلاسمید pFG3 به طول ۸۶۳۸ جفت‌باز، ناحیه کد کننده پروتئین 3C (۷۳۳۸-۴۲۰۰) از ژنوم پاراکوویروس تیپ یک با آنزیم PstI بریده شد و در وکتور pUBS بریده شده با همان آنزیم، وارد گردید، سپس این پلاسمید نو ترکیب و پلاسمید pFG1، جداگانه توسط آنزیم HindIII و BpmI هضم شده به هم متصل (Ligate) شدند. در نتیجه پلاسمید نو ترکیب pFG3، تهیه گردید.

برای تکثیر، این پلاسمیدها در باکتری E.coli سوش MC1022 که با کلرور کلسیم به حالت سلولهای مستعد (Competent Cells) در آورده شده بود<sup>(۱۶)</sup>، توسط شوک حرارتی، ترانسفورم گردیدند.<sup>(۱۷)</sup>

پلاسمیدهای نو ترکیب با روش فنل و کلروفرم و رسوب دادن توسط اتانول و استات سدیم ۳ مولار<sup>(۱۸)</sup> استخراج شدند و برای تأیید، پلاسمیدها توسط آنزیم‌های محدودالایر (PstI، BamHI و HindIII) هضم شده و با ژل آگارز، الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند. سپس به کمک PCR (یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و پس از ۳۰ سیکل، ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و یک جفت پرایمر تهیه شده از ژن 3C، تأیید و در نهایت تعیین توالی گردیدند. بعد از تأیید نهایی، پلاسمیدهای مورد نظر در سیستم پروکاریوتی بیان شدند.<sup>(۱۹)</sup>

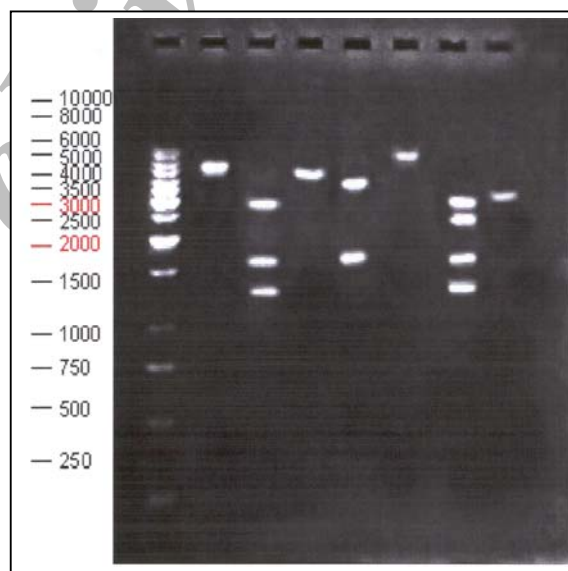
جهت بیان ژن در سیستم پروکاریوتی، از باکتری E.coli سوش BL-21(DE3) به عنوان میزبان استفاده شد. این باکتری به کمک فاژ لامبدا، لیزوژن شده است و در کروموزوم آن، ژن T7 RNA Polymerase قرار دارد. به کمک این آنزیم، از روی ژنهایی که در ابتدای آنها پروموتور T7 قرار دارد، یک mRNA، تولید شد و این mRNA، توسط میزبان به پروتئین ترجمه گردید. برای بیان ژن ابتدا باکتری در محیط SOB



**شکل شماره ۱** - پلاسمیدهای طراحی شده برای بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین 3C. نواحی نشان داده شده در پرانتز، بخشهای ناقصی از ژنهای مرتبط می‌باشند. همان گونه که در تصویر آمده است، pFG1 دارای بخشهای کاملی از 5'-UTR، 2A و 2B و بخشهای ناقصی از VP0، VP1 و 2C می‌باشد. در pFG1.1 ناحیه 5'-UTR، به میزان ۶۷۲ نوکلئوتید از pFG1 کوتاه‌تر می‌باشد. پلاسمید pFG3، واجد تمامی نواحی pFG1 به علاوه توالی‌های 3C و 3D و دنباله polyA است.

پلاسمید pFG1 با آنزیم HindIII، تنها یک باند ۵۰۰ نوکلئوتیدی، پس از هضم و کتور pUBS با آنزیم HindIII، تنها یک باند در حدود ۲۶۰۰ نوکلئوتیدی، پس از هضم پلاسمید pFG3 با آنزیم PstI، ۴ باند، پس از هضم پلاسمید pFG1.1 با آنزیم PstI، تنها ۲ باند و پس از هضم پلاسمید pFG1.1 با آنزیم BamHI نیز، ۲ باند مشاهده گردید.

پس از تکثیر پلاسمیدها و استخراج DNA آنها، برای تأیید، با آنزیم‌های محدودالایر، به طور مجزا هضم شدند و الکتروفورز گردیدند و پس از عکسبرداری، توسط Gel document مورد بررسی قرار گرفتند و اندازه هر قطعه با توجه به مارکر DNA مشخص شد. همان گونه که در شکل شماره ۲ دیده می‌شود، پس از هضم پلاسمید pFG1 با آنزیم PstI، سه باند، پس از هضم

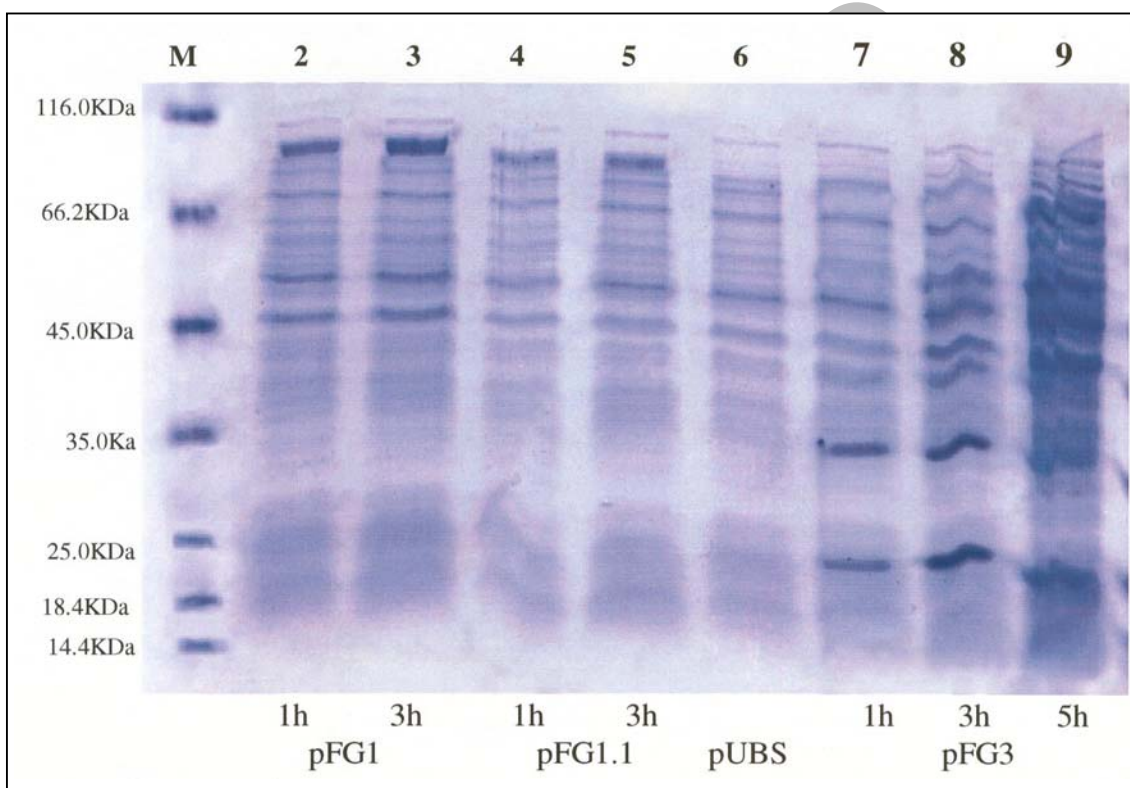


**شکل شماره ۲** - نتایج بررسی اثر آنزیم‌های محدودالایر بر روی پلاسمیدهای طراحی شده در سمت چپ مارکر 1kb و وزن مولکولی مربوط به هر باند مشخص شده است. ۱- پلاسمید pFG1 ۲- پلاسمید pFG1 برش داده شده با آنزیم PstI ۳- پلاسمید pFG1.1 ۴- پلاسمید pFG1.1 برش داده شده با آنزیم PstI ۵- پلاسمید pFG3 برش داده شده با آنزیم PstI ۶- پلاسمید pUBS (نمونه‌ها در آگارز ۰/۸٪ به مدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند).

پلاسمیدهای نوترکیب در پروکاریوت‌ها و الکتروفورز پروتئین‌ها، طرح متفاوتی مشاهده شد، بدین ترتیب که در محصولات حاصل از بیان پلاسمیدهای نوترکیب pFG1 و pFG1.1 یک باند سنگین در حدود ۹۰ کیلودالتون دیده شد؛ این باند سنگین در کنترل منفی (وکتور بیانی خالی pUBS) مشاهده نگردید، اما در محصولات حاصل از بیان پلاسمید pFG3، به جای این باند سنگین ۹۰ کیلودالتونی، چند باند سبک (بین ۲۰ تا ۴۵ کیلودالتونی) مشاهده شد (شکل شماره ۳).

همچنین پلاسمید نوترکیب pFG3 با واکنش PCR و با استفاده از یک جفت پرایمرهای تهیه شده از ژن 3C، بررسی گردید. محصول PCR، یک قطعه DNA به طول ۶۳۰ جفت باز بود. سپس پلاسمیدها برای تایید نهایی، تعیین توالی شدند. در مرحله بعد، این پلاسمیدهای نوترکیب در سیستم‌های پروکاریوتی و درون لوله‌ای (In vitro) تحت پرموتور T7، بیان گردیدند. (۲۱ و ۲۲)

همان طور که شکل شماره ۳ نشان می‌دهد، پس از بیان



**شکل شماره ۳-** نتایج بیان ژن پلاسمیدهای نوترکیب در سیستم بیانی پروکاریوتی (باکتری *E. coli* سوش BL-21 (DE3))، شکل فوق بیانگر نمونه‌های جمع‌آوری شده در ساعتهای مختلف بیان ژن پلاسمیدهای نوترکیب می‌باشد. پس از مارکر پروتئینی M در خطوط ۲ و ۳، محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید pFG1، در زمانهای یک و ۳ ساعت پس از القاء بیان ژن با IPTG قرار داده شده‌اند. در خطوط ۴ و ۵، پلاسمید pFG1.1 در زمانهای یک و ۳ ساعت، در خط ششم، وکتور خالی pUBS به عنوان شاهد منفی و در خطوط ۷ الی ۹، محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید pFG3 قرار دارند. همان طور که مشاهده می‌شود پس از القا و بیان ژن، در محصولات پروتئینی حاصل از پلاسمیدهای pFG1 و pFG1.1، در مقایسه با وکتور شاهد pUBS یک باند سنگین در حدود ۹۰ کیلودالتون دیده می‌شود (این پروتئین همان پلی‌پروتئین اولیه است که هیچ کلیواژی روی آن صورت نگرفته است). در نقطه مقابل، در محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید نوترکیب pFG3 این باند پروتئینی سنگین وزن وجود نداشته و در عوض سه باند سبک وزن ۲۰ تا ۴۰ کیلودالتونی مشاهده گردید. این موضوع، بر کلیواژ پلی‌پروتئین اولیه توسط پروتئاز ویروسی دلالت می‌کند. در سمت چپ تصویر، مارکر پروتئینی و وزن‌های مولکولی مرتبط با هر باند آمده است. (لازم به ذکر است که نمونه‌های زمان صفر «قبل از اضافه نمودن IPTG»، و ۲ ساعت پس از القاء بیان ژن، در این تصویر لحاظ نگردیده‌اند.)

پروتئولیتیکی، متفاوت از دیگر اعضای خانواده پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند و به نظر می‌رسد که در پاراکوویروس‌ها، فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئازی بوده و کلیه کلیواژهای پلی پروتئین اولیه ویروس، توسط این پروتئاز انجام می‌شوند.

پلاسمیدها در سیستم *In vitro* نیز بیان شدند و نتایج توسط SDS-PAGE، بررسی گردید. نتایج بدست آمده، با نتایج بیان ژن در سیستم پروکاریوتی یکسان بود، با این تفاوت که در سیستم *In vitro* به علت اینکه بدون سلول می‌باشد، باندها، واضح‌تر دیده می‌شدند.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پاراکوویروس‌های انسانی تیپ یک از نظر فعالیت پروتئولیتیکی متفاوت از دیگر پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند و در این ویروس‌ها فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئازی بوده و کلیه کلیواژهای پلی پروتئین اولیه ویروس، توسط این پروتئاز انجام می‌شوند.

### تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ثبت: ۳۶۴) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی آن دانشگاه، ابراز می‌دارند.

### فهرست منابع

- 1- Ruecker RR. Picornaviridae, the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 3 rd ed. New York, NY: Raven press Ltd; 1996. p. 609-54.
- 2- Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. Science 1985; 229: 1358-65.
- 3- Ghazi F, PJ Hughes, T Hyypia, G Stanway. Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). J Gen Virol 1998; 79: 2641-50.
- 4- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 22nd ed. New York: Appleton & Lange; 2001. p. 418-32.
- 5- Van Regenmortel HV, Bishop DHL, Fauquet CM. Virus taxonomy: Seventh report of ICTV. Academic press London 2000; 662-712.

### بحث

در پاراکوویروس‌ها، پروتئین  $L^{pro}$  وجود ندارد و از طرفی در تحقیقات قبلی نشان داده شده که بخش 2A نیز در این جنس، فاقد فعالیت پروتئازی می‌باشد، مثل حالتی که در هپاتوویروس‌ها مشاهده می‌شود. (۲۳ و ۲۲)

با توجه به این اطلاعات، در این مطالعه سعی شد تا خاصیت پروتئازی 3C (مهم‌ترین پروتئاز در خانواده پیکورنا ویریده) در پاراکو ویروس‌ها بررسی شود. بدین منظور، با طراحی یک پلاسمید نوترکیب واجد ژن 3C به نام pFG3 و مقایسه با دو پلاسمید بدون ژن 3C به نامهای pFG1 و pFG1.1، به بررسی خاصیت پروتئازی بخش 3C پرداخته شد. هنگامی که پلاسمیدهای بدون ژن 3C (pFG1 و pFG1.1) بیان شدند، تنها یک باند سنگین (حدود ۹۰ کیلو دالتون) در ژل SDS-PAGE مشاهده گردید؛ این باند سنگین در کنترل منفی (وکتور خالی) وجود نداشت، اما وقتی پلاسمید واجد بخش 3C یعنی pFG3 در باکتری *E.coli* و روش *In vitro* بیان گردید، دیگر باند سنگین ۹۰ کیلو دالتونی در ژل مشاهده نگردید؛ در عوض چند باند سبک (۴۰-۲۰ کیلودالتونی) مشاهده شد. همچنین این باندهای سبک در کنترل منفی (وکتور خالی) مشاهده نشدند؛ این موضوع نشان دهنده فعالیت پروتئازی قطعه 3C در ژنوم پاراکوویروس‌ها می‌باشد. برای تأیید این موضوع، به لوله حاوی پلاسمید pFG3 (واجد ژن 3C)، آنتی پروتئاز افزوده شد و نتیجه حاصل، مشابه محصولات حاصل از پلاسمید pFG1 (بدون ژن 3C) بود. یعنی فقط یک باند بزرگ ۹۰ کیلودالتونی در ژل مشاهده شد.

با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان عنوان نمود که پاراکوویروس‌های انسانی تیپ یک، از نظر فعالیت

- 6- Stanway G, Hyypia T. Parechoviruses. *J Virol* 1999; 73: 5249-54.
- 7- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalaka AM. Principles of virology. 1st ed. Washington, DC: ASM press; 2000. p. 162-94, 662-712.
- 8- Gan W, Rhoads RE. Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation. *J Biol Chem* 1996; 271: 623-6.
- 9- Petersen JF, Cherney MM, Liebig HD, Skern T, Kuechler E, James MN. The structure of the 2A proteinase from a common cold Virus: A proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *EMBO J* 1999; 18: 5463-75.
- 10- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981; 291: 547-53.
- 11- Belnap DM, Filman DJ, Trus BL. Molecular tectonic model of virus structural transitions: The putative cell entry states of poliovirus. *J Virol* 2000; 74: 1342-54.
- 12- Stanway G, N Kalkkinen, M Roivainen, F Ghazi, M Khan, M Symth, et al. Molecular and biological characteristics of echovirus 22: A representative of a new picornavirus group. *J Virol* 1994; 68: 8232-8.
- 13- Jia XY, Summers DF, Ehrenfeld E. Primary cleavage of the HAV capsid protein precursor in the middle of the proposed 2A coding region. *Virology* 1993; 193: 515-19.
- 14- Kean KM, Teterina NL, Marc D, Girard M. Analysis of putative active site residues of the poliovirus 3C protease. *Virology* 1991; 181: 609-19.
- 15- Hyypia T, C Horsnell, M Maaronen, M Khan, N Kalkkinen, P Auvinen, et al. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8847-51.
- 16- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of E.coli and other bacteria. *Methods Enzymol* 1991; 204: 63-113.
- 17- Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 1990; 96: 23-8.
- 18- Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 1981; 114: 193-7.
- 19- Sambrook KJ, Russell DW. In molecular cloning. 3rd ed. New York NY: cold spring harbor laboratory press; 2001. p. 1-31.
- 20- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* 1990; 185: 60-89.
- 21- Moffatt BA, Studier FW. Use of Bacteriophage T-7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Molecular Biology* 1986; 189(1): 113-30.
- 22- Villa-Komaroff L, Guttman N, Baltimore D, Lodishi HF. Complete translation of poliovirus RNA in a eukaryotic cell-free system. *Proc natl Acad Sci USA* 1975; 72: 4157-61.
- 23- Schultheiss T, Emerson SU, Purcell RH, Gauss-Muller V. Polyprotein processing in echovirus 22: A first assessment. *Biochem Biophys res Commun* 1995; 217: 1120-7.

## *Molecular Analysis of Proteolytic Activity of 3C Protein in Human Parechovirus Type 1*

<sup>I</sup>  
\*F. Ghazi, PhD

<sup>II</sup>  
A.A. Gorzin, MSc

<sup>III</sup>  
M.Sh. Shahrabadi, PhD

<sup>IV</sup>  
B. Dabirmanesh, MSc

### *Abstract*

**Background & Aim:** Human parechovirus is a genus of picornaviruses which includes a number of important viruses of clinical significance. Recent sequence analysis suggests that human parechovirus type 1 (HPEV-1) is distinct from other picornaviruses and lacks the motives believed to be involved in the protease function of 2A. The aim of this study was to analyse proteolytic activity of 3C protein in human parechovirus type 1.

**Materials and Method:** The region of HPEV-1 cDNA that was coded for 3C protein was inserted into plasmid pUBS by Ligase enzyme and pFG3 recombinant plasmid was prepared. After transformation and replication of this plasmid in E.coli MC 10.22, DNA was isolated by phenol extraction and then expressed in prokaryotic (E.coli BL-21) and in vitro systems under T7 promoter. The results were detected by SDS-PAGE and analyzed.

**Results:** The products of expression of recombinant plasmid (not included 3C gene) in both prokaryotic and in vitro systems were analyzed. Just one large band (90 KD) was observed, but with plasmid including 3C gene, several small bands were detected. These results indicated proteolytic activity of 3C protein. After addition of anti protease to the products of plasmid with 3C gene the result was the same as the plasmid without 3C gene.

**Conclusion:** The results showed that HPEV-1 has a processing strategy different from other members of picornaviruses, and 3C protein seems to be the only virus encoded protease that can catalyze cleavages of all sites in the parechoviruses primery polyprotein.

**Key Words:** 1) Picornaviruses 2) Human Parechoviruses 3) 3C Protease 4) Gene Expression

<sup>I</sup>) Associate Professor, PhD Molecular biology, Medical College, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (\*Corresponding Author)

<sup>II</sup>) MSc Virology.

<sup>III</sup>) Professor, PhD in Virology, Medical College, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

<sup>IV</sup>) MSc Biochemistry.