نقش ژن نورآمینیداز در بیولوژی ویروس آنفلوانزا

۱.مسعود سلطانی الوار* ۲. ساجده حسن زاده ۳.محمد فلاح گرجی ۴بهادر بردشیری

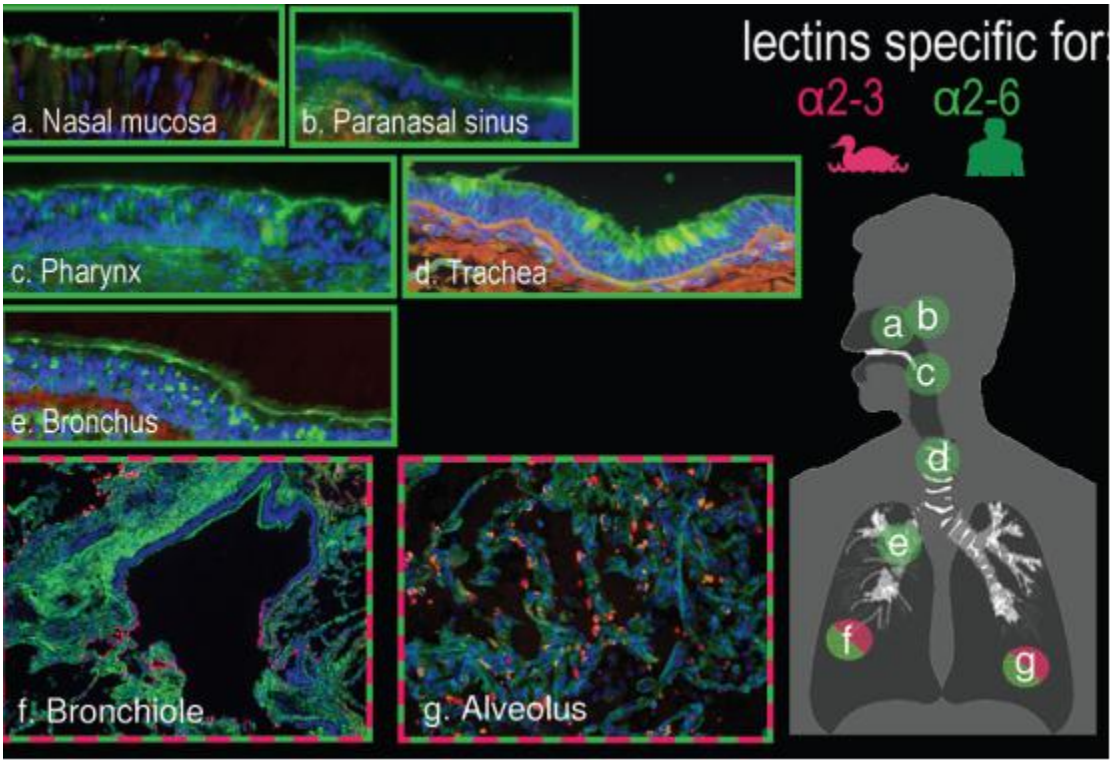
چکیده:

نور آمینیداز جز گلیکوپروتئین های کلاس II است که انتهای آمینی آن در داخل ویریون و انتهای کربوکسیل آن در خارج قرار دارد. این گیلکوپروتئین توسط قطعه شش RNA کد می شود. این ژن حدود ۱۴۱۳ نوکلئوتید طول دارد و پروتئین حاصل از آن از ۴۵۳ آمینواسید تشکیل شده است. عموما به ازای هر یک ملکول نورآمینیداز (NA) در سطح ویروس پنج مولکول هماگلوتینین (HA)قرار دارد اما این نسبت بین تحت تیپ های ویروس متفاوت است نورآمینیداز (NA) دومین گلیکوپروتئین مهم در ویروس های آنفلوانزای نوع A,B می باشد یازده تحت تیپ NA در ویروس های آنفلوانزای نوع A وجود دارد که برحسب مقایسه سکانس در دو گروه قرار دارد. هیچ تحت تیپی در ویروس های آنفلوانزای نوع B شناخته نشده که این احتمالا به دلیل نداشتن میزبان مخزن در بین حیوانات است. نورآمینیداز ۵ تا ۱۰ درصد کل پروتئین ویروس را شامل می شود و نقش مهمی در بیولوژی ویروس آنفلوانزا دارد لذا در این مقاله سعی شده است که به اهمیت و نقش این پروتیئن پرداخته شود

کلیدواژه:آنفولانزا، نورآمینیداز، بیولوژی

مقدمه :

اولین شواهد حضور آنزیم نورآمینیداز در ویروس آنفلوانزا بوسیله هرست در سال ۱۹۴۲ کشف شد. او گلبول های قرمز را با ویروس آنفلوانزا در گرمخانه (incubation) مجاور کرد و مشاهده نمود که واکنش هماگلوتیناسیون پس از مدتی از بین می رود (۵). در این آزمایش ساده یکی از دو گلیکوپروتئین سطحی ویروس آنفلوانزا یعنی هماگلوتینین بوسیله گلیکوکونژوگه های حاوی اسید سالیک موجود در سطح گلبول قرمز به آن متصل می شود و گلیکوپروتئین دیگر یعنی نورآمینیداز به صورت اختصاصی اسید سیالیک را از گلیکوکونژکه ها آزاد می کند. نورآمینیداز خار گلیکوپروتئینی روی ذره ویروسی به صورت یک تترامر می باشد که از چهار منومر یکسان تشکیل شده است نورآمینیداز ویروس های آنفلوانزای نوع A دارای یک دم داخل سیتوپلاسمی بسیارمحافظت شد و یک ناحیه آب گریز داخل غشایی است که بعنوان لنگری برای قسمت های خارج غشایی ،ساقه (stalk) سر (Head) عمل می کند.نورآمینیداز یک پروتئین قارچی شکل است که از چهار تحت واحد مشابه تشکیل شده است (۲). این پروتئین یک سر جعبه مانند به ابعاد ۱۰۰×۱۰۰×۶۰ A دارد که روی یک ساقه نازک قرار گرفته است. وزن مولکولی هر یک از مونومرهای مولکولهای نورآمینیداز ۶۸-۵۸ کیلودلتن است. چهار مونومر مولکول نورآمینیداز بوسیله پیوندهای دی سولفید به هم متصل شده و تشکیل تترامر می دهند (۸). این تحت واحدها کروی بوده و با تقارن دایره ای چیده شده اند شکل (۱-۶) ساختار هر یک از ساختار چین خورده پروتئین نورآمینیداز سبب شده است که تعداد نسبتا زیادی از آمینواسیدهای باردار از نظر شکل فضایی در کنار هم قرار بگیرند و این آمینواسید ها در تمام سویه های ویروس آنفلوانزا تیپ A,B مشابه اند. این آمینواسیدها دیواره ها و اطراف یک حفره یا شیار عمیق رادر سطح پروتئین تشکیل می دهند که محل اتصال و قرار گرفتن اسید سیالیک و آنالوگ های آن است و محل فعال آنزیمی پروتئین نورآمینیداز به شمار می رود.



شکل (۱-۷) چهار مونومر مولکول نورآمینیداز که بوسیله پیوندهای دی سولفید به هم متصل شده اند

.این جایگاه در مولکول نورآمینیداز در موقعیت های ۱۱۸ Arg ، Glu۱۱۹ ، Asp۱۵۱ ، Asp۱۹۸ ، Arg۲۲۴ ، Glu۲۲۷ ، Arg۲۹۲ ، Asp۳۳۰ ، lys۳۵۰ ، Glu۴۲۵می باشد و جایگاه های نزدیک و دخیل در جایگاه فعال عبارتند ازleu۱۳۴: ..try۱۲۱ (۳).در محل فعال آنزیمی

شبکه ای متشکل از سه اسید آمینه آرژنین در موقعیت های ۳۷۱،۲۹۲،۱۱۸ وجود دارد که گروه کربوکسیلات اسید سیالیک متصل شده را احاطه کرده ودر ایجاد حالت (قایق) جایگاه فعال آنزیمی در زمان اتصال به اسید سیالیک نقش دارد و این حالت برای فعالیت کاتالیزوری ضروری است (۳).الگوی جایگاه های گلیکوزیلاسیون در مولکول های مختلف نورآمینیداز مشابه بوده است و عبارت است از N-X-T/S که X هر اسید آمینه ای به جز پرولین می تواند باشد این جایگاه عبارت است از آسپارژین در جایگاه های ۴۰۲،۲۳۴،۲۰۰،۱۴۶،۶۹،۶۱ تنها تفاوت بین ویروس های H۹N۲ انسان و پرندگان و ویروس های H۳N۲ انسان وجود جایگاه گلیکوزیلاسیون اضافی در جایگاه آسپارژین ۳۲۹ در ویروس های انسانی است (۹).

۱-۲-۳-۱عملکرد آنزیم نور آمینیداز:

مطالعات انجام شده روی ساختار مولکول نورآمینیداز در ویروس های آنفلوانزای تیپ A,B نشان داده است که شکل کلی چین خوردگی پروتئین نورآمینیداز در تحت تیپ های مختلف یکسان است اگر چه مواردی از حذف واضافه شدن آمینواسیدها یامحل های گلیکوزیلاسیون در مولکول نورآمینیداز در تحت تیپ های مختلف دیده می شود (۳).قسمت ساقه به طور معمول از حدود ۵۰ آمینواسید تشکیل شده است که حدودا از جایگاه آمینواسیدی ۴۰ از انتهای N پروتئین شروع می شود . ساقه نورآمینیداز حداقل یک جایگاه آمینواسیدی سیستین (پیوند دی سولفید) دارد .نورآمینیداز ویروس آنفلوانزا بوسیله یک دامین هیدروفوبیک سیگنالی – لنگری به طول ۲۹ اسید آمینه در انتهای آمینی به غشای دو لایه لیپیدی متصل می شود جالب اینکه اغلب گلیکوپروتئین های غشای ویروسی وسلولی از انتهای کربوکسیل خود به غشا متصل می گردند (۱). به نظر می رسد خاصیت هیدروفوبی این ناحیه از توالی آن در القای نقش خاصی که دارد مهمتر است. با این حال تعداد جایگاه آمینواسیدی در این ناحیه که بلافاصله بعد از ناحیه دم سیتوپلاسمیک قرار دارندنسبتا حافظت شده است (۳).

گلیکوپروتئین نورآمینیداز اسیدسیالیک را از گیرنده های سطحی سلول میزبان و هماگلوتینین بارزشده در سطح ویروس ها یا سطح سلول های آلوده برمی دارد (۱۴). هنگامی که عملکرد نورآمینیداز بوسیله آنتی بادی های مهار کننده مختل شود و یا هنگام کشت ویروس های موتانت فاقد نورآمینیداز که به صورت کامل یا ناقص فعالیت نورآمینیداز خود را از دست داده باشند مشاهده می شودکه ذرات ویروسی به همدیگر یا به سطح سلول می چسبند و با اضافه کردن نورآمینیداز اگزوژن به محیط کشت در این شرایط از شکل گیری تجمع ویروسی ذکر شده ممانعت می شود. بنابراین به نظر می رسد که عمل اصلی نورآمینیداز در ویروس آنفلوانزا ممانعت از تجمع ویروس ها با جدا کردن اسید سیالیک از سطح ویروس و کمک به رها کردن ویروس ها از سلول آلوده با جدا کردن اسیدسیالیک از هماگلوتینین ویروس در سطح سلول است (۱۲). از آنجای که مهارنورآمینیداز منجر به تاخیر در آزاد شدن ویروس های تولید شده از سطح سلول آلوده می شود میزان ویروس کاهش یافته،و سیستم ایمنی فرصت کافی برای حذف ویروس خواهد داشت . به همین دلیل نورآمینیداز گزینه خوبی برای طراحی داروهای ضد آنفلوانزا است (۱۴). اگر چه برخی مطالعات نقش نورآمینیداز را صرفا محدود به رهاسازی ذرات ویروس از سطح سلول های میزبان یا تجمع های ویروسی می دانند. مطالعات دیگر نقش های دیگری برای نورآمینیداز درچرخه عفونت و فرآیند مونتاژ ویروس قائل هستند (۱۲). به نظر می رسد نورآمینیداز در نفوذ ویروس آنفلوانزا در ترشحات مخاطی (موسین) مملو از اسید سیالیک نقش داشته باشد و به ویروس کمک می کند تا از اپیتلیوم تنفسی عبور کرده و به سلول های هدف برسد (۴).شواهد مختلفی از دخیل بودن نورآمینیداز در القا آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی وجود دارد چرا که نورآمینیداز باعث فعال شدن TGF-βمی شود که یک القا کننده مرگ سلولی در سلول های پوششی است و از طرفی ترکیبات ضد نورآمینیداز بطور نسبی باعث از بین رفتن آپوپتوزیس در سلول های MDCK آلوده به ویروس آنفلوانزا بدون تاثیر روی تعداد سلول های آلوده می شود (۱۱).عملکرد دیگر پروتئین نورآمینیداز وجود فعالیت هماددسوربشن در آن است در واقع گلیکوپروتئین نورآمینیداز (NA) دارای سه جایگاه هماددسوربشن (HB)است که در جایگاه های ۳۷۳-۳۶۶،۴۰۴- ۴۳۳،۳۹۹-۴۳۱ قرار دارد مهار فعالیت نورآمینیداز با آنالوگ اسید سیالیک و برخی از آنتی بادی ها اثری روی فعالیت (HB) آن نداشته اند (۱۰).نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که احتمالا جایگاه هماددسوربشن در پروتئین نورآمینیداز در جایگاهی متفاوت نسبت به جایگاه های فعال آنزیمی قرار دارد (۳).تحت تیپ های

دارای فعالیت HB قادرند گلبول های قرمز ماکیان و انسان رادر دمای ۴ درجه سانتی گراد آگلوتینه کنند (۷). اگر چه در مورد تحت تیپ N۹ فعالیت HB در محلول PBS تا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد دوام می یابد. خاصیت HB در اغلب تحت تیپ های نورآمینیداز ویروس های آنفلوانزای پرندگان آبزی و اسب دیده می شود اما در ویروس های آنفلوانزای جدا شده از انسان و خوک اغلب مقادیر ضعیفی از خاصیت HB دیده می شود که حاکی از تغییر در توالی آمینواسید های مرتبط با این خاصیت در این ویروس ها است (۱۳). با توجه به وجود خاصیت HB در اغلب ویروس های آنفلوانزای طیور و اسب ممکن است این خاصیت نقش بیولوژیک مهمی در تکثیر و دوام ویروس در این میزبان ها داشته باشد.از طرف دیگر ممکن است که محل HB در ساختار مولکول نورآمینیداز در میزبان جدید انسان در این ویروس تغییر کرده باشد به طوری که توانایی ارتباط ویروس با یک مولکول متفاوت را در میزبان جدید فراهم کرده باشد و این توانایی اتصال به مولکول جدید دیگر با آزمایش اتصال به R.B.C جوجه ها قابل تشخیص نباشد. . بس و همکاران نشان دادند که انتهای آمینی هیدروفوبیک بین غشایی پروتئین نورآمینیداز علاوه بر نقشی که در اتصال کل مولکول به غشای ویروس و سلول دارد (نقش لنگر) بعنوان یک سیگنال عمل کرده و قادر است پروتئین هماگلوتینین فاقد سیگنال را به شبکه آندپلاسمیک خشن منتقل کند از این رو ناحیه هیدروفوبیک انتهای آمینی را دامین سیگنالی – لنگری می نامند (۱).اهمیت ناحیه دم سیتوپلاسمی می تواند در ارتباط سلول میزبان واجزای ویروس ونهایتا مونتاژ ویروس باشد. از آنجای که عملکرد نورآمینیداز در ویروس های آنفلوانزای نوع A,B مشابه است و جایگاه های فعال موثر در این عملکرد بسیار محافظت شده است امکان تاثیر ممانعت کننده های نورآمینیداز در حد وسیع وجود دارد نورآمینیداز مثل هماگلوتینین یک مولکول آنتی ژنتیک است ودارای سویه های متعدد در طبیعت می باشد . معمولا آنتی بادی هایی که بر علیه نورآمینیداز تولید می شود خنثی کننده نیستند ولی مشخص شده ایمنی زایی با نورآمینیداز یک روش حد واسط است که امکان آلودگی را فراهم می کند ولی باعث کاهش بیماری می شود .شواهد مختلفی از دخیل بودن نورآمینیداز در القا آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی وجود دارد چرا که نورآمینیداز باعث فعال شدن TGF-β می شود که یک القا کننده مرگ سلولی در سلول های پوششی است و از طرفی ترکیبات ضد نورآمینیداز بطور نسبی باعث از بین رفتن آپوپتوزیس در سلول های MDCK آلوده به ویروس آنفلوانزا بدون تاثیر روی تعداد سلول های آلوده می شود (۱۱).عملکرد دیگر پروتئین نورآمینیداز وجود فعالیت هما دسوربشن در آن است در

واقع گلیکوپروتئین نورآمینیداز (NA) دارای سه جایگاه همادسوربشن (HB) است که در جایگاه های ۳۷۳-۴۰۴،۳۶۶-۴۳۳،۳۹۹-۴۳۱ قرار دارد مهار فعالیت نورآمینیداز با آنالوگ اسید سیالیک و برخی از آنتی بادی ها اثری روی فعالیت (HB) آن نداشته اند (۱۰).نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که احتمالا جایگاه همادسوربشن در پروتئین نورآمینیداز در جایگاهی متفاوت نسبت به جایگاه های فعال آنزیمی قرار دارد (۳).تحت تیپ های دارای فعالیت HB قادرند گلبول های قرمز ماکیان و انسان رادر دمای ۴ درجه سانتی گراد آگلوتینه کنند (۷) اگر چه در مورد تحت تیپ N۹ فعالیت HB در محلول PBS تا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد دوام می یابد. خاصیت HB در اغلب تحت تیپ های نورآمینیداز ویروس های آنفلوانزای پرندگان آبزی و اسب دیده می شود اما در ویروس های آنفلوانزای جدا شده از انسان و خوک اغلب مقادیر ضعیفی از خاصیت HB دیده می شود که حاکی از تغییر در توالی آمینواسید های مرتبط با این خاصیت در این ویروس ها است (۱۳). با توجه به وجود خاصیت HBدر اغلب ویروس های آنفلوانزای طیور و اسب ممکن است این خاصیت نقش بیولوژیک مهمی در تکثیر و دوام ویروس در این میزبان ها داشته باشد.از طرف دیگر ممکن است که محل HB در ساختار مولکول نورآمینیداز در میزبان جدید انسان در این ویروس تغییر کرده باشد به طوری که توانایی ارتباط ویروس با یک مولکول متفاوت را در میزبان جدید فراهم کرده باشد و این توانایی اتصال به مولکول جدید دیگر با آزمایش اتصال به R.B.C جوجه ها قابل تشخیص نباشد.

۱. Bos TJ., Davis, AR. and Nayak, DP, (۱۹۸٤), NH۲- terminal hydrophobic region of influenza virus neuraminidase provides the signal function in translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry, ۸۱: ۲۳۲۷-۲۳۳۱.

۲. Capua, D. and Alexander, D.J, (۲۰۰٤), Avian Influenza: Recent development. Avian Pathology, ۳۳(٤), Cameron, K٤o٤.

۳. Colman, PM, (۱۹۹٤), Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies, and inhibitors. Protein Sci. ۳:۱٦۸۷-۱٦۹٦.

٤. Govorkova, EA., Murti, G., Meignier, B., Detaisne, C. and Webster, RG, (۱۹۹٦), African green monkey kidney (Vero) cells provide on alternative host cell system for influenza A and influenza B viruses. J. Viruses. J. Virol. ۷۰: ٥٥۱۹-٥٥۲٤.

٥. Hirst, M., Astell, CR., Griffith, M., Coughlin SM., Moksa, M., Zeng, T., Smailus, DE., Holt, RA., Jones, S., Marra, MA., Petric, M., Krajden, M., Lawrence, D., Mak, A., Chow, R., Skowronski, DM., Tweed, SA., Goh, S., Brunham, RC., Robinson, J., Bowes, V., Sojonky, K., Byrne, SK., Li, Y., Kobasa, D., Booth, T. and Paetzel, M, ۲۰۰٤, Novel avian influenza H۷N۳ strain outbreak, British Columbia. Emerg. Infect. Dis. ۱۰: ۲۱۹۲-۲۱۹٥.

٦. Knipe, DM. and Howely, PM, (۲۰۰۷), Orthomyxoviridea in Fields Virology. Lippincott Williams and Wilkins. ۱٦٤۷-۱٦۹۱

۷. Kobasa, D., Rodgers ME., Wells, K. and Kawaoka, Y., (۱۹۹۷), Neuraminidase Hemadsorption Activity, Conserved in Avian Influenza A Viruses, Does Not Influence Viral Replication in Ducks. J. Virol. ۷۱(۹): ٦۷۰٦-٦۷۱۳

۸. Lambre, CR., Terzidis, H., Greffard, A. and Webster, RG, (۱۹۹۰), Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. J. Immunol. Meth. ۱۳٥: ٤۹–٥۷.

۹. Liu, J., Okazaki, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Wu, Q., Chen, F. and Kida, H, (۲۰۰۳), H۹N۲ influenza viruses prevalent in poultry in China are phylogenetically distinct from A/quail/Hong Kong/Gl/۹۷presumed to be doner of the internal protein genes of the H٥N۱ HongKong/۹۷ virus. Avian Pathology. ۳٥: ٥٥۱-٥٦۰

۱۰. Matrosovich, MN., Krauss, S. and Webster, RG, (۲۰۰۱), H۹N۲ influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-liKe receptor specificity. Virology, ۲۸۱: ۱۵٦-۱٦۲.

۱۱. Mohsin, MA., Morris, H. and Sweet, C, (۲۰۰۲), Correlation between levels of apoptosis. levels of infection and haemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: Dose the viral neuraminidase have a role in these associations. Virus Research, ۸۵: ۱۲۳-۱۳۱.

۱۲. Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. and Compans, RW, (۱۹۷٤), Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virol. ٦۱: ۳۹۷-٤۱۰.

۱۳. Vorghese, JN., Colman, PM., Donkellar, AV., Blick, TJ., Sahasrabudhe, A. and Mckimm-breschkin J.L, (۱۹۹۷), Structual evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. Proc. Natl. Acod. Sci. ۹٤: ۱۱۸۰۸-۱۱۸۱۲.

۱٤. Wei, DQ., Du, QS., Sun II. and Chou, C, (۲۰۰٦), Insights from modeling the ۳D Structure of H۵N۱ influenza virus neuraminidase and its binding interactions with ligands. Biochem. Biophys. Res. Comm. ۳٤٤: ۱۰٤۳-۱۰۵۵