

مقایسه برهم‌کنش‌های ریبوزوم 40S انسانی و حیوانات ناقل با پروتئین NSP1 ویروس SARS-CoV-2

آفاق باپیرزاده^۱، میترا صالحی^۱، زرین مینوچهر^۲ و بیژن بمبئی^{۲*}

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

^۲ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

چکیده

پروتئین NSP1 پروتئین تولید شده در ویروس SARS-CoV-2، عامل بیماری کرونا، میباشد که جایگاه آن در ابتدای ژن شماره ۱ یک از انتهای ۵' ژنوم ویروس است. اتصالات NSP1 با زیرواحدهای 40S ریبوزوم‌های انسانی، نقش احتمالی این پروتئین در مهار فرآیند ترجمه mRNA سلولهای میزبان را توجیه می‌کند. با هدف آشکار کردن دلایل مولکولی عدم بیماریزایی این ویروس در حیوانات ناقل، ابزارهای بیوانفورماتیکی و ساختار کمپلکس NSP1 با زیرواحدهای 40S ریبوزومی در فایل 7k5I از بانک اطلاعات پروتئین (PDB)، برهمکنش‌ها و پیوندهای داخلی این زیرواحد هادرحالت طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین NSP1 در سلولهای میزبان بطور عمده به زیرواحد 18SrRNA ریبوزومی و یکی از پروتئین‌های ریبوزومی اتصال برقرار میکند. اتصالاتی که در موقعیت نوکلئوتیدهای A⁶⁰⁵ و G^{600,601} میباشد با تداخل در شکل‌گیری پیوند‌های داخلی و همچنین ایجاد ممانعت فضایی در برقراری تعداد دیگری از اتصالات درون-ریبوزومی، عامل بسیار مهمی در مهار عملکرد ریبوزوم‌ها فراهم می‌آورند. علاوه بر NSP1، 18SrRNA، در این کمپلکس با سه پروتئین ریبوزومی دیگر به نام‌های S2, S3, S30 نیز برهمکنش‌هایی را برقرار می‌کند. مقایسه توالی‌های این مولکول‌ها بین انسان و چند پستاندار دیگر و موجودات ناقل مانند شتر و مورچه خوار نشان داد که مثلاً پروتئین S2 شتر از نظر تکاملی به مورچه خوار شبیه‌تر است در حالیکه از نظر عمومی شتر قرابت ژنتیکی بیشتری با انسان یا گاو دارد. این یافته‌های کلیدی تایید کننده‌ی نقش پروتئین NSP1 به عنوان یکی از عوامل اصلی مهار ترجمه توسط ریبوزوم‌ها در سلولهای میزبان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: SARS-CoV-2، NSP1، Bioinformatics، 40s ribosomal subunits، Bats، Manis

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Bambai2biotech@gmail.com

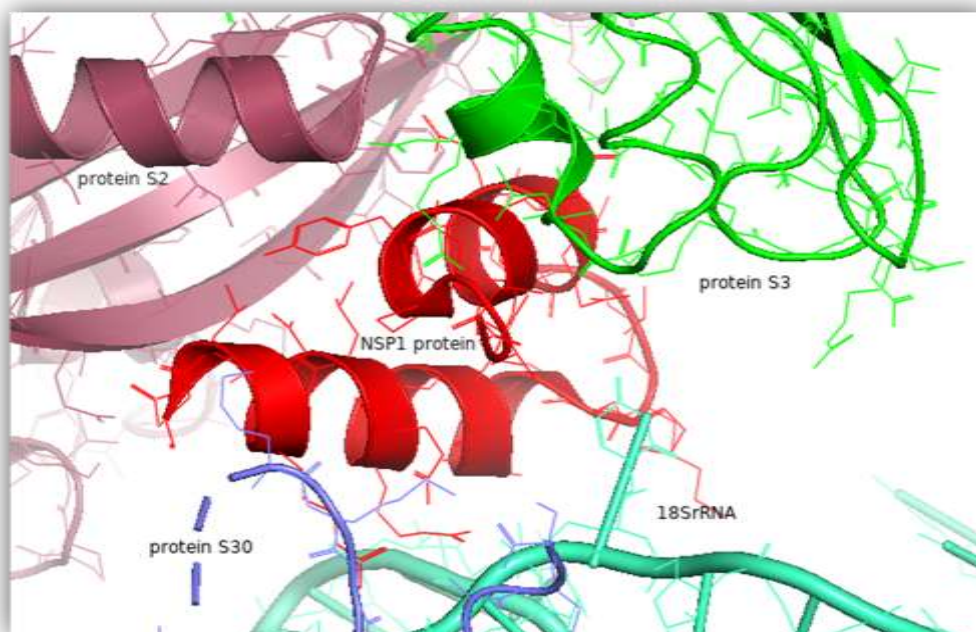
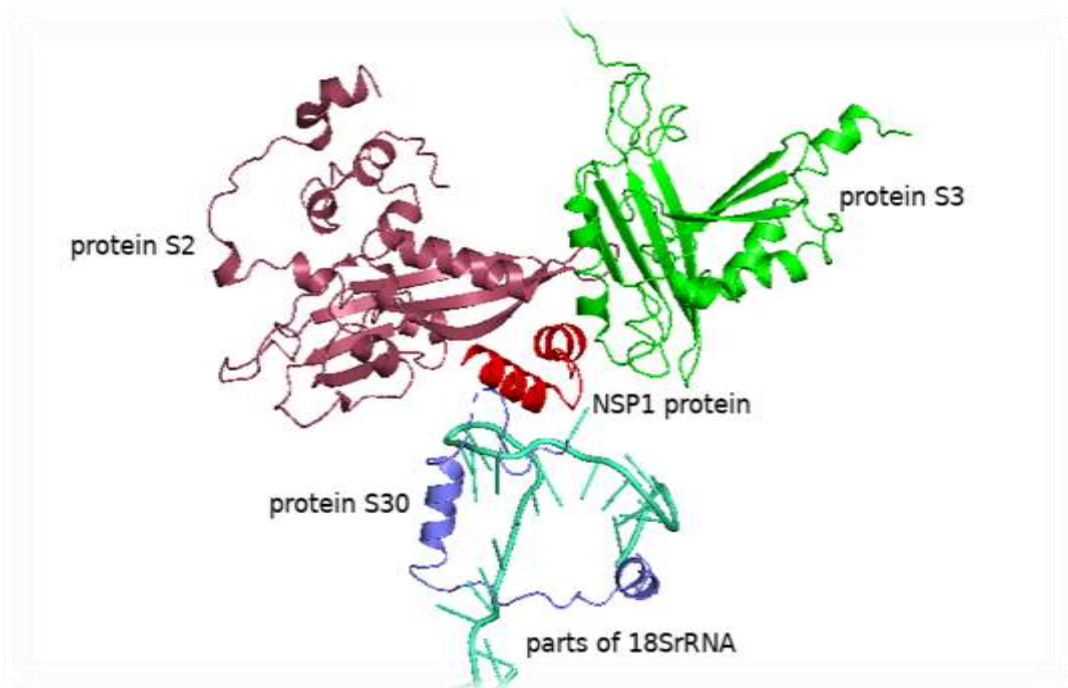
مقدمه

بیماری کرونا حاصل ورود ویروس SARS-CoV-2 از طریق اتصال پروتئین ساختاری Spike یا S به گیرنده‌ی سطحی ACE2 سلولهای انسانی است (۴). ژنوم این ویروس از یک رشته RNA ی با سنس مثبت تشکیل شده است. این ژنوم تولید ۶ ORF یا قالب خوانش باز می‌کند.

در ماه مارچ سال ۲۰۲۰ طبق اطلاعیه‌ی سازمان بهداشت جهانی (WHO) به دلیل شیوع گسترده و پاندمیک بیماری ویروسی کرونا حالت فوق‌العاده‌ی بهداشتی در جهان اعلام شد (۳).

کیلودالتونی در سیتوپلاسم سلولهای آلوده یافت میشود و طبق بررسیهای Yoshimoto و همکارانش نام دیگر این پروتئین Leader protein است. یکی از نقش‌های اصلی این پروتئین مهار بیان ژن‌های سلول میزبان میباشد که Yoshimoto و همکارانش احتمال میدهند به دلیل اتصال NSP1 به زیرواحدهای ریبوزومی 40S باشد (۷).

پروتئازهای ویروسی شامل پروتئاز اصلی (Mpro)، پروتئاز شبه پایلین (PLP) و پروتئاز شبه کموتریپسین (3C1pro)، پلی پروتئین‌های تولید شده توسط ORF‌ها را مورد برش قرار میدهند و پروتئین‌های مورد نیاز ویروس برای تکثیر و بقایش را فراهم می‌آورند. NSP1 یکی از پروتئین‌های غیر ساختاری ویروس است (۶ و ۵). این پروتئین ۲۰



پروتئین NSP1 با اجزای کمپلکس ریپوزوم ۴۰ انسانی در مقایسه با این حد واسط‌ها یکسان نیست و دچار حذف، اضافه و یا تغییر ماهیت شده است. این امر امکان مطرح کردن این فرضیه را به وجود می‌آورد که همین تغییرات در محل اتصال پروتئین NSP1 عاملی برای اتصال نیافتن و یا اتصال ضعیف پیدا کردن آن در این حد واسط‌ها می‌باشد. این شیوه‌ی برقراری اتصال توسط پروتئین NSP1 با اجزای ریپوزومی این حیوانات ممکن است یکی از عوامل تاثیرگذار در ناقل بودن آنها و عدم ایجاد بیماری کرونا در این موجودات حد واسط باشد.

جهت راستی آزمایشی این نظریه، در این تحقیق ابتدا با بررسی ساختاری پروتئین NSP1 و شناسایی نوع، تعداد و نحوه‌ی برهم‌کنش‌های آن با ریپوزوم ۴۰ انسانی، نقاط مهم ایجاد پیوند در آنها شناسایی شد. پس از به دست آوردن نقاط اتصال با انجام مقایسه‌ی جامع بین اجزای تشکیل‌دهنده 40S ریپوزوم انسان و موجودات حد واسط ناقل به بیان دلایل احتمالی عدم وقوع بیماری کرونا در بعضی از حیوانات پرداخته شد.

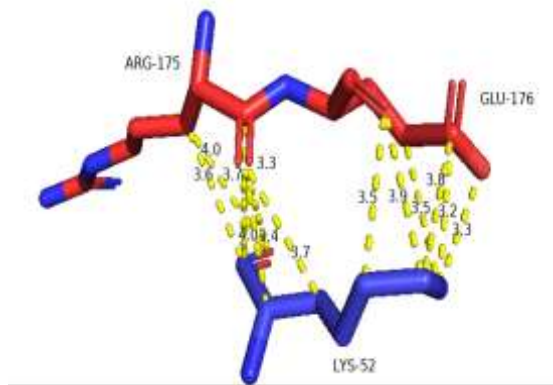
مواد و روشها

Shi و همکارانش در اواخر دسامبر سال ۲۰۲۰، ساختار کریستالوگرافی شده‌ی پروتئین NSP1 در کمپلکس با ریپوزوم 40S را در دسترس محققان قرار دادند (۱۲). این فایل که تحت عنوان 7K5I در پایگاه اطلاعات داده‌ی PDB (Protein Data Bank) موجود است، مبنای تحقیق حال حاضر قرار گرفت. با به کارگیری نرم‌افزار غیر تجاری PyMOL نسخه‌ی 2.4.1 به بررسی نحوه‌ی اتصال پروتئین غیر ساختاری شماره‌ی یک ویروس کرونا یا NSP1 در ارتباط با ریپوزوم 40S پرداخته شد. پروتئین NSP1 با چهار جز در این کمپلکس اتصالاتی را برقرار

ریپوزوم‌ها از اندامک‌های بسیار مهم سلولی هستند که از پروتئین و RNA ساخته شده‌اند و وظیفه‌ی سنتز پروتئین‌ها را برعهده دارند. پروتئین NSP1 برای اعمال عملکردهای متفاوتش در ابتدا نیاز به برقراری اتصال به زیرواحدهای ریپوزومی 40S دارد. اتصال این پروتئین از ویروس کرونا بطور قطع سبب تغییراتی در ساختار ریپوزومی می‌شود (۸). فرض ما در این تحقیق بر این امر استوار بود که اتصالاتی که NSP1 با زیرواحدها و پروتئین‌های موجود در ساختار ریپوزوم‌ها برقرار می‌کند، اتصالاتی قبلی را قطع خواهد کرد. برقراری ارتباط جدید به مفهوم از دست رفتن اتصالاتی قبلی در کمپلکس ریپوزومی می‌باشد. پیوندهای جدید مابین NSP1 و اجزای کمپلکس ریپوزومی گاهی با ایجاد ممانعت فضایی از پیوند طبیعی اسیدهای آمینه‌ی مجاور و یا بازها جلوگیری می‌کند و یا عمل آنها را تحت الشعاع قرار می‌دهد.

کرونا ویروس جدید به وسیله‌ی یکسری موجودات حدواسط ناقل به انسان منتقل شده است. خفاش‌ها یکی از این موجودات هستند که به احتمال قوی طی فرایند نوترکیبی متوالی این ویروس را ایجاد کرده‌اند (۹). *Masked palm civet* از دیگر ناقلان و موجودات حد واسط انتقال کرونا به انسان هستند، این حیوانات از دسته‌ی همه‌چیزخوارها یا مورچه‌خواران می‌باشند (۱۰). تحقیقات روی خرگوشهای سفید نیوزیلندی، موش خرما و همسترها مشخص کرد که این حیوانات نیز از ناقلان بدون علامت عفونت ویروسی ناشی از کرونا هستند ولی مخزن ویروس به حساب نمی‌آیند (۱۱). توجه به این امر ضروری است که این ناقلان حد واسط حیوانی در اثر مواجهه با ویروس SARS-CoV-2 یا اصلاً به بیماری کرونا مبتلا نمی‌شوند و یا مبتلایان بدون علامتی خواهند بود (۱۲). در این مقاله مشخص خواهد شد که برهمکنش‌های

نتایج



شکل ۲. پیوندهای پروتئین NSP1 (قرمز رنگ) و پروتئین S30 (آبی رنگ) ریبوزوم ۴۰ انسانی

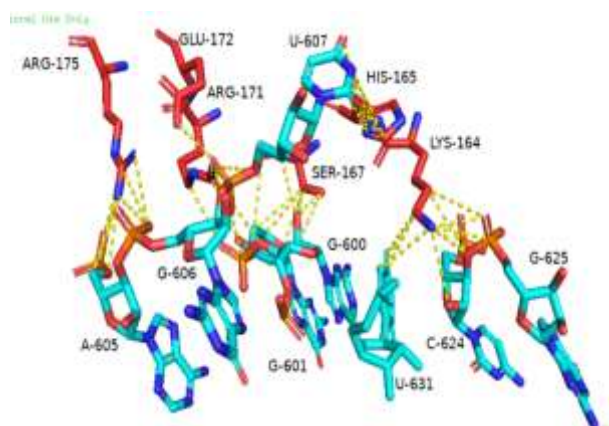
از بین پروتئین‌هایی که در سیستم ترجمه ی ریبوزومی به زیرواحد های 40S کمک میکنند و پروتئین NSP1 برای اعمال عملکرد خود به آنها اتصال میابد میتوان به سه پروتئین S2، S3 و S30 اشاره کرد. همانند ارتباط NSP1 با 18SrRNA در اینجا هم بین اسیدهای آمینه ی پروتئین NSP1 با پروتئین‌های گفته شده پیوندهایی قطبی و غیر قطبی شکل میگیرد. از میان این سه پروتئین ریبوزومی، پروتئین S30 کمترین ارتباط را در قالب یک پیوند قطبی و یک پیوند غیر قطبی داشت. اسید آمینه ی لیزین ۵۲ از پروتئین S30 با اسید آمینه ی Glu-176 یک پیوند قطبی و با Arg-175 یک پیوند غیر قطبی برقرار کرد که عامل اتصالش به NSP1 شده است (شکل ۲).

پروتئین S3 برخلاف پروتئین S30 بیشترین ارتباط را با NSP1 داشت. Arg¹¹⁷ از S3 دو پیوند قطبی با Thr-151 و Gly-150 و چندین پیوند غیر قطبی با Asp-152، Leu-149، Gly-150 و Thr-151 از پروتئین NSP1 برقرار می‌کرد. Arg¹⁴³ نیز مانند Arg¹¹⁷ با سه اسید آمینه ی NSP1، Asp-156، Asn-160 و Glu-159 پیوند داشت.

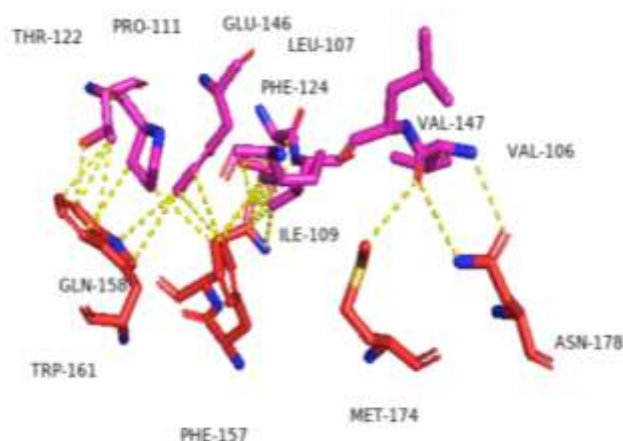
Arg¹¹⁶ از S3 در موقعیت اسید آمینه Asp-152 هم پیوند قطبی و هم غیر قطبی دارد و با اسید آمینه های Glu-155 نیز یک پیوند غیر قطبی داشت.

در جدول ۱، بیشترین ارتباط قطبی پروتئین NSP1 با 18SrRNA، بزرگترین زیرواحد RNA ی ریبوزوم 40S نشان داده شده است. این ارتباط شامل نه پیوند قطبی و چهار پیوند غیر قطبی زیر ۴ آنگستروم (4\AA) است. پروتئین NSP1 در موقعیت اسیدهای آمینه ی Ser-167، Arg-171، Arg-175 و His-165، Lys-164 با بازهای نوکلئوتیدهای 18SrRNA پیوند قطبی برقرار کرده است. از میان این پیوندها Arg-175 با G⁶⁰⁶ و A⁶⁰⁵ و Arg-171 با G⁶⁰¹، G⁶⁰⁰ و U⁶⁰⁷ پیوندهایی تماما قطبی داشت.

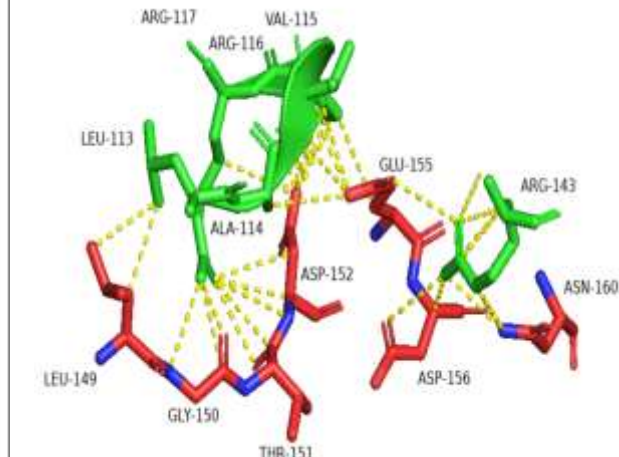
برخلاف آن، اسیدهای آمینه ی Ser-167، His-165 و Lys-164 هم پیوندهایی قطبی و هم غیر قطبی با نوکلئوتیدهای 18SrRNA دارند. Ser-167 با باز G⁶⁰⁰ پیوندی قطبی ولی با باز G⁶⁰¹ پیوندی غیر قطبی برقرار کرده بود. His-165 نیز پیوندی قطبی با U⁶³⁰، اما با U⁶⁰⁷ پیوندش غیر قطبی بود. در مورد Lys-164 همانطور که در جدول ۱ مشخص شده است سه پیوند برقرار میکند که G⁶²⁵ و C⁶²⁴ پیوندهای قطبی آن و U⁶³¹ پیوند غیر قطبی اش است. Glu-172 نیز تنها یک پیوند غیر قطبی با باز U⁶⁰⁷ دارد. (شکل ۱).



شکل ۱. پیوندهای پروتئین NSP1 (قرمز رنگ) با 18SrRNA (فیروزه ای رنگ) ریبوزوم ۴۰ انسانی



شکل ۴. پیوندهای پروتئین NSP1 (قرمز رنگ) و پروتئین S2 (بنفش رنگ) ریبوزوم ۴۰ انسانی



شکل ۳. پیوندهای پروتئین NSP1 (قرمز رنگ) و پروتئین S3 (سبز رنگ) ریبوزوم ۴۰ انسانی

پروتئین‌های وابسته به آن در انسان و جانداران حد واسطه ناقل است. یکی از مهمترین تفاوت‌های چشمگیر محل اتصال پروتئین NSP1 با ریبوزوم‌های انسانی در مقایسه با خصوصاً شتر، خفاش و مورچه خوار در پروتئین S2 مشهود است. در توالی پروتئین S2 ای که مختص شتر می باشد (*Camelus dromedaries*) و در جدول ۲ قرار دارد، حذف قطعه‌ی بزرگی مشاهده شد که از اسید آمینه‌ی ۴۸ شروع شده و تا اسید آمینه‌ی شماره‌ی ۸۰ ادامه یافته است. در بین این اسید آمینه‌های حذفی دو اسید آمینه‌ی گلوتامات- ۱۴۶ و والین-۱۴۷ قرار داشتند که محل اتصال پروتئین NSP1 به پروتئین S2 ریبوزوم انسانی بودند. این حذف در توالی مشابه پروتئین S2 ریبوزوم‌های انسانی وجود نداشت. دو تفاوت شاخص بعدی در موقعیت اسید آمینه‌های شماره‌ی ۳۴ و ۳۷ توالی پروتئین S2 ریبوزوم‌های شتر مشاهده گردید، که به جای اسید آمینه‌های آرژنین و فنیل آلانین، به ترتیب گلوتامین و لوسین جایگزین شده‌اند. قابل ذکر است که شتر یکی از حد واسطه‌های ناقل ویروس SARS-CoV-2 میباشد که مبتلا به کرونا نمیشود. پروتئین S2 از ایزوفرم X1 نوعی میمون

از دیگر اسید آمینه‌های درگیر در اتصال به NSP1، Leu^{113} بود که با اتصال غیر قطبی به اسید آمینه‌ی $Leu-149$ و $Gly-150$ متصل میشد. از NSP1 اسید آمینه‌ی $Glu-155$ علاوه بر Arg^{116} با Ala^{114} و Val^{115} پیوند غیر قطبی داشت (شکل ۳).

آخرین پروتئین مورد بحث ما پروتئین S2 از کمپلکس ریبوزومی 40S بود. NSP1 در دو اسید آمینه‌ی $Asn-178$ و $Gln-158$ با به ترتیب Val^{106} و Val^{147} پیوند قطبی برقرار کرد. این دو پیوند تنها پیوندهای قطبی این پروتئین با پروتئین NSP1 بود و بقیه‌ی پیوندهای آن غیر قطبی بودند. $Gln-158$ در سه موقعیت Glu^{146} ، Val^{147} و Phe^{124} پیوند غیر قطبی داده بود. $Trp-161$ از پروتئین NSP1 با Phe^{124} ، Thr^{122} و Pro^{111} ارتباطی غیر قطبی داشت. $Phe-157$ هم با Phe^{124} و Ile^{109} از پروتئین S2 اتصال غیر قطبی برقرار کرد. علاوه بر $Met-174$ ، $Asn-178$ نیز یک پیوند غیر قطبی با Val^{106} از پروتئین NSP1 داشت (شکل ۴).

مرحله‌ی بعدی در بررسی ارتباط NSP1 با کمپلکس ریبوزومی انطباق‌پذیری 18SrRNA ی ریبوزومی و

پروتئین NSP1 وجود داشت. این امر در مورد پروتئین S30 نیز به همین منوال بود. نکته ی بسیار مهم در مورد پروتئین S30 این بود که این پروتئین در ریبوزوم های انسانی تنها ۵۹ اسید آمینه داشت در حالی که جانداران دیگر توالی های طولانی تری از این پروتئین را داشتند.

مرحله ی بعدی بررسی ارتباط نقاط پیوندی موجود در جدول ۱، در حالت طبیعی سلول بود که سیستم ترجمه ای در حال ترجمه ی mRNA میباشد. با بررسی فایل 5VYC از سایت pdb که توسط Lomakin و همکارانش در سال ۲۰۱۷ منتشر شد (۱۱)، کمپلکس ریبوزومی ۴۰ انسانی در حال ترجمه یک mRNA بدست آمد. این کمپلکس نشان دهنده ی پیوند درونی اکثر این نقاط با دیگر بازهای ریبوزومی بود. اگر چه در موقعیتهای A-605 و U-607 و G-625 از زیرواحد 18S ریبوزومی با اسیدهای آمینه ی Lys^{22} از پروتئین S9، Arg^{143} از پروتئین S3 و Asn^{63} از پروتئین S23 به ترتیب توسط NSP1 در سلولهای آلوده به ویروس قطع میگردند (جدول ۴).

(*Mandrillus leucophaeus*) نیز به جای ایزولوسین موقعیت ۱۰۹ پروتئین S2 ریبوزوم انسانی، ترئونین داشت (جدول ۲).

پروتئین ریبوزومی S3 نیز همانند پروتئین S2 تفاوتی را مابین توالی انسانی و حدواسط ها از خود بروز داد. بطور مثال یک قطعه ی حذف شده ۱۲۶ اسید آمینه ای در ابتدای این پروتئین وجود داشت که در ایزوفرم های X3 و X2 از *Manis pentadactyla* و *Manis javanica* مشاهده شد این حذف عامل یک تفاوت بزرگ در اندازه ی پروتئین بود. در کنار این امر در این ناحیه ی حذف شده پنج نقطه ی اتصال پروتئین NSP1، شامل لوسین-۱۱۳، آلانین-۱۱۴، والین-۱۱۵، آرژنین-۱۱۶ و آرژنین-۱۱۷ نیز واقع شده بود که مورد حذف قرار گرفته بودند (جدول ۳).

در مورد انطباق توالی بین توالی ژنومی 18SrRNA از ریبوزوم ۴۰ انسانی، تفاوت شاخصی در بررسی ها حاصل نشد و در تمامی جانداران مورد بررسی نقاط اتصال به

جدول ۲. انطباق توالی پروتئین ریبوزومی S2

Human S2 ribosomal protein	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Camelus dromedarius	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQTRLKAFVATGDDKG-----
Camelus bactrianus	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Mus musculus	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Bos taurus	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Manis pentadactyla	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Manis javanica	LKDDVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGHYNHVGVLGX-SKEVATAIR
Myotis brandtii	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Ochotona princeps	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Gorilla gorilla	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Mandrillus leucophaeus isoform X1	LKDEVLKIMTVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Mandrillus leucophaeus	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Pan paniscus	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Rhinolophus ferrumequinm	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Saimiri boliviensis	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKEFVAIGDYNHVGVLGVKCSKEVATAIR
Ovis aries	LKDEVLKIMPVQKQTRAGQRTRFKAFVAIADYNHVGVLGVKCSKEVATAIR

جدول ۳. انطباق توالی پروتئین ریبوزومی S3

Human S3 ribosomal protein	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Camelus dromedarius	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Mus musculus	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Bos taurus	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Manis pentadactyla isoform X1	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Manis pentadactyla isoform X2	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Manis pentadactyla isoform X3	-----MESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Manis javanica isoform X1	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Manis javanica isoform X2	-----MESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Myotis brandtii	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Ochotona princeps	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Gorilla gorilla	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Pan troglodytes	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Rhinolophus ferrumequinum	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Saimiri boliviensis	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS
Ovis aries	QAESLRYKLLGG LAVRR ACYGVLRFIMESGAKGCEVVVSGK LR GQRAKSMKFVDGLMIHS

جدول ۴. مقایسه نقاط پیوندی 18SrRNA در حضور ویروس و در شرایط طبیعی سلول

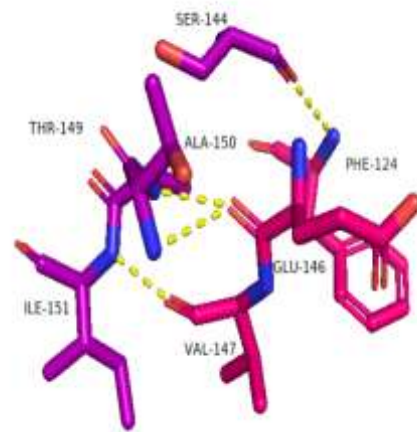
Interaction points between NSp1 and 18SrRNA in the presence of coronavirus	Interaction points of 18SrRNA in normal cell conditions
G-600	C-622/U-630
G-601	G-6/C-621
A-604	C-603/C-639
A-605	C-603/C-638/G-598/Lys-22(Protein S9)
G-606	NON
U-607	Arg-143(Protein S3)
C-624	G-623/G-617/U-631
G-625	Asn-63(Protein S23)/C-615/G-617
U-630	G-600
U-631	G-623/A-629/C-624

در شکل ۶ به بررسی پیوند S3 با پروتئین NSP1 پرداخته شده است. Arg¹¹⁶ از این پروتئین که با چندین اسید آمینه ی پروتئین NSP1 در ارتباط بود، در حالت عادی با Cys¹¹⁹ یک پیوند قطبی برقرار کرده است (شکل ۶).

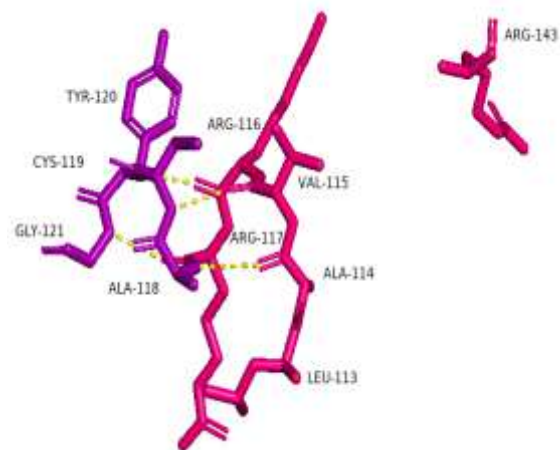
در رابطه با بقیه ی پروتئین های متصل شونده به پروتئین NSP1 در کمپلکس ریپوزومی مورد خاصی از اتصال در فایل 5VYC مشاهده نشد. دلیل این امر کمبود اطلاعات کریستالوگرافی میباشد و به همین دلیل ارتباط این اسید های آمینه با اجزای دیگر در کمپلکس ۴۰ ریپوزوم انسانی را نمیتوان بطور کامل و قطعی رد کرد.

بحث

کرونا ویروسها (CoVs)، باعث ایجاد انواع بیماریها از جمله بیماریهای تنفسی، روده، کلیه، مغز و اعصاب در انسان و حیوانات میشوند (۲). در این تحقیق به بررسی بیوانفورماتیکی نقش پروتئین NSP1 بر عملکرد ویروس کرونا پرداخته شد. سیستم ریپوزومی بخاطر ترجمه mRNAs موجب بقا، رشد و تکثیر سلول ها میگردد. ویروس SARS-COV2 با جلوگیری از ترجمه mRNAs سلول میزبان و ترجمه mRNAs ویروس موجب مرگ سلول میزبان و رها شدن تعداد زیادی ویروس به فضای میان بافتی و آلوده کردن سلول های بیشتری میگردد (۱۳). پروتئین NSP1 که یک پروتئین غیر ساختاری ویروس با ۱۸۰ اسید آمینه است، مسئول مهار ترجمه mRNAs سلول میزبان می باشد (۱۴). با توجه به مطالعات کریستالوگرافی، انتهای کربوکسیلیک این پروتئین به دهانه زیر واحد 40S ریپوزوم می چسبد و مانع ورود mRNAs سلولی و در نتیجه ترجمه آن می شود (۱۵). ما با بررسی برهم کنش های مولکولی این پروتئین با اجزای تشکیل دهنده زیر واحد 40S نقاط اتصال را شناسایی نمودیم. این اجزا



شکل ۵. پیوندهای داخلی پروتئین S2 در شرایط طبیعی-اسیدهای آمینه مشخص شده به رنگ صورتی در ارتباط با NSP1 نقش دارند و اسیدهای آمینه ی بنفش رنگ در عدم حضور NSP1 به صورت داخل پروتئینی با آنها اتصال برقرار میکنند.



شکل ۶. پیوندهای داخلی پروتئین S3 در شرایط طبیعی-اسید های آمینه ی مشخص شده به رنگ صورتی در ارتباط با NSP1 نقش دارند و اسیدهای آمینه ی بنفش رنگ در عدم حضور NSP1 به صورت داخل پروتئینی با آنها اتصال برقرار میکنند.

در شکل ۵ نقاط پیوندی Phe¹²⁴ و Glu¹⁴⁶ و Val¹⁴⁷ نشان داده شده است که در پروتئین S2 توسط پروتئین NSP1 قطع شده و با چهار اسید آمینه ی دیگر، Thr¹⁴⁹، Ser¹⁴⁴، Ala¹⁵⁰ و Ile¹⁵¹ به ترتیب در حالتی که سلول در شرایط طبیعی است پیوند قطبی تشکیل داده است (شکل ۵).

بخوبی توجیه نمایید و نتایج بررسی ارتباطات این نقاط پیوندی در حالت طبیعی ترجمه توسط کمپلکس ریبوزومی ۴۰ انسانی گویای این واقعیت است که اتصال با پروتئین NSP1 مانع برهم کنش های طبیعی میشود.

نتایج حاضر راه را برای طراحی موتان های خاصی از NSP1 بعنوان یک دارو و یا حتی یک واکسن باز می کند (۱۸ و ۱۹ و ۲۰).

نتیجه گیری

پروتئین NSP1 از ویروس SARS-CoV-2 قادر است با اتصال به زیرواحدهای ریبوزومی سلول میزبان در پروتئین های S2، S3 و S30 و نیز 18SrRNA، سبب برهم زدن اتصالات طبیعی این پروتئین ها شود و همین امر اختلالاتی را در عملکرد ترجمه ای سیستم ریبوزومی سلول میزبان بوجود می آورد. هنوز اطلاعات کافی در مورد اینکه چگونه سیستم ریبوزومی به صورت انتخابی تنها mRNA های ویروسی را ترجمه میکند اما از ترجمه ی mRNA های سلول میزبان جلوگیری به عمل می آورد، در دسترس نیست، اما بر طبق اطلاعات بدست آمده در این تحقیق، این پروتئین به طور مشخصی بسیاری از اتصالات داخل پروتئینی زیرواحدهای ریبوزومی را هدف قرار میدهد و همین امر میتواند در کارکرد طبیعی آنها مداخله ایجاد کند. در توالی های مورد بررسی در حیوانات ناقل حد واسط بسیاری از این نقاط اتصالیه مربوط به NSP1 در سیستم ترجمه ای میزبان وجود ندارند (احتمالا دچار حذف تکاملی شده اند) و همین امر میتواند توضیح دهنده ی تفاوتی باشد که در شدت ابتلا و مرگ و میر ویروس SARS-CoV-2 در میان آنها در مقایسه با موجودات دیگری مثل انسان وجود دارد.

عبارت بودند از 18S rRNA و پروتئین های S2، S3، و S30. برای مثال اتصالات بین توالی 5' مولکول های mRNA و توالی های 18S RNA نقش مهمی در تنظیم ترجمه این مولکول ها بازی میکنند. بنابر این در گام بعدی توالی مولکولهای فوق در نرم افزار Clustal Omega با همان مولکول ها اما در گونه های دیگر بویژه موجودات ناقل مانند خفاش و مورچه خوار و همچنین شتر (در بیماری SARS-CoV با منشا عربستان شتر بعنوان ناقل معرفی شده بود) مقایسه شدند (۱۶ و ۱۷). در سالهای اخیر خفاش ها به طور فزاینده ای به عنوان مخازن بالقوه برای این ویروسها و پایدار شدن عفونتهای ناشی از آنها شناخته شده اند (۱). نتایج مقایسه توالی ها نشان داد که موجودات ناقل در توالی های فوق با موجوداتی که بیمار می شوند، دارای تفاوت های مشخصی هستند. برای مثال پروتئین S2 در شتر و مورچه خوار دارای تغییرات جهشی و یا حتی حذف قسمتی از توالی هستند. این امر میتواند دلیل ناقل بودن این موجودات مانند شتر را نشان دهد. رسم نمودار قرابت تکاملی بین مولکولهای مختلف نشان داد که پروتئین S2 شتر به مورچه خوار نزدیک تر می باشد تا گاو و یا انسان. از طرف دیگر مطالعات Yuan-Qin Min و همکاران (۹) که توالی NSP1 مختلف را مقایسه نموده اند، نشان دادند که اسید آمینه های کلیدی مانند آرژنین های ۱۷۱ و ۱۷۵ در بعضی از گونه های دیگر کروناویروس ها مانند MERS-CoV تغییر یافته اند. اسید آمینه آرژنتین ۱۷۵ همزمان به لیزین ۵۲ از پروتئین S30 و همچنین آدنین ۶۰۵ و گوانین ۶۰۶ از مولکول 18S rRNA اتصال برقرار کرده است، بنابراین این اسید آمینه نقش کلیدی در اتصال NSP1 به کمپلکس ریبوزومی بازی می کند. موتاسیون جایگاه ۱۷۵ در NSP1 می تواند تفاوت مرگ و میر بالای SARS-CoV-2 در مقایسه با بیماریزایی MERS-CoV را

منابع

۱. پوی و همکاران، بررسی مهارپذیری متابولیت‌های ثانویه گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی بر روی پروتئاز اصلی Mpro و Spike گلیکوپروتئین ویروس SARS-CoV-2 (nCoV-19) به روش داکینگ مولکولی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۰۲۰. ۳۳(۴): p. 484-498.
۲. خالدی و همکاران، مروری بر فیلوژنتیک و سیتوپاتوژنز فیلوویروس‌ها، رتروویروس‌ها و کرونا ویروس‌های منتقل‌شونده از خفاش به انسان. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۰۲۲. ۳۵(۳): p. 415-424.
3. Abdi, M., *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in Iran: Actions and problems*. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2020. **41**(6): p. 754-755.
4. Artika, I.M., A.K. Dewantari, and A. Wiyatno, *Molecular biology of coronaviruses: current knowledge*. Heliyon, 2020. **6**(8): p. e04743.
5. Connor, R.F. and R.L. Roper, *Unique SARS-CoV protein nsp1: bioinformatics, biochemistry and potential effects on virulence*. Trends in microbiology, 2007. **15**(2): p. 51-53.
6. Dhama, K., et al., *Coronavirus Disease 2019–COVID-19*. Clinical Microbiology Reviews, 2020. **33**(4): p. e00028-20.
7. El-Sayed, A. and M. Kamel, *Coronaviruses in humans and animals: the role of bats in viral evolution*. Environmental Science and Pollution Research, 2021. **28**(16): p. 19589-19600.
8. Lomakin, I.B., et al., *Crystal structure of the human ribosome in complex with DENR-MCT-1*. Cell reports, 2017. **20**(3): p. 521-528.
9. Min, Y.-Q., et al., *SARS-CoV-2 nsp1: bioinformatics, potential structural and functional features, and implications for drug/vaccine designs*. Frontiers in microbiology, 2020. **11**: p. 587317.
10. Mykityn, A.Z., et al., *Susceptibility of rabbits to SARS-CoV-2*. Emerging Microbes & Infections, 2021. **10**(1): p. 1-7.
11. Narayanan, K., et al., *Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression*. Virus research, 2015. **202**: p. 89-100.
12. Preziuso, S., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) exhibits high predicted binding affinity to ACE2 from lagomorphs (rabbits and pikas)*. Animals, 2020. **10**(9): p. 1460.
13. Schubert, K., et al., *SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation*. Nature structural & molecular biology, 2020. **27**(10): p. 959-966.
14. Semper, C., N. Watanabe, and A. Savchenko, *Structural characterization of nonstructural protein 1 from SARS-CoV-2*. IScience, 2021. **24**(1): p. 101903.
15. Yoshimoto, F.K., *The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the cause of COVID-19*. The protein journal, 2020. **39**(3): p. 198-216.
16. Zhao, J., W. Cui, and B.-p. Tian, *The potential intermediate hosts for SARS-CoV-2*. Frontiers in microbiology, 2020. **11**: p. 580137.
17. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
18. Butt, M.H., et al., *Appraisal for the Potential of Viral and Nonviral Vectors in Gene Therapy: A Review*. Genes (Basel), 2022. **13**(8).
19. Deng, S., et al., *Viral Vector Vaccine Development and Application during the COVID-19 Pandemic*. Microorganisms, 2022. **10**(7).
20. Yuan, Y., et al., *Advances of mRNA vaccine in tumor: a maze of opportunities and challenges*. Biomarker Research, 2023. **11**(1): p. 6.

Comparison of 40S Human ribosomes and carrier animals' interactions with NSP1 from the SARS-CoV-2 virus

Bapirzadeh A.^{1,2}, Salehi M.¹, Minucmehr Z.² and Bambai B.²

¹Islamic Azad University, Tehran branch, Tehran, I.R. of Iran

²National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

NSP1 protein is the first produced protein of SARS-CoV-2, the virus which is responsible for COVID-19, situated at the beginning of 5' end of the virus gene number one. NSP1 binds to Human 40S ribosomal subunits and has potential roles in host cells' mRNA translation inhibition. To clarify the subtle molecular reasons of the carrier animal's pathogenicity, we used bioinformatics tools and 7k5I file structure acquired from the PDB data bank to investigate interactions and internal bonds of 40S ribosomes. The majority of NSP1 interactions involve the 18SrRNA ribosomal subunit and one of the ribosomal proteins. These bonds are at A⁶⁰⁵ and G^{600,601} nucleotide positions in 18SrRNA, leading to both physically and spatially disrupting existing internal interactions in this subunit, which eventually could cause the ribosome to lose its function. In addition to 18SrRNA, NSP1 also binds with three ribosomal proteins: S2, S3, and S30. alignment comparison of these molecules in humans and other mammals on one hand, and between humans and carrier animals such as camel and *manis* on the other hand, showed, for example camel S2 protein is more like *manis* instead of being genetically close to humans or cows. These crucial findings strongly support the important role of NSP1 in the translation inhibition of host cells

Keywords: SARS-CoV-2, NSP1, Bioinformatics, 40s ribosomal subunits, Bats, Manis