

بسته‌بندی ژنوم در ویروس‌های گیاهی

Genome Packaging in Plant Viruses

احسان حسنوندا^۱، سمیرا پاکباز^{۲*}

Ehsan Hasanvand¹, Samira Pakbaz^{2*}

۱- دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه

لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

1. Ph.D. student of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. Assistant Professor of Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی:

samira.pakbaz@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴)

چکیده

ویروس‌ها ذرات شگفت‌انگیزی در طبیعت هستند که برای تکثیر با حداقل مجموعه ژنتیکی طراحی شده‌اند. این فرآیند حیاتی بسیار پیچیده، نیازمند زمان و همکاری هماهنگ تعدادی از پروتئین‌های ویروس و میزبان است. به‌منظور بسته‌بندی ژنوم، زیرواحدهای پروتئینی تکرارشونده ویروسی با یکدیگر و با اسیدهای نوکلئیک ویروسی ارتباط برقرار می‌کنند. اصل کلی حاکم بر بسته‌بندی، برهم‌کنش بین ساختار پروتئین پوششی (Coat Protein) و یک سیگنال خاص در اسیدنوکلئیک است. تکثیر ویروس‌های ssRNA و مونتاژ نوکلئوکپسید آن‌ها در سیتوپلاسم رخ می‌دهد و به برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین و پروتئین-RNA نیاز دارد. فرآیند بسته‌بندی در آن‌ها خودبه‌خودی بوده و به ATP نیاز ندارد. برهم‌کنش بین زیرواحدهای پروتئین پوششی و RNA ژنومی توسط یک ساختار منحصربه‌فرد در توالی که تمایل بسیار زیادی برای برهم‌کنش با پروتئین پوششی دارد، کنترل می‌شود. وجود این ساختارهای خاص در اسیدنوکلئیک ویروس که سیگنال بسته‌بندی (Packaging signal) یا OAS (Origin of assembly sequence) نام دارند، سبب تمایز اسیدنوکلئیک‌های ویروسی از سایر مولکول‌های RNA سلولی موجود در ناحیه‌ای که مونتاژ در آن روی می‌دهد، می‌شود. دانش کلی از سازوکارهای دقیق ویروسی، شکل‌گیری پیکره و اجتماع ویروس‌ها و بسته‌بندی ژنوم آن‌ها که منجر به تشکیل ساختارهای پایدار ویروسی می‌شوند یک پیش نیاز مهم برای درک زیست‌شناسی کلی ویروس‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

اسیدنوکلئیک،

بسته‌بندی،

پروتئین پوششی،

مونتاژ،

ویروس

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.2.12.4>

DOR:20.1001.1.25885073.1400.10.2.12.4

Genetic Engineering and Biosafety
Journal
Volume 10, Number 2
2022

<http://gebsj.ir/>

<https://ecc.isc.ac/showJournal/23064>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Viruses are the amazing particles in nature that is designed to reproduce with a minimal genetic set. This vital process is very complex and requires the time and coordinated activities of a number of virus and host proteins. In order to the genome packaging, the virus protein subunits interact with each other and with viral nucleic acids. The general principle in packaging is the interaction between the structure of coat protein and a specific signal in RNA. Replication of +ssRNA viruses and their nucleocapsid assembly occurs in the cytoplasm and requires Pro-Pro and Pro-RNA interactions. The packaging process in them is spontaneous and does not require ATP. The interaction between the coat protein subunits and the genomic RNA is controlled by a unique structure in the sequence that is highly desired to interaction with the coat protein. The presence of these unique structures in the viral nucleic acid, called the packaging signal or OAS (origin of assembly sequence), causes viral nucleic acid to be distinguished from other cellular RNA molecules in the region which assembly takes place. General knowledge of the precise mechanisms of viruses, the configuration and aggregation of viruses, and the packing of their genomes that lead to the formation of stable viral structures is an important prerequisite for understanding the overall biology of viruses.

Keywords: Assembly, Coat protein, Nucleic acid, Packaging, Virus.

مقدمه

همه ویروس ها انگل اجباری درون سلولی اند و نیازمند یک میزبان مناسب که در آن تکثیر و گسترش یابند. ویروس ها استراتژی های متنوعی جهت تکثیر در سلول میزبان دارند و فضای سلول را جهت ساخت پیکره خود اشغال می کنند. به این ترتیب پیش سازها به صورت ویروس آلوده کننده درون سلولی بسته بندی می شوند. پوشش دار شدن و مونتاژ ژنوم در ویروس های گیاهی و ویروس های آلوده کننده جانوران و سایر یوکاریوت ها، یک مرحله اصلی از چرخه آلودگی ویروس بوده و فرآیندی اساسی، پیچیده، نیازمند زمان و همکاری هماهنگ تعدادی از پروتئین های ویروسی و میزبان است با این حال، جزئیات آن به طور کامل شناخته نشده و اطلاعات موجود بر اساس به کارگیری اشعه X، فن آوری Yeast two hybrid و میکروسکوپ الکترونی در دسترس قرار گرفته است (Wang et al. 2015). به طور کلی هر ویروس گیاهی شامل اسید نوکلئیک آلوده کننده یا ژنوم است که درون پوشش پروتئینی (Coat Protein, CP) قرار گرفته است (نوکلئوکپسید). در واقع پوشش پروتئینی مانند حفاظی، اسید نوکلئیک ویروس را در بر می گیرد. در اغلب گروه های ویروس های گیاهی، ژنوم که حاوی اطلاعات لازم جهت همانند سازی ویروس است از نوع اسید

ریبونوکلئیک (RNA) است، ولی اسید دئوکسی ریبونوکلئیک (DNA) نیز در ویروس های گروه های *Nanoviridae*، *Caulimoviridae* و *Geminiviridae* وجود دارد. مسیرهای مونتاژ در بیشتر ویروس ها متفاوت است، اما ویژگی های مشترک در گروه های خاص مشاهده می شود (Matthews, 1979). در این مقاله به توضیح انواع سازوکار بسته بندی ژنوم در گروه های مختلف ویروس های گیاهی و مسیرهای سیگنالی آنها پرداخته می شود و هدف ترسیم یک الگوی کلی از بسته بندی ژنوم ویروس هاست که می تواند به درک بهتر این مرحله اساسی از چرخه آلودگی ویروسی کمک کند.

مکانیسم بسته بندی در ویروس های گیاهی با ژنوم RNA

خصوصیات عمومی مونتاژ نوکلئوکپسید: مونتاژ ویروس های بیماری زا یک فرآیند است که به زیرواحدهای پروتئینی کوچک، مشابه و تکرارشونده نیاز دارد که با دقت و نظم بالایی با یکدیگر و با اسیدهای نوکلئیک ویروسی ارتباط برقرار کنند. بنابراین اصل کلی حاکم بر بسته بندی RNA، برهم کنش بین ساختار پروتئین پوششی (CP) و یک سیگنال خاص از RNA است. اگرچه سازوکارهایی که بسته بندی انتخابی ژنوم های ویروسی و پوشش-

RNA، تنها رابطه تکاملی ویروس های RNA تکرشته ای منفی را ترسیم نمی کند، بلکه درک سازوکار تکثیر آن ها را نیز فراهم می کند (Green et al. 2014).

مکانیسم بسته بندی ژنوم: مونتاژ در ویروس ها به کپی های متعددی از یک محصول ژنی (پروتئین پوششی یا کپسید) و یک نسخه RNA ژنومی (gRNA) نیاز دارد و این شرایط برای اکثر ویروس های گیاهی صدق می کند (Rao et al. 2006). ویروس هایی وجود دارند که ژنوم خود را به چند بخش تقسیم می کنند. این ویروس ها ژنوم تقسیم شده خود را در یک یا چند پیکره بسته بندی می کنند. به عنوان مثال ژنوم های ویروس پيسک سبزدرد نخودفرنگی (Cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) و ویروس موزائیک جاروی علفی (Brome mosaic virus, BMV) هر دو از خانواده Bromoviridae به سه قطعه gRNA تقسیم می شوند. علاوه بر این، یک مولکول RNA اضافی به نام RNA زیرژنومی (subgenomic RNA, sgrRNA) نیز در پیکره بسته بندی می شود. RNA های یک و دو در کپسیدهای مختلف بسته بندی می شوند، در حالی که RNA های سه و چهار (RNA زیرژنومی، sgrRNA) در یک کپسید با نسبت یک به یک بسته بندی می شوند. سادگی ساختار برخی ویروس های گیاهی و باکتریوفاژها این امکان را داده است که در شرایط آزمایشگاهی آن ها را از اجزای خالص شده به ذرات آلوده کننده مونتاژ کنند. روش های درون شیشه (invitro) برای درک اصول فیزیکی کنترل مونتاژ کپسید های خالی، نوکلئوکپسیدها و همچنین بسته بندی RNA بسیار با اهمیت هستند. پژوهش ها نشان داده است که: (۱) مونتاژ ویروس های ssRNA به برهمکنش های پروتئین-پروتئین و پروتئین-RNA نیاز دارد. (۲) این روند خودبه خودی است. (۳) کپسید مونتاژ شده و RNA به یکدیگر متصل می شوند. علاوه بر این، آزمایشات این امکان را دادند که از ویروس ها به عنوان ابزارهای بیوتکنولوژی در علوم زیستی، شیمی و نانوپزشکی استفاده شود (Tapia-Moreno et al. 2017).

آزمایشات انجام شده برای درک مونتاژ و بسته بندی هم در حضور و هم در عدم حضور برهمکنش های خاص پروتئین-RNA بسیار مفید بوده اند. مطالعه ای که روی ویروس کوتولگی سبزدرد

دار شدن ویروس های بیماری زا را کنترل می کنند، ممکن است تحت تأثیر عواملی غیر از پروتئین پوششی و توالی خاصی از اسید نوکلئیک باشند. به طور مثال درگیری احتمالی پروتئین های رپلیکاز، یک نمونه از آن است (Rao, 2006). بسته بندی RNA به عوامل مختلفی بستگی دارد: (۱) یک یا چند سیگنال بسته بندی، (۲) همانندسازی RNA، (۳) ترجمه، (۴) کارخانه های ویروس سازی (سلول میزبان)، (۵) خصوصیات فیزیکی RNA. سهم نسبی هر یک از این عوامل در بسته بندی برای هر ویروس متفاوت است. مونتاژ نوکلئوکپسید و تکثیر ویروس های ssRNA در سیتوپلاسم رخ می دهد. به طور تقریبی در همه ویروس های ssRNA، پوشش دار شدن ژنوم به بسته بندی RNA ژنومی (gRNA) در سلول آلوده نیاز دارد (Wang et al. 2015). یکی از جالب ترین ویژگی های ویروس های ssRNA از نظر مونتاژ این است که برخلاف ویروس های dsDNA (double-stranded DNA)، مونتاژ و بسته بندی RNA فرآیندهای خودبه خودی هستند و به ATP نیاز ندارند. آن ها بسته به برهمکنش های پروتئین-RNA و پروتئین-پروتئین به یکدیگر متصل می شوند. این مدل، با مونتاژ ویروس های رشته ای DNA و RNA دورشته ای بسیار متفاوت است (Cadena-Nava et al. 2012).

در ویروس های RNA تکرشته ای منفی Negative single strand RNA virus (NSRV) نیز، مونتاژ نوکلئوکپسید به کمک پروتئین پوششی و RNA ژنومی ویروس انجام می شود. زیر واحدهای پروتئین پوششی در امتداد طول RNA ژنومی تکرشته ای، به آن متصل می شوند. این روند یا فرآیند پوشش دار شدن ژنوم، هم زمان با همانندسازی ژنومی اتفاق می افتد. در نوکلئوکپسید یک فضای خالی در پروتئین وجود دارد که RNA ویروسی از آن قسمت جدا می شود. در پیکره ویروسی، RNA به منظور در معرض قرار دادن توالی الگو جهت رونویسی و تکثیر، باید به طور موقت از پوشش پروتئینی جدا شود. برهمکنش های مولکولی متقابلی بین زیرواحدهای پروتئینی به صورت خطی در امتداد نوکلئوکپسید وجود دارد تا ساختار آن حفظ شود. آنچه که ویروس های RNA تکرشته ای منفی (ssRNA-) را از بقیه ویروس ها جدا می کند این است که ژنوم آن ها به عنوان الگو برای ساخت RNA ویروسی و آلوده کننده عمل می کند. ویژگی های مشترک پوشش دار شدن

نخودفرنگی (*Cowpea chlorotic dwarf virus*, CpCDV) انجام گرفت نشان داد که صرف نظر از برهم کنش های خاص پروتئین-RNA، طول RNA بسته بندی شده نیز به شدت به فرآیند بسته بندی کمک می کند. از طرفی، پژوهشگران نشان دادند که در ویروس وابسته نکروتیک توتون (*Satellite Tobacco necrotic virus*, STNV)، بسته بندی انتخابی grRNA بستگی به برهم کنش های خاص پروتئین-RNA ژنومی دارد. این برهم کنش ها توسط یک سری عناصر RNA مشابه PS (Packaging Signal) یا سیگنال بسته بندی که در grRNA توزیع می شوند، کنترل می شوند. سیگنال بسته بندی به طور معمول به عنوان یک ساختار منحصربه فرد در توالی RNA ژنومی تعریف می شود که در مقایسه با طول ژنوم بسیار کوتاه است و از تمایل بسیار زیادی برای برهم کنش با پروتئین پوششی برخوردار است. در پژوهشی با استفاده از روش های آزمایشگاهی و ریاضیات نشان دادند که در بعضی موارد بسته بندی انتخابی نه تنها به سیگنال بسته بندی ابتدایی یا استاندارد، بلکه به یک سری عناصر مشابه PS نیاز دارد که الگوی آن را به طور کامل تغییر دهد. مفهوم اصلی سازوکار اتصال با میل بالا بین سیگنال بسته بندی و پروتئین پوششی همیشه با برخی از داده های درون شیشه (*invitro*) و درون موجود زنده (*invivo*) سازگار نیست (Comas-Garcia et al. 2019). پیشنهاد شده است که سیگنال بسته بندی می تواند به عنوان هسته یا کلید ساختاری عمل کند. به غیر از سیگنال بسته بندی و یا عناصر شبیه آن عوامل دیگری نیز وجود دارند که باید مورد توجه قرار گیرند. داده های بیوشیمیایی، ویروسی و ساختاری نشان می دهد که بسته بندی RNA بسیار پیچیده تر از مدلی است که به طور خاص به حضور سیگنال بسته بندی بستگی داشته باشد. به عنوان مثال، تنها وظیفه و عملکرد RdRp (RNA dependent RNA Polymerase) سنتز RNA ویروسی نیست (Chatel-Chaix et al. 2014). پژوهشی نشان داد که ژن RdRp به همراه ژن پروتئین حرکتی در بروز علائم و سیستمیک شدن ویروس برگ بادبزی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) نقش دارد (Pakbaz et al. 2016). هم چنین ساخت سازه سنجاق سری حاوی ژن RdRp ویروس برگ بادبزی مو و القای آن در گیاه توتون تراریخته سبب شد آلودگی

و علائم ویروسی در گیاهان بروز نکند و یا با تأخیر ظاهر شود (Pakbaz et al. 2018).

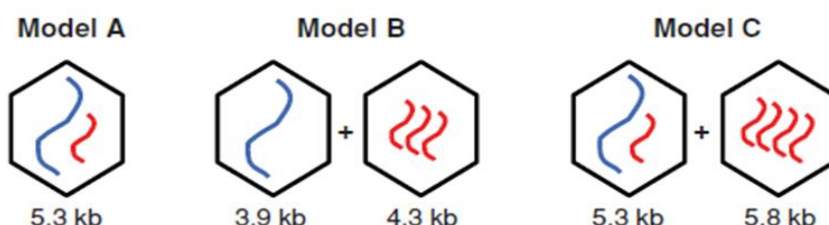
علاوه بر این، آنزیم RdRp و یا برخی از زیرواحدهای آن می توانند اندام ها و غشاهای مختلف را بازسازی کنند. بازسازی غشاء با تشکیل وزیکول ها، RNA ژنومی را از فضای داخلی شبکه آندوپلاسمی زیر جدا می کند. به نظر می رسد این تفکیک برای ویروس های *Flaviviridae* بسیار مهم است. این تفکیک در BMV ابتدا در یک سیستم مبتنی بر مخمر مشاهده شد (Diaz et al. 2015). با این حال پژوهشگران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که نقش RdRp در بسته بندی انتخابی RNA ویروس BMV به دلیل تقسیم بندی RNA ژنومی نیست، بلکه به دلیل برهم کنش مستقیم بین RdRp و پروتئین پوششی است (Chaturvedi et al. 2014).

تکثیر و ترجمه به فرآیند بسته بندی کمک می کنند؟ در شرایط آزمایشگاهی، مونتاژ BMV به سیگنال بسته بندی نیاز دارد که در موقعیت 3'UTR در هر چهار RNA ویروس BMV قرار دارد. این یک توالی بسیار محافظت شده با طول ۲۰۰ نوکلئوتید است که می تواند در یک ساختار شبه tRNA (tRNA like structure) جمع شود. حذف این توالی، مونتاژ آزمایشگاهی را در هر یک از چهار RNA ویروس BMV مختل و مهار می کند. جالب اینجاست که افزودن TLS (به عنوان یک مولکول جداگانه) باعث انجام مونتاژ آزمایشگاهی می شود. حتی افزودن tRNA های غیرویروسی برای مونتاژ مؤثر پیکره کافی است. این یافته ها نشان می دهد که انتهای ۳' در UTR (TLS) در واقع یک سیگنال بسته بندی است (Choi and Roa, 2003). شاید جالب ترین نتیجه این است که بسته بندی مؤثر RNA زیرژنومی (sgRNA) نه تنها به همانندسازی RNA بستگی دارد، بلکه به ترجمه نیز بستگی دارد (Annamalai and Roa, 2006). آنزیم RdRp با افزایش تعداد RNA های ویروسی به بسته بندی انتخابی کمک می کند. علاوه بر این، پژوهشگران نشان دادند که جهت بسته بندی ژنوم به برهم کنش های فیزیکی و مستقیم بین پروتئین های RdRp و پروتئین پوششی نیاز است که در BMV برای فرآیند بسته بندی ضروری است. بنابراین مشخص شد که سیگنال بسته بندی برای اکثر ویروس ها لازم است، اما کافی نیست و جهت ایجاد RNA

Cucumovirus و *Alfavirus* می باشد که gRNA و sgRNA در پیکره های مختلف قرار می گیرند. به طور مثال gRNA در جنس های *Bromovirus* و *Cucumovirus* در دو پیکره جداگانه و sgRNA در پیکره سوم قرار می گیرد (شکل ۲). در این نوع ژنوم پیکره های مونتاژ شده از نظر اندازه و ظاهری ناهمگون هستند. در جنس *Alfavirus* سه تا gRNA در پیکره های ایزومتریکی جداگانه و sgRNA در پیکره چهارم که باسیلی شکل است قرار می گیرند. همچنین gRNA و RNA های ثانویه مثل sgRNA و satRNA (satellite RNA) و DI-RNAs (Defective) (Intriferfing RNA) جهت شروع آلودگی ضروری نیستند، اما در تکثیر و بسته بندی ویروس حضور دارند و تاکنون نقش آن ها در بسته بندی به صورت مستقل یا همراه با gRNA مشخص نشده است (Simon et al. 2004).

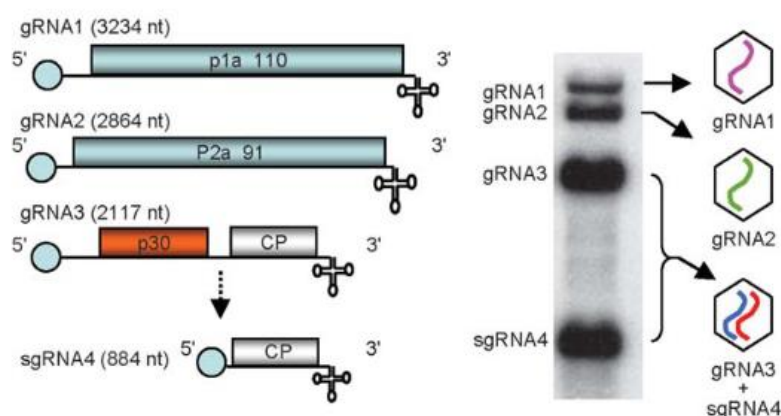
ویروسی مناسب برای بسته بندی به تکثیر و یا ترجمه نیاز است (Chaturvedi et al. 2014).

پیکربندی ژنوم: ویروس ها طیف گسترده ای از پیکربندی ژنوم را نشان می دهند و ژنوم یک ویروس گیاهی از نوع RNA می تواند به صورت یک پارچه و یا قطعه قطعه شده و چندبخشی باشد. جنس های *Sobemovirus*، *Luteovirus*، *Tymovirus* و *Tombusvirus* دارای ژنوم تک بخشی هستند که این ژنوم در یک پیکره قرار می گیرد و RNA زیرژنومی (sgRNA) این ویروس ها در پیکره دیگری قرار می گیرد. ژنوم دوبخشی شامل جنس های *Comovirus*، *Nepovirus* و *Dainthovirus* بوده که برخی مانند *Comovirus* و *Nepovirus* داخل دو پیکره و برخی مانند *Dainthovirus* در یک پیکره قرار می گیرند (شکل ۱) (Rao, 2006). ژنوم سه بخشی شامل جنس های *Bromovirus*



شکل ۱- طرح های مختلف بسته بندی RNA های ژنومی دوبخشی در ویروس ها. مدل A فقط یک نوع پیکره که شامل یک کپی از هر RNA است و با هم در یک پیکره قرار می گیرند. مدل B دو نوع پیکره، یکی با یک کپی از RNA1 و دیگری با سه نسخه از RNA2. مدل C ترکیبی از مدل های A و B، دو نوع پیکره که یکی با یک کپی از هر یک از RNA1 و RNA2 و دیگری با چهار نسخه از RNA2. در شکل RNA1 با رنگ آبی و RNA2 با رنگ قرمز نمایش داده شده است.

Fig1. Various schemes for the packaging of bipartite genomic RNAs into virions. Model A) displays only one virion type containing a copy of each RNA together in a single virion. Model B) displays two virion types: one with a single copy of RNA1 and the other with three copies of RNA2. Model C) a hybrid of Models A and B, displays two virion types: one with a copy of each of RNA1 and RNA2 and the other with four copies of RNA2. RNA1: Blue and RNA2: Red.



شکل ۲- تصویر شماتیک از سازماندهی ژنومی و پروفایل بسته بندی پیکره ویروس در ویروس سه بخشی BMV. دایره پر شده در انتهای 5' ساختار کلاهک و یک برگ شبدر در انتهای 3' نشان دهنده TLS است.

Fig2. Schematic illustration of genome organization and virion packaging profile representing configuration of tripartite virus (BMV). The filled circle at the 5' end represents cap structure and a 3' clover leaf represents TLS.

برهم کنش مولکولی

چهار نوع برهم کنش به بسته بندی و مونتاژ ژنوم ویروس کمک می کند:

(۱) برهم کنش پروتئین-پروتئین: نقش مهمی در مونتاژ پیکره دارد. جنس های *Tymovirus* و *Comovirus* اغلب از طریق این برهم کنش به وجود می آیند. در این نوع برهم کنش کپسید در غیاب RNA می تواند شکل بگیرد.

(۲) برهم کنش پروتئین-RNA: جنس های *Bromovirus*، *Alfamovirus* و *Cucumovirus* اغلب از طریق این برهم کنش به وجود می آیند. در این ویروس ها شکل گیری کپسید نیازمند وجود RNA به عنوان هسته اصلی است و کپسیدهای خالی داخل محیط زنده (*invivo*) پیدا نمی شوند. این برهم کنش منحصراً تضمین کننده پیکره ویروس های دارای RNA است. دیگر پروتئین های رمزگذاری شده مانند رپلیکاز در این فرآیند شرکت می کنند (Annamalai et al. 2006).

(۳) برهم کنش پروتئین-RNA مستقل از توالی: جهت تثبیت RNA های محصور شده با کپسید است. N-terminal ARM (Arginine-arch RNA-binding Motif) در پروتئین پوششی چندین ویروس با ژنوم از نوع RNA دیده شده است، هرچند توسط میکروسکوپ الکترونی در ساختار کپسید مشاهده نشده، اما در برهم کنش با RNA درون کپسید مؤثر است. در طی فرآیند پوشش دار شدن ژنوم، برهم کنش بین باقیمانده ناحیه N-ARM و فسفات های RNA، مونتاژ پیکره های آلودگی را تثبیت می کند (Johnson, 2003).

(۴) برهم کنش پروتئین-RNA وابسته به توالی: این برهم کنش جهت شروع فرآیند مونتاژ ویروس حیاتی است. هم چنین برهم کنش وابسته به توالی یا توالی خاص بین RNA و پروتئین پوششی پیش بینی شده است تا اطمینان حاصل شود که اکثر پیکره های مونتاژ شده منحصراً حاوی RNA ویروسی هستند (Venter et al. 2005).

سیگنال های بسته بندی: در حین بسته بندی، اسیدهای نوکلئیک ویروسی باید از سایر مولکول های RNA سلولی موجود در

ناحیه ای که مونتاژ در آن روی می دهد، متمایز شوند. چنین فرآیندی نتیجه شناخت توالی ها یا ساختارهای منحصربه فردی از اسیدنوکلئیک ویروس است که اغلب OAS (Origin of assembly sequence) یا سیگنال بسته بندی نامیده می شود. در ویروس های دارای RNA و آلوده کننده یوکاریوت ها، مشخص ترین سیگنال بسته بندی مربوط به ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*) است که یک ویروس RNA گیاهی است که در آن برهم کنش ویژه بین پروتئین پوششی و یک ناحیه ۶۹ نوکلئیدی از ژن پروتئین حرکتی (Protein, MP) منجر به عمل مونتاژ پیکره می شود. در بین ویروس های RNA گیاهی با تقارن بیست وجهی (Icosahedral)، عناصری که به عنوان سیگنال های بسته بندی خاص عمل می کنند، فقط در مدل تک بخشی مثل ویروس چروکیدگی شلغم (*Turnip crinkle virus, TCV*) و سه بخشی مثل BMV شناسایی شده اند. با این حال، وجود سیگنال بسته بندی به تنهایی ضمانت کننده بسته بندی RNA ویروس ها نیست. چندین فاکتور از خصوصیات سیگنال بسته بندی مانند ساختار ثانویه، موقعیت ژنومی و محل آن (سیس یا ترانس) نیز بر بازده بسته بندی تأثیر می گذارد (Choi et al. 2003).

یکی از شناخته ترین سیگنال های بسته بندی و فرآیندهای مونتاژ، ویروس موزائیک توتون (TMV) است. در صورت عدم وجود اسیدنوکلئیک و تحت شرایط غیرفیزیولوژیکی، پروتئین پوششی در TMV می تواند در شرایط آزمایشگاهی به ساختاری شبیه کپسید مونتاژ شود. این نشان می دهد که نه حضور سیگنال بسته بندی و نه RNA یک نیاز مطلق برای مونتاژ کپسید آزمایشگاهی نیست. بنابراین این یک واقعیت است که کپسیدها می توانند بدون حضور RNA تحت شرایط محلول که بسیار متفاوت از فیزیولوژیکی است، مونتاژ شوند. در نتیجه برهم کنش پروتئین-پروتئین باید برای غلبه بر عدم وجود یک الگوی هسته ساز مثل سیگنال بسته بندی و RNA تغییر کند. TMV را می توان در حضور RNA هترولوگ مونتاژ کرد، با این حال این فرآیند در حضور RNA همولوگ TMV کارآمدتر است. نتایج مشابهی هنگام مقایسه مونتاژ پروتئین پوششی در TMV در حضور Pol I و PolyA و RNA همولوگ مشاهده شد. این نتایج با سازوکاری که

پروکسپید خالی، بسته بندی شود. این فرآیند، نشان دهنده تقاطعی از مسیرهای سنتز کسپید و DNA است که مرحله ضروری در مونتاژ ویروس می باشد. در این موارد DNA ویروس مثل Concatomer خطی از ژنوم ویروس تکثیر می یابد. کنکتومر در واقع یک مولکول DNA طویل است که از چند نسخه توالی DNA مشابه که به صورت پشت سرهم قرار گرفته اند ایجاد شده است که در نتیجه همانندسازی به روش دایره غلتان ساخته می شود. مونتاژ یک ویروس به طور هم زمان نیازمند ژنوم های منحصر به فرد است که از برش ژنوم کنکتومر ایجاد شده اند و در کسپید خالی بسته بندی می شوند. مانند ساخت یک کاردستی که برش های مختلف روی کاغذ ایجاد می شود و سپس با کنار هم قرار گرفتن و بسته بندی برش ها یک طرح به دست می آید. آنزیم Terminase به طور معمول در این ویروس ها نقش مستقیمی در بسته بندی ژنوم دارد. این آنزیم از زیرواحدهای کوچک ۲۱-۱۸ کیلودالتون و زیرواحدهای بزرگ ۷۲-۴۹ کیلودالتون تشکیل شده است (Catalano, 2005; Johnson, 2003).

بسته بندی ویروس هایی با ژنوم از نوع DNA از طریق اتصال ویژه پروتئین های ترمیناز به محل آغاز بسته بندی روی کنکتومر ویروس انجام می شود. تشخیص ویژه ژنوم DNA با زیرواحد کوچک ترمیناز انجام می گیرد. پس از مونتاژ یک هسته فعال متمرکز در زیرواحد بزرگ، دو رشته را می برد و یک ژنوم نهایی بالغ آماده سازی شده جهت بسته بندی DNA تشکیل می شود. سپس این نوکلئوکسپیدها به یک درگاه حلقه ای شکل متصل می شوند که در یک رأس کسپید مستقر می گردد و با ایجاد شکافی، DNA وارد کسپید می شود. جزئیات این برهم کنش ها مبهم است. در این نوع ویروس ها بسته بندی با هیدرولیز ATP تأمین انرژی می کند. توسعه و ایجاد کسپیدی با ساختار زاویه دار نیازمند سازماندهی پروتئین های کسپید می باشد و پیوند فیزیکی متقابل بین زیرواحدهای پروتئینی کسپید سبب تثبیت، استحکام و نیز ایجاد یک ساختار ایده آل می شود. در واقع یک موتور بیولوژیکی منجر به بسته بندی DNA به صورت فشرده می شود. ترمیناز دوباره دو رشته را برش می زند تا ژنوم فرآیند بسته بندی را کامل کند و کسپید پر از DNA (کمپلکس ترمیناز-کنکتومر) می شود. فعالیت نوکلئازی زیرواحد بزرگ ترمیناز یک روش مؤثر جهت برش شدن

در آن سیگنال بسته بندی به عنوان یک هسته برای مونتاژ کسپید است، مطابقت دارد. در حقیقت اختلال در سیگنال های بسته بندی برای جلوگیری از مونتاژ آزمایشگاهی کافی می باشد. به عنوان مثال اتصال مولکول های آلی کوچک به سیگنال های بسته بندی برای جلوگیری از این فرآیند کافی است. این پدیده مهار با واسطه دارو از فرضیه ای پشتیبانی می کند که در آن مونتاژ آزمایشگاهی TMV بسیار وابسته به وجود سیگنال های بسته بندی باشد (Gao et al. 2012).

پژوهشگران از آزمایشات جداسازی برای شناختن سیگنال بسته بندی TCV استفاده کردند و دریافتند که سیگنال بسته بندی این ویروس یک توالی RNA کوچک در ژن پروتئین پوششی است. آن ها سیگنال بسته بندی TCV را در gRNA ویروس کوتولگی بوته انبوهی گوجه فرنگی (Tomato bushy stunt virus, TBSV) وارد کردند (که به آن chimeric RNA گویند) تا بتوانند آزمایشات رقابت بین این دو ویروس را در پروتوپلاست انجام دهند. این آزمایشات نشان داد که قرار دادن سیگنال بسته بندی TCV درون gRNA ویروس TBSV، باعث بسته بندی RNA غیرهم جنس TBSV توسط پروتئین پوششی TCV می شود. آن ها همچنین نشان دادند که بازده بسته بندی chimeric RNA نیز به طول RNA بستگی دارد. با نزدیک شدن طول chimeric RNA به wild-type (WT) بازده بسته بندی افزایش می یابد (Comas et al. 2012).

مکانیسم بسته بندی در ویروس های گیاهی با ژنوم DNA : در خانواده های ویروسی *Geminiviridae* و *Caulimoviridae* که آلوده کننده گیاهان هستند، اسیدنوکلئیک از نوع دئوکسی ریبونوکلئیک (DNA) است (Matthews, 1979). مسیرهای مونتاژ ویروس ها با هم متفاوت است، اما در برخی گروه ها، ویژگی های مشترک دیده می شود. به عنوان مثال در ویروس های dsDNA علی رغم تفاوت های آشکار آن ها، مسیرهای مشترکی وجود دارد. آلودگی سلول میزبان در نهایت منجر به سنتز پروتئین های کسپید می شود که به صورت مجتمع هستند. هم زمان DNA ویروس تولید نسخه های متعددی از ژنوم ویروس می کند. در مونتاژ یک ویروس آلوده کننده، ژنوم باید در ناحیه منحصر به فردی از

پژوهش ها نشان داده است که کپسید ذرات ویروسی بیست وجهی مانند ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی (Cowpea mosaic virus, CPMV) تحریک کننده سیستم ایمنی بوده و گزینه امیدوارکننده ای برای درمان های ایمنی و تولید واکسن هستند. ویروس های گیاهی مزایای سیستم های انتقال ویروسی و غیرویروسی را با هم دارند، زیرا در سیستم های جانوری و انسانی بیماری را نمی شنوند، در ژنوم ادغام نمی شوند و در نهایت ایمنی بیشتری ایجاد می کنند (Wen et al. 2020). بنابراین از آنجا که ذرات ویروسی در ساختار، پتانسیل و نحوه عمل تفاوت های زیادی دارند، لذا مطالعه و ارزیابی جزئیات کپسید و پیکره این نانوذرات زیستی و سازوکارهای بسته بندی آنها می تواند اطلاعاتی مفیدی را فراهم نماید تا در جهت استفاده صحیح از آنها در نیازمندی های دارویی و افزایش کارایی انتقال مورد استفاده قرار گیرد (Yildiz et al. 2011).

نتیجه گیری

ژنوم ویروس های ssRNA، یک اسیدنوکلئیک منحصربه فرد است، از این جهت که (۱) حاوی حداقل اطلاعات ژنتیکی مورد نیاز برای چرخه آلودگی است. (۲) الگوی برای تکثیر RNA است. (۳) یک mRNA است. (۴) می تواند به عنوان داربست در هنگام مونتاژ پیکره عمل کند. (۵) باید بتواند ساختارهای مختلف RNA را برای تنظیم فرایندها در طی چرخه آلودگی ارائه دهد. همچنین از یک طرف باید با RNA های سلولی معماری مشابه داشته باشد تا بتواند ترجمه شود و از پاسخ سلولی حفاظتی در برابر dsRNA فرار کند و با عوامل سلول میزبان برهم کنش داشته باشد. از طرفی دیگر باید آن قدر از RNA های سلولی متفاوت باشد که توسط RdRp شناسایی و در حین مونتاژ به صورت انتخابی بسته بندی شود. بسته بندی ویروس هایی با ژنوم از نوع DNA از طریق اتصال ویژه پروتئین های ترمیناز به محل آغاز بسته بندی روی کنکומר ویروس انجام می شود و این فرایند به نیاز به انرژی دارد. لازم به ذکر است که بسته بندی و مونتاژ اسیدنوکلئیک ویروس در حضور جمعیت زیاد و متنوعی از RNA های سلولی و مشتق شده از ویروس های مختلف رخ می دهد، با این حال فقط ژنوم ویروس مورد نظر بسته بندی می شود

فضای کپسید است. اضافه کردن پروتئین های پایان، مونتاژ یک ویروس آلوده را کامل می کند و آغازی برای تکرار چرخه بسته بندی DNA است (Catalano, 2005; Johnson, 2003).

کاربرد بسته بندی ژنوم و نوکلئوکپسیدها: سطح داخلی پوشش پروتئینی ویروس بار مثبت دارد و می تواند به طور مستقیم برای بسته بندی و کپسوله کردن مولکول هایی با بار منفی استفاده شود. علاوه بر این، سطح داخلی کپسید می تواند از طریق طراحی های پروتئینی و مهندسی ژنتیک تغییر کند و در حالی که توانایی مونتاژ را حفظ می کند، بار منفی خالصی را ارائه دهد. بر اساس این اصول، مولکول ها و داروهایی که بار مثبت دارند نیز می توانند درون کپسید ویروس بسته بندی شوند (Singh et al. 2006; Costello et al. 2013). ویروس ها به طور معمول مواد ژنتیکی خود را درون کپسید بسته بندی می کنند. اما اصولی که برای بسته بندی RNA و DNA ویروسی استفاده می شود، می تواند برای بسته بندی محموله یا بارهای وظیفه دار نیز استفاده شود. پیکره های ویروسی به خاطر داشتن مزایایی از جمله سازگاری زیستی، قابلیت حل در آب و کارایی بالا می توانند به عنوان سیستم های ناقل پروتئین عمل کنند. بنابراین می توان از پوشش پروتئینی چند بعدی ویروس های میله ای یا ایزومتری که به عنوان نانوذرات زیستی در داروسازی استفاده کرد (Khot et al. 2012; Alishiri et al. 2015). از نانوذرات ویروسی می توان برای رساندن محموله های دارویی سمی به تومورها در سلول های سرطانی استفاده کرد که به دلیل تجمع دارو در داخل تومور، سبب کاهش عوارض جانبی و سیستمیک می شوند. بدین منظور، در صورت استفاده از PVX (Potato virus X)، سازوکارهای فعال هدف گیری و تجمع نانوذرات در تومورها از طریق فرایندهای غیرفعال افزایش می یابد. PVX با ساختار رشته ای انعطاف پذیر به عنوان یک نانوذره مبتنی بر پروتئین، به دلیل ابعاد بزرگتر در مقایسه با نانو ذرات کروی، توانایی بالاتری در مهار تومور دارد و می تواند محموله های زیادی را حمل کند و به جهت خواص عملکردی منحصربه فرد، در پزشکی بسیار مناسب تر از نانومواد مصنوعی عمل می کند. علاوه بر این، نانوذرات PVX دارای سمیت بسیار کمی در داخل بدن هستند (Roder et al. 2019). هرچند که ساختار رشته ای PVX باعث افزایش کارایی انتقال در تحویل دارو می شود، اما

در این بین، نانوذرات ویروسی با منشاء گیاهی، احتمال بیماری-زایی و نیز عوارض جانبی کمتری برای انسان و محیط زیست دارند که از آن جمله می توان به PVX با کارایی بالا در تحویل دارو و CPMV جهت تحریک سیستم ایمنی و تولید واکنش اشاره کرد (Alishiri et al. 2015; Wen et al. 2020). بنابراین مطالعه هرچه بیشتر جزئیات و سازوکارهای بسته بندی و ارزیابی پیکره این نانوذرات زیستی، کارایی و استفاده مفید از آن ها را در علوم مرتبط افزایش می دهد.

(Twarock et al. 2018). اصولی که برای بسته بندی RNA و DNA ویروسی استفاده می شود، می تواند برای بسته بندی مولکول ها یا بارهای وظیفه دار نیز استفاده شود. بنابراین پیکره های ویروسی ایزومتریک و میله ای با ساختار هندسی منظم و منحصربه فرد، می توانند به عنوان نانوذرات زیستی در رشته های مختلف از جمله داروسازی مورد استفاده قرار گیرند. عدم سازگاری مطلوب زیستی و سمیت نانوذرات شیمیایی سبب شده است که امروزه استفاده از نانوذرات زیستی مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- Alishiri A, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H. 2015.** Using viruses as carriers for drug delivery. *New cellular & molecular biotechnology journal* 5 (17): 57-68. (In Farsi with English Abstract).
- Annamalai P, Rao ALN. 2006.** Packaging of *Brome mosaic virus* subgenomic RNA is functionally coupled to replication-dependent transcription and translation of coat protein. *Journal of Virology* 80: 10096-10108.
- Borodavka A, Tuma R, Stockley PG. 2012.** Evidence that viral RNAs have evolved for efficient, two-stage packaging. *National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 15769-15774.
- Cadena-Nava RD, Comas-Garcia M, Garmann RF, Rao AL, Knobler CM, Gelbart WM. 2012.** Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: Requirement for a specific high protein/ RNA mass ratio. *Journal of Virology* 86: 3318-3326.
- Catalano EC. 2005.** *Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structure and Mechanism.* Plenum Publishers, chapter 1.
- Chatel-Chaix L, Bartenschlager R. 2014.** Dengue virus and hepatitis c virus-induced replication and assembly compartments: The enemy inside caught in the web. *Journal of Virology* 88: 5907-5911.
- Chaturvedi S, Rao AL. 2014.** Live cell imaging of interactions between replicase and capsid protein of *Brome mosaic virus* using bimolecular fluorescence complementation: Implications for replication and genome packaging. *Virology*: 464-465.
- Choi YG, Rao AL. 2003.** Packaging of *Brome mosaic virus* RNA3 is mediated through a bipartite signal. *Journal of Virology* 77: 9750-57.
- Comas-Garcia M, Cadena-Nava RD, Rao AL, Knobler CM, Gelbart WM. 2012.** In vitro quantification of the relative packaging efficiencies of single-stranded RNA molecules by viral capsid protein. *Journal of Virology* 86: 12271-12282.
- Comas-Garica M. 2019.** Packaging of Genomic RNA in Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses: A Complex Story. *Viruses* 11: 253.

- Costello DA, Hsia CY, Millet Y, Porri T, Daniel S. 2013.** Virus-like proteoliposomes and proteinaceous supported bilayers for drug delivery and screening applications. *Alche Annual meeting November 3-8.* Hilton San Francisco Union Square, San Francisco, CA.
- Damayanti TA, Tsukaguchi S, Mise K, Okuno T. 2003.** Cis-acting elements required for efficient packaging of *Brome mosaic virus* RNA3 in barley protoplasts. *Journal of Virology* 77: 9979-9986.
- Diaz A, Zhang J, Ollwerther A, Wang X, Ahlquist P. 2015.** Host esct proteins are required for *bromovirus* RNA replication compartment assembly and function. *PLOS Pathogens* 11, e1004742.
- Gao S, Zhang R, Yu Z, Xi Z. 2012.** Antofine analogues can inhibit *Tobacco mosaic virus* assembly through small-molecule-RNA interactions. *ChemBioChem*. 13: 1622-1627.
- Green TJ, Cox R, Tsao J, Rowse M, Qiu S, Luo M. 2014.** Common mechanism for RNA encapsidation by negative-strand RNA viruses. *Journal of Virology*. Apr: 88(7): 3766-75.
- Johnson JE. 2003.** Virus particle dynamics. *Advances in Protein Chemistry* 64: 197-218.
- Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, Schuster EW. 2012.** Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Protection* 35: 64-70.
- Matthews REF. 1979.** *Plant virology*, Academic Press. Pp. 1. 897.
- Pakbaz S, Pazhouhandeh M, Eini Gandomani O and Sokhandan N. 2018.** Induction of Resistance to *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) by RNA Silencing Method. *Journal of Cellular and Molecular Research* 31(2): 137-150. (In Farsi with English Abstract).
- Pakbaz S, Pazhouhandeh M, Eini Gandomani O. 2016.** A method for Evaluation of RNA Silencing Suppression Activity in Plants Using to Proteins of *Grapevine fanleaf virus*, *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 4(2): 135-144. (In Farsi with English Abstract).

- Rao ALN. 2006.** Genome Packaging by Spherical Plant RNA Viruses. *Annual Review of Phytopathology* 44: 3.1-3.27.
- Roder J, Dickmeis C, Commandeur U. 2019.** Small, Smaller, Nano: New Applications for Potato Virus X in Nanotechnology. *Front. Plant Sci.* 10:158. doi: 10.3389/fpls.2019.00158.
- Simon AE, Roossinck MJ, Havelda Z. 2004.** Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annual Review Phytopathology* 42: 415–37.
- Singh P, Gonzalez M, Manchester M. 2006.** Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research* 67: 23-41.
- Tapia-Moreno A, Juarez-Moreno K, Gonzalez-Davis O, Cadena-Nava RD, Vazquez-Duhalt R. 2017.** Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal* 12.
- Tworock R, Bingham RJ, Dykeman EC, Stockley PG. 2018.** A modelling paradigm for RNA virus assembly. *Current Opinion in Virology* 31, 74–81.
- Venter PA, Krishna NK, Schneemann A. 2005.** Capsid protein synthesis from replicating RNA directs specific packaging of the genome of a multipartite, positive-strand RNA virus. *Journal of Virology* 79: 6239–48.
- Wang X, Ren J, Gao Q, Hu Z, Sun Y, Li X, Rowlands DJ, Yin W, Wang J, Stuart DL. 2015.** Hepatitis a virus and the origins of picornaviruses. *Nature* 517: 85–88.
- Wen AM, Lee KL, Steinmetz NF. 2020.** Plant Virus-Based Nanotechnologies. In: Norris, P., Friedersdorf, L. (eds) *Women in Nanotechnology. Women in Engineering and Science*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19951-7_5
- Yildiz I, Shukla S, Steinmetz NF. 2011.** Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current opinion in biotechnology* 22(6): 901-908.