

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۹ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۶ صفحات ۱۱۴-۱۰۹

بررسی پردازش پلی پروتئین در پاراکوویروس انسانی تیپ ۱ به روش کلونینگ و بیان ژن

دکتر فریده قاضی: استادیار میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران: نویسنده رابط

E-mail: frida@iums.ac.ir

علی اکبر گرزین: کارشناس ارشد ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
بهاره دبیر منش: کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه الزهرا
دکتر عبدالعزیز رستگار لاری: استاد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

دریافت: ۸۵/۴/۲۹، پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۹

چکیده

زمینه و اهداف: پاراکوویروس انسانی جزو خانواده پیکورناویریده می باشد. همه ویروس های این گروه دارای یک پروتئاز مهم 3C می باشند که در پردازش پروتئین و تکثیر ویروس رل مهمی دارد. بدین جهت این تحقیق برای بررسی پردازش پلی پروتئین در پاراکو ویروس انسانی تیپ یک به روش کلونینگ و بیان ژن 3C طراحی گردید.

روش بررسی: ناحیه کد کننده پروتئین 3C از cDNA تهیه شده از ژنوم پاراکو ویروس انسانی تیپ یک در پلاسمید pUBS با آنزیم لیگاز وارد و پلاسمید نو ترکیب تهیه گردید. پس از انتقال پلاسمید و تکثیر آن در باکتری به طریق استخراج با فنل DNA جدا شد. و سپس در سیستم پروکاریوتی و روش درون لوله ای تحت پروموتور T7 بیان گردید. نتایج با پلی آکریل آمید ژل الکترو فورز بررسی شد.

یافته ها: با بررسی محصول بیان پلاسمید نو ترکیب فاقد ژن 3C در هر دو سیستم پروکاریوتی و درون لوله ای فقط یک باند بزرگ هم اندازه محصول اولیه ترجمه مشاهده گردید. در صورتیکه وقتی محصول بیان پلاسمید نو ترکیب حاوی 3C در هر دو سیستم توسط پلی آکریل آمید ژل بررسی شد، بجای یک باند بزرگ، چندین باند کوچک مشاهده شد که کوچکتر از محصول اولیه تر جمه بودند که دلالت بر خاصیت پروتئاز پروتئین 3C می کند. در ضمن برای اثبات نتایج آنتی پروتئاز به محصول پلاسمید حاوی ژن 3C اضافه گردید، نتیجه مشابه محصولات حاصل از بیان پلاسمید فاقد ژن 3C بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که پاراکو ویروس های انسانی تیپ ۱ از نظر فعالیت پروتئولیتیکی متفاوت از دیگر پیکورنا ویروسها می باشند و در این ویروسها فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئاز بوده و کلیه کلیواژهای و پردازش پلی پروتئین اولیه که حاصل ترجمه ژنوم RNA ویروس است توسط این پروتئاز انجام می شود.

کلید واژه ها: پاراکو ویروس انسانی، پروتئاز 3C، پلاسمید نو ترکیب، کلونینگ، بیان ژن

مقدمه

خصوصیات بیولوژیکی و ملکولی اختلافاتی با اعضای دیگر این خانواده دارند (۹).

ژنوم پیکورنا ویروسها پس از آلوده نمودن سلول در سیتوپلاسم بصورت یک پلی پروتئین بزرگ ترجمه می شود سپس توسط پروتئازهای ویروسی به پروتئین های ساختمانی و غیر ساختمانی می شکند (۱۰-۱۲). کلیواژ پروتئولیتیکی پلی پروتئین ویروسی برای چرخه تکثیر ویروس ضروری می باشد و باعث تشکیل پروتئینهای کپسیدی و پروتئینهای غیر ساختمانی از محصول اولیه ترجمه می شود. در اغلب پیکورنا ویروسها کلیواژ اولیه پلی پروتئین توسط پروتئاز 2A و بقیه کلیواژها توسط پروتئاز 3C انجام می شود (۱۳). اما در هپاتو ویروس ها پروتئین 2A فاقد

خانواده پیکورنا ویریده شامل ویروس های کوچک بدون پوشش با ژنوم RNA تک رشته ای با قطبیت مثبت میباشد طول ژنوم این ویروسها از ۹۵۰۰ - ۷۰۰۰ نوکلئوتید است که در داخل کپسیدی که از ۶۰ کپی از پروتئین های کپسیدی VP1-VP4 تشکیل شده است قرار دارند (۳-۱). پاراکو ویروس های انسانی یکی از جنس های پیکورنا ویروس ها هستند (۴) و از نظر ژنتیکی دارای پنج گروه می باشند (۵) که تیپ های یک، دو و سه آن برای انسان بیماری زا می باشند (۶). این ویروسها عامل گاستروانتریت، بیماری های دستگاه تنفسی و بندرت عامل عفونت سیستم عصبی مرکزی می باشند (۷و۸). ترتیب ژنوم پاراکو ویروس ها شبیه پیکورنا ویروس های دیگر می باشد اما از نظر

پلاسمیدها در باکتری E.coli سوش MC1022 که با کلرور کلسیم بحالت سلول های مستعد (Competent Cells) در آورده شده بود (۲۳) توسط شوک حرارتی ترانسفورم گردید (۲۴). پس از استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب با روش فنل و کلروفورم و رسوب دادن توسط اتانول و استات سدیم ۳ مولار (۲۵) برای تائید، پلاسمیدها توسط آنزیمهای محدودالایر (HindIII, BamHI, PstI) هضم شده و با آگارز ژل الکتروفورز پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و عکسبرداری با Gel document بررسی گردیدند. سپس بکمک PCR (۳۰ سیکل در ۹۴°C یک دقیقه، ۵۶°C یک دقیقه و ۷۲°C یک دقیقه و پنج دقیقه در ۷۲°C) و یک جفت پرایمر تهیه شده از ژن 3C تائید و در نهایت تعیین توالی گردیدند. سپس پلاسمیدهای مورد نظر در سیستم پروکاریوتی با استفاده از باکتری E.coli سوش BL-21(DE3) بیان شدند (۲۶). برای بیان ژن ابتدا باکتری در محیط SOB حاوی $MgCl_2$ و KCl به مرحله لگاریتمی رشد وارد شد (۲ تا ۳ ساعت). سپس پلاسمیدهای نو ترکیب در باکتری ترانسفورم شده و توسط IPTG با غلظت ۰/۱ میلی مولار بیان ژن القا گردید (۲۷ و ۲۸). از این باکتری ها در زمانهای صفر، ۱، ۲ و ۳ ساعت پس از القاء با IPTG نمونه برداری صورت گرفت. سپس نمونه را سانتریفوژ نموده و رسوب حاصل را در بافر لیز کننده محتوی SDS به حالت سوسپانسیون در آورده و نمونه های لیز شده را در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار دادیم تا همه نمونه ها جمع آوری گردید. این پلاسمیدها در سیستم درون لوله ای و با استفاده از کیت *In vitro* Cell Free T7/SP6 Transcription / Translation محصول شرکت Roche آلمان، تحت پروموتور T7 بیان شدند. پس از بیان پلاسمیدها، محصولات پروتئینی در SDS-PAGE پس از رنگ آمیزی گیمسا بررسی و مقایسه گردیدند. پرایمرهای استفاده شده در PCR:

Forward Primer: 5'GGTGAATAACGGTACCAGCTGG3'
Reverse Primer: 5'GATTTATAAACTCAGTGGTGATCATC3'

یافته ها

جهت بررسی پردازش پلی پروتئین و خاصیت پروتئازی پروتئین 3C، چندین پلاسمید نو ترکیب بدون ژن 3C (pFG1, pFG1.1) و واجد ژن 3C (pFG3) مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسمید اصلی pFG1 می باشد بقیه پلاسمیدها با استفاده از آن ساخته شدند. تجربیات گذشته با ویروس های دیگر نشان داده که کوتاه کردن ناحیه غیر قابل ترجمه 5'-UTR باعث افزایش سنتز پروتئین می شود بدین منظور پلاسمید pFG1.1 ساخته شد که آن مشابه pFG1 است؛ با این تفاوت که بخش 5'-UTR آن ۶۷۲ نوکلئوتید کوتاه تر می باشد. پلاسمید pFG3 واجد همان بخش های pFG1 بعلاوه بخش کد کننده 3C و دنباله (A) poly است (شکل ۱).

پس از تکثیر پلاسمیدها و استخراج DNA آنها، برای تأیید با آنزیمهای محدود الاثر بطور مجزا هضم شده و الکتروفورز

فعالیت پروتئازی بوده و در پردازش پلی پروتئین ویروس دخالتی ندارد و تمام کلیواژها توسط پروتئاز 3C انجام می گیرد (۱۶-۱۴). اخیرا با آنالیز ملکولی ژنوم پاراکوویروس ها نشان داده شده که یک همولوگی در ناحیه کد کننده پروتئین 2A بین این ویروس ها با هپاتوویروس ها وجود دارد (۱۷) و پروتئین 2A در پاراکوویروس هانیز فاقد فعالیت پروتئازی می باشد (۱۱ و ۱۸). همه پیکورنا ویروسها دارای یک پروتئاز 3C می باشند که برای بلوغ و تکثیر ویروس ضروری است. با تعیین توالی اسیدهای آمینه و مطالعه ساختمان سه بعدی پروتئین 3C با اشعه X مشخص شده که این پروتئین مشابه کیموتریپسین و جزء سرین پروتئازها می باشد (۱۹ و ۲۰). اخیرا یک سری ممانعت کننده های 3C پروتئازها طراحی شده که بعنوان آنتی ویروس برای پاتوژن های پیکورنا ویروس های انسانی می باشند (۲۱). با توجه باینکه در پاراکو ویروس های انسانی پروتئین 2A فاقد فعالیت پروتئازی می باشد و در پردازش اولیه پلی پروتئین ویروس نقشی ندارد لذا برای بررسی بیشتر پردازش پلی پروتئین و سنتز پروتئین های ویروسی قسمتی از cDNA کد کننده پروتئین 3C کلون شده و توسط بیان ژن مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

cDNA ژنوم پاراکو ویروس انسانی تیپ یک (سویه Harris) توسط آنزیم نسخه برداری معکوس (Reverse Transcriptase-RT) و با استفاده از پرایمر 17(dt) تهیه و سپس توسط (Polymerase Chain reaction) PCR تکثیر داده شد، محصول PCR در وکتور pBS با استفاده از آنزیم های محدود کننده که محل برش آنها در روی پرایمر تعبیه شده بود کلون گردید (۲۲).

برای بررسی فعالیت پروتئازی پروتئین 3C در پاراکوویروس انسانی تیپ یک (HPEV1) سه پلاسمید pFG1.1, pFG1, pFG3 مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه پلاسمید pFG1 بخشی از cDNA پاراکوویروس که واجد ژن 2A و VP1 بود، با آنزیم های محدود کننده Hind III و EcoRI 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 SmaI وارد (Ligate) گردید.

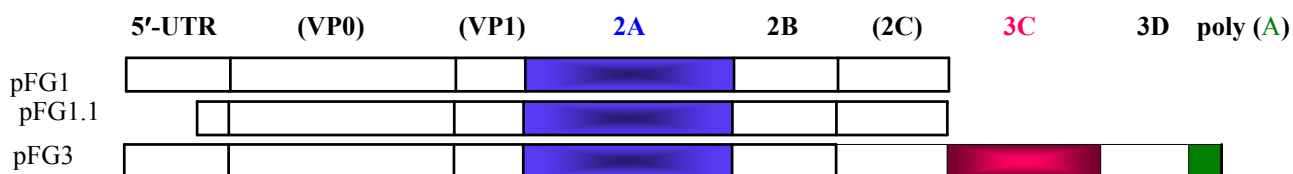
پلاسمید pFG1.1 به طول ۴۸۲۸ جفت باز می باشد. پلاسمید pFG1 را با آنزیم BamHI هضم کرده در وکتور pUBS که با BamHI بریده شده بود متصل و در نتیجه پلاسمید pFG1.1 که ۶۷۲ نوکلئوتید کوتاه تر از پلاسمید pFG1 بود تهیه شد. پلاسمید pFG3 به طول ۸۶۳۸ جفت باز ناحیه کد کننده پروتئین 3C (۷۳۳۸-۴۲۰۰) از ژنوم پاراکوویروس 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 شدند. در نتیجه پلاسمید نو ترکیب pFG3 تهیه گردید. برای تکثیر این

های حاصل، طرح های متفاوتی در ژل مشاهده می شود. بدین ترتیب که در محصولات حاصل از بیان پلاسمیدهای نوترکیب فاقد ناحیه 3C (pFG1 و pFG1.1) یک بند سنگین در حدود ۹۰ کیلو دالتون دیده می شود. این بند سنگین در کنترل منفی (وکتور بیانی خالی pUBS) مشاهده نمی شود. اما در محصولات حاصل از بیان پلاسمید واجد ژن 3C (pFG3) به جای این بند سنگین ۹۰ کیلو دالتونی چندین بند سبک (بین ۲۰ تا ۴۵ کیلو دالتونی) مشاهده می شود (شکل ۳).

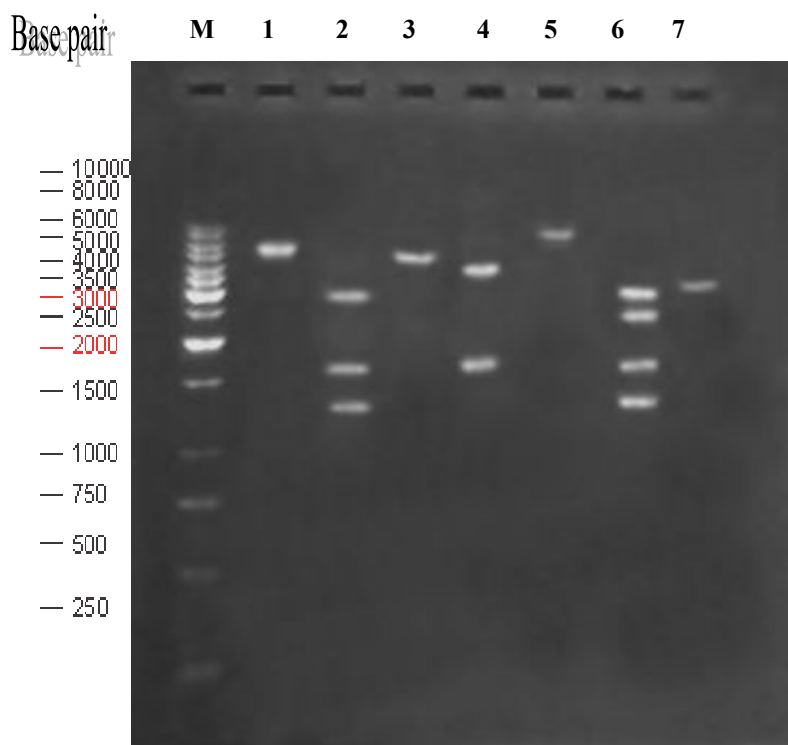
نتایج حاصل از بیان پلاسمیدها در سیستم درون لوله ای نیز نتایج بدست آمده در سیستم پروکاریوتی را تأیید میکند با این تفاوت که در این سیستم بعلت فقدان سلول بند ها واضح تر دیده می شوند.

گردیدند و اندازه هر قطعه با توجه به مارکر DNA مشخص شد (شکل ۲).

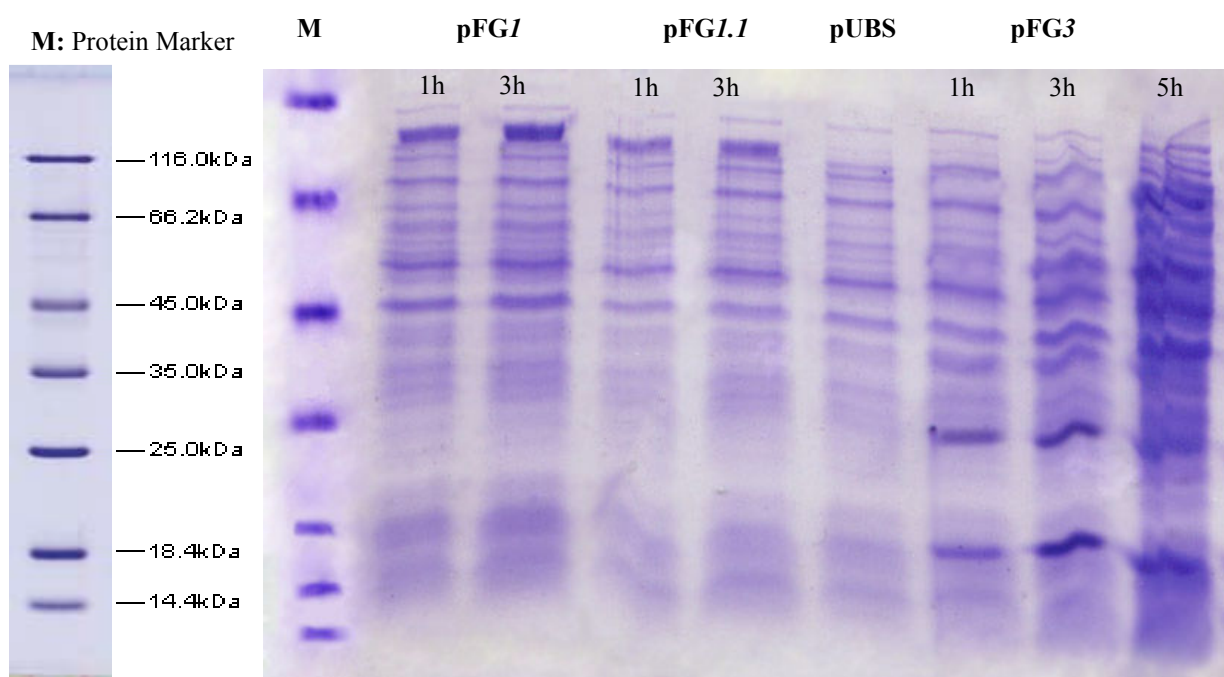
محصول PCR پلاسمید نوترکیب pFG3 یک قطعه DNA بطول ۶۳۰ جفت باز بود. این پلاسمیدها پس از تعیین توالی در پروکاریوت ها و سیستم درون لوله ای تحت پروموتور T7 بیان گردیدند (۲۹). برای بیان در پروکاریوت ها از باکتری E.Coli BL-21 استفاده شد این باکتری به کمک فاژ لامبدا لیزوژن شده است و در کروموزوم آن ژن T7 RNA Polymerase قرار دارد. به کمک این آنزیم از روی ژنهایی که در ابتدای آن ها پروموتور T7 قرار دارد، یک mRNA تولید شده و این mRNA توسط میزبان به پروتئین ترجمه می گردد همانطور که شکل شماره ۳ نشان می دهد، پس از بیان پلاسمیدهای نوترکیب و الکتروفورز پروتئین



شکل ۱) پلاسمیدهای طراحی شده برای بررسی فعالیت پروتئینی پروتئین 3C. نواحی نشان داده شده در پراتر بخشهای ناقصی از ژنهای مرتبط می باشند. همانگونه که در تصویر آمده است، pFG1 دارای بخشهای کاملی از 5'-UTR، 2A، 2B، و بخش های ناقصی از VP0، VP1، و 2C می باشد. در pFG1.1 ناحیه 5'-UTR به میزان ۶۰۰ نوکلئوتید از pFG1 کوتاه تر می باشد. پلاسمید pFG3 واجد تمامی نواحی pFG1 به علاوه توالی های 3C، 3D و دنباله polyA می باشد.



شکل ۲) نتایج بررسی اثر آنزیم های محدودالایز بر روی پلاسمیدهای طراحی شده. در سمت چپ مارکر 1kb و وزن مولکولی مربوط به هر بند مشخص شده است. ۱- پلاسمید pFG1 ۲- پلاسمید pFG1 برش داده شده با آنزیم Pst1 ۳- پلاسمید pFG1.1 ۴- پلاسمید pFG1.1 برش داده شده با آنزیم Pst1 ۵- پلاسمید pFG3 ۶- پلاسمید pFG3 برش داده شده با آنزیم Pst1 ۷- پلاسمید pUBS. (نمونه ها در آگارز ۰/۸ درصد بمدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز گردید).



شکل ۳) نتایج بیان ژن پلاسمیدهای نو ترکیب در سیستم بیانی پروکاریوتی (باکتری *E. coli* سوش BL-21(DE3)). شکل فوق بیانگر نمونه های جمع آوری شده در ساعاتی مختلف بیان ژن پلاسمیدهای نو ترکیب می باشد. پس از مارکر پروتئینی M در خطوط ۲ و ۳ محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید pFG1 در زمانهای یک و سه ساعت پس از القا. بیان ژن با IPTG قرار داده شده است. در خطوط ۴ و ۵ پلاسمید pFG1.1 در زمانهای یک و سه ؛ در خط سوم وکتور خالی pUBS به عنوان شاهد منفی و در خطوط ۷ الی ۹ محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید pFG3 قرار دارد. همانطور که مشاهده می شود پس از القا بیان ژن ، محصولات پروتئینی حاصل از پلاسمید های pFG1 و pFG1.1 در مقایسه با وکتور شاهد pUBS یک بند سنگین در حدود ۹۰ کیلو دالتون بیان شده است (این پروتئین همان پلی پروتئین اولیه است که هیچ کلیواژی روی آن صورت نگرفته است). در نقطه مقابل در محصولات پروتئینی حاصل از بیان ژن پلاسمید نو ترکیب pFG3 این بند پروتئینی سنگین وزن وجود نداشته و در عوض سه بند سبک وزن ۲۰ تا ۴۰ کیلو دالتونی مشاهده گردید. این موضوع دلالت بر کلیواژ پلی پروتئین اولیه توسط پروتئاز ویروسی می باشد. در سمت چپ تصویر مارکر پروتئینی و وزن های مولکولی مرتبط با هر بند آمده است. (لازم به ذکر است که نمونه های زمان صفر قبل از اضافه نمودن IPTG " و ۲ ساعت پس از القا بیان ژن در این تصویر لحاظ نگردیده است).

بحث

پروتئین 3C در پیکورناویروس ها یک پروتئاز مهم ویروسی است که کلیواژهای پلی پروتئین را که نتیجه ترجمه RNA ویروسی است کاتالیز و تولید پروتئین های بالغ ویروسی می کند، بنا بر این عملکرد آن برای تکثیر و عفونت زایی ویروس ضروری است و می تواند یک هدف خوبی برای داروهای ضد ویروسی باشد اخیراً پروتئین 3C پیکورناویروس ها توسط ممانعت کننده های پروتئازی طبقه بندی شده و مشخص شده که متعلق به گروه سیستئین پروتئازها میباشد (۳۰) و توالی GXCG و YGDD در فعالیت کاتالیتیکی آن مهم است این موضوع در پاراکوویروس های انسانی تیپ ۲ و ۳ نیز نشان داده شده است (۱۹ و ۳۱).

در پاراکو ویروسها پروتئاز L (L^{Pro}) وجود ندارد (۱۳) و از طرفی در تحقیقات قبلی نشان داده شده که بخش 2A نیز در این جنس فاقد فعالیت پروتئازی بوده و در پردازش پلی پروتئین اولیه نقشی ندارد مانند حالتی که در هپاتو ویروسها مشاهده می شود (۱۴، ۱۵، ۱۸). در مطالعات قبلی برای بررسی پردازش پلی پروتئین پیکورناویروس های دیگر غالباً از روش بیان در باکتریها و سیستم

Transcription / Translation *in vitro* رونویسی و ترجمه توام استفاده شده است. با توجه به این اطلاعات ، در این تحقیق نیز برای بررسی خاصیت پروتئازی 3C و پردازش پلی پروتئین اولیه در پاراکو ویروس انسانی تیپ ۱ ناحیه 3C از cDNA این ویروس در وکتور بیانی pUBS کلون شده و تحت پروموتور T7 در باکتری و سیستم درون لوله ای رونویسی و ترجمه توام بیان شد و محصول آن با نتیجه بیان پلاسمید های نو ترکیب بدون ژن 3C در ژل الکترو فورز مقایسه گردید. در محصول ترجمه پلاسمیدهای بدون 3C فقط یک بند بزرگ که هم اندازه پلی پروتئین اولیه بود مشاهده گردید که نشان دهنده عدم پردازش پلی پروتئین است در صورتیکه در محصول بیان پلاسمید حاوی 3C چندین باند سبک کوتاه تر از محصول اولیه دیده شد که این موضوع نشان دهنده کلیواژ پلی پروتئین اولیه توسط پروتئاز 3C می باشد.

قابل ذکر است که نتایج بدست آمده از این مطالعه نتایج قبلی را در مورد اینکه در پاراکو ویروس ها پروتئین 2A فاقد فعالیت پروتئولیتیک می باشد (۱۳، ۱۸، ۳۲) را تأیید میکنند. تحقیقات

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق می توان عنوان نمود که پاراکو ویروسهای انسانی تیپ یک از نظر فعالیت پروتئولیتیکی متفاوت از دیگر اعضای خانواده پیکورنا ویروس ها می باشند و بنظر می رسد که در این ویروسها مانند هپاتوویروس ها فقط پروتئین 3C دارای خاصیت پروتئازی بوده و پردازش پلی پروتئین اولیه که نتیجه ترجمه ژنوم RNA ویروس است توسط این پروتئاز انجام می شود.

تقدیر و تشکر

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران که در طول انجام این پروژه تحقیقاتی با کمک مالی ما را یاری نمودند. و از همکاری صمیمانه پروفسور گلین استنوی (دانشگاه Essex انگلستان) بخاطر تهیه RNA ویروس و تعیین توالی پلاسمیدهای نو ترکیب قدردانی می گردد.

References

- Rueckert R R. Picornaviridae: The viruses and their replication, In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M. *Field's virology*. Raven Press Ltd., New York, N.Y. 1996; PP: 609-654.
- Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolutions. *Science*. 1985; **229**: 1358-1365.
- Ghazi F, Hughes PJ, Hyypiä T, Stanway G. Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). *J Gen Virol* 1998; **79**: 2641-2650.
- Van Regenmortel HV, Bishop DHL, Fauquet CM, *Virus Taxonomy: Seventh report of ICTV*. Academic press, London. 2000; 662-712.
- Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G. Analysis of human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 2007; **81**: 1013-1021.
- Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 2004; **85**: 391-398.
- Shinichi T, Yukie S, Masahiro N, and Shizuyo T. The isolation of human parechovirus type 1 from cases of acute respiratory illness in children. *J Infect Dis* 2001; **54**: 36-38.
- Benschop K S, Schinkel J, Minnaar R P, Pajkr D, Spanjerberg L, Wolthers KC. Human Parechovirus Infections in Dutch Children and the Association between Serotype and Disease Severity. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 204-10.
- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology* 1st edition ASM Press, Washington, DC. 2000; **6**: 162-194.
- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. 1981; **291**: 547-553.
- Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Hyypiä T, et al. Molecular and biological characteristics of echovirus 22: a representative of a new picornavirus group. *J Virol* 1994; **68**: 8232-8238.
- Leong EC, Cornell CT, Semler BL, Processing determinants and function of cleavage products of picornavirus polyproteins. In: Semler BL and Wimmer E. *Molecular biology of picornaviruses*. ASM press, Washington, DC. 2002; **16**: 187-197.
- Stanway G, Hyypia T. Parechoviruses. *J Virol*. 1999; **73**: 5249-54.
- 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**: 515-519.
- Probst C, Jecht M, Gauss-Muller V. Proteinase 3C Mediated processing of VP1-2A of two hepatitis A virus strain. *J. Virol.* (1997); **77**: 3288-3299.
- Pinto RM, Guix S, Gonzales-Dankaat JF, Bosch A. Hepatitis A virus polyprotein processing by Escherichia Coli proteases. *J.G. Virol.* 2002; **83**: 395-368.
- Hughes P J, Stanway G. The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation. *J.G. Virol.* 2000; **81**: 201-207.
- Schultheiss T, Emerson SU, Purcell RH, Gauss-Muller V. Polyprotein processing in echovirus 22: A first assessment. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **217**: 1120-1127.

19. Kean KM, Teterina NL, Marc D, Girard M. Analysis of putative active site residues of the poliovirus 3C protease. *Virology*. 1991; **181**:609–619.
20. Skern T, Hampolz B, Guarne A, and James N G. Structure and function of picornavirus proteases. In : Semler BL and Wimmer E. *Molecular biology of picornaviruses*. ASM press, Washington, DC. 2002; **17**: 199-212.
21. Wang QM. Protease inhibitors as potential agent for the treatment of picornaviral infections. *Prog Drug Res*. 2001; 229-53.
22. Hyypiä T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M., Kalkkinen N, Auvinen P, et al. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; **89**:8847-8851
23. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of E.coli and other bacteria. *Methods Enzymol*. 1991; **204**: 63-113.
24. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*. 1990; **96**:23-28.
25. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Ana. Biochem*. 1981; **114**:193-197.
26. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning* third edition. Cold spring harbor laboratory press. New York, N.Y. 2001; **1**:1-31.
27. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, and Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*. 1990; **185**: 60-89.
28. 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): 113-130.
29. Villa-Komaroff L, Guttman N, Baltimore D, Lodishi HF. Complete translation of poliovirus RNA in a eukaryotic cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 1975; **72**:4157–4161.
30. Yin J, Bergman EM, Lall MS, James MN. Dual modes of modification of Hepatitis A virus 3C protease a serine- driven beta-lactone: selective crystallization and formation of a functional catalytic traid in the active site. *J Mol Biol*. 2005; **354**: 854-71.
31. Lall MS, Jain RP, Vederas JC. Inhibitors of 3C cysteine proteinases from picornaviridae. *Curr Top Med Chem*. 2004; **4**:1239-53.
32. Samuilova O, KrogerusC, PoyraT, Hyypia T. Specific Interaction between Human Parechovirus Nonstructural 2A protein and viral RNA. *J. of Biol. Chem.*(2004); **279**:37822-37831.
33. Di Napoli A, Maltese E, Bercoff R. Molecular cloning, expression and purification of protein 2A hepatitis A virus. *New Microbiol*. 2004; **27**: 105-12.
34. Peters H, Kusv Y, Meyer S, and Gauss-Muller V. Hepatitis A virus proteinase 3C binding to viral RNA: Correlation with substrate binding and enzyme dimeration. *J. Biochem* 2005; **385**: 363-370.
35. Krogerus C, Egger D, Samuilova O, Hyypia T. Replication complex of human parechovirus1. *J. Virol*. 2003; **77**: 8512-23.