

## مقایسه اتصال اینترفرون بتای طبیعی و جهش یافته (mHuIFN- $\beta$ 27-101) به پذیرنده IFNRA به کمک داکینگ مولکولی

سیدشریف بلخی<sup>۱</sup>، زهره حجتی<sup>۲\*</sup>

• پذیرش مقاله: ۹۷/۷/۱۹

• دریافت مقاله: ۹۷/۴/۲۸

**مقدمه:** اینترفرون بتا جزء گروه I اینترفرون‌ها می‌باشد. ایجاد جهش‌های R27T و V101F از جمله پژوهش‌های مهم صورت گرفته در جهت بهبود عملکرد، کاهش ایمونوژنسیته، افزایش بیان و افزایش نیمه عمر آن می‌باشد. در این تحقیق اثر جهش‌های R27T و V101F بر اتصال اینترفرون بتا نوترکیب به پذیرنده IFNAR به کمک داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

**روش:** این مطالعه به صورت بیوانفورماتیکی انجام شد. ساختارهای کریستالی موردنیاز از بانک اطلاعاتی RCSB تهیه گردید. شبیه‌سازی جهش R27T و V101F در نرم‌افزار بر خط Rosetta Bakrub انجام گرفت. مقایسه دسترسی به حلال برای اسیدآمین‌ها در ساختارهای ایجاد شده، در سرور برخط asaview انجام گرفت. همچنین اثر جهش‌های ایجاد شده بر ساختار و پیچ خوردگی پروتئینی در سرور برخط Hope و نرم‌افزار SPDBV و داکینگ مولکولی بین  $\beta$ -HuIFN و ناحیه خارجی پذیرنده IFNAR با استفاده از سرور برخط داکینگ پروتئین-پروتئین ClusPro2 انجام گرفت.

**نتایج:** مقایسه مقادیر منفی‌ترین سطح انرژی اتصال ( $\Delta G_{bind}$ ) حاصل از داکینگ مولکولی پروتئین-پروتئین بین پذیرنده IFNAR و لیگندهای  $\beta$ -HuIFN، mHuIFN- $\beta$ -27، mHuIFN- $\beta$ -101 و mHuIFN- $\beta$ -27-101 تفاوت فاحشی را نشان ندادند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید ( $P > 0/99$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به این نتایج می‌توان استنباط کرد که جهش‌های ایجاد شده اثر منفی بر تشکیل ترکیب rHuIFN- $\beta$ /IFNAR ندارد و اختلالی در اتصال اینترفرون بتای نوترکیب به پذیرنده ایجاد نمی‌کند و باعث افزایش بهبود و کیفیت rHuIFN- $\beta$  تولیدی گردید.

**کلید واژه‌ها:** اینترفرون بتا، داکینگ مولکولی، پذیرنده اینترفرون

• **ارجاع:** بلخی سیدشریف، حجتی زهره. مقایسه اتصال اینترفرون بتای طبیعی و جهش یافته (mHuIFN- $\beta$  27-101) به پذیرنده IFNRA به کمک داکینگ مولکولی. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۳۹۷؛ ۵(۳): ۴۱۱-۴۲۲.

۱. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲. دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشیار، بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

\* **نویسنده مسئول:** بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

• **Email:** z.hojati@sci.ui.ac.ir

• **شماره تماس:** ۰۳۱۱-۳۷۹۳۲۴۷۸

مقدمه

اینترفرون‌ها جزء مهمی از خانواده بزرگ سایتوکاین‌ها می‌باشند که اولین بار در سال ۱۹۵۷ توسط Isaacs و Lindenmann به خاطر خاصیت ضد ویروسی خود شناخته شدند [۱]. امروزه طیف وسیعی از عملکردهای آن‌ها در زمینه‌های متنوع بیولوژیکی همچون دفاع در برابر عفونت‌های میکروبی، خواص ضد ویروسی، ضد سرطانی، خودایمنی، التهابی، ایمن‌سازی، تکثیر، تمایز و بقاء سلول آشکار شده است [۲-۳]. این مولکول‌های پیام‌رسان کوچک (> ۳۰ KDa) به عنوان یک پیغامبر خارج سلولی توسط سلول‌های مختلف مهره‌داران در پاسخ به محرک‌های مختلف ترشح می‌گردند که نقش مهمی را در حفظ سلامت ایفا می‌کنند [۲، ۴]. اینترفرون‌ها اولین سایتوکاین‌های بودند که جهت اهداف درمانی به صورت

مشتقات طبیعی و یا اشکال نوترکیب در انسان مورد استفاده قرار گرفتند [۵]. در چند سال اخیر اثرات درمانی انواع اینترفرون‌ها بر درمان بیماری‌های مختلف از جمله انواع هپاتیت، سرطان‌ها، بیماری‌های خودایمن، مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis) و غیره مشخص گردیده و اهمیت آن‌ها در برنامه‌های درمانی به خوبی آشکار شده است [۶-۸]. اینترفرون‌ها براساس ویژگی‌های ساختاری، نوع سلول ترشح کننده، فعالیت بیولوژیکی و نوع پذیرنده سطح سلولی به سه گروه اصلی نوع I، II و III تقسیم‌بندی می‌شوند (جدول ۱) [۱]. بیان اینترفرون‌های نوع I و نوع III معمولاً در زمان عفونت‌های ویروسی به شدت افزایش می‌یابند که نشان‌دهنده نقش آن‌ها در کنترل عفونت‌های ویروسی می‌باشد [۱].

جدول ۱: تقسیم‌بندی انواع اینترفرون‌ها، موقعیت آن‌ها روی کروموزم و نوع پذیرنده [۱]

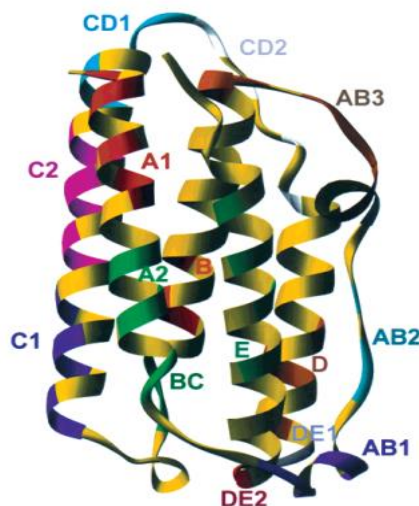
IFN TYPE	NAME (NO. OF GENES)	LOCATION IN HUMAN CHROMOSOMES	RECEPTORS
Type I	IFN $\alpha$ (14) IFN $\beta$ (1) IFN $\kappa$ (1) IFN $\omega$ (1) IFN $\epsilon$ (1)	Chromosome 9	IFNAR1 AND IFNAR2 (ALSO KNOWN AS IFNAR1 AND IFNAR2)
Type II	IFN $\gamma$ (1)	Chromosome 12	IFNGR1 AND IFNGR2 (ALSO KNOWN AS IFNGR1 AND IFNGR2)
Type III	IFN $\lambda$ (3)	Chromosome 19	IFNLR1 (ALSO KNOWN AS IL-28RA) AND IL-10R2

عملکرد وسیع و متنوع آن‌ها می‌باشد. همه انواع اینترفرون‌های نوع I پاسخ‌های متفاوت سلولی را از طریق اتصال به یک نوع پذیرنده به نام IFNAR فعال می‌کنند که به صورت هترودایمر شامل IFNAR1 و IFNAR2 هستند [۱۰]. تمایل هریک از زیر گروه‌های اینترفرون نوع I به پذیرنده‌های IFNAR1 و IFNAR2 با همدیگر متفاوت می‌باشد. به طوری که تقریباً همه انواع در ابتدا تمایل به تشکیل ساختار دوتایی IFNAR2-IFN دارند و سپس ساختار سه تایی IFNAR2-IFN-IFNAR1 ایجاد خواهد شد [۹]. به وضوح ثابت شده

نوع I در انسان شامل HuIFN- $\alpha$  (که بیش از ۱۲ ژن کد کننده دارد)، HuIFN- $\beta$ ، HuIFN- $\omega$ ، HuIFN- $\epsilon$  و HuIFN- $\kappa$  می‌باشد که از نظر طول بین ۱۶۵-۱۷۲ اسید آمینه دارند و از نظر توالی همولوژی بسیار نزدیک به هم دارند [۶]. اینترفرون‌های نوع I به علت عملکرد آن‌ها در سیستم ایمنی شناخته می‌شوند؛ ولی با این وجود در ایمن‌سازی، کنترل تکثیر سلولی، کنترل سلول‌های سرطانی و تنظیم سیستم ایمنی اکتسابی ایفای نقش می‌کنند [۹]. توزیع و گسترش پذیرنده‌های اینترفرون‌ها در گستره وسیعی از سلول‌ها نشان دهنده

HuIFN- $\beta$  به طور عمده توسط فیروپلاست‌ها تولید می‌شود؛ ولی با این حال سلول‌های دیگر مثل سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های دندربیتییک و فاگوسیت‌ها نیز در تولید و ترشح آن نقش دارند [۶، ۱۲]. از نظر ساختار ثانویه HuIFN- $\beta$  و  $\alpha 2$  تقریباً مشابه هم هستند و در بین IFNs فقط این دو به طور طبیعی گلیکوزیله هستند [۱۳، ۱۴]. ساختار ثانویه هر دو از پنج مارپیچ آلفا تشکیل شده‌اند که شامل A، B، C، D، E می‌باشند و فاصله بین هر دو ناحیه با یک لوپ ۲۸-۲ اسید آمینه‌ای پر می‌شود CD، BC، AB و DE [۱۳، ۱۵]. (شکل ۱). مارپیچ A با B موازی و با سایر مارپیچ‌ها ناموازی می‌باشد. لوپ AB بزرگ است و معمولاً به سه قسمت AB1، AB2، AB3 و AB3 تقسیم می‌شود. در HuIFN- $\beta$  یک پل دی‌سولفیدی بین Cys ۳۱ در لوپ AB و Cys ۱۴۱ در لوپ DE وجود دارد هر دوی این لوپ‌ها نقش مهمی را در اتصال به پذیرنده دارند. همچنین Asn ۸۰ به طور طبیعی گلیکوزیله می‌شود که این قند از انتهای دیگر با اسید آمینه‌های Asn ۸۶ (مارپیچ C) و گلوتامین ۲۳ (Gln) (مارپیچ A) پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و این امر علاوه بر افزایش حلالیت باعث پایداری در ساختار سه بعدی اینترفرون نیز می‌گردد [۱۳].

است که به جای تفاوت در ساختار اینترفرون‌ها همین متفاوت بودن در تمایل اینترفرون‌ها به پذیرنده، عامل ایجاد پیام‌های متفاوت سلولی و در نتیجه عملکردهای متفاوت می‌گردد [۱۰]. البته برخلاف سایر زیر گروه‌های نوع I، اینترفرون بتا توانایی اتصال به IFNAR1 را به تنهایی با ۱۰۰ برابر تمایل بیشتر دارد و همین امر باعث ایجاد خصوصیات و ویژگی‌های عملکردی متمایز HuIFN- $\beta$  گردیده است [۱۰]. اتصال اینترفرون‌های نوع I به پذیرنده‌های سطح سلولی آن باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ Jak1/STAT و TYK2 می‌گردد که بر بیان بیش از ۲۰۰۰ ژن مختلف با عملکردهای متنوع بیولوژیکی تأثیر می‌گذارد [۷]. اینترفرون بتا اهمیت به سزایی در روند درمان مولتیپل اسکلروزیس دارد و جزء اولین و تنها داروهای توسعه یافته در درمان آن می‌باشد [۱۱]. اینترفرون بتای انسانی (HuIFN- $\beta$ ) (UniProtKB - P01574) یا اینترفرون فیروپلاستی، گلیکو پروتئینی به طول ۱۶۶ اسید آمینه به وزن تقریبی ۲۳ کیلو دالتون می‌باشد که تنها توسط یک ژن بدون اینترون بیان می‌گردد و به طور طبیعی در ساختار خود یک جایگاه گلیکوزیلاسیون روی ۸۰ Asn دارد.



شکل ۱: ساختار سه بعدی اینترفرون بتای انسانی

شامل پنج مارپیچ آلفا (A1, A2), B, C (C1, C2), D و E همچنین لوپ‌های AB (AB1-AB3), BC, CD (CD1, CD2) و DE (DE1, DE2) می‌باشد [۲۳].

جهش‌های R27T و V101F بر اتصال rHuIFN $\beta$  طبیعی و جهش‌یافته 27-101 mHuIFN- $\beta$  به پذیرنده IFNAR به کمک داکینگ مولکولی پروتئین-پروتئین مورد مقایسه و مطالعه قرار گرفت.

از ساختارهای کریستالی (HuIFN- $\beta$  (PDB ID: 1AU1), IFN- $\beta$ -IFN-a 2a/IFNAR2 (PDB ID: 2HYM), IFNAR1 (PDB: ID3wcy), (ID:16vn PDB), IFNAR2EC (PDB ID:3s98) و IFNAR1 موجود در RCSB سرور

(<https://www.rcsb.org/structure/1n6v>) استفاده گردید. شبیه‌سازی جهش آرژنین به ترونین در بیست‌وهفتمین اسیدآمینه (R27T) و همچنین جهش والین به فنیل‌آلانین در سدویکمین اسیدآمینه (V101F) در نرم‌افزار بر خط RosettaBakrub براساس ساختار کریستالی (PDB ID: 1AU1) HuIFN- $\beta$  ایجاد گردید [۱۹]. مقایسه نواحی سطوح قابل دسترس (ASA) اسیدآمینه‌ها در ساختارهای ایجاد شده، در سرور برخط (<http://asaview.netasa.org>) انجام گرفت [۲۰]. همچنین اثر جهش‌های ایجاد شده بر ساختار و فولد پروتئینی در سرور برخط (<http://www.cmbi.ru.nl/hope>) HOPE و نرم‌افزار SPDBV (<https://spdbv.vital-it.ch>) مورد بررسی قرار گرفت [۲۱، ۲۲].

HOPE، یک برنامه کاملاً اتوماتیک که اثرات ساختاری و کاربردی جهش‌های نقطه‌ای را تحلیل می‌کند. HOPE اطلاعات را از طیف گسترده‌ای از منابع اطلاعاتی از قبیل محاسبات در مختصات 3D پروتئین با استفاده از خدمات سرور WHAT IF، اطلاعات مربوط به توالی‌ها را از UniProt و پیش‌بینی‌های سرویس (Dense Alignment Surface) DAS را جمع‌آوری می‌کند [۲۱]. بررسی همولوژی مدل‌ها با YASARA (<http://www.yasara.org>) انجام شد. داده‌های به دست آمده در یک پایگاه داده ذخیره شد جهت ویرایش نهایی اثرات جهش در ساختار و عملکرد پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. HOPE یک گزارش با متن، ارقام و انیمیشن ایجاد می‌کند که برای محققان آسان و قابل درک است [۲۱].

به علت شباهت ساختاری و نقاط اتصال به پذیرنده بین HuIFN- $\beta$  و HuIFN- $\alpha$ 2a، ترکیب IFN-a (PDB ID: 2HYM) 2a/IFNAR2 به عنوان الگوی اولیه برای ترکیب HuIFN- $\beta$ /IFNAR2 و ترکیب سه‌گانه

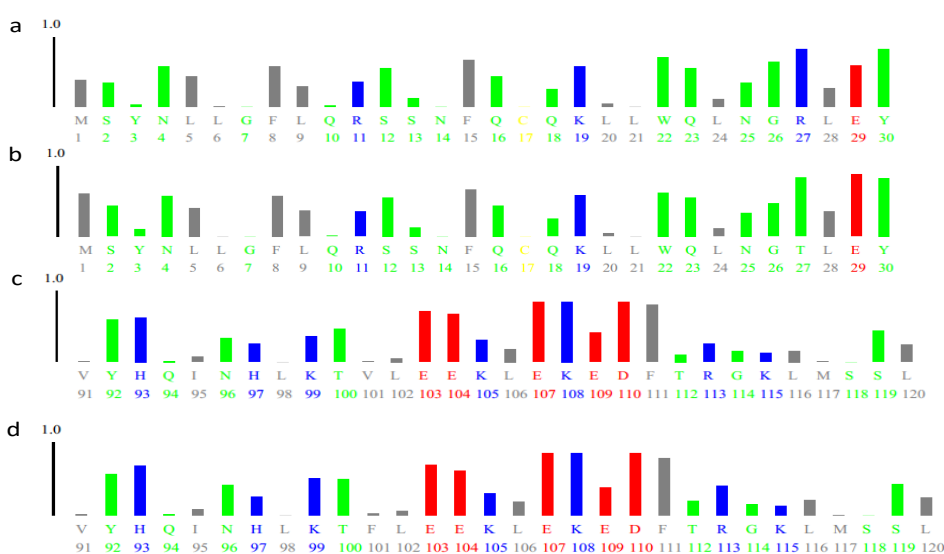
امروزه انواع rHuIFN- $\beta$  با نام‌های تجاری مختلف همانند Avonex، Betaseron و Rebif در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی تولید می‌شوند و جهت درمان بیماران RRMS با دوزهای درمانی متفاوت مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۶]. از قابل توجه‌ترین تفاوت‌های این سه گروه فعالیت اختصاصی آن‌ها است که در IFN $\beta$ -1a نسبت به IFN $\beta$ -1b بسیار بالاتر می‌باشد. توضیح احتمالی که برای این امر می‌توان داشت مجتمع شدن IFN  $\beta$ -1b آن‌ها می‌باشد. چون IFN  $\beta$ -1b در *E. coli* تولید می‌شود بر خلاف IFN $\beta$ -1a که در سلول‌های یوکاریوتی (مانند CHO) تولید می‌شوند، گلیکوزیله نمی‌شود و همین امر باعث از بین رفتن حلالیت آن و در نتیجه سبب تجمع، کاهش فعالیت و کمتر شدن نیمه عمر آن می‌گردد، که شاید در نتیجه اتصال ضعیف یا غیر مؤثر به پذیرنده باشد [۱۶]. به علت فعالیت کمتر، میزان دوز تجویزی بالا می‌باشد و این امر باعث ایمونونویستی و تولید آنتی‌بادی بر علیه آن در بیماران می‌گردد که یکی دیگر از معایب مصرف HuIFN  $\beta$ -1b می‌باشد. اهمیت اینترفرون‌تا در درمان MS مشخص شده و همچنین اثرات مهم درمانی آن بر آرتريت روماتوئید، سرطان و تومور مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۱، ۶]. پس با توجه به نقش و اهمیت اینترفرون بتا انسانی در درمان بیمارهای خودایمن و التهابی مانند MS و همچنین درمان عفونت‌های ویروسی لازم است تا این دارو با کیفیت بهتر تولید گردد، از این رو مطالعات زیادی در روند بهبود تولید، افزایش اثر درمانی، کیفیت و پایداری اینترفرون‌تا نو ترکیب صورت گرفته است. بهینه‌سازی محیط کشت، بهینه‌سازی شرایط رشد و ایجاد تغییرات در نواحی مختلف mRNA اینترفرون سبب افزایش پایداری و افزایش بیان HuIFN- $\beta$  می‌گردد [۱۷، ۳]. همچنین ایجاد جهش R27T سبب شکل‌گیری یک جایگاه N-گلیکوزیلاسیون جدید بر روی بیست‌وپنجمین اسید آمینه (Asn25) می‌شود که باعث افزایش حلالیت و نیمه عمر rHuIFN $\beta$  شده [۱۸، ۳] و نیز جهش V101F باعث افزایش بیان rHuIFN $\beta$  تا چندین برابر می‌گردد [۳]. از آنجا که R27 و V101 در ناحیه‌ای قرار دارند که در اتصال HuIFN $\beta$  به پذیرنده آن‌ها نقش دارد و تغییرات در این ناحیه ممکن است بر اتصال اینترفرون به پذیرنده‌های خود تأثیرگذار باشد و با توجه به اینکه جهش‌های ایجاد شده بر حلالیت، نیمه عمر، فعالیت و بیان اینترفرون مؤثر می‌باشد؛ لذا مهم است تا اثر این جهش‌ها بر اتصال اینترفرون به پذیرنده خود مورد بررسی قرار گیرد. در مطالعه حاضر اثر

محتمل ترین ترکیب باشد [۲۴]. بر اساس نتایج داکینگ مولکولی مدل‌هایی که ساختارهای هندسی آن‌ها مشابه بودند بر اساس معیار RMSD گروه‌بندی شدند: هر گروه شامل ساختارهایی بودند که در حداکثر شعاع RMSD به اندازه 9 Å از یکدیگر متفاوت بودند. مشاهده ساختار مدل‌های ایجاد شده حاصل از داکینگ مولکولی در Cluspro2.2 به وسیله نرم‌افزار PyMOL انجام شد. برای مشاهده، مقایسه و آنالیز ساختارها با قالب PDB از نرم‌افزارهای PyMOL v 1.7.8، Chimera v 1.10.1، SPDBV v 4.1.0.99، YASARA v 11.17.10.9 استفاده شد.

### نتایج

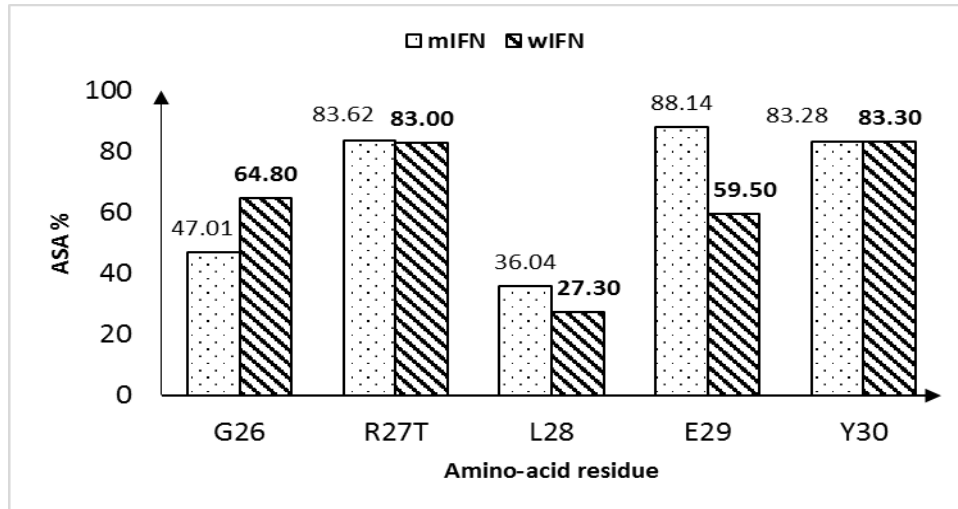
شبیه‌سازی ساختارهای mHuIFN-β-27، mHuIFN-β-101 و mHuIFN-β-101-27 بر اساس ساختار کریستالی HuIFN-β (PDB ID: 1AU1) در سرور Rosetta Bakrub انجام گرفت و ساختارهایی که بالاترین امتیاز را دارا بودند (منفی‌ترین  $\Delta G$ ) جهت مطالعه انتخاب گردیدند. مقایسه نواحی سطوح قابل دستر (ASA) یا دسترسی به حلال آمینو اسیدهای ساختارهای طبیعی و جهش یافته نشان داد که به علت جایگزینی اسید آمینه‌های با زنجیره‌های جانبی متفاوت در سایز و نوع، سبب افزایش و کاهش دسترسی به حلال (ASA) اسید آمینه‌های مجاور گردید (شکل ۲) (نمودار ۲).

HuIFN $\alpha$ 2-IFNAR (PDB ID: 3se3) برای ترکیب HuIFN-β/IFNAR1 جهت داکینگ مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. داکینگ مولکولی بین HuIFN-β و ناحیه خارجی پذیرنده IFNAR [۲۳]. با استفاده از سرور برخط پروتئین - پروتئین داکینگ ClusPro2 (<https://cluspro.org>) انجام پذیرفت [۲۴]. سرور ClusPro (<https://cluspro.org>) ابزاری است که به طور گسترده برای پروتئین - پروتئین داکینگ مورد استفاده قرار می‌گیرد که فایل ورودی مورد نیاز با قالب (PDB Protein Data Bank) بود. همچنین دارای یک تعداد گزینه‌های پیشرفته می‌باشد که برای تسریع و اصلاح در روند داکینگ می‌توان از آن‌ها استفاده کرد. این سرور مرحله محاسباتی را به صورت زیر انجام می‌دهد: (۱) مجموعه داکینگ جسم سخت (rigid body docking) با نمونه گیری میلیاردها ترکیب، (۲) خوشه بندی مبتنی بر انحراف معیار ریشه (RMSD) از ۱۰۰۰ ساختار با کمترین انرژی تولید شده برای یافتن بزرگ‌ترین خوشه‌ها که محتمل ترین مدل‌ها از ترکیب را نشان می‌دهد و (۳) پاک‌سازی ساختارهای انتخاب شده با استفاده از حداقل انرژی، در پایان نتایج به صورت چند پارامتر انرژی به طور پیش فرض در ۱۰ مدل برای هر داکینگ ارائه گردید و دسته‌ای که بیشترین تعداد جمعیتی و کمترین مقدار انرژی را به خود اختصاص داد و بالاترین امتیاز را دارد می‌تواند



شکل ۲: اثر جهش بر دسترسی به حلال اسید آمینه‌ها (ASA).

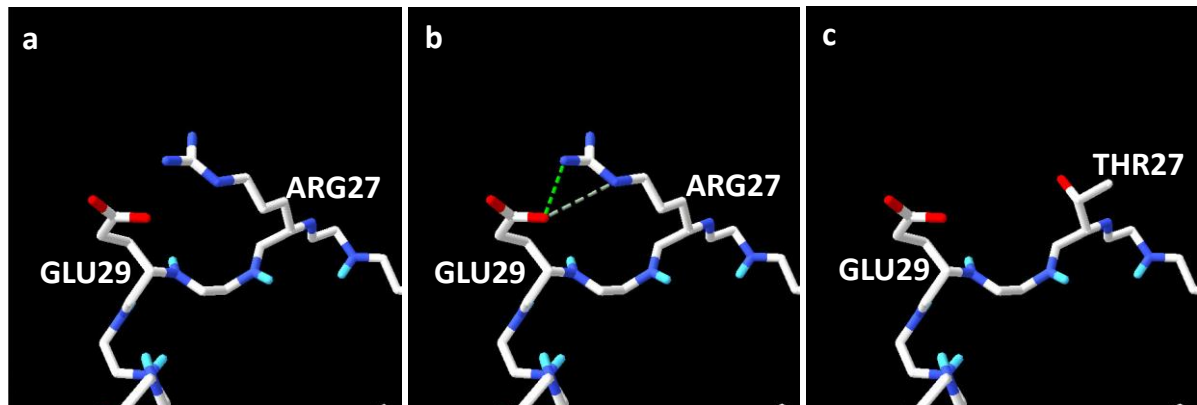
A- موقعیت و دسترسی به حلال R27 و اسید آمینه‌های اطراف آن در wIFN $\beta$ . B- در mIFN $\beta$  که اسید آمینه جدید (T27) سبب تغییر در دسترسی به حلال بعضی از اسید آمینه‌ها می‌گردد و این امر در E29, G26 و M1 بیشتر مشهود می‌باشد. C- موقعیت و دسترسی به حلال V101 و اسید آمینه‌های اطراف آن در wIFN. D- جایگزینی V101F در mIFN تغییر چندانی بر اسید آمینه‌های اطراف ندارد. V101 و Phe هر دو در قسمت درونی مولکول قرار دارند و دسترسی به حلال آن‌ها بسیار کم می‌باشد.



نمودار ۲: اثرات جایگزینی R27T بر قابلیت دسترسی (ASA) اسیدآمینه‌های مجاور

دارد، سبب ایجاد تغییراتی در پیوندهای هیدروژنی و اینترکشن با سایر مولکول‌ها (پذیرنده) گردد که این امر در SPDBV نیز قابل مشاهده است (شکل ۳).

نرم افزار برخط Hope نشان داد که تغییر در نوع اسید آمینه‌های جایگزین شده با زنجیره‌های جانبی متفاوت در نوع، سایز و خصوصیات می‌تواند با توجه به قرار گیری این اسیدآمینه‌ها در موقعیتی که بر واکنش با سایر مولکول‌ها نقش



شکل ۳: تغییرات ایجاد شده با جایگزینی R27T

a- موقعیت اسیدآمینه ARG27 که در مجاورت اسیدآمینه GLU29 قرار دارد. b- دو اسید آمینه ARG و GLU با توجه به فاصله و موقعیت قادر به ایجاد رابطه هیدروژنی با هم می‌باشند. c- با جایگزینی R27T زنجیره‌های جانبی متفاوت می‌گردند و موقعیت و دو اسیدآمینه THR و GLU فرق می‌کند به طوری که رابطه هیدروژنی بین آن دو ایجاد نمی‌گردد (تهیه شده با کمک نرم افزار SPDBV).

و IFN- $\beta$ -IFNAR1(PDBID:3wcy), 2HYM) ترکیب سه‌گانه HuIFNa2-IFNAR (PDB ID:

نتایج پروتئین-پروتئین داکینگ مولکولی در مقایسه با ترکیب‌های الگو IFN-a 2a/IFNAR2(PDB ID:

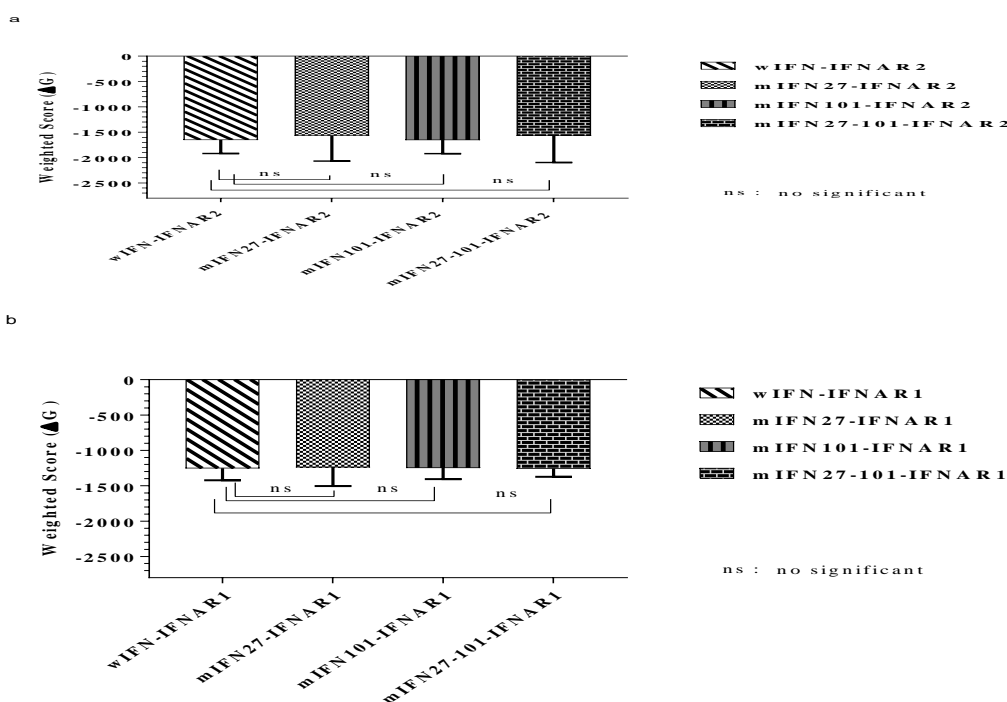
3se3 مجموعاً در چهار پارامتر انرژی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج منفی ترین سطح انرژی اتصال ( $\Delta G_{bind}$ ) برای هرساختار در چهار پارامتر انرژی

	متعادل شده (Kcal/mol)	الکترواستاتیک (Kcal/mol)	آبگریز (Kcal/mol)	واندروالس + الکتروستاتیک (Kcal/mol)
wIFN-IFNAR2	- ۱۶۵۰	- ۱۷۳۲/۸	- ۱۸۱۴/۷	- ۳۱۶/۴
mIFN27-IFNAR2	- ۱۵۶۵	- ۱۶۰۸/۷	- ۱۷۶۱/۵	- ۲۹۲/۶
mFN101-IFNAR2	- ۱۶۵۲/۸	- ۱۷۳۴/۲	- ۱۸۱۵/۳	- ۳۴۵/۱
mIFN27-101-IFNAR2	- ۱۵۶۳/۹	- ۱۶۲۴/۸	- ۱۹۱۶/۵	- ۲۹۵/۷
wIFN-IFNAR1	- ۱۱۸۱/۲	- ۱۲۰۹/۷	- ۱۳۷۱/۳	- ۲۲۹/۷
mIFN27-IFNAR1	- ۱۱۳۵	- ۱۲۱۰/۷	- ۱۳۲۷/۱	- ۲۲۴
mFN101-IFNAR1	- ۱۱۲۶/۶	- ۱۲۵/۴	- ۱۲۱۱/۵	- ۲۲۹/۲
mIFN27-101-IFNAR1	- ۱۱۲۴/۸	- ۱۱۵۱/۷	- ۱۲۶۲/۸	- ۲۵۴/۹

فاحشی را نشان ندادند و اختلاف معنی داری بین آن‌ها مشاهده نگردید ( $P > 0/99$ )، (نمودار ۴)، با توجه به این نتایج می‌توان استنباط کرد که جهش‌های ایجاد شده اثر منفی بر تشکیل ترکیب mHuIFN- $\beta$  /IFNAR ندارد.

مقایسه مقادیر منفی ترین سطح انرژی اتصال ( $\Delta G_{bind}$ ) حاصل از پروتئین- پروتئین داکینگ مولکولی بین پذیرنده IFNAR و لیگاندهای HuIFN- $\beta$ ، mHuIFN- $\beta$ -27، mHuIFN- $\beta$ -101 و mHuIFN- $\beta$ -27-101 تفاوت



نمودار ۴: مقایسه  $\Delta G$  حاصل از مولکولار داکینگ

a- نتایج حاصل از مقایسه  $\Delta G$  کمپلکس بین wIFN/IFNAR2 و کمپلکس wIFN/IFNAR2 که نشان می‌دهد تغییرات  $\Delta G$  معنی دار نمی باشد. b- نتایج حاصل از مقایسه  $\Delta G$  کمپلکس بین wIFN/IFNAR1 و کمپلکس wIFN/IFNAR1 که نشان می‌دهد تغییرات  $\Delta G$  معنی دار نمی باشد.

## بحث و نتیجه گیری

ایجاد جهش‌های (R27T) و (V101F) از جمله مطالعات انجام شده در راستای بهبود کیفیت، پایداری و افزایش بیان  $\text{HuIFN-}\beta$  جهت بالابردن اثرات درمانی، افزایش نیمه عمر و کاهش ایمونوژنیسیته می‌باشد [۳، ۱۸، ۲۵]. Song و همکاران نشان دادند که جهش (R27T) باعث ایجاد یک سیگنال گلیکوزیلاسیون جدید بر سطح  $\text{rHuIFN-}\beta$  و گلیکوزیلاسیون اسید آمینه Asn 25 می‌گردد. گلیکوزیله شدن اسید آمینه Asn25 در اتصال  $\text{rHuIFN-}\beta$  1a به پذیرنده نه تنها ممانعت ایجاد نمی‌کند بلکه با ایجاد رابطه‌های هیدروژنی جدید بین قند متصل به Asn25 و آمینواسیدهای Thr 44 و Asn51 پذیرنده  $\text{IFNAR2}$  سبب پایداری ترکیب  $\text{mHuIFN-}\beta$ -27/ $\text{IFNAR2}$  می‌گردد [۱۸]. Goelz و همکاران و Kay و همکاران نشان دادند که جهش V101F باعث افزایش بیان و افزایش خاصیت آنتی‌ویروسی تا چندین برابر حالت طبیعی می‌گردد [۳، ۲۵]. در مطالعه انجام گرفته توسط Song و همکاران [۱۸] جهش R27T بر اینترفرون ایجاد شده بود و اثر گلیکوزیلاسیون Asn 25 بر اتصال اینترفرون به پذیرنده مورد مطالعه قرار گرفته بود؛ ولی اثر خود جهش R27T بر اتصال اینترفرون به پذیرنده، اثرات آن بر ساختار پروتئین و بر قابلیت دسترسی به حلال (ASA) مورد مطالعه قرار نگرفته بود. Goelz و همکاران [۲۵] اثر جهش V101F را در اتصال اینترفرون به پذیرنده به صورت آزمایشگاهی نتایج نشان داد جهش ایجاد شده ممانعت برای اتصال اینترفرون به پذیرنده خود ندارد. Kay و همکاران به طور همزمان اثر هر دو جهش R27T و V101F روی بیان اینترفرون مورد مطالعه قرار داده بودند؛ ولی اثرات این جهش‌ها بر قابلیت دسترسی به حلال (ASA)، بر ساختار پروتئین و اتصال اینترفرون به پذیرنده خود مورد مطالعه قرار نگرفته بود [۳]. در مطالعه حاضر سعی بر این شده تا با کمک مطالعات *In silico* اثر هر دو جهش R27T و V101F به طور همزمان بر اتصال اینترفرون به پذیرنده خود مورد بررسی قرار گیرد و همچنین اثر این جهش‌ها بر قابلیت دسترسی به حلال آمینواسیدها و بر ساختار و فولد پروتئین مورد مطالعه قرار گیرد. اسید آمینه‌های مهم در اتصال  $\text{HuIFN-}\beta$  به پذیرنده  $\text{IFNAR2}$  در نواحی A2, AB1, AB2, E و  $\text{IFNAR1}$  در نواحی B, C2, DE, قرار دارند [۱۵]. R27 در ناحیه AB1 قرار دارد و V101 در ناحیه C2 قرار دارد که این نواحی در اتصال  $\text{HuIFN-}\beta$  به پذیرنده  $\text{IFNAR}$  اهمیت

دارد؛ بنابراین این تغییرات در مجموع ممکن است که اتصال  $\text{HuIFN-}\beta$  به پذیرنده اختصاصی خود را دچار تغییرات کند که در نهایت ممکن است روی عملکرد و نتایج درمانی آن مؤثر باشد. در این مطالعه اثرات این جهش‌ها بر دسترسی به حلال اسید آمینه‌ها و اثرات آن بر ساختار پروتئین و در نهایت اثر این جهش‌ها بر اتصال  $\text{rHuIFN-}\beta$  1a به پذیرنده مشترک  $\text{IFNs}$  نوع I ( $\text{IFNAR}$ ) مورد مطالعه قرار گرفت. نواحی قابل دسترس سطحی (ASA) یا دسترسی به حلال اسیدهای آمینه در یک پروتئین، کاربردهای مهمی دارد به طوری که شناختن سطح دسترسی اسید آمینه‌ها به شناسایی جایگاه‌های فعال در یک پروتئین کمک می‌کند. نرم‌افزار *Braxp* یک الگوریتم، برنامه کاربردی و پایگاه اطلاعاتی از داده‌های دسترسی به حلال اسید آمینه‌ها در ساختار پروتئین می‌باشد که به راحتی قابلیت دسترسی به حلال اسید آمینه را محاسبه می‌کند و آمینو اسیدهای را که در سطح و قابل دسترس هستند و نیز اسید آمینه‌های که در قسمت درونی قرار دارند را مشخص می‌کند و به صورت یک گراف از توزیع توپولوژیکی اسید آمینه‌ها را ارائه می‌کند. مقایسه دسترسی به حلال اسید آمینه‌های ساختارهای طبیعی و جهش یافته نشان داد که به علت جایگزینی اسید آمینه‌های با زنجیره‌های جانبی متفاوت در سایز و نوع، سبب افزایش و کاهش در نواحی سطوح قابل دسترس (ASA) اسید آمینه‌های مجاور می‌گردد (جدول ۲). اسید آمینه‌های T و R هر دو دسترسی به حلال بالاتر از ۸۰ درصد دارند و زنجیره‌های جانبی آن‌ها به خاطر قرار گرفتن در سطح خارجی مولکول و نسبت به آمینواسیدهای داخلی تر به خوبی قابل دسترس تر می‌باشند (شکل ۲)، ولی اسید آمینه‌های F و V هر دو در قسمت داخل قرار دارند و مخفی شده‌اند. طوری که دسترسی به حلال آن‌ها کمتر از ۳٪ می‌باشد و دسترسی آن‌ها به سطح مولکول خیلی کمتر است و نیز جایگزینی (V101F) تغییرات قابل توجه بر دسترسی به حلال اسید آمینه‌های اطراف خود نداشت (شکل ۲). جایگزینی T در جایگاه ۲۷ سبب ایجاد تغییر در دسترسی به حلال اسید آمینه‌های مجاور گردید به خصوص در E29 که دسترسی به حلال آن از ۵۹/۵٪ به ۸۸٪ افزایش داشته، افزایش دسترسی به حلال در اسید آمینه L2۸ از ۲۷/۳٪ به ۳۶/۰۴٪ و کاهش دسترسی به حلال در اسید آمینه G26 از ۶۴/۸٪ به ۴۷/۰۱٪ این اسید آمینه‌ها در اتصال  $\text{IFN}$  به پذیرنده نقش دارند که این تغییرات بر اثر جهش ایجاد شده ممکن است در نحوه اتصال  $\text{IFN}$  به پذیرنده خود تأثیر بگذارد.

نتایج به دست آمده از HOPE نشان داد که در جایگزینی R27T که هریک از اسید آمینه T و R دارای اندازه، شارژ و مقدار هیدروفوبی خاص خود است. طوری که اسید آمینه T کوچکتر از اسید آمینه R می باشد و شارژ الکتریکی اسید آمینه R مثبت می باشد در حالی که اسید آمینه T از این نظر خنثی می باشد و نیز اسید آمینه T نسبت به R آبریزتر می باشد. در حالت طبیعی بین اسید آمینه R27 و E29 یک رابطه هیدروژنی و یک پل نمکی وجود دارد تفاوت شارژ بین اسید آمینه های T و R باعث مختل شدن برهمکنش هایی می شود که توسط اسید آمینه R شکل می گیرد. همچنین HOPE نشان داد که موقعیت اسید آمینه 27 محافظت شده نمی باشد و آمینواسیدهای دیگر و همچنین T نیز در این موقعیت در همولگ های دیگر مشاهده شده اند؛ بنابراین بر اساس اطلاعات محافظتی احتمالاً جهش در این موقعیت آسیب رسان نمی باشد. بررسی دمن ها در HOPE نشان داد که موقعیت دنباله 27 در دامنه ای است که برای اتصال مولکول های دیگر و اسید آمینه این جایگاه در تماس با اسید آمینه های در یک دامنه دیگر اهمیت دارد. جهش ممکن است تعامل بین این دو حوزه را مختل کند و به همین ترتیب بر عملکرد پروتئین اثر می گذارد. نتایج به دست آمده از HOPE در رابطه با جهش V101F نشان داد که خصوصیات و ویژگی های دو اسید آمینه V و F به همدیگر متفاوت می باشد. اسید آمینه F از نظر اندازه نسبت به V بزرگ تر می باشد و از آنجا که V در قسمت مرکزی پروتئین نهفته است قرار گرفتن F با سایز بزرگ تر برای این ناحیه مناسب نمی باشد. همچنین این موقعیت محافظت شده نمی باشد و همولگ های دیگر برای این موقعیت وجود دارد؛ ولی از آنجا که همولگ F مشاهده نشده احتمالاً این جهش مضر می باشد. نرم افزار بر خط HOPE مشخص کرد که V101 در دمنی قرار دارد که این ناحیه در تعامل اینترفرون با مولکول و اسید آمینه های دیگر اهمیت دارد؛ بنابراین جهش در این ناحیه می تواند باعث مختل شدن تعامل با مولکول های دیگر شود.

HuIFN $\alpha$ 2-IFNAR (3se3) به عنوان الگوی اولیه جهت مشخص شدن موقعیت و مکان تقریبی  $\beta$ -rHuIFN بر روی پذیرنده ها استفاده شد [26, 23]. با توجه به مشخص بودن اسید آمینه های مهم در اتصال  $\beta$ -HuIFN به پذیرنده و نواحی درگیر در اتصال [13-15] [26]. بین ساختارهای mHuIFN- $\beta$ -27-101، mHuIFN- $\beta$ -101،  $\beta$ -27 و mHuIFN- $\beta$ -27-101 با پذیرنده های IFNAR به کمک نرم افزار برخط Cluspro 2.2 داکینگ مولکولی گذاشته شد. مشابه ترین مدل ها حاصل از پروتئین-پروتئین داکینگ مولکولی با بیشترین تعداد در یک دسته و کمترین مقدار انرژی تقریباً در موقعیت و مکان مشابه در مقایسه با ترکیب های الگو (PDB ID: 2HYM/IFNAR2/a-IFN)، (PDB ID: 3wcy/IFNAR1/ $\beta$ -IFN) و ترکیب سه گانه (PDB ID: 3se3/HuIFN $\alpha$ 2-IFNAR) انتخاب شد و در چهار مجموعه از پارامترهای مختلف انرژی شامل بالانس (Balanced)، الکترواستاتیک (electrostatic-favored)، آبریز (hydrophobic-favored) و الکترو استاتیک + واندروالس (van der Waals + electrostatics) مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه منفی تر سطح انرژی اتصال ( $\Delta G_{bind}$ ) به دست آمده از داکینگ مولکولی بین ساختارهای mHuIFN- $\beta$ -27-101، mHuIFN- $\beta$ -101،  $\beta$ -27 و HuIFN- $\beta$  با پذیرنده های IFNAR نشان دهنده اختلاف معنی داری بین اینترفرون های جهش یافته و نوع طبیعی در اتصال به پذیرنده نمی باشد ( $P > 0.99$ )، که می توان گفت ایجاد جهش R27T و V101F در  $\beta$ -HuIFN با وجود قرار گرفتن این نقاط در نواحی مهم، در اتصال به پذیرنده اختلال ایجاد نمی کند و از آنجا که در مطالعات گذشته مشخص شده بود که این تغییرات باعث افزایش بهبود کیفیت و کارایی و افزایش میزان بیان  $\beta$ -rHuIFN می گردد؛ لذا به نظر می رسد که ایجاد این جهش ها در ساختار  $\beta$ -rHuIFN بسیار مناسب بوده و باعث افزایش بهبود و کیفیت  $\beta$ -rHuIFN تولیدی می گردد بدون اینکه اختلال در اتصال به پذیرنده های IFNAR ایجاد کند.

از محدودیت های این کار می توان گفت علی رغم جستجوی فراوان اکثر نرم افزارهای داکینگ مولکولی قادر نبودند که با توجه به نقاط اتصالی بین لیگاند و پذیرنده، مولکول اینترفرون و پذیرنده آن را در موقعیت، جایگاه و جهت مناسب همانند مدل الگوی که در این مطالعه استفاده شد (IFN-a 2a/IFNAR2 (PDB ID: 2HYM) قرار دهند و فقط

برای داکینگ مولکولی ساختار کریستالی از ترکیب HuIFN- $\beta$ /IFNAR2 و  $\beta$ /IFNAR1 موجود نمی باشد از آنجا که شباهت بسیار بالای بین ساختار  $\beta$ -HuIFN و HuIFN- $\alpha$ 2a و نقاط اتصال آن ها به پذیرنده وجود دارد به همین دلیل از ترکیب دو تایی IFN-a 2a/IFNAR2 (PDB ID: 2HYM) و ترکیب سه گانه (PDB ID: 2HYM)

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکتری و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۲۰۴۲۸۵۶ می باشد. بدین وسیله از گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان و سازمان حمایت از پژوهشگران و فناوران ریاست جمهوری به خاطر فراهم آوری امکانات و تجهیزات پژوهش کمال قدردانی و سپاس را دارم. از دکتر گنجعلی خانی و دهباشی که در اجرای این پژوهش و نوشتن مقاله من را یاری کردند و زحمات بسیار کشیدند کمال قدردانی و تشکر را دارم.

### تعارض منافع

در پایان اعلام می داریم که هیچ گونه تعارض علائق بین نویسندگان مقاله وجود ندارد.

### References

1. Capobianchi MR, Uleri E, Caglioti C, Dolei A. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015;26(2):103-11.
2. Schleicher U, Liese J, Justies N, Mischke T, Haerberlein S, Sebald H, et al. Type I Interferon Signaling Is Required for CpG-Oligodesoxynucleotide-Induced Control of *Leishmania major*, but Not for Spontaneous Cure of Subcutaneous Primary or Secondary *L. major* Infection. *Front Immunol* 2018;9:79.
3. Kay M, Hasan-Abad AM, Hojati Z, Korbekandi H. Targeted mutations in Val101 and Arg27 interferon beta protein increase its transcriptional and translational activities. *Cytokine* 2016;78:1-6.
4. Vazquez-Lombardi R, Roome, B, Christ D. Molecular Engineering of Therapeutic Cytokines Antibodies 2013; 2(4): 42651.
5. Penny R, Stuart-Harris R. Interferons: Therapeutic Uses. eLS 2001.
6. Muskardin TLW, Niewold TB. Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2018;14(4):214-28.
7. Feld JJ. The beginning of the end: what is the future of interferon therapy for chronic hepatitis C? *Antiviral Res* 2014;105:32-8.
8. Dolati S, Babaloo Z, Jadidi-Niaragh F, Ayromlou H, Sadreddini S, Yousefi M. Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems. *Biomed Pharmacother* 2017;86:343-53.
9. Schreiber G, Piehler J. The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends Immunol* 2015;36(3):139-49.
10. Wilmes S, Beutel O, Li Z, Francois-Newton V, Richter CP, Janning D, et al. Receptor dimerization

نرم افزار برخط Cluspro2.2 این کار را به طور مناسب و مطلوب انجام داد. اگر این مشکل نبود می توانستیم کار را با نرم افزارهای داکینگ مولکولی دیگر هم بررسی و نتایج با همدیگر مقایسه شود.

در پایان پیشنهاد می شود که داکینگ مولکولی بین اینترفرون و هر دو پذیرنده به طور همزمان انجام گیرد و اثر جهش های ایجاد شده در اتصال همزمان به دو رسپتور مورد بررسی قرار گیرد.

dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling. *J Cell Biol* 2015;209(4):579-93.

11. Jakimovski D, Kolb C, Ramanathan M, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B. Interferon beta for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8(11).
12. Imanishi J. Basis and Clinical Applications of Interferon. *Japan Medical Association Journal* 2004;47(1):7-12.
13. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P. The structure of human interferon-beta: implications for activity. *Cell Mol Life Sci* 1998;54(11):1203-16.
14. Deonarain R, Chan DC, Plataniias LC, Fish EN. Interferon-alpha/beta-receptor interactions: a complex story unfolding. *Curr Pharm Des* 2002;8(24):2131-7.
15. Runkel L, deDios C, Karpusas M, Betzenhauser M, Muldowney C, Zafari M, et al. Systematic mutational mapping of sites on human interferon-beta-1a that are important for receptor binding and functional activity. *Biochemistry* 2000;39(10):2538-51.
16. Rudick RA, Goelz SE. Beta-interferon for multiple sclerosis. *Exp Cell Res* 2011;317(9):1301-11.
17. Han YK, Koo TY, Lee GM. Enhanced interferon-beta production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature. *Biotechnol Prog* 2009;25(5):1440-7.
18. Song K, Yoon IS, Kim NA, Kim DH, Lee J, Lee HJ, et al. Glycoengineering of interferon-beta 1a improves its biophysical and pharmacokinetic properties. *PLoS One* 2014;9(5):e96967.
19. Smith CA, Kortemme T. Backrub-like backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant side-chain prediction. *J Mol Biol* 2008;380(4):742-56.
20. Ahmad S, Gromiha M, Fawareh H, Sarai A. ASAView: database and tool for solvent accessibility

- representation in proteins. *BMC Bioinformatics* 2004;5:51.
21. Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 2010;11:548.
22. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18(15):2714-23.
23. Chill JH, Quadt SR, Levy R, Schreiber G, Anglister J. The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding. *Structure* 2003;11(7):791-802.
24. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc* 2017;12(2):255-278.
25. Goelz SE, Cate RL, Chow EP, Pepinsky RB. Muteins of IFN- $\beta$ . Google Patents; 2000.
26. de Weerd NA, Matthews AY, Pattie PR, Bourke NM, Lim SS, Vivian JP, et al. A hot spot on interferon alpha/beta receptor subunit 1 (IFNAR1) underpins its interaction with interferon-beta and dictates signaling. *J Biol Chem* 2017;292(18):7554-65.

## Comparison of Wild Type and Mutated (mHuIFN- $\beta$ 27-101) Interferon Binding to the IFNRA Receptor by Molecular Docking

Sayed Sharif Balkhi, Zohreh Hojati\*

• Received: 19 July, 2018

• Accepted: 11 Oct, 2018

**Introduction:** Interferon beta is one of the members of type I interferons. Creating R27T and V101F mutations is one of the important researches performed to improve function, decrease immunogenicity, increase expression and increase half-life of interferon beta. In this study, the effects of R27T and V101F mutations on interferon beta binding to interferon receptors were studied by molecular docking.

**Method:** This study was performed through Bioinformatics methods. The required crystal structures were provided by the RCSB server. The simulations of R27T and V101F mutations were performed using online Rosetta Backrub software. Comparison of access to the solvent for the amino acids in the created structures was performed using asaview online server. Also, the effect of mutations on the structure and protein folding was investigated by the online Hope server and SPDBV software. The molecular docking between HuIFN- $\beta$  and the external region of IFNAR receptor was performed using the online ClusPro2 protein-protein docking server.

**Results:** The comparison of the values of the negative binding energy ( $\Delta G_{bind}$ ) obtained from protein-protein molecular docking between IFNAR receptor and HuIFN- $\beta$ , mHuIFN- $\beta$ -27, mHuIFN- $\beta$ -101 and mHuIFN- $\beta$ -27-101 ligands did not show a significant difference ( $P > 0.99$ ).

**Conclusion:** Regarding these results, it can be concluded that the produced mutations do not have a negative effect on the forming of rHuIFN- $\beta$ /IFNAR complex and does not interfere with the binding of the interferon beta to the receptor and thus improves the quality of the produced rHuIFN- $\beta$ .

**Keywords:** Interferon Beta, Molecular Docking, IFNAR

• **Citation:** Balkhi SS, Hojati Z. Comparison of Wild Type and Mutated (mHuIFN- $\beta$  27-101) Interferon Binding to the IFNRA Receptor by Molecular Docking. *Journal of Health and Biomedical Informatics* 2018; 5(3): 411-422.

1. Ph.d, Student in Division of Genetics, Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2. Ph.d, in Division of Genetics, Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

\***Correspondence:** Division of Genetics, Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

• **Tel:** +98-311-37932478

• **Email:** z.hojati@sci.ui.ac.ir