

## پیشگویی جهش‌های پایدارکننده بالقوه پروتئین اینترفرون بتا-1a (سینوکس) به وسیله

### شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

سوکند امیری فر<sup>۱</sup> و کریم مهنام<sup>۱،۲\*</sup>

<sup>۱</sup> ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، مرکز پژوهشی فناوری نانو

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

#### چکیده

داروی ایرانی سینوکس (اینترفرون بتا) یک داروی مهم در جلوگیری از پیشرفت بیماری ام اس است و افزایش پایداری آن اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق با طراحی پنج جهش برای این پروتئین و انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و داکینگ پایدارکننده‌ترین جهش، مشخص شد. برای انجام این کار در ابتدا ساختار طبیعی اینترفرون بتا به درگاه اینترنتی پاپ میوزیک داده شد تا جهش‌های پایدارکننده پیشگویی شوند. سپس مدل چهارجهش مناسب‌تر پیشگویی شده توسط این سرور و یک جهش ترکیبی (جهش ترکیبی ۲ و ۳ یا جهش ۵) از این پروتئین تهیه شد. سپس مدل هرکدام از این جهش‌ها و ساختار طبیعی به‌طور جداگانه در دماهای ۳۰۰ و ۳۵۰ و ۴۰۰ و ۴۵۰ و ۵۰۰ کلون به مدت ۲۰ نانوثانیه به‌وسیله برنامه گرومکس شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شدند (در مجموع ۶۰۰ نانوثانیه). سپس پارامترهای ساختاری برای هرکدام از این ساختارها در هر دما در ۱۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازیها محاسبه شد و نمودارهای دما در برابر میانگین پارامترها رسم شدند و شیب تغییرات ساختاری در اثر افزایش دما برای همه جهش‌ها و ساختار طبیعی به دست آمد تا ساختارهای پایدارتر مشخص شوند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که جهش شماره سه (G127E) در بین پنج جهش پایداری بیشتری در مقایسه با ساختار اینترفرون طبیعی دارد. به علاوه قدرت اتصال جهش شماره سه به گیرنده اینترفرون نسبت به حالت وحشی و سایر جهش‌ها بیشتر بود. به نظر می‌رسد که افزایش آبدوستی اطراف باقی‌مانده ۱۲۷ در جهش ۳ در سطح پروتئین منجر به افزایش حلالیت و پایداری بیشتر آن در خارج از بدن شده است.

واژه‌های کلیدی: اینترفرون بتا، پایداری، جهش، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، داکینگ

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۴۰۹۶۸۳۱، پست الکترونیکی: [mahnam.karim@sci.sku.ac.ir](mailto:mahnam.karim@sci.sku.ac.ir)

#### مقدمه

است (۱۶). اینترفرون‌ها در کاهش شمار حمله‌های ام‌اس و آسیب مغزی و در کاهش التهاب نورونها نقش دارند. علاوه بر این در افزایش تولید فاکتور رشد عصبی و در نتیجه در بهبود بقای نورونها تأثیر دارند. با این وجود تمام بیماران به این دارو پاسخ نمی‌دهند یعنی سطح بالایی از اینترفرون در بیماری‌های خود ایمن توسط آنتی‌بادی‌ها خنثی می‌شود (۷). اینترفرون‌ها به دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند. نوع یک

اینترفرون‌ها سیتوکین‌های پروتئینی مهمی هستند که خاصیت ضدویروسی و ضد تکثیر در برابر ویروس‌ها و باکتری‌ها را دارند. از نظر ساختاری اینترفرون‌ها شماری از خانواده سیتوکین‌های دارای هلیکس هستند و همچنین از خانواده فاکتورهای رشد در موجود زنده به شمار می‌آیند. فعالیت ضدویروسی و مقابله در برابر عوامل بیگانه، اینترفرون‌ها را به‌عنوان دارو برای بیماری‌هایی مثل هپاتیت، سرطانهای ویروسی و بیماری ام‌اس (Multiple sclerosis) پیشنهاد کرده

است و نیمه‌عمر این دارو درخارج از بدن نسبتاً کم است. همچنین در داخل بدن نیز درطول یک هفته دارو توسط آنزیم‌های کبدی متابولیزه می‌شود یا از طریق کلیه دفع می‌گردد (۱۲). گلیکوزیلاسیون در موثف حفاظت‌شده Asn Thr/ser-x- منجر به پایدارتر شدن این پروتئین می‌شود (۱۳).

روش‌های مختلف محاسباتی برای تغییر در پایداری پروتئین از طریق جهش توسعه یافته است. تمامی این روش‌ها از ساختار سه بعدی پروتئین استفاده می‌کنند. یکی از این روش‌ها، روش سرویس دهنده پاپ میوزیک است که توسط آقای دهوک و همکاران ابداع شد (۶). این درگاه اینترنتی تغییرات پایداری ترمودینامیک ناشی از جهش‌های نقطه‌ای را با استفاده از ترکیب خطی پتانسیل‌های آماری پیش‌بینی می‌کند. ضرایب پتانسیل‌ها وابسته به سطح در دسترس حلال باقی‌مانده‌های جهش یافته است. این سرور پس از اتمام، لیستی از جهش‌های پایدارکننده، ناپایدارکننده و بی‌اثر ایجاد می‌کند. این درگاه اینترنتی مقدار تأثیر یک جهش را به طور کمی در پایداری پروتئین محاسبه می‌کند که می‌تواند برای ارزیابی بهینه بودن جایگاه هر یک از باقی‌مانده‌ها در توالی پروتئین و بررسی پایداری ساختار آن استفاده شود (۶).

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یک پروتئین یا اسید نوکلئیک حرکت اتم‌های ماکرومولکول یا سامانه در طی یک‌زمان مشخص را با استفاده از حل معادله حرکت نیوتن و توابع انرژی پتانسیل بررسی می‌کند. خروجی شبیه‌سازی یک سری از ساختارهای ایجادشده در طی زمان شبیه‌سازی است که روند تغییرات ساختار را در طی زمان موردنظر ارائه می‌دهد که چگونگی این تغییرات دینامیک سامانه یا مولکول را منعکس می‌کند (۱۵ و ۵). شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی می‌تواند در هنگرد (ensemble) مقادیر ثابت تعداد اتم، حجم و دمای ثابت (NVT) یا هنگرد تعداد اتم، فشار و دمای ثابت (NPT) انجام شود. هنگرد NPT نتایج شبیه‌سازی با شرایط آزمایشگاهی همخوانی بیشتری دارد و

ایتترفرون‌ها شامل آلفا، بتا، تاو و امگا است، درحالی‌که گاما تنها عضو شناخته‌شده گروه دو ایتترفرون‌ها است (۳). ایتترفرون بتا که توالی DNA آن در سلول‌های پستانداران و مهره‌داران مثل پرندگان و ماهی‌های استخوانی یافت می‌شود، به دو گروه  $\beta 1a$  و  $\beta 1b$  تقسیم‌بندی می‌شود که ایتترفرون  $\beta 1a$  خنثی‌سازی آنتی‌بادی‌ها را در ۵ تا ۳۰ درصد بیماران تحریک می‌کند و هر دو گروه از طرف سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برای درمان بیماری ام‌اس تأیید شده‌اند. ایتترفرون بتا یک گلیکوپروتئین است که به صورت همودیمراست و بدون درنظرگرفتن پپتید علامت ۳۳۲ باقی‌مانده دارد. ۲۱ باقی‌مانده اول آن پپتید علامت (signal peptide) است. وزن مولکولی دیمران ۲۲/۵ کیلو دالتون است که ۳۵ درصد از توالی آن با ایتترفرون آلفا و ۵۰ درصد با توالی ایتترفرون بتای موش مشابهت دارد. توالی ایتترفرون بتا در درگاه اینترنتی UniProt با کد P01574 و در پایگاه داده پروتئینی PDB با کد 1AU1 موجود است. ساختار کریستالوگرافی از ایتترفرون بتای انسان نشان می‌دهد که این پروتئین از پنج مارپیچ آلفا تشکیل شده است (۴).

ایتترفرون‌های آلفا و بتا حدود ۳۰ درصد در توالی باقی‌مانده مشابهت دارند و هر دو باهم برای اتصال به گیرنده‌های مشابه رقابت می‌کنند (۱۶).

توانایی ایجاد آپوپتوز توسط ایتترفرون بتا با القای مقدماتی مرگ تومور همراه با مولکول‌هایی که آپوپتوز را تحریک می‌کنند انجام می‌پذیرد. همچنین ایتترفرون بتا تنظیم‌کننده بالینی آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی است که اجازه افزایش پپتیدهای مشتق‌شده از آنتی‌ژن‌های ویروسی را می‌دهد (۴).

سینووکس (CinnoVex) نام تجاری ایتترفرون بتا یک a است که در ایران به صورت همسان زنده (تکثیر در باکتری *E. coli*) تولید می‌شود. این دارو به صورت تزریقی هفته‌ای یک‌مرتبه باید مصرف شود. علی‌رغم مزیت درمانی این پروتئین نگهداری و استفاده از این داروی زیستی با مشکلاتی همراه

استفاده شد. برای شبیه‌سازی ساختار کریستالوگرافی پروتئین بتا اینترفرون a از بانک PDB با کد 1AU1 و بزرگنمایی ۲/۲ انگستروم گرفته شد و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با برنامه گرومکس ۵ در شرایط فشار و دمای ثابت (NPT) با میدان نیروی G43a1 به مدت ۲۰ نانوثانیه انجام شد (۱۵). برای انجام شبیه‌سازی ساختار کریستالوگرافی پروتئین اینترفرون در یک جعبه آب شامل ۱۲۷۷۴ مولکول آب با مدل spc216 قرار داده شد. همچنین ۳۳ یون سدیم و ۴۲ یون کلر به‌طور تصادفی جایگزین مولکولهای آب شدند. ابتدا کل سامانه با الگوریتم کاهش پرشیب و سپس شیب مزدوج کمینه (minimize) شد. در مرحله بعد به‌منظور به تعادل رساندن حجم و دمای سامانه به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در هنگرد (دما و حجم و تعداد مولکولهای ثابت) و سپس به منظور به تعادل رساندن دما و فشار سامانه ۱۰۰۰ پیکوثانیه در هنگرد NPT (دما و فشار و تعداد مولکولهای ثابت) با ثابت در نظر گرفتن مکان اتمهای پروتئین (position restraint) انجام شد. در مرحله نهایی ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در هنگرد NPT و در دمای ۳۰۰ کلوین و گام زمانی ۲ فمتوثانیه بدون ثابت در نظر گرفتن مکان اتمهای پروتئین انجام شد (۵ و ۹). جزئیات بیشتر در منبع ۱۴ ذکر شده است (۲ و ۱۴).

همچنین ساختار کریستالوگرافی پروتئین به سرور پاپ میوزیک (<http://dezyme.com/>) داده شد (۶). این سرور می‌تواند جهشهای پایدارکننده ساختار پروتئین را پیش‌بینی کند و آنها را برحسب تغییرات پایداری ترمودینامیکی (Thermodynamic stability changes) نسبت به حالت وحشی مرتب می‌کند. سپس چهارجهش پیشنهادی اول (شکل ۱) با منفی‌ترین  $\Delta\Delta G$  (تغییرات پایداری ترمودینامیکی حالت جهش‌یافته نسبت به حالت وحشی) انتخاب شد. مقادیر  $\Delta\Delta G$  در این شکل در زیر هر باقی مانده نوشته شده است که مجموع تغییرات انرژی جهش آن باقی مانده به ۱۹ باقی مانده دیگر است.

رفتار واقعی سامانه در شرایط تجربی بهتر منعکس می‌شود. روش‌های محاسباتی می‌توانند برای پیش‌بینی تغییرات ساختار پروتئین در اثر جهش استفاده شوند. آقای Doss همکارانش در سال ۲۰۱۲ با استفاده از روش‌های محاسباتی اقدام به طراحی چند جهش روی آنزیم سیستاتین بتا سنتاز به‌منظور افزایش پایداری این آنزیم کردند (۹). آقای Pikkemaat و همکاران در سال ۲۰۰۲ روی آنزیم هالوالکان دهالوژناز کار کردند و نشان دادند که شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌تواند پیوندهای دی سولفید مهم که باعث پایداری می‌شوند، را مشخص کند. آنها برای افزایش پایداری پروتئین چند جهش روی ساختار آنزیم ایجاد کردند و مشاهده کردند که آنزیم‌های جهش‌یافته، تغییرات قابل‌توجهی را نسبت به حالت وحشی نشان می‌دهند و دمای ذوب پروتئین نسبت به حالت وحشی افزایش می‌یابد (۱۷).

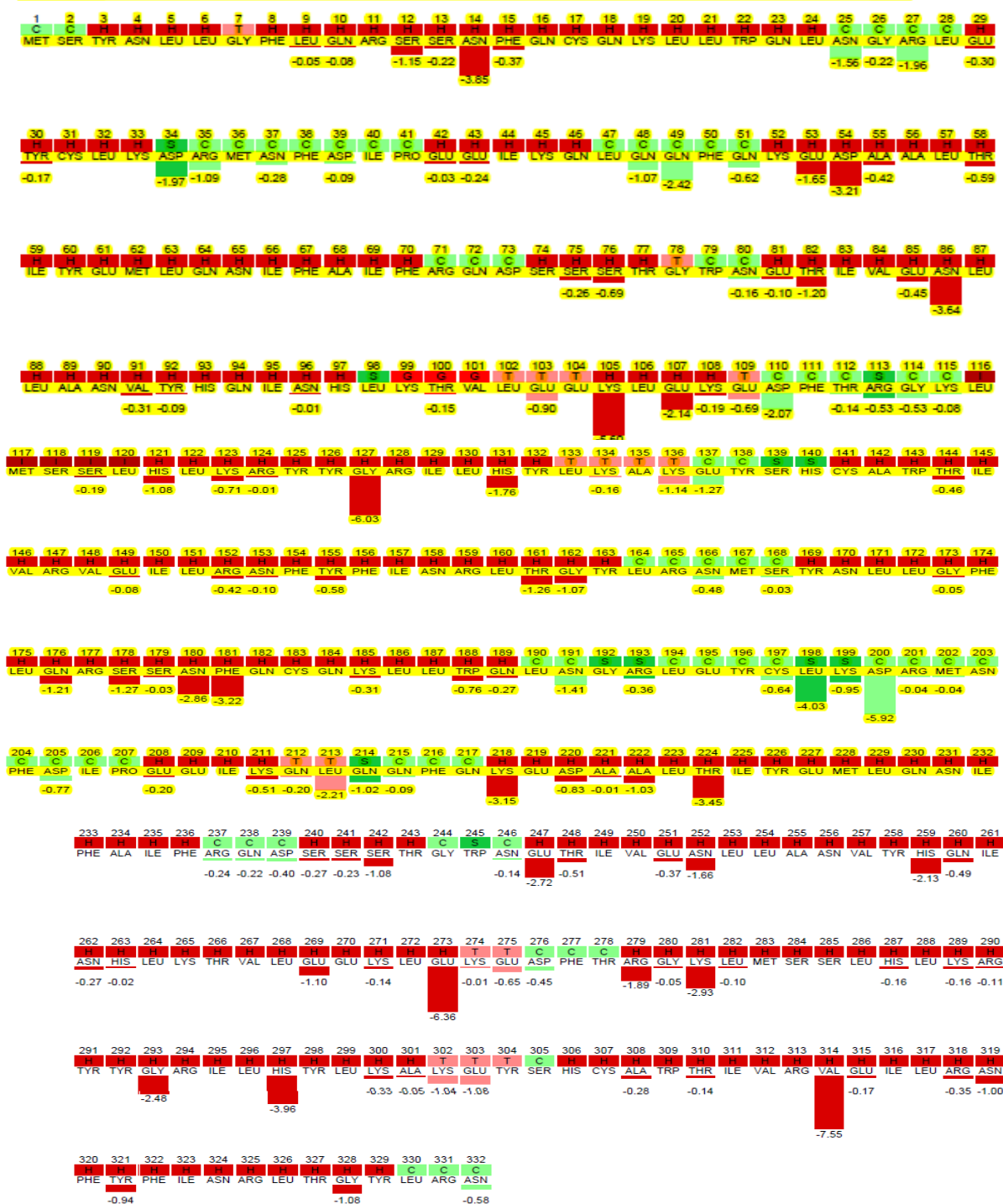
در این تحقیق به‌منظور افزایش پایداری این داروی پروتئینی در خارج از بدن و نگهداری طولانی‌تر در داروخانه و کاهش هزینه نگهداری اینترفرون بتا اقدام به پایدارسازی دارو به‌وسیله طراحی جهشهای پایدارکننده و پیشگویی تغییرات پایداری به کمک روش‌های نظری و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی گردید.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یک پروتئین یا اسید نوکلئیک حرکت اتمهای ماکرو مولکول یا سامانه در طی یک‌زمان مشخص را با استفاده از حل معادله حرکت نیوتن و توابع انرژی پتانسیل بررسی می‌کند. خروجی شبیه‌سازی یک سری از ساختارهای ایجادشده در طی زمان شبیه‌سازی است که روند تغییرات ساختار را در طی زمان موردنظر ارائه می‌دهد که چگونگی این تغییرات دینامیک سامانه یا مولکول را منعکس می‌کند (۱۴).

#### مواد و روشها

در این تحقیق از روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای بررسی تغییر پایداری پروتئین دارویی اینترفرون بتا یک a

## Sequence optimality (sum of negative ddG per sequence position) - fmd7.pdb - Systematic - 06-07-2017



شکل ۱- نتایج سرورپای میوزیک در مورد نقاط مستعد به جهش در پروتئین همودیمیر اینترفرون. قسمت های سبز رنگ و قرمز و سبز پررنگ و صورتی به ترتیب ساختار کوئل (C) (کلاف یخخانه)، ماریچ آلفا (H)، پیچ (Bend) (S) و پیوند های هیدروژنی کوتاه برد در ماریچ (T) هستند. مقادیر  $\Delta\Delta G$  در زیر هر باقی مانده ذکر شده است. در جهش ۱ هرودی والین ۳۱۴ و ۴۸ او در جهش ۲ هرودی گلوتامات ۱۰۷ و ۲۷۳ و در جهش ۳ هرودی گلیسین ۱۲۷ و ۲۹۳ و در جهش ۴ هرودی لوسین ۳۲ و ۱۹۸ جهش داده شده اند.

دما تغییرات ساختاری کمتری داشته باشند، پایدارتر باشند. بنابراین هرکدام از جهش‌ها و ساختار طبیعی در پنج دما (۳۰۰ و ۳۵۰ و ۴۰۰ و ۴۵۰ و ۵۰۰ کلوین) به‌طور جداگانه و به مدت ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی شدند. این محدوده دمایی هرچند در شرایط تجربی نمی‌تواند وجود داشته باشد ولی در کارهای نظری می‌توان از استفاده کرد و دمای بالا باعث شکسته شدن پیوندهای پروتئین نمی‌شود. در این مطالعه هدف از افزایش دما فراهم آوردن امکان باز شدن پروتئین و بررسی پایداری آن بود. در مقالات دیگر هم از شبیه‌سازی در دمای بالا استفاده شده است (۱۸). بنابراین در مجموع برای همه جهش‌ها و ساختار طبیعی (۶ ساختار) در ۵ دما به مدت ۶۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شد. سپس مقادیر RMSD (جذر میانگین جابه‌جایی اتم‌ها نسبت به لحظه شروع)، RMSF (جابه‌جایی مکان هر باقی مانده نسبت به مکان لحظه شروع خودش)، سطح در دسترس کل پروتئین، سطح در دسترس باقی مانده‌های قطبی، شعاع چرخش پروتئین (Rg)، تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین با خودش، تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین با آب، پارامتر ناپایداری و محتوی ساختار دوم پروتئین برای همه شبیه‌سازی‌ها محاسبه شد و شیب هر یک از پارامترها در اثر افزایش دما روی نمودار محاسبه شد تا تغییرات ساختارها (که از مقایسه هر جهش با خودش به‌دست آمده بود) در حالت جهش یافته و حالت وحشی بدست آید.

یکی دیگر از راه‌های نشان دادن پایداری پروتئین و میزان حلالیت آن ( $\Delta G_{sol}$ )، محاسبه انرژی آزاد حلالیت است که هر چه کمتر باشد نشان‌دهنده حلالیت بیشتر پروتئین است (۱۹). در این پژوهش انرژی آزاد حلالیت همه جهش‌ها و ساختار طبیعی در همه دماها محاسبه شد. برای محاسبه انرژی آزاد حلالیت از ده نانوثانیه آخر هر شبیه‌سازی بیست ساختار استخراج شد و انرژی آزاد حلالیت این ساختارها توسط برنامه APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver)

انتخاب جهش‌های پایدارکننده به این صورت است که ابتدا باقی مانده‌هایی که دارای منفی‌ترین  $\Delta\Delta G$  بودند بعنوان نقاط مستعد انتخاب شدند که عبارت بودند از والین ۳۱۴ و گلوتامات ۲۷۳ و گلیسین ۱۲۷ و لوسین ۱۹۸. از آنجایی که پروتئین اینترفرون همودیمیر می‌باشد و تعداد باقی مانده‌های هر مونومر آن ۱۶۶ می‌باشد و ایجاد جهش‌ها در هر دو زیر واحد بطور همزمان انجام شد در ادامه مقاله برای ذکر شماره جهش‌ها از شماره‌های باقی مانده‌های زیر واحد اول یعنی والین ۱۴۸ و گلوتامات ۱۰۷ و گلاسین ۱۲۷ و لوسین ۳۲ استفاده شد. مثلاً منظور از جهش والین ۱۴۸، جهش همزمان در والین ۱۴۸ و ۳۱۴ است. همچنین برای هر کدام از این نقاط مستعد بهترین و منفی‌ترین  $\Delta\Delta G$  از بین ۱۹ جهش انتخاب شد که عبارت بودند از جهش والین ۱۴۸ به گلوتامات (جهش ۱) و جهش گلوتامات ۱۰۷ به ایزولوسین (جهش ۲) و جهش گلیسین ۱۲۷ به گلوتامات (جهش ۳) و جهش لوسین ۳۲ به پرولین (جهش ۴).

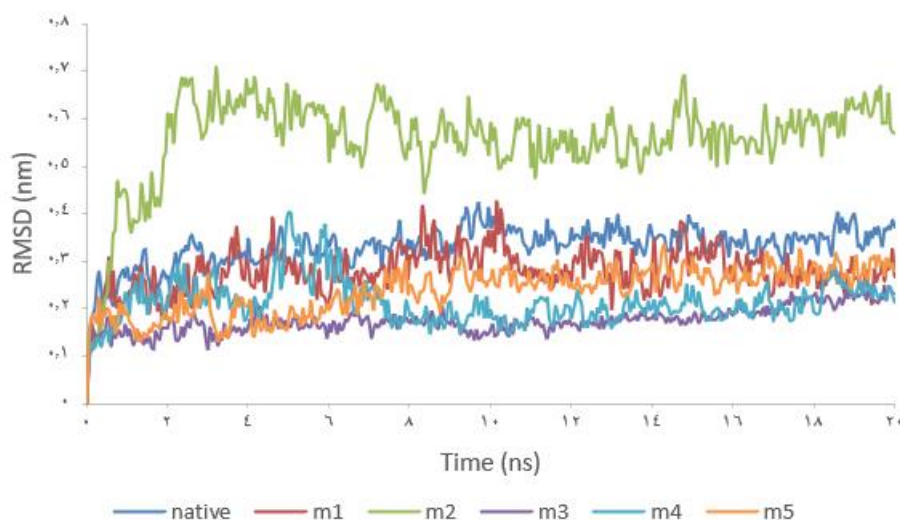
پس از انتخاب جهش‌ها با استفاده از برنامه هایپرکم (Hyperchem 8) چهار جهش به‌طور جداگانه در ساختار دیمر ایجاد شد. همچنین یک جهش از ترکیب جهش ۲ و ۳ تهیه شد (جهش ۵). این ساختارهای جهش‌یافته به‌صورت فایل PDB ذخیره شدند.

تحمل دمای بالا و حفظ عملکرد و تاخوردگی و ساختار پروتئین‌ها یکی از مهمترین پارامترها برای تطابق موجود زنده با شرایط محیطی است. بنابراین جلوگیری از تغییرات ساختاری به منظور حفظ عملکرد پروتئین‌ها در دمای بالاتر از حد عادی یک مساله حیاتی برای موجود زنده است. ما نیز به‌طور منطقی انتظار داریم پروتئین‌های پایدارتر مثل پروتئین‌های ترموفیل در اثر افزایش دما تغییرات ساختاری نامطلوب کمتری را متحمل شوند. در این مقاله اثر دما روی تغییرات ساختاری بررسی شده است و می‌توان انتظار داشت که پروتئین‌هایی که در اثر افزایش

اینترفرون به گیرنده‌اش از سرور هادداک (<http://haddock.science.uu.nl/services/HADDOCK/haddock>) (server-easy.html) استفاده شد (۸). در ضمن هرچه انرژی اتصال منفی تر باشد اتصال قوی‌تر است.

## نتایج و بحث

نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: نمودار تغییرات جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) پروتئین در حالت وحشی و جهش یافته در طول زمان شبیه‌سازی در دما ۳۰۰ کلوین در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲- جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) پروتئین اینترفرون وحشی (native) و جهش های (m1) ۱ و جهش ۲ (m2) و جهش ۳ (m3) و جهش ۴ (m4) و جهش ۵ (m5) در دمای ۳۰۰ کلوین در طول ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

میانگین گرفته شد و نمودار نقاط میانگین هر پارامتر در برابر دما رسم شد و شیب بهترین خط عبوری از بین نقاط به دست آورده شد (برازش) و روند تغییر آن پارامتر نسبت به افزایش دما مشخص شد. هرچه شیب این خط کمتر باشد افزایش دما اثر کمتری روی آن پارامتر خواهد داشت و آن جهش پایدارتر است. به عبارت دیگر در اثر افزایش دما آن ساختار کمتر دچار تغییر و تحول می‌شود. از آنجایی که هدف ما پیدا کردن جهشی است که منجر به پایداری بیشتر

محاسبه شد (۱ و ۱۰) و سپس از این انرژی‌ها میانگین گرفته شد.

پس از انجام آنالیزهای شبیه‌سازی، ساختار نهایی همه جهشها و حالت وحشی که در دمای ۳۰۰ کلوین به دست آمده بود به گیرنده اینترفرون (کد PDB: 1n6v) داگ شد تا مشخص شود که کدام یک از جهش‌یافته‌ها به گیرنده خود محکم‌تر اتصال می‌یابد. باقی مانده های ۴۴ و ۴۵ و ۴۶ و ۴۷ و ۱۰۰ و ۱۰۷ بعنوان باقی مانده های فعال برای گیرنده و همچنین باقی مانده های ۴۱ و ۴۲ و ۴۶ برای پروتئین اینترفرون وحشی یا جهش یافته در نظر گرفته شدند (۱۱). برای انجام داکینگ ساختار وحشی و جهش یافته

همان‌طور که در این شکل مشخص است، در ده نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی در همه حالت های پروتئین در دمای ۳۰۰ کلوین به تعادل ساختاری رسیده اند. بنابراین میانگین همه آنالیزها در ۱۰ نانوثانیه آخر محاسبه شد.

بعد از ایجاد جهش و شبیه‌سازی در ۵ دما برای هر جهش پارامترهای ذکر شده در هر دما برای هر سویه به دست آورده شد و از هر پارامتر در ۱۰ نانوثانیه آخر شبیه سازی

دست آید. نتایج شیب تغییرات پارامترها در جدول ۱ نشان داده شده است.

ایتترفرون نسبت به حالت وحشی باشد، انتظار می رود شیب تغییرات در جهش پیشنهادی این تحقیق کمتر از فرم وحشی باشد و نسبت به فرم وحشی پایداری بیشتری به

جدول ۱- شیب تغییرات پارامترها در برابر دما برای ساختار وحشی و حالت های جهش یافته

جهش ۵ (ترکیبی)	جهش ۴ L32P	جهش ۳ G127E	جهش ۲ E107I	جهش ۱ V148E	وحشی	شیب	
						شیب پارامتر	شیب
۳۹/۵۶	۳۶/۳۲	۳۹/۷	۳۳/۷	۳۸/۳	۴۶/۷	مجموع انرژی الکتروستاتیک و واندروالسی پروتئین-آب	
۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	RMSD اسکلت اصلی دایمر	
۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	RMSD مونومر	
۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲۷	۰/۰۰۲۹	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	RMSF اسکلت اصلی باقی مانده ها	
-۰/۰۰۱	-۰/۰۰۱	-۰/۰۰۱	-۰/۰۰۱	-۰/۰۰۱	-۰/۰۰۲	شعاع چرخش کل پروتئین	
۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۴	شعاع چرخش مونومر	
-۰/۰۰۵	-۰/۰۰۶۴	-۰/۰۰۳۷	-۰/۰۰۳۱	-۰/۰۰۶۱	-۰/۰۰۶۹	فاصله مرکز جرم دو مونومر	
۰/۰۱۴	۰/۰۵۲	۰/۰۲۱	۰/۰۱	۰/۰۳۲	۰/۰۴۳	سطح در دسترس حلال	
۰/۰۸۵	۰/۰۹۷	۰/۰۵۳	۰/۰۵۹	۰/۰۹۸	۰/۱۲	سطح در دسترس حلال مونومر	
۰/۰۱۵	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱۵	۰/۰۲	سطح در دسترس باقی مانده های قطبی	
۰/۰۴۱	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۵۵	۰/۰۳۲	۰/۲۴	سطح در دسترس حلال باقی مانده های غیر قطبی	
-۰/۴۰	-۰/۳۹	-۰/۳۴	-۰/۳۵	-۰/۴۳	-۰/۴۲	تعداد پیوند هیدروژنی پروتئین- پروتئین	
-۱/۱۲	-۱/۱۴	-۱/۲۶	-۱/۱۱	-۱/۱۲	-۱/۰۴	تعداد پیوند هیدروژنی پروتئین- آب	
۰/۰۷	۰/۱	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۱۱	۰/۱۱	تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مونومر	
۰/۰۳۹	-۰/۰۳۹	-۰/۰۲	-۰/۲۳	-۰/۲۶	-۰/۰۳	پارامتر ناپایداری	
۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۱۱	۰/۳۶	۰/۴۶	۰/۴۲	افزایش تعداد باقی مانده های شرکت کننده در کلاف بختانه	
-۰/۸۲	-۰/۸۱	-۰/۴۶	-۰/۶۵	-۰/۹۲	-۰/۸۵	تعداد باقی مانده های شرکت کننده در ساختار سخت	
۱۷/۹۵	۲۱/۴۹	۱۷/۸۱	۱۶/۵۲	۱۴/۳۲	۲۶/۵۲	انرژی آزادگیس حلالیت	

زیر واحد است و ممکن است ارتباط و فاصله مونومرها روی نتایج اثر بگذارد و باعث نتیجه گیری نامناسب شود، بنابراین RMSD یک زیر واحد یعنی زیر واحد اول محاسبه و مقایسه شد. در این مورد نیز مثل RMSD پروتئین دایمر تغییرات شیب RMSD در اثر افزایش دما ناچیز بود و افزایش اندکی در شیب مشاهده شد.

نتایج جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF): همچنین

نتایج جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD): از نظر تغییر میانگین RMSD اسکلت اصلی دایمر در برابر دما، به نظر می رسد همه جهش یافته ها تغییر ساختار قابل توجهی نسبت لحظه شروع شبیه سازی نداشته اند و جهشها و فرم وحشی عکس العمل یکسانی در برابر افزایش دما از خود نشان می دهند یا اگر اختلاف دارند این اختلافات ناچیز است. پروتئین ایتترفرون همودایمر است و هر دو مونومر کاملاً باهم یکسان اند. از آنجاکه RMSD دایمر متعلق به دو

دما شده‌اند.

برای حذف اثر فاصله دو مونومر در نتایج شعاع چرخش کل، شعاع چرخش یک مونومر هم محاسبه گردید. در این حالت برخلاف شعاع چرخش کل که با افزایش دما کم می‌شد با افزایش دما شعاع چرخش مونومر اول زیاد می‌شود. از آنجاکه جهش دوم و سوم شیب افزایش شعاع کمتری نسبت به حالت وحشی دارد می‌توان نتیجه گرفت که جهش دوم و سوم باعث باز شدن کمتر پروتئین یا ناپایداری کمتر در این جهشها نسبت به حالت وحشی در اثر افزایش دما می‌شوند. به عبارت دیگر این جهشها نسبت به افزایش دما حساسیت کمتر دارند اما در نمونه وحشی جهشهای یک و چهار افزایش شیب ثابت است و باز شدن و ناپایداری پروتئین بیشتر است.

از آنجایی که پروتئین اینترفرون یک همودیمراست و مونومر دوم هم دقیقاً مانند مونومر اول است نتایج این آنالیز برای مونومر دوم هم قابل‌تعمیم است و نیازی به تکرار محاسبات برای مونومر دوم نیست. این مسئله در همه آنالیزهایی که برای مونومر یک انجام شده است صادق است.

**نتایج فاصله مرکز جرم دو زیر واحد:** افزایش دما باعث کاهش فاصله دو مونومر می‌شود. از نظر فاصله مرکز جرم دو مونومر پروتئین جهش دودارای کمترین شیب است و با شیب کمتری دو مونومر در اثر افزایش دما نسبت به بقیه جهشها و حالت وحشی به هم نزدیک می‌شود. کاهش فاصله مرکز جرم دو مونومر هماهنگ با کاهش شعاع چرخش کل پروتئین است که قبلاً بحث شد.

**نتایج سطح در دسترس حلال پروتئین (ASA):** با افزایش دما در همه مدلها ساختار پروتئین باز می‌شود و سطح در دسترس کل اینترفرون (ASA) افزایش می‌یابد. از آنجایی که روند افزایش سطح جهش دوم در اثر افزایش دما کندتر از بقیه جهشها و حتی حالت وحشی است، می‌توان نتیجه گرفت جهش دوم باعث پایداری بیشتر اینترفرون نسبت به

RMSF اسکلت اصلی (Backbone) همه نمونه‌ها در همه دماها در ۱۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی محاسبه شد و سپس از RMSF همه باقی‌مانده‌ها در هر پروتئین در هر دما میانگین گرفته شد. این میانگین می‌تواند نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری کلی پروتئین باشد. شیب تغییر میانگین RMSF اسکلت اصلی باقی‌مانده‌ها در همه جهشها مشابه نمونه وحشی بود، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت افزایش دما در همه جهشها و نمونه وحشی تقریباً اثر یکسانی روی انعطاف‌پذیری کلی پروتئین داشته است.

باقی مانده های ۴۱ و ۴۲ و ۴۶ از اینترفرون به پروتئین گیرنده اینترفرون متصل می‌شوند. شیب میانگین RMSF باقی مانده‌های متصل به گیرنده در همه نمونه‌ها در هر دما گرفته شد و شیب خط برازش شده از بین این نقاط به دست آمد که نتایج حاکی از آن است که جهشهای شماره دو و چهار و پنج دارای کمترین شیب هستند ولی در کل می‌توان گفت همه مدلها نزدیک به هم بوده و این پارامتر در آنها ثابت هستند و افزایش دما اثر قابل‌توجهی روی روند انعطاف‌پذیری باقی مانده‌های متصل به گیرنده نگذاشته است.

**نتایج شعاع چرخش پروتئین (Rg):** شیب تغییرات شعاع چرخش اینترفرون منفی است که به معنی کاهش شعاع چرخش کل پروتئین با افزایش دما است. در کلیه آنالیزها برای مقایسه شبیه‌ها قدرمطلق اعداد را با هم مقایسه می‌گردد چون علامت منفی تنها به معنی کاهش آن پارامتر است. از نظر شعاع چرخش پروتئین (Rg) می‌توان گفت با افزایش دما در هر مدل کاهش این پارامتر را دیده می‌شود. کاهش شعاع چرخش در اثر افزایش دما به واسطه نزدیک‌تر شدن دو مونومر نسبت به هم در اثر افزایش دماست که در جدول ۱ ذکر شده و بعداً به آن اشاره می‌شود. با توجه به شیب یکسان کاهش شعاع چرخش دیمر در برابر افزایش دما می‌توان نتیجه گرفت همه جهشها به‌طور یکسان باعث کاهش جزئی شعاع چرخش دیمر اینترفرون در اثر افزایش

و از حالت وحشی پایدارتر است. دلیل این پایدارکنندگی را می‌توان این‌گونه توضیح داد که وقتی زنجیره غیر قطبی والین به گلوتامات قطبی منفی تبدیل شود جایابی گلوتامات به صورتی است که آبگریزی صورت‌بندی ساختار را کمتر می‌کند.

#### نتایج تعداد پیوند های هیدروژنی پروتئین با خودش:

آقای وان هپیل و همکارانش (۲۰) در مورد جهش‌های زیان‌بار روی پروتئین دیستروفی گلیکان تحقیق کرده و به این نتیجه رسیدند که در بین چند جهش آن جهشی که موجب افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی در ساختار پروتئین می‌شود ساختار را منسجم‌تر کرده و باعث می‌شود آن جهش کمتر باعث بیماری شود یعنی کمتر زیان‌بار باشد. افزایش دما باعث شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی درونی و کاهش تعداد پیوندهای هیدروژنی می‌شود. از آنجاکه جهش سوم و دوم کمترین روند کاهش پیوند هیدروژنی با افزایش دما را داشته است می‌توان آن را به‌عنوان جهش پایدارتر از همه جهش‌ها و همچنین نسبت به حالت وحشی در نظر گرفت. به‌عبارت‌دیگر پیوندهای پایدارکننده پروتئین با سرعت کمتر باز می‌شوند و ساختار دیرتر از هم گسیخته می‌شود. در این مورد می‌توان گفت نمونه وحشی و جهش شماره یک عملاً یکسان هستند. جهش شماره چهار هم نسبت به نمونه وحشی دارای شیب کمتری است ولی روند کاهش پیوند هیدروژنی سریع‌تری نسبت به جهش‌های شماره دو و سه دارد.

#### نتایج تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین با آب: در این

مورد هم با افزایش دما پیوندهای هیدروژنی پروتئین با آب از بین می‌روند و حلالیت پروتئین با افزایش دما کم می‌شود. نتایج حاصل از بررسی شیب خط به‌دست‌آمده نشان‌دهنده اختلافات کم نمونه‌ها نسبت به هم است ولی اگر به اختلافات کم توجه کنیم مشخص می‌شود که همه جهش‌ها شیب بیشتری نسبت به حالت وحشی دارند و حلالیت با افزایش دما با سرعت بیشتری نسبت به حالت

حالت وحشی و سایر جهش‌ها می‌شود؛ بنابراین جهش دو، پایدارکننده‌ترین جهش در این آنالیز به حساب می‌آید. با توجه به اینکه با افزایش دما سطح پروتئین زیاد شده است، انتظار افزایش در شعاع کل پروتئین هم وجود دارد در حالی که قبلاً نشان داده شد شعاع کل پروتئین کم می‌شود و شیب تغییرات شعاع کل پروتئین منفی بود. این اختلاف را به این صورت می‌توان توضیح داد که دو مونومر اینترفرون توسط یک اتم روی (Zn) به هم وصل هستند و با افزایش دما دو مونومر به هم نزدیک می‌شوند و در نتیجه شعاع کلی اینترفرون کاهش می‌یابد، اما از آنجایی که شعاع هر مونومر به‌طور جداگانه افزایش پیدا می‌کند و سطح در دسترس کل پروتئین نیز افزایش پیدا می‌کند. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که افزایش دما باعث افزایش در سطح در دسترس حلال مونومر یک می‌شود. به علت اینکه افزایش سطح به معنای ناپایداری در نظر گرفته می‌شود می‌توان گفت جهش شماره سه و بعد از آن جهش دو با سرعت کمتری نسبت به همه حالات باز می‌شود و از بقیه پایدارتراند. جهش شماره یک و چهار هم تقریباً با هم از این نظر مشابه‌اند.

با توجه به اینکه افزایش سطح در دسترس حلال قطبی به معنی افزایش حلالیت پروتئین است، با افزایش دما سطح در دسترس حلال قطبی زیاد می‌شود ولی همه جهش‌ها با شیب کمتر یا مساوی حالت وحشی سطح در دسترس حلال قطبی خود را افزایش می‌دهند، بنابراین هیچ‌کدام از جهش‌ها مزیتی نسبت به حالت وحشی از نظر افزایش سطح قطبی در اثر افزایش دما ندارند. افزایش سطح در دسترس حلال غیر قطبی به معنی کاهش حلالیت و رسوب پروتئین است. به بیان دیگر هر چه سطح در دسترس حلال باقی‌مانده‌های غیر قطبی یا هیدروفوب کمتر باشد پروتئین حلالیت و پایداری بیشتری دارد و در این مورد هر پروتئینی که با افزایش دما شیب کمتری برای افزایش سطح در دسترس حلال غیر قطبی داشته باشد پایدارتر است، بنابراین از این نظر جهش شماره یک (V148E) از همه بهتر

می‌کرد را به دست آوردند. با داشتن اطلاعات تجربی در مورد دمای ذوب (Tm) سویه‌های گرمادوست و سرمادوست مشخص شد که این شیب با دمای ذوب رابطه عکس دارد، یعنی هرچه کمتر باشد، پایداری بیشتر و دمای ذوب بالاتر است. بنابراین می‌توان این پارامتر را پارامتر ناپایداری نامید. این پارامتر برای نمونه وحشی و پنج جهش محاسبه شد و نتایج حاصل نشان داد که شیب‌خط برازش برای جهش شماره سه از همه نمونه‌های جهش‌یافته و وحشی کمتر است. پس از آن جهش شماره چهار دارای شیبی تقریباً برابر با نمونه وحشی است و جهش شماره یک و دو دارای شیبهای نامناسب و بیشتر از نمونه وحشی می‌باشند.

**نتایج میانگین تعداد باقی مانده‌های شرکت‌کننده در ساختار کلاف بختانه و ساختار سخت:** آقای لئون و همکاران نشان دادند که جهشی که باعث افزایش ساختار دوم پروتئین مونلین می‌شود باعث افزایش پایداری آن در دمای بالاتر هم می‌شود (۱۴). در مورد اینترفرون بتا، چون افزایش دما منجر به باز شدن پروتئین می‌شود میانگین تعداد باقی مانده‌هایی که در ساختار کلاف بختانه شرکت می‌کنند با افزایش دما زیاد می‌شود و شیب نمودارها در همه موارد مثبت است. کمترین شیب در این مورد متعلق به جهش سوم است که نشان‌دهنده پایداری بیشتر بودن آن نسبت به بقیه جهشها و نمونه وحشی است. پس از آن جهش شماره دو دارای شیب کمتری نسبت به حالت وحشی است و بنابراین پایداری بیشتر است. بقیه جهشها دارای شیب‌های تقریباً برابر و زیادتر از نمونه وحشی هستند و مقاومت کمتری برای تبدیل به ساختار کلاف بختانه شدن در برابر افزایش دما دارند.

با افزایش دما ساختار دوم سخت (مجموعه ساختارهای مارپیچ آلفا و صفحات بتا و دور (turn)) اینترفرون هم کم می‌شود و شیب در همه نمونه‌ها منفی می‌شود. در اینجا کمترین شیب متعلق به جهش سوم است که نسبت به

وحشی کم می‌شود، بنابراین همه جهشها باعث حساسیت بیشتر اینترفرون از نظر کاهش حلالیت داشته‌اند. در بین جهش‌ها، جهش شماره دو دارای کمترین شیب و کمترین کاهش حلالیت نسبت به بقیه است پس جهش بهتری از این نظر است.

**انرژی واندروالسی و الکتروستاتیک پروتئین و آب:** همان‌طور که در جدول ۱ مشخص است مجموع انرژی واندروالسی و الکتروستاتیک بین پروتئین و آب و با افزایش دما زیاد می‌شود که به معنی کاهش حلالیت و جاذبه بین پروتئین و آب است. شیب‌خط برازش شده از بین میانگین‌های ۱۰ نانو ثانیه آخر هر شبیه‌سازی نشان می‌دهد جهش شماره دو دارای کمترین شیب افزایشی در بین مدل‌ها است و بعد از آن جهش شماره یک و چهار دارای کمترین شیب هستند ولی در کل همه مدل‌های جهش‌یافته از نمونه طبیعی دارای شیب بهتر و کمتری هستند و از این نظر پایداری بیشتری دارند.

**نتایج پارامتر ناپایداری:** آقای Zeiske و همکاران (۲۱) از چهار سویه آنزیم ریونوکلائاز برای محاسبه این پارامتر استفاده کردند این چهار سویه به ترتیب سرمادوست (so) RNH، متعادل دوست ((ec RNH)، گرمادوست متوسط (Ct) RNH و گرمادوست (Tt RNH) بودند. هدف آنها این بود که دمای ذوب (Tm) هر یک از این سویه‌ها را به وسیله شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به دست بیاورند. برای این کار ابتدا پارامتر نظم پیوندهای NH اسکلت اصلی که نشان‌دهنده نوسانات جهت‌گیری پیوندهای NH در پروتئین است را در هر دما به دست آوردند. سپس از پارامتر نظم در چند نانو ثانیه آخر شبیه‌سازی میانگین گرفتند و در عدد ۰/۸۹ ضرب کردند و از یک‌کم کردند و لگاریتم نپری آن را حساب کردند. به علاوه لگاریتم نپری دما را هم محاسبه کردند و این کار را برای همه سویه‌ها در چند دما انجام دادند و نمودار اعداد به دست آمده از این دو لگاریتم را رسم کردند و شیب بهترین خطی که از بین این نقاط عبور

نمونه وحشی شیب کمتر و پایداری بیشتری دارد، بنابراین جهش سوم در اثر افزایش دما ساختار دوم پایدارتر مانده و کمتر تخریب شده است. پس از جهش سوم، جهش دوم نیز بهتر از حالت وحشی است. جهش شماره یک از نمونه وحشی دارای شیب بیشتر شده یعنی پایداری ساختار دوم کمتری دارد. جهش شماره چهار تقریباً مثل نمونه وحشی بوده است و در کل می‌توان گفت جهش شماره سه و دو بیشتر از بقیه جهش‌ها باعث پایداری ساختار دوم پروتئین ایتترفرون شده است.

**انرژی آزاد گیبس حلالیت پروتئین:** از نظر اختلاف انرژی آزادگیس حلالیت می‌توان گفت در همه نمونه‌ها با افزایش دما انرژی آزاد حلالیت زیادتر می‌شود که به معنی کاهش حلالیت با افزایش دما است و شیب در همه نمونه‌ها مثبت است. در همه جهش‌ها شیب افزایش انرژی حلالیت کمتر از نمونه وحشی است که به معنی سرعت کمتر کاهش حلالیت با افزایش دماست. در این نتایج کمترین شیب متعلق به جهش یک و دو است و جهش شماره چهار دارای بیشترین شیب و بیشترین کاهش حلالیت است.

**نتایج داکینگ:** نتایج به دست آمده از سرورهاد داک برای جهش ۳ و ۲ و ۴ و ۵ و ۱ و وحشی به ترتیب برابر با ۹۹/۳- و ۹۳/۲- و ۸۵/۹- و ۵۹/۱- و ۵۲/۹- کیلوکالری برمول است. بنابراین در بین همه نمونه‌ها جهش شماره سه دارای منفی‌ترین انرژی آزاد اتصال یعنی قوی‌ترین اتصال است و نسبت به نمونه وحشی اتصال محکم‌تری به گیرنده خود دارد که مزیت دیگری برای جهش شماره سه است. همچنین در جهش شماره سه در بین همه جهش‌ها دارای کمترین انرژی اتصال و اندروالسی و کمترین انرژی الکتروستاتیک بین ایتترفرون و گیرنده و بیشترین سطح مدفون شده در اثر اتصال به گیرنده بود.

**نتیجه‌گیری**

داروی سینووکس (ایتترفرون بتا) یک داروی مهم برای

جلوگیری از عود مجدد بیماری ام‌اس است که افزایش نیمه‌عمر آن از اهمیت به‌سزایی برخوردار است چون این دارو به‌صورت محلول و در یخچال نگهداری می‌شود. در این تحقیق اقدام به افزایش پایداری پروتئین ایتترفرون بتا (سینووکس) با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شد. هدف از این تحقیق کمک به بیماران مبتلا به ام‌اس و پیدا کردن جهش‌هایی بود که منجر به پایداری بیشتر آن شود در اینجا برای طراحی جهش‌های پایدارکننده از درگاه ایترنی پاپ میوزیک استفاده شد و برای تأیید دقیق‌تر نتایج این سرور از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. مطالعه تغییر ساختار پروتئین‌ها در اثر جهش به کمک تکنیک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی توسط محققین زیادی انجام شده است (۲). همچنین از انرژی آزاد حلالیت برای بررسی پایداری ساختار پروتئین‌ها استفاده شده است (۱). از بین جهش‌های پیشنهادی این سرور، چهار جهش مناسب‌تر انتخاب شد. در ضمن یک جهش ترکیبی از جهش دو و سه نیز تهیه شد (جهش ۵) و با انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در دماهای ۳۰۰ و ۳۵۰ و ۴۰۰ و ۴۵۰ و ۵۰۰ کلون و به مدت ۲۰ نانوثانیه در پنج دمای مذکور برای این پنج جهش پارامترهای مختلف محاسبه شد و شیب تغییرات این پارامترها در اثر افزایش دما بدست آمد. بطور منطقی انتظار داریم ساختار پایدارتر در اثر افزایش دما شیب تغییرات کمتری در این پارامترها داشته باشد. با بررسی شیب تغییرات پارامترهای بدست آمده در شبیه‌سازی و مقایسه آن با ساختار وحشی نشان داده شد که جهش شماره دو و سه از بین پنج جهش، جهش‌های مناسب‌تری می‌باشند. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت جهش‌های شماره دو و سه به‌صورت جداگانه در خیلی از آنالیزها توانسته بودند پایدارکنندگی مناسبی را نشان دهند اما وقتی این دو جهش باهم ترکیب شد (جهش ۵) برخلاف انتظار به پایدارکنندگی بیشتر از هرکدام از آن‌ها به‌طور جداگانه نرسیدیم و ترکیب این دو جهش اثر مثبت هرکدام به‌تنهایی را خنثی کرده بود و جهش ترکیبی

سرعت دفع پروتئین از طریق کلیه، البته افزایش پایداری در خارج بدن با پایداری در داخل بدن متناسب است. بهرحال حتی اگر این جهش منجر به افزایش پایداری دارو در خون هم نشود منجر به پایداری دارو در خارج از بدن و افزایش زمان ذخیره‌سازی و نگهداری آن می‌شود. به علاوه این جهش می‌تواند باعث افزایش و بهبود عملکرد دارو در اتصال به گیرنده‌اش شود. برای انجام بررسی‌های دقیق‌تر باید به‌طور تجربی این پروتئین جهش‌یافته تهیه شود و پایداری و قدرت اتصال آن به گیرنده‌اش با روش‌های تجربی بررسی شود. در این مطالعه از ترکیب روش‌های بیوانفورماتیکی و محاسباتی برای بررسی پایداری پروتئین ایتترفون استفاده شده است که جالب و قابل کاربرد برای بررسی پایداری سایر پروتئینها در اثر جهش می‌باشد و بنابراین بدون نیاز به صرف هزینه‌های سنگین برای انجام کاری‌های تجربی می‌توان به طراحی جهش‌های پایدار کننده ساختار پروتئین اقدام نمود. در پایان امید است نتایج این مطالعه کمکی به درمان بهتر بیماری ام‌اس کرده باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت و پشتیبانی از این کار تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تقریباً در هیچ‌کدام از آنالیزها برتری نسبت به حالت وحشی از نظر پایداری نداشت. در مورد جهش شماره دو (E107I) با تبدیل گلوتامیک به ایزولوسین احتمالاً آبگریزی ساختار داخلی پروتئین زیاد می‌شود که منجر به افزایش پایداری نسبت به حالت وحشی می‌شود. همچنین احتمال دارد که ایزولوسین با همسایه‌های خود اقدام به برقراری پیوندهای آبگریزی قوی‌تری کرده که به فشردگی بیشتر هسته آبگریزی و پایداری کمک کند یا در مورد جهش شماره سه (G127E) وقتی گلايسين که بدون بار است به یک باقی‌مانده قطبی باردار (گلوتامات) تبدیل می‌شود سطح پروتئین قطبی تر شده و به پایداری و حالیت کمک می‌کند. با بررسی مجموع نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد در بین جهش ۲ و ۳، جهش ۳ (G127E) بهتر از همه منجر به پایداری ایتترفون نسبت به حالت وحشی می‌شود. از نظر اتصال به گیرنده هم جهش شماره سه دارای اتصال بهتری نسبت به حالت وحشی و سایر جهشها است که مزیت دیگری برای جهش شماره سه است. با توجه به این‌که این مطالعه تنها بر روی خود مولکول ایتترفون انجام شده است، افزایش پایداری را بیشتر به خارج از بدن می‌توان نسبت داد چون پایداری در داخل بدن ممکن است تابع عوامل دیگری غیر از ساختار پروتئین هم باشد مانند

### منابع

۲- صفر زاده، م، پازنگ، م، مهرزاد، ف، دوستدار، ف، چاپارزاده، ن، ربیعی فردانیه، د، یاری خسروشاهی، ا، محمد پور، ع، ۱۳۹۴. بررسی نحوه تأثیر جهشها بر غیر فعال شدن آنزیم پیرازین آمیداز با شبیه سازی دینامیک مولکولی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۸: ۲۶۶-۲۷۸

۱- جهانین سردودی، ج، دباغ حسینی پور، م، ایقایی بناب، م، راستکار ابراهیم زاده، ع، ۱۳۹۸. مطالعه برهم‌کنش پروتئین آستروپسین A و پاکلی تاکسول با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی و معادله پواسون- بولتزمن تطبیقی (APBS). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، دوره ۳۴، شماره ۳، مهر ۱۴۰۰، صفحه ۳۶۴-۳۷۹

3- Balachandran, S. Roberts, PC. Kipperman, T. Bhalla, KN. Compans, RW. Archer, DR. Barber, GN. 2000. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol*: 74(3): 1513-23.

4- Bekisz, J. Schmeisser, H. Hernandez, J. Goldman, ND. Zoon, KC. 2004. Mini Review Human

Interferons Alpha, Beta and Omega. Growth factors: 22(4): 243-51.

5- Childers, MC. Daggett, V. 2017. Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. *Molecular Systems Design & Engineering*: 2: 9-33.

6- Dehouck, Y. Kwasigroch, JM. Gilis, D. Rooman, M. 2011. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon

- mutation and sequence optimality. *BMC bioinformatics*: 12(1): 151.
- 7- De Masi, R. Pasca, S. Scarpello, R. Idolo, A. De Donno, A. 2013. The clinical potential of blood-proteomics in multiple sclerosis. *BMC Neurology*: 13: 45.
- 8- Dominguez, C. Boelens, R. Bonvin, AMJJ. 2003. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc*: 125: 1731-1737.
- 9- Doss, CG. Rajith, B. Garwasis, N. Mathew, PR. Raju, AS. Apoorva, K. William, D. Sadhana, NR. Himani, T. Dike, IP. 2012. Screening of mutations affecting protein stability and dynamics of FGFR1-A simulation analysis. *Applied & translational genomics*: 1: 37-43.
- 10- Hoppe, TA. 2013. Simplified representation of anisotropic charge distributions within proteins. *The Journal of chemical physics*: 138(17): 05B603\_1.
- 11- Karpusas, M. Nolte, M. Benton, CB. Meier, W. Lipscomb, WN. Goelz, S. 1997. The crystal structure of human interferon  $\beta$  at 2.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 94(22): 11813-8.
- 12- Karpusas, M. Nolte, M. Benton, CB. Meier, W. Lipscomb, WN. Goelz, S. 1997. The crystal structure of human interferon  $\beta$  at 2.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 94(22): 11813-8.
- 13- Karpusas, M. Whitty, A. Runkel, L. Hochman, P. 1998. The structure of human interferon- $\beta$ : implications for activity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*: 54(11): 1203-16.
- 14- Leone, S. Picone, D. 2016. Molecular dynamics driven design of pH-stabilized mutants of MNEI, a sweet protein. *PLoS One*: 11(6): e 0158372.
- 15- Lindahl, E. Hess, B. Van Der Spoel, D. 2001. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Molecular modeling annual*: 7(8): 306-317.
- 16- Morán, GAG. Parra-Medina, R. Cardona, AG. Quintero-Ronderos, P. Rodríguez, ÉG. 2013. Cytokines, chemokines and growth factor. Chapter 9.
- 17- Pikkemaat, MG. Linssen, AB. Berendsen, HJ. Janssen, DB. 2002. Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability. *Protein engineering*: 15(3): 185-92.
- 18- Settanni, G. Fersht, AR. 2008. High temperature unfolding simulations of the TRPZ1 peptide. *Biophysical journal*: 94(11): 4444-53.
- 19- Shivakumar, D. Williams, J. Wu, Y. Damm, W. Shelley, J. Sherman, W. 2010. Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J. Chem. Theory Comput*: 5: 1509-1519.
- 20- Von Hippel, PH. Schleich, T. 1969. Structure and stability of biological macromolecules, Marcel Dekker, New York, 417.
- 21- Zeiske, T. Stafford, KA. Palmer, AG. 2016. Thermostability of enzymes from molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*: 12(6): 2489-92.

## Prediction of potential stabilizer mutation of Interferon beta 1 A (Cinovex) via molecular dynamics simulation

Amirifar S.<sup>1</sup> and Mahnam K.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Nanotechnology Research Center, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

### Abstract

Iranian drug CinnoVex (Interferon beta) is an important drug for preventing the progress of M.S. disease and an increase of its stability is very important. In this research, we designed five mutations in the structure of interferon and performed molecular dynamics simulation and docking and the best stabilizer mutation was determined. At first, the wild type structure of beta interferon was subjected to Pop music server for the prediction of stabilizer mutations. Then the first four proper score mutations were selected and also a mutated structure of mutation 2 and mutation 3 (mut 5) were made. Then, molecular dynamics simulation performed via Gromacs package on wild and mutated structures in five temperatures (300, 350, 400, 450, 500 K) separately for 20 ns (in total 600 ns). The simulation parameters were calculated in each temperature for all structures during the last 10 ns of simulations. The plots of temperature against averages of parameters were drawn separately and the regression slope of parameters was calculated to find the more stable structure. The results revealed that mutation 3 (G127E) is the best compared to wild interferon and other mutations. Also, the binding power of mutation 3 with its receptor is more than wild type and other mutations. It seems that the increase of hydrophilicity of protein around position 127 in mutation 3 on interferon surface leads to increase the stability and solubility of it *ex vivo*.

**Keywords:** Molecular Dynamics simulation, Interferon beta 1, Mutation, Stability, Docking