

Phylogenetic and In Silico Analysis of Interferon Beta-1b Protein

Seyed Ziaeddin Mirhoseini¹,
Zahra Pezeshkian²,
Shahrokh Ghovvati³

¹ Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran

² PhD Student in Molecular Genetics, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran

(Received August 8, 2016 ; Accepted December 26, 2016)

Abstract

Background and purpose: Interferon beta-1b recombinant protein is used for reducing the relapse rate and treatment in patients with Multiple sclerosis (MS). In this study, phylogenetic and in silico analysis of interferon beta-1b were conducted by servers and bioinformatics tools to predict its structural potential.

Materials and methods: Physiological and physico-chemical characteristics of interferon beta-1b protein were evaluated by ProtScale and ProtParam servers, respectively. The 3D structure of the interferon beta-1b protein and its interaction with other proteins were studied using Swiss-Model server and the STRING platform, respectively.

Results: The results of the phylogenetic analysis showed that the human interferon beta protein is closest to Daubenton's bat in the amino acid structure by 96%. The in silico analysis of interferon beta 1b protein implied the existence of signal peptide and lack of the transmembrane domain. The results of post-translational modification predictions showed that protein acetylation and phosphorylation may occur in some regions of interferon beta-1b protein. The analysis of the protein networking of interferon beta-1b revealed more interactions between this protein and interferon receptor 1 (IFNAR1) and interferon regulatory factor 3 (IRF3).

Conclusion: In Silico analysis showed that interferon beta-1b, is a protein with effective regulatory role but unstable in vitro. This bioinformatic analysis of interferon beta-1b protein can provide the groundwork for practical tests and future functional studies.

Keywords: interferon beta-1b, bioinformatics tools, multiple sclerosis, in silico analysis, protein-protein interaction.

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 70-82 (Persian).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و آنالیز In Silico پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی

سید ضیاءالدین میرحسینی^۱

زهره پزشکیان^۲

شاهرخ قوتی^۳

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی، جهت درمان بهبود دهنده بیماری MS و کاهش تعداد حملات در بیماران استفاده می گردد. روابط فیلوژنتیکی و آنالیز بیوانفورماتیکی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی به صورت In Silico با هدف پیش بینی پتانسیل ساختاری اش توسط سرورها و ابزارهای بیوانفورماتیکی معتبر مورد پیش بینی قرار گرفت.

مواد و روش ها: ویژگی های فیزیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی نیز توسط سرورهای ProtScale و ProtParam مورد بررسی قرار گرفت. ساختار سه بعدی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از سرور Swiss-Model و اثرات متقابل آن با پروتئین های دیگر توسط پلت فرم STRING بررسی شد.

یافته ها: نتایج تجزیه و تحلیل درخت تکاملی نشان دادند که پروتئین اینترفرون بتای انسانی بیشترین قرابت را از لحاظ ساختار اسید آمینه ای به میزان ۹۶ درصد به خفاش آبی دارد. نتایج بررسی In Silico ساختار پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی، حاکی از وجود توالی راهنما و عدم وجود منطقه تراغشایی در این پروتئین بود. نتایج پیش بینی تغییرات پس از ترجمه نشان دادند که در مناطقی از این پروتئین امکان استیلایسیون و فسفریلاسیون محتمل می باشد. نتایج تجزیه و تحلیل شبکه پروتئینی نشان داد که بیشترین تقابل بین پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی و پروتئین گیرنده اینترفرون ۱ و فاکتور تنظیمی ۳ اینترفرون وجود دارد.

استنتاج: به طور کلی نتایج نشان دادند که پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی، پروتئینی با نقش تنظیمی موثر اما ناپایدار در شرایط آزمایشگاهی است. آنالیزهای بیوانفورماتیکی انجام شده روی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی زمینه را برای مطالعات عملکردی آینده فراهم می کند.

واژه های کلیدی: اینترفرون بتا ۱ بی، ابزارهای بیوانفورماتیکی، اسکروز چند گانه (MS)، آنالیز In Silico، اثر متقابل پروتئین - پروتئین

مقدمه

بین سلول ها مورد استفاده قرار می گیرند تا موجب فعال نمودن دفاع حفاظتی سیستم ایمنی بدن شوند که منجر به ریشه کنی عوامل بیماری زا می شود (۲). اینترفرون بتا ۱ بی یک آنالوگ (۱۶۵ اسید آمینه، ۱۸۵۰۰ دالتون) از

اینترفرون ها پروتئین های ترشحی هستند که موجب ایجاد یک حالت ضد ویروس در سلول های هدف خود می شوند (۱). آن ها متعلق به گروه بزرگی از پروتئین ها به نام سایتوکاین ها هستند، مولکول هایی که برای ارتباط

E-mail: Ghovvati@guilan.ac.ir

مؤلف مسئول: شاهرخ قوتی - رشت: ۵ کیلومتر بزرگراه خلیج فارس، دانشگاه گیلان

۱. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۹/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۰/۶

اینترفرون بتای انسانی می باشد که امروزه به صورت نو ترکیب در سامانه باکتریایی تولید می شود. این پروتئین آنالوگ نو ترکیب دارای مزایایی از قبیل عدم نیاز به گلیکوزیله شدن و بیان در سلول پستانداران می باشد. همچنین در موقعیت ۱۷ این پروتئین اسید آمینه سرین جایگزین سیستمین شده است. با وجود چنین تفاوتی، این پروتئین نو ترکیب به همان گیرنده های اینترفرون بتای طبیعی متصل می گردد (۳). دو نوع پروتئین اینترفرون بتا نو ترکیب وجود دارد: اینترفرون بتا ۱ بی که اولین درمان بهبود دهنده بیماری اسکروز چند گانه (MS^۱) بود که توسط سازمان غذا و دارو (FDA^۲) مورد تایید قرار گرفت (۴) و اینترفرون بتا ۱ آ که آن هم برای درمان MS با مشخصات دارویی بسیار مشابه مورد استفاده قرار می گیرد (۵). MS یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که بزرگسالان به خصوص جوانان را تحت تاثیر قرار می دهد. این بیماری از طریق وقوع عود کننده اختلالات عصبی ناشی از یک حمله خود ایمنی وابسته به سلول T علیه بافت های سیستم عصبی مرکزی مشخص می شود (۶). پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی سبب کاهش تعداد حملات در بیمارانی می شود که مبتلا به اسکروز چند گانه عود کننده هستند. به طور متوسط استفاده از همه تولیدات اینترفرون بتا باعث کاهش حدود یک سوم میزان عود سالانه در بیماران مبتلا به MS می شود. مشاهدات حاصل از MRI^۳ نیز نشان دهنده ۵۰ تا ۷۰ درصد کاهش در فعالیت بیماری پس از مصرف این دارو بود (۷). مطالعات دیگری در زمینه استفاده زود هنگام اینترفرون بتا در مواردی از بیماری انجام شد که موجب تاخیر در اولین حمله بیماری و تبدیل آن به MS قطعی کلینیکی و نیز تاخیر در پیشرفت ناتوانی اعضا می شود (۸). تاکنون مطالعاتی در مورد بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در باکتری اشرشیاکلی (۹)، پایدار سازی این پروتئین و عدم تشکیل

توده در بدن (۱۰) و بررسی اثرات ایمونوژنتیکی (۱۱) این پروتئین انجام شده است. بهره برداری از توانایی و پتانسیل بالقوه ابزارهای بیوانفورماتیکی یک استراتژی قدرتمند برای صرفه جویی در هزینه و وقت می باشد. هدف از این مطالعه تجزیه و تحلیل تکاملی پروتئین اینترفرون بتا در پستانداران و آنالیز In silico آن به منظور پیش بینی پتانسیل ساختاری پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی بود.

مواد و روش ها

توالی ها و ترسیم درخت تکاملی

تمام توالی های پروتئین اینترفرون بتا مربوط به گونه های مختلف پستانداران شامل: Homo sapiens (AAC41702.1) (انسان)، Ailuropoda melanoleuca (ADN34671.1) (پاندا)، Bos Taurus (ABX72063.1) (گاو)، Canis lupus familiaris (ACI22684.1) (سگ)، Capra hircus (AFU82528.1) (بز)، Cricetulus griseus (EGV95888.1) (همستر چینی)، Equus caballus (CAA02145.1) (اسب)، Felis catus (ABL74243.1) (گربه)، Macaca mulatta (EHH24077.1) (میمون)، Macaca fascicularis (EHH57361.1) (میمون دم دراز)، Myotis daubentonii (AEZ67293.1) (خفاش آبی)، Sus scrofa (AAB22723.1) (گراز)، Mus musculus (P01575.1) (موش)، Ovis aries (AFU82527.1) (گوسفند)، Pteropus vampyrus (ADK11364.1) (خفاش میوه بزرگ)، Rousettus aegyptiacus (BAF37103.1) (خفاش میوه خوار مصری) و Panthera tigris altaica (ALJ03295.1) (ببر سیبری) از پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) با کدهای دسترسی که در پراوتر آمده است، به دست آمد. جهت بررسی روابط تکاملی و تفاوت ساختار اسید آمینه ای این پروتئین در

1. Multiple sclerosis
2. Food and Drug Administration
3. Magnetic Resonance Imaging

انسان و سایر گونه‌ها، توالی پروتئین اینترفرون بتای گونه‌های مختلف توسط نرم افزار DNAMAN نسخه ۸ هم‌ردیف شدند و سپس درخت تکاملی ترسیم و فواصل ژنتیکی بررسی شد.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی

توالی راهنمای پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور SignalP 4.1 پیش بینی شد که مطمئن‌ترین ابزار با صحت ۸۷ درصد (۱۲) بین نرم‌افزارها و ابزارهای پیش بینی توالی راهنمای پروتئین‌ها و مناطق برش آن‌ها است. این سرور به آدرس <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> در دسترس می‌باشد (۱۵). جهت پیش‌بینی منطقه تراغشایی و جهت‌گیری‌های مرتبط با پروتئین اینترفرون بتا، از سرور TMPred به آدرس http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

استفاده شد. سرور ProtScale در پلت فرم Expasy به آدرس <http://web.expasy.org/protscale/> جهت پیش‌بینی ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی شامل آب دوستی، قابلیت دسترسی، قطبیت، انعطاف‌پذیری، تغییرپذیری و بزرگی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی به کار رفت. سایر پارامترهای مختلف فیزیولوژیکی و فیزیکی‌شیمیایی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی شامل وزن مولکولی، pI ، شاخص آلفاتیکی، شاخص ناپایداری و نیمه عمر پروتئین توسط سرور ProtParam از پلت فرم <http://web.expasy.org/protparam/> ارزیابی شد. تغییرات پس از ترجمه پروتئین اینترفرون بتا شامل جایگاه‌های مانوزیله شدن، گلیکوزیله شدن و فسفریله شدن توسط سرور CBS <http://www.cbs.dtu.dk/services> پیش‌بینی شد.

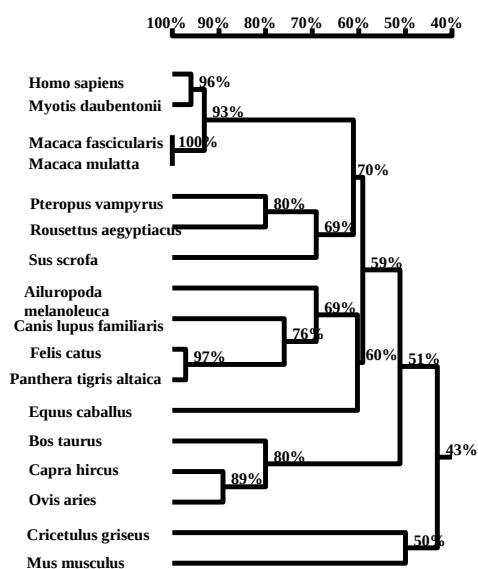
آنالیز اثر متقابل پروتئین-پروتئین / اینترفرون بتا ۱ بی مطالعه اثر متقابل پروتئین-پروتئین با استفاده از تکنیک شبکه ژنی و ابزار جستجوی بازایی تعامل ژن‌ها

و پروتئین‌ها (STRING نسخه ۱۰) که یک پایگاه داده از اثرات متقابل پروتئینی شناخته و پیش‌بینی شده است، صورت گرفت (<http://string-db.org>). هم‌چنین ساختار سه بعدی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از سرور Swiss-Model پیش‌بینی شد.

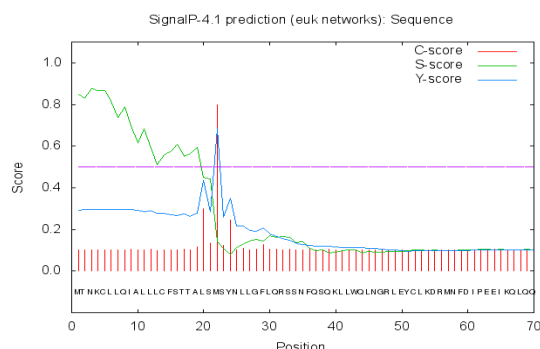
یافته‌ها

توالی‌ها و بررسی درخت تکاملی

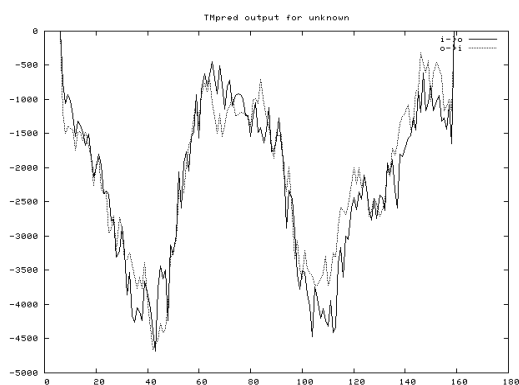
به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی و تکاملی پروتئین اینترفرون بتای گونه‌های پستاندار مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از توالی‌های هم‌ردیف شده اسید آمینه مربوط به آن‌ها، توسط نرم افزار قدرتمند DNAMAN نسخه ۸ رسم گردید (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: نتایج درخت تکاملی رسم شده توسط نرم افزار DNAMAN. مقایسه رابطه تکاملی پروتئین اینترفرون بتای گونه ی انسان (Homo sapiens) با سایر گونه های پستاندار، که بیشترین نزدیکی ساختاری با گونه ی خفاش آبی (Myotis daubentonii) به میزان ۹۶ درصد و میمون (Macaca mulatta) و میمون دم دراز (Macac fascicularis) به میزان ۹۳ درصد و بیشترین فاصله ژنتیکی با گونه‌های همستر چینی (Cricetulus griseus) و موش خانگی (Mus musculus) به میزان ۵۰ درصد مشاهده شد



تصویر شماره ۲: پیش بینی توالی راهنما توسط سرور SignalP. خروجی های سرور SignalP شامل مواردی زیر است: ۱- نمره C (C-score) که محل برش را شناسایی می کند (۰/۸۰۰)، ۲- نمره S (S-score) که موقعیت توالی راهنما را تشخیص می دهد (۰/۸۷۷)، ۳- نمره Y (Y-score) که مشتقی از نتایج نمره های C و S با پیش بینی دقیق تر محل های برش نسبت به نمره C خام است (۰/۶۸۵). نتایج حاکی از وجود توالی راهنما و محل برش بین اسید آمینه موقعیت ۲۱ و ۲۲ با توالی ALS-MS بود. محور افقی نشان دهنده توالی اسید آمینه و محور عمودی نمره های پیش بینی شده توسط سرور است



تصویر شماره ۳: پیش بینی منطقه تراغشایی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور TMpred. ماریچ آلفا از داخل به خارج ($i > 0$) و از خارج به داخل ($0 > i$) مشاهده نشد و تمام مقادیر زیر صفر بود. در حالی که تنها مقادیر بالای ۵۰۰ به صورت معنی دار در نظر گرفته می شوند. محور افقی نشان دهنده توالی اسید آمینه و محور عمودی مقادیر پیش بینی شده توسط سرور است

پیش بینی آب دوستی، قابلیت دسترسی، قطبیت، انعطاف پذیری، تغییر پذیری و بزرگی

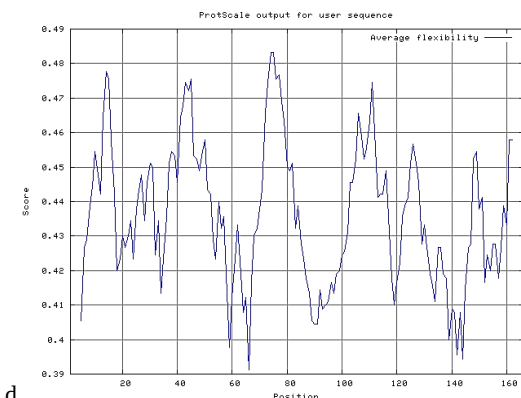
به منظور بررسی برخی از پارامترهای بسیار مهم در مهندسی پروتئین و پروتئین های نو ترکیب که شامل: آب دوستی، قابلیت دسترسی، قطبیت، انعطاف پذیری،

نتایج این آزمون نشان داد که توالی پروتئین اینترفرون بتا در گونه های پستانداران در طول زمان تقریباً حفاظت شده باقی مانده است. به نحوی که این اثر حفاظتی در گونه های نزدیک تر از نظر علم طبقه بندی زیست شناسی بیش تر بود. هم چنین این نتایج نشان دادند که پروتئین اینترفرون بتای انسانی به ترتیب بیش ترین نزدیکی را از لحاظ ساختار اسید آمینه ای به خفاش آبی (*Myotis daubentonii*) با ۹۶ درصد و میمون (*Macaca mulatta*) و میمون دم دراز (*Macaca fascicularis*) با ۹۳ درصد داشت. از طرفی نتایج بررسی درخت تکاملی هم چنین نشان دادند که بیشترین فاصله ژنتیکی و ساختاری پروتئین اینترفرون بتای انسانی با توالی اسید آمینه این پروتئین در گونه های همستر چینی (*Cricetus griseus*) و موش خانگی (*Mus musculus*) حاصل گردیده است. به طوری که این پروتئین ها در دو گروه هاپلو تپی مجزا قرار گرفته ولی با این وجود بخشی از ساختار آنها در طول فرآیند تکامل حفاظت شده باقی مانده است.

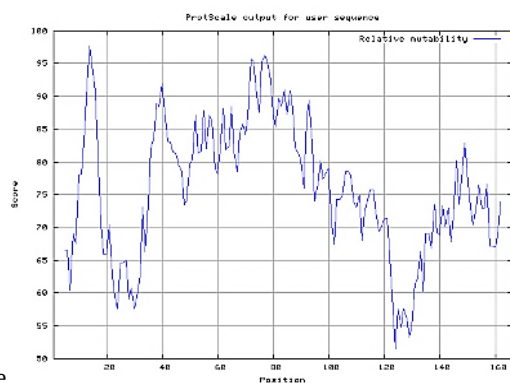
پیش بینی توالی راهنما و منطقه تراغشایی

توالی راهنمای اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور SignalP 4.1 پیش بینی شد (تصویر شماره ۲). خروجی های حاصل از این پیش بینی شامل نمره های C، S و Y بودند که مقادیر همه آن ها بالاتر از مقدار استاندارد (۰/۵) برای تشخیص یک توالی به عنوان توالی راهنما بود. همچنین در خروجی آنالیز انجام شده توسط این سرور، مقدار نمره D که معیار تمایز بین پروتئین های ترشحی و غیر ترشحی است، ۰/۶۷۹ بود. توالی های پروتئینی با نمره D بالاتر از ۰/۵ به احتمال زیاد توالی راهنما دارند (۱۳). بنابراین پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی دارای توالی راهنما می باشد.

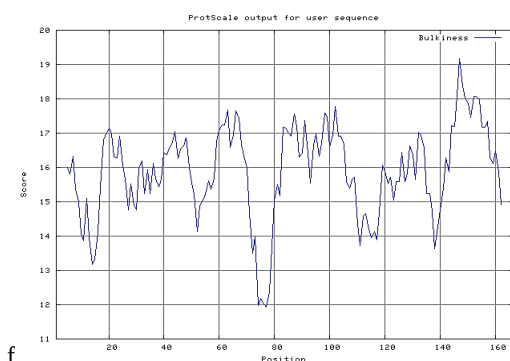
سپس منطقه تراغشایی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور TMpred پیش بینی شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که تمامی مقادیر زیر صفر بودند و هیچ ماریچ آلفای احتمالی از داخل به خارج یا از خارج به داخل غشا یافت نشد (تصویر شماره ۳). بنابراین این پروتئین فاقد منطقه تراغشایی می باشد.



d



e

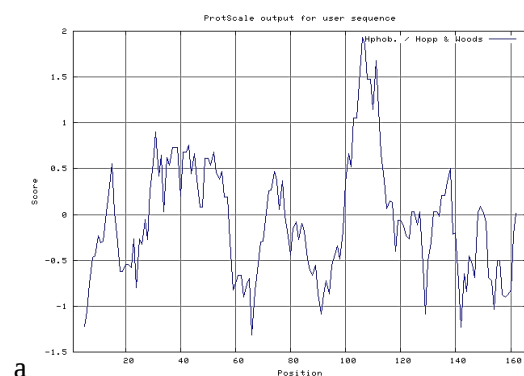


f

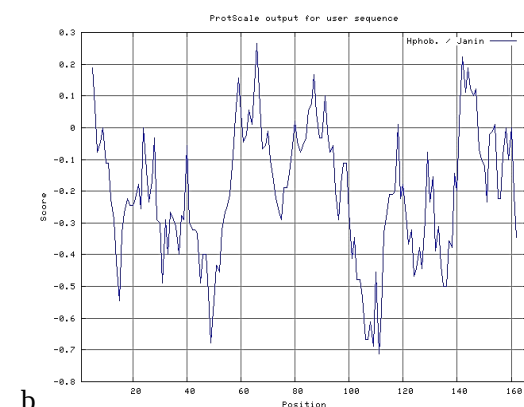
تصویر شماره ۴: آب دوستی (a)، قابلیت دسترسی (b)، قطبیت (c)، انعطاف پذیری (d)، تغییرپذیری (e) و بزرگی (f) پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور protscale. نمره‌های بالاتر نشان‌دهنده احتمال بالاتری برای هر یک از پارامترهای پیش‌بینی شده بود. محور افقی (Position) نشان‌دهنده موقعیت اسید آمینه‌ها در توالی پروتئین و محور عمودی نمره مربوط به هر پارامتر است.

بررسی قابلیت دسترسی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط مقیاس Janin که نشان‌دهنده انرژی آزاد انتقال از داخل به خارج یک پروتئین کروی است محاسبه گردید (تصویر شماره ۴-b). نتایج این آنالیز نشان دادند که کم‌ترین و بیش‌ترین میزان دسترسی برای این پروتئین بین ۰/۷۱۱- برای موقعیت اسید آمینه ۱۱۱ (فیل آلانین)

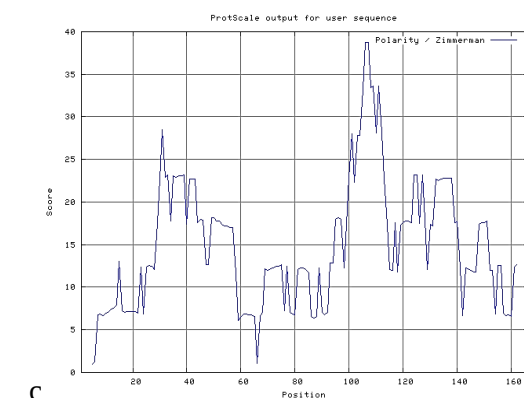
تغییرپذیری و بزرگی پروتئین بود از سرور معتبر ProtScale که توسط پلت فرم ExPASy ایجاد شده است برای آنالیز پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی استفاده شد. نمره‌های بالاتر نشان‌دهنده احتمال بالاتری برای هر یک از پارامترهای پیش‌بینی شده مربوط به پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی بود. نتایج تجزیه تحلیل به درستی نشان داد که کم‌ترین و بیش‌ترین مقادیر آب دوستی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی بین ۱/۳۱۱- برای موقعیت اسید آمینه ۶۶ (ایزولوسین) و ۱/۹۳۳ برای موقعیت اسید آمینه ۱۰۶ (لوسین) بود (تصویر شماره ۴-a).



a



b



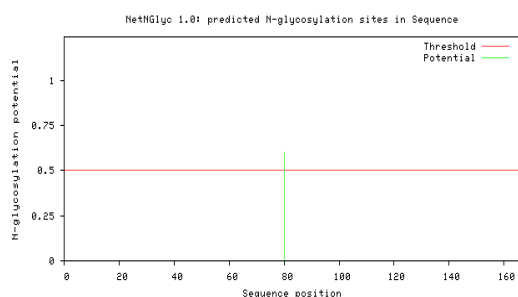
c

و ۰/۲۶۷ برای موقعیت اسید آمینه ۶۶ (ایزولوسین) بود. هم چنین قطبیت پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی نیز محاسبه گردید (تصویر شماره ۴-۲). کم ترین و بیش ترین میزان قطبیت به ترتیب بین ۰/۹۸۱ برای اسید آمینه موقعیت ۵ (لوسین) و ۳۸/۷۵۳ برای اسید آمینه در موقعیت ۱۰۷ (اسید گلو تامیک) بود. انعطاف پذیری پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی نیز توسط شاخص میانگین انعطاف پذیری مورد آنالیز قرار گرفت (تصویر شماره ۴-۳). نتایج این آزمون نشان داد که کم ترین و بیش ترین مقادیر مربوط به انعطاف پذیری پروتئین بین ۰/۳۹۱ برای اسید آمینه موقعیت ۶۶ (ایزولوسین) و ۰/۴۸۳ برای اسید آمینه موقعیت ۷۴ (سرین) متغیر بود. تغییر پذیری نسبی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی نیز مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شماره ۴-۴). نتایج این بررسی نشان دادند که کم ترین و بیش ترین مقادیر آن بین ۵۱/۴۴۴ برای اسید آمینه موقعیت ۱۲۴ (آرژنین) و ۹۷/۶۶۷ برای اسید آمینه موقعیت ۱۴ (آسپارژین) بود. آنالیز مقادیر بزرگی^۱ (حجم) پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی نشان داد که کمترین و بیشترین مقدار حجم به ترتیب بین ۱۱/۹۲۴ برای اسید آمینه ۷۷ (ترئونین) و ۱۹/۱۸۱ برای اسید آمینه موقعیت ۱۴۷ (آرژنین) متغیر بود (تصویر شماره ۴-۵).

تغییرات پس از ترجمه

برای آنالیز ساختاری پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی، پارامترهای مختلفی از تغییرات پس از ترجمه با استفاده از سرور CBS پیش بینی شد. ابتدا جایگاه استیلایسیون انتهای N توسط سرور NetAcet پیش بینی شد. نتایج این بررسی نشان دادند که یک واکنش استیلایسیون بر روی اسید آمینه سرین در موقعیت ۲ توالی با نمرة ۰/۵۲۳ پیش بینی می شود. سپس جایگاه مانوزیلایسیون انتهای C توسط سرور NetCGlyc به صورت آنالیز پیش بینی شد. در این سرور برای هر اسید آمینه تریپتوفان در توالی ورودی اطلاعاتی پیش بینی می شود که شامل نمرة

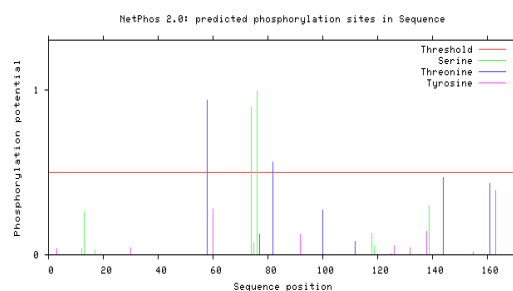
مانوزیلایسیون نیز می باشد. مانوزیلایسیون در مواردی رخ می دهد که مقدار پیش بینی شده این نمرة بالاتر از ۰/۵ باشد. از بین ۳ اسید آمینه تریپتوفان موجود در موقعیت های ۲۲، ۷۹ و ۱۴۳ توالی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی، هیچ کدام نمرة بالاتر از ۰/۵ را کسب نکردند. بنابراین در این توالی جایگاه مانوزیلایسیون پیش بینی نشد. جایگاه گلیکوزیلایسیون متصل به انتهای N برای پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از سرور NetNGlyc پیش بینی شد. نتایج نشان داد که فقط در جایگاه اسید آمینه موقعیت ۸۰ (آسپارژین) پتانسیل گلیکوزیلایسیون به میزان ۰/۶۰۱۸ وجود دارد (تصویر شماره ۵). به طور موازی نیز از سرور NetOGlyc جهت پیش بینی جایگاه گلیکوزیلایسیون استیل گالاکتوز آمین متصل به انتهای (O-GalNAc) نوع تراوشه (mucin) در پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که نمرة O گلیکوزیلایسیون در تمام جایگاه ها کمتر از ۰/۵ بوده و بنابراین جایگاهی برای O گلیکوزیلایسیون پیش بینی نشد.



تصویر شماره ۵: جایگاه گلیکوزیلایسیون متصل به انتهای N پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور NetNGlyc. نتایج آنالیز نشان داد که پتانسیل گلیکوزیلایسیون در جایگاه اسید آمینه موقعیت ۸۰ به میزان ۰/۶۰۱۸ وجود دارد. محور افقی نشان دهنده موقعیت توالی اسید آمینه و محور عمودی نشان دهنده پتانسیل گلیکوزیلایسیون متصل به انتهای N است.

هم چنین از سرور NetPhos جهت آنالیز و پیش بینی جایگاه های فسفریلایسیون عمومی پروتئین

اینترفرون بتا ۱ بی استفاده شد. نتایج این آزمون نشان دادند که ۲ جایگاه فسفریلاسیون سرین برای پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی پیش‌بینی می‌گردد. این احتمال در اسید آمینه موقعیت ۷۴ (سرین) نمره ۰/۸۹۵ و در اسید آمینه موقعیت ۷۶ (سرین) نمره ۰/۹۹۵ را به خود اختصاص داد. در این آزمون جایگاه‌هایی با نمره‌های بالاتر از ۰/۵ به عنوان جایگاه‌های محتمل برای فسفریلاسیون پیش‌بینی می‌شوند و هرچه این نمره‌ها بالاتر باشد، احتمال فسفریلاسیون بیش‌تر است (۱۴). هم‌چنین دو جایگاه برای فسفریلاسیون ترئونین در موقعیت اسید آمینه ۵۸ با نمره ۰/۹۳۵ و موقعیت اسید آمینه ۸۲ با نمره ۰/۵۶۳ پیش‌بینی شد (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۶: تغییرات پس از ترجمه پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور NetPhos. مقادیر بالاتر از حد آستانه (۰/۵) به عنوان جایگاه‌های محتمل برای فسفریلاسیون پیش‌بینی می‌شوند. دو جایگاه فسفریلاسیون سرین و دو جایگاه فسفریلاسیون ترئونین در شکل دیده می‌شوند.

پارامترهای فیزیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی

سرور ProtParam جهت پیش‌بینی پارامترهای فیزیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی مختلف مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان دادند که وزن مولکولی پیش‌بینی شده ۲۰۱۱ دالتون (۲۰ کیلودالتون) و pH ایزوالکتریک تنوری آن ۹/۰۲ بود. فرمول خطی شیمیایی مربوط به پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی به صورت $C_{908}H_{1408}N_{246}O_{253}S_6$ و تعداد کلی اتم‌های برآورد شده آن برابر با ۲۸۲۱ بود. شاخص ناپایداری تخمینی از

ثبات پروتئین در شرایط لوله آزمایش فراهم می‌آورد. پروتئین با شاخص ناپایداری کوچک‌تر از ۴۰ به عنوان پایدار و مقادیر بالاتر از ۴۰ به عنوان پروتئین ناپایدار پیش‌بینی می‌گردند (۱۵). شاخص ناپایداری پیش‌بینی شده برای پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی، ۵۳/۹۵ پیش‌بینی شد. نتایج این پیش‌بینی نشان می‌دهد که این پروتئین یک پروتئین ناپایدار تحت شرایط لوله آزمایش است. شاخص آلفاتیک یک پروتئین به صورت حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره جانبی آلفاتیک (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) تعریف شده و نشان‌دهنده مقدار آب‌گریزی پروتئین است و یک عامل مثبت برای پایداری حیاتی پروتئین و ساختار سه بعدی آن محسوب می‌گردد. شاخص آلفاتیک برای این پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی ۹۴/۵۸ بود. میانگین نسبی آب دوستی یا آب‌گریزی (GRAVY^۱) پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی نیز محاسبه شد. این میانگین از مجموع مقدار آب دوستی یا آب‌گریزی هر اسید آمینه، تقسیم بر طول پروتئین به دست می‌آید و مقدارش برای این پروتئین -۰/۴۴۷ بود. نتایج به‌دست آمده بیانگر آب‌گریز بودن نسبی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی می‌باشد. همچنین نیمه عمر برآورد شده پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در سلول پستانداران در شرایط آزمایشگاهی ۳۰ ساعت، در مخمر کم‌تر از ۲۰ ساعت و در باکتری اشرشیاکلی کمتر ۱۰ ساعت برآورد گردید.

آنالیز اثر متقابل پروتئین - پروتئین برای پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی

پلت فرم STRING یک پایگاه داده از اثرات متقابل پروتئین‌های شناخته شده و پیش‌بینی شده است. نتایج این تجزیه و تحلیل نشان داد که پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی فعالیت ضد رشد و ضد ویروسی دارد. نتایج این آنالیز حاکی از این بود که پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در مرکز شبکه با پروتئین‌های گیرنده اینترفرون ۱، فاکتور تنظیمی ۳ اینترفرون، پروتئین سرکوبگر پیام‌رسان

1. Grand Average of Hydropathicity

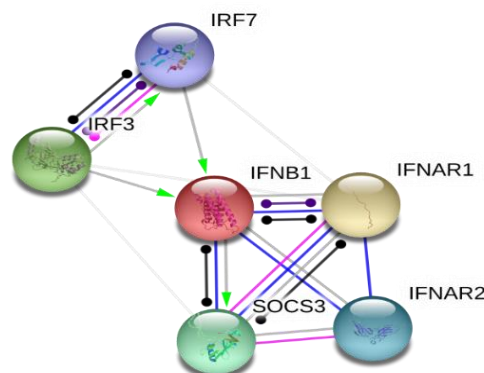
پیام‌رسان سایتوکاین ۳ جهت اعمال اثر تنظیمی و فعال‌سازی آبشارهای پایین دستی متصل می‌گردد.

بحث

پروتئین اینترفرون بتا انسانی از خانواده پروتئینی سایتوکاین‌ها بوده و توسط القای ژن اینترفرون بتا در پاسخ به حضور عوامل خارجی نظیر ویروس‌ها، باکتری‌ها و حتی سلول‌های سرطانی در سلول‌های فیروبلست تولید می‌گردد (۱۶). اینترفرون بتا در حالت طبیعی به گیرنده اینترفرون متصل می‌شود. این گیرنده دارای دو بخش IFNAR1 و IFNAR2 است و مسیر سیگنال‌رسانی JAK/STAT^۱ را فعال می‌کند که منجر به فسفریله شدن دو زیر واحد STAT1 و STAT2 می‌شود. این دو با هم دایمر تشکیل داده و با فاکتور تنظیمی اینترفرون (IRF3) همراه می‌شوند تا به عناصر مسئول تحریک اینترفرون در هسته باند شوند. این اتصال سبب فعال‌سازی ژن‌های تحریک‌کننده اینترفرون می‌شود که سبب تولید محصولات ضد ویروسی، ضد تکثیر و ضد توموری می‌شود (۱۷).

در این مطالعه ساختار پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی‌انسانی توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت. توالی پروتئین اینترفرون بتای انسانی و سایر گونه‌ها هم‌ردیف شد و نتایج تجزیه و تحلیل درخت تکاملی حاکی از قرابت ژنتیکی توالی پروتئینی اینترفرون بتا خفاش آبی (۹۶ درصد) به توالی پروتئین اینترفرون بتای انسانی بود. از نتایج آنالیز In Silico به دست آمده می‌توان چنین استنباط نمود که با بکارگیری دانش مهندسی ژنتیک و استفاده از تکنیک جدید ویرایش ژنوم، شاید بتوان در آینده حیوانات تراریختی تولید نمود که به عنوان یک بیوراکتور زنده در خدمت صنایع دارویی جهت تولید پروتئین نو ترکیب اینترفرون بتای انسانی در سطح انبوه باشند. از آنجا که شباهت ژنتیکی ساختار پروتئینی آن تا حدود ۹۶ درصد

سایتوکاین ۳، گیرنده اینترفرون ۲ و فاکتور تنظیمی ۷ اینترفرون در ارتباط بوده و اثر متقابل دارد (تصویر شماره ۷). نتایج آنالیز شبکه نشان داد که بالاترین نمره همکاری برآورد شده در شبکه پروتئینی برابر ۰/۹۹۱ و مربوط به پروتئین‌های گیرنده اینترفرون ۱ و فاکتور تنظیمی ۳ اینترفرون بود (جدول شماره ۱).



تصویر شماره ۷: نتایج آنالیز اثر متقابل پروتئین - پروتئین برای پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط پلت فرم STRING. در این تصویر اثرات متقابل پیش‌بینی شده بین پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی و سایر پروتئین‌های همکار مشاهده می‌شود. این پروتئین اثر تنظیمی را با اتصال به پروتئین‌های گیرنده اینترفرون ۱ (IFNAR1)، گیرنده اینترفرون ۲ (IFNAR2) و پروتئین سرکوبگر پیام‌رسان سایتوکاین ۳ (SOCS3) اعمال می‌کند.

جدول شماره ۱: هم‌گروه‌های عملکردی پیش‌بینی شده ی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی: نتایج پیش‌بینی، ارزیابی و امتیاز مرتب به پروتئین‌های همکار با پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در شبکه ژنی به صورت زیر حاصل گردیده است

نمره	پروتئین
۰/۹۹۱	گیرنده اینترفرون (آلفا، بتا و گاما) ۱ (IFNAR1)
۰/۹۹۱	فاکتور تنظیمی ۳ اینترفرون (IRF3)
۰/۹۸۲	پروتئین سرکوبگر پیام‌رسان سایتوکاین ۳ (SOCS3)
۰/۹۶۲	گیرنده اینترفرون (آلفا، بتا و گاما) ۲ (IFNAR2)
۰/۹۴۹	فاکتور تنظیمی ۷ اینترفرون (IRF7)

نتایج به دست آمده نشان دادند که پروتئین اینترفرون بتا علاوه بر همکاری و اثر متقابل بر سایر پروتئین‌ها، به صورت مستقیم به پروتئین‌های گیرنده اینترفرون ۱، گیرنده اینترفرون ۲ و پروتئین سرکوبگر

1. Janus kinase (JAK)/ Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)

می‌باشد، پیش‌بینی می‌گردد که این پروتئین نو ترکیب هیچ اثر سمی و مضر برای حیوان تراریخت نخواهد داشت (۱۹،۱۸). به‌علاوه این که خفاش از پستانداران و یوکاریوت‌های پیشرفته می‌باشد که این امر زمینه پیش‌بینی و تاخوردگی مناسب و صحیح پروتئین را نیز فراهم می‌آورد (۲۱،۲۰). هم‌چنین این نتایج بیانگر این نکته است که امکان استفاده از این شباهت ساختاری برای ساخت و تولید سایر پروتئین‌های دارویی با استفاده از بیوراکتورهای زنده نیز وجود دارد. این امر مستلزم بررسی‌های بیوانفورماتیکی و انجام مطالعات *In Silico* بیش‌تر به منظور آشکارسازی این پتانسیل برای سایر پروتئین‌های دارویی می‌باشد. از دیگر نکات قابل توجه در تجزیه و تحلیل نتایج درخت تکاملی، نزدیکی و شباهت ژنتیکی ساختاری و تکاملی پروتئین اینترفرون بتا در گونه‌های هم‌خانواده بود به‌طوری‌که توالی اسید آمینه‌ای پروتئین اینترفرون بتا در درون خانواده گربه سانان، اسب سانان، نشخوارکنندگان و ... کمترین فاصله ژنتیکی را داشته و این امر مؤید حفاظت توالی این پروتئین در طی دوره تکامل و اهمیت این پروتئین در سیستم ایمنی پستانداران می‌باشد. نتیجه‌ی آنالیز پلت فرم SignalP جهت یافتن توالی راهنما در توالی این پروتئین مثبت بود و نشان داده شد که پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی به صورت طبیعی دارای توالی راهنما جهت هدایت این پروتئین است. طراحی، انتخاب و اتصال توالی راهنما مناسب جهت هدایت این پروتئین به مکان صحیح و به صورت ترشحی می‌تواند راه‌کاری در جهت بهره‌برداری از تولید این پروتئین نو ترکیب در تحقیقات آینده باشد. از این رو استفاده از پتانسیل بالقوه ابزارهای بیوانفورماتیکی و بکارگیری دانش مهندسی ژنتیک به منظور انتخاب توالی‌های راهنمای مناسب و جایگزین نمودن آن با توالی راهنمای وحشی راهکاری قابل تأمل برای بیان پروتئین در سامانه پروکاریوتی می‌باشد. پیش‌بینی تغییرات پس از ترجمه حاکی از احتمال وقوع استیلایسیون در اسید آمینه موقعیت ۲ پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی و

گلیکوزیلایسیون در موقعیت اسید آمینه ۸۰ پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی بود. البته به طور کلی پروتئین‌هایی که در سامانه‌های پروکاریوتی بیان می‌گردند بعید است که در معرض گلیکوزیلایسیون انتهای N قرار بگیرند. بنابراین حتی اگر شامل موتیف‌های با پتانسیل گلیکوزیلایسیون باشند، گلیکوزیده نمی‌شوند. اما این مشکل با بیان آنها در سامانه‌های یوکاریوتی برطرف خواهد شد (۲۲). پارامترهای فیزیکوشیمیایی مختلف پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی توسط سرور ProtParam آنالیز شد. شاخص آلفاتیک پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی ۹۴/۵۸ بود. این مقدار شاخص آلفاتیک یک فاکتور مثبت افزایش پایداری ساختار کروی پروتئین در برابر حرارت محسوب می‌گردد (۲۳). ۲ جایگاه فسفریلایسیون سرین و ۲ جایگاه فسفریلایسیون ترئونین در توالی این پروتئین پیش‌بینی شد. نتایج کلی حکایت از این داشت که پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در شرایط لوله آزمایش، پروتئینی ناپایدار است.

در حال حاضر کریستالوگرافی اشعه ایکس^۱، NMR^۲ و cryo-EM^۳ سه روش رایج برای تعیین ساختار سه بعدی پروتئین‌ها می‌باشند. اما تمام این روش‌ها به مقادیر زیادی از پروتئین با خلوص بسیار بالا نیاز دارند که این امر یکی از المان‌های محدودکننده استفاده از این روش‌ها برای تعیین ساختار سه بعدی پروتئین‌ها محسوب می‌گردد (۲۴). پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین‌ها با استفاده از توالی اسید آمینه یک روش سودمند جهت صرفه‌جویی در زمان و هزینه علاوه بر بستر سازی مناسب برای مهندسی پروتئین می‌باشد. شکل سه بعدی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی نیز بر اساس روش SWISS-MODEL شبیه‌سازی و ترسیم شد که مبتنی بر شبکه عصبی مصنوعی و استفاده از روش HMMS^۴ بود (۲۵،۲۶). نتایج آزمون مدل‌سازی همولوژیک اینترفرون بتا ۱ بی در این مقاله نمایش داده نشده است.

1. X-ray crystallography
2. Nuclear magnetic resonance
3. Cryo-electron microscopy
4. Hidden Markov Models

بخشی از یک سیستم بازخورد منفی کلاسیک هستند که سیستم تنظیم انتقال و هدایت سیگنال سایتوکاین را تشکیل می‌دهند. SOCS3 از طریق هدایت مسیر انتقال پیام JAK/STAT در تنظیم منفی سایتوکاین‌ها نقش دارد و حساسیت‌های آلترژیک را کاهش می‌دهد (۳۴).

به‌طور کلی و به صورت خلاصه اثرات محرک سیستم ایمنی اینترفرون بتا ۱ بی‌انسانی شامل: افزایش فعالیت سلول‌های T سرکوبگر، کاهش واکنش‌های پس التهابی تولید سیتوکاین (ضد التهابی)، کاهش بیان عرضه کننده‌های آنتی ژن، مهار و جلوگیری از انتقال لنفوسیت‌ها به سیستم عصبی مرکزی می‌باشد (۳۵، ۳۶). در مجموع نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان دادند که پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی‌پروتئینی ناپایدار، دارای توالی راهنما و فاقد منطقه تراغشایی است. هم‌چنین نتایج بررسی In Silico پیشنهاد نمودند که طراحی توالی راهنما مناسب برای افزایش ترشح این پروتئین دارویی می‌تواند منجر به افزایش کارایی تولید انبوه این دارو در سامانه‌های متداول پروکاریوتی گردد. تمامی نتایجی که از آنالیزهای بیوانفورماتیکی پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی‌در این پژوهش حاصل شد می‌تواند زمینه مطالعات بیش‌تر برای انجام آزمایشات عملی در آینده بر روی این پروتئین را فراهم آورد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه گیلان که امکانات پژوهشی و تجهیزات سخت افزاری لازم جهت پیشرفت تحقیق حاضر را تامین نمود و در اختیار محققان قرار داد، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Arora D, Khanna N. Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. *J Biotechnol* 1996; 52(2): 127-133.
2. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357(9270): 1777-1789.
3. Goodkin DE. Interferon beta-1b. *Lancet* 1994; 344(8929): 1057-1060.
4. Marziniak M, Meuth S. Current perspectives on interferon Beta-1b for the treatment of multiple sclerosis. *Adv Ther* 2014; 31(9): 915-931.
5. Croze E, Yamaguchi KD, Knappertz V,

تقابل پروتئین اینترفرون بتای ۱ بی و پروتئین‌های دیگر بر اساس پلت فرم STRING مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه تحلیل اثر متقابل پروتئین بر روی پروتئین نشان داد که بیش‌ترین تقابل بین پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی و پروتئین گیرنده اینترفرون ۱ و هم‌چنین فاکتور تنظیمی ۳ اینترفرون وجود دارد، که اتصال به گیرنده‌های اینترفرون سبب فعال‌سازی مسیرهای سیگنال رسانی JAK/STAT شده و این فعال‌سازی خود به صورت سلسله مراتبی سبب فعال شدن حدود ۱۰۰ پروتئین سیستم ایمنی ضد ویروسی می‌گردد (۲۷، ۲۸). فاکتور تنظیمی ۳ اینترفرون نقشی تنظیم‌کننده رونویسی پروتئین اینترفرون را دارد که فعالیت آن وابسته به پاسخ سیستم ایمنی بوده و نقش حیاتی در ایمنی ذاتی بر علیه DNA و RNA ویروسی بازی می‌کند (۳۱-۲۹). محصولات آبشار فعال‌سازی این پروتئین می‌توانند با راندمان مناسبی ژن‌های اینترفرون بتا و حتی آلفا را فعال نموده و به صورت غیر مستقیم سبب القای فعالیت ضد ویروسی از طریق مسیر مستقل MyD88 و TLR فعال شده شوند (۳۲، ۳۳). به صورت کلی پروتئین اینترفرون بتا در مرکز شبکه به پروتئین‌های گیرنده اینترفرون ۱، پروتئین سرکوبگر پیام رسان سایتوکاین ۳ و گیرنده اینترفرون ۲ متصل می‌گردد و سبب فعال شدن همه پروتئین‌های مرتبط با آن می‌گردد. از آن‌جاکه همیشه کلیدی‌ترین پروتئین در مرکز شبکه قرار می‌گیرد این امر در مورد پروتئین اینترفرون بتا بیانگر نقش اصلی آن در فعال‌سازی پاسخ سیستم ایمنی می‌باشد. پروتئین‌های خانواده SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling)

- Reder AT, Salamon H. Interferon-beta-1b-induced short- and long-term signatures of treatment activity in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics J* 2013; 13(5): 443-451.
6. Kolb-Maurer A, Goebeler M, Maurer M. Cutaneous adverse events associated with Interferon-beta treatment of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 2015; 16(7):14951-1460.
7. Farrell RA, Giovannoni G. Current and future role of Interferon beta in the therapy of multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30(10): 715-726.
8. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH, et al. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the benefit study. *Lancet* 2007; 370(9585): 389-397.
9. Rao DV, Ramu CT, Rao JV, Narasu ML, Rao AK. Cloning, high expression and purification of recombinant human Intereferon- β -1b in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 2009; 158(1):140-154.
10. Mahjoubi N, Fazeli MR, Dinarvand R, Khoshayand MR, Fazeli A, Taghavian M, et al. Preventing aggregation of recombinant Interferon beta-1b in solution by additives: Approach to an albumin-free formulation. *Adv Pharm Bull* 2015; 5(4): 497-505.
11. Abdolvahab MH, Fazeli A, Radmalekshahi M, Nejadnik MR, Fazeli MR, Schellekens H. An albumin-Free formulation for *Escherichia coli* derived Interferon beta-1b with decreased immunogenicity in immune tolerant mice. *J Interferon Cytokine Res* 2016; 36(3): 192-203.
12. Bendtsen JD, Nielsen H, Von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; 340(4): 783-795.
13. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 2011; 8(10): 785-786.
14. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; 294(5): 1351-1362.
15. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Walker JM. Totowa: Humana Press; 2005. p. 571-607.
16. Ghane M, Yakhchali B, Khodabandeh M, Malekzadeh F. Design, construction, and expression of a synthetic β -Interferon (IFN- β) gene in *E. coli*. *Pak J Biol Sci* 2006; 9: 2922-2926.
17. Kasper LH, Reder AT. Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann Clin Transl Neurol* 2014; 1(8):622-631.
18. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 32(2):107-121.
19. Wang Y, Zhao S, Bai L, Fan J, Liu E. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *Bio Med Res Int* 2013; 2013
20. Dalton AC, Barton WA. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci* 2014; 23(5): 517-525.
21. Khan KH. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Adv Pharm Bull* 2013; 3(2): 257-263.
22. Skoko N, Argamante B, Grujicic NK, Tisminetzky SG, Glisin V, Ljubijankic G. Expression and characterization of human interferon-beta1 in the methylotrophic yeast

- Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem* 2003; 38(3): 257-265.
23. Shen P, Zhang H, Su Z, Wang S, Xu H. In silico analysis of tumor necrosis factor alpha induced protein 8-like-1 (TIPE1) protein. *PLoS ONE* 2015; 10(7): e0134114.
 24. Dorn M, MB ES, Buriol LS, Lamb LC. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Comput Biol Chem* 2014; 53: 251-276.
 25. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006; 22(2):195-201.
 26. Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 387-392.
 27. Russell-Harde D, Wagner TC, Perez HD, Croze E. Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon beta is dependent upon particular interactions between interferon beta and its receptor and independent of tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255(2): 539-544.
 28. Zhu F, Han B, Kumar P, Liu X, Ma X, Wei X, et al. Update of TTD: Therapeutic target database. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 787-791.
 29. DeWitte-Orr SJ, Mehta DR, Collins SE, Suthar MS, Gale M, Jr, Mossman KL. Long double-stranded RNA induces an antiviral response independent of IFN regulatory factor 3, IFN-beta promoter stimulator 1, and IFN. *J Immunol* 2009; 183(10):6545-6553.
 30. Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, et al. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 2002; 15(1): 29-40.
 31. Lin L, Pan S, Zhao J, Liu C, Wang P, Fu L, et al. HSPD1 interacts with IRF3 to facilitate interferon-beta induction. *PLoS ONE* 2014; 9(12): e114874.
 32. Hiscott J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J Biol Chem* .2007; 282(21): 15325-15329.
 33. Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* 2006; 16(2): 141-147.
 34. Akhtar LN, Qin H, Muldowney MT, Yanagisawa LL, Kutsch O, Clements JE, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits antiviral IFN-beta signaling to enhance HIV-1 replication in macrophages. *J Immunol* 2010; 185(4): 2393-2404.
 35. Miller A, Lanir N, Shapiro S, Revel M, Honigman S, Kinarty A, et al. Immunoregulatory effects of interferon-beta and interacting cytokines on human vascular endothelial cells. Implications for multiple sclerosis autoimmune diseases. *J Neuroimmunol* 1996; 64(2):151-161.
 36. Smith BT. Concepts in Immunology and Immunotherapeutics. 4th ed. Maryland ASHP; 2008.