



Production of a Novel Hyper-Glycosylated Human Coagulation Factor IX in Human Embryonic Kidney 293 Cells (HEK293T Cells), Using a Glyco-Engineering Approach

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ghasemi F.¹ PhD,
Khorramizadeh M.R.² PhD,
Karkhane A.A.³ PhD,
Zomorodipour A.*⁴ PhD,

How to cite this article

Ghasemi F, Khorramizadeh M.R, Karkhane A.A, Zomorodipour A. Production of a Novel Hyper-Glycosylated Human Coagulation Factor IX in Human Embryonic Kidney 293 Cells (HEK293T Cells), Using a Glyco-Engineering Approach. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(3):319-326.

¹Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technology of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Institute of Industrial and Environmental Biotechnology (IIEB), National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

⁴Department of Molecular Medicine, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: National Institute of genetic engineering and biotechnology, Shahrak-e Pajooheh, 15km of Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 44787348
Fax: +98 (21) 44787395
zomorodi@nigeb.ac.ir

Article History

Received: May 6, 2019

Accepted: August 11, 2020

ePublished: September 20, 2020

ABSTRACT

Hyper-glycosylation is an approach to introduce new N-glycosylation consensus sequence (s) (Asn-Xxx-Ser/Thr three-peptide) into a protein primary amino acid sequences by site-directed mutagenesis which is followed by the attachment of a new glycan to the Asn residue located within the three-peptide sequence. Hyper-glycosylation has attracted lots of interest especially in the protein therapeutics industry. The attached glycan may improve the pharmacokinetic properties of the hyper-glycosylated proteins and increase their half-life in the bloodstream. In the current study, a new N-glycosylation site was introduced into N-terminal Gla domain of hFIX. Arg³⁷ position of mature hFIX was targeted to be converted into Asn residue by site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. Recombinant expression plasmids for native and mutant hFIX were constructed. The expression of the recombinant wild-type and mutant hFIX was analyzed in mammalian HEK293T cells using gradient SDS-PAGE and western blotting analysis. The results indicated in higher molecular weight for R37N mutant in compared with the native protein. The glycan attachment to R37N mutant was further confirmed by PNGase digestion and western blotting.

Keywords Recombinant Human Coagulation Factor IX; Hyper-Glycosylation; Site Directed Mutagenesis; HEK293T Cells

CITATION LINKS

[1] Mammalian recombinant coagulation proteins: structure and ... [2] Surface-loop residue Lys316 in blood coagulation Factor IX is a major determinant for Factor X but not ... [3] Update on chronic hepatitis C in ... [4] Detailed characterization of an anti-factor IX monoclonal antibody that neutralizes the prolonged ox brain prothrombin time of hemophilia BM by ... [5] Effects of HIV infection on age and cause of death for persons with hemophilia A in the ... [6] Treatment of hemophilia B: focus on recombinant ... [7] First epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX is required ... [8] The molecular genetics of ... [9] Crystal structure of the calcium-stabilized human factor IX Gla domain bound to a conformation-specific ... [10] Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized ... [11] Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and in ... [12] Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering N-glycosylation ... [13] Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in ... [14] Effect of N-linked glycosylation on the activity and stability of a β -glucosidase from ... [15] Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human ... [16] Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic ... [17] Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered ... [18] Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic ... [19] In silico designing of hyper-glycosylated analogs for the human coagulation ... [20] Comparative protein structure modeling using ... [21] ASAView: Database and tool for solvent accessibility representation in ... [22] dna00.bio.kyutech ... [23] Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to ... [24] cbs.dtu ... [25] A systematic study of the function of the human β -globin introns on the expression of the human ... [26] Several N-glycans on the HIV envelope glycoprotein ... [27] Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and ... [28] N-glycosylation increases the circulatory half-life of human growth ... [29] Novel long-lasting interferon alpha derivatives ... [30] Disulfide bond formation is a determinant of glycosylation ... [31] Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator effects of disulfide ... [32] The expression efficiency of recombinant human clotting factor IX analogs, rationally ...

تولید فاکتور ۹ انعقادی انسانی هایپرگلیکوزیله در سلول‌های جنینی کلیه انسان (HEK293T) با رویکرد مهندسی گلیکوزیلاسیون

فهیمة قاسمی PhD

گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

محمدرضا خرمی‌زاده PhD

مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی و مولکولی، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

علی‌اصغر کارخانه PhD

پژوهشکده صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، ایران

علیرضا زمردی‌پور PhD

گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

هایپرگلیکوزیلاسیون فرآیندی است که در آن با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و جهش‌زایی هدفمند یک جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون (موتیف Asn-Xxx-Ser/Thr) به درون توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین نوترکیب اضافه می‌شود. در صورت اتصال گلیکان جدید به آسپاراژین موجود در این موتیف، هایپرگلیکوزیلاسیون رخ می‌دهد. این فرایند به‌ویژه در صنعت تولید پروتئین‌های دارویی بسیار مورد توجه است. ویژگی‌های فارماکوکینتیکی داروهای نوترکیب، ممکن است تحت تأثیر گلیکان اضافه‌شده قرار گیرد و نیمه عمر آنها افزایش یابد. در مطالعه حاضر، براساس مطالعات بیوانفورماتیکی، در دامنه گلای فاکتور ۹ انسانی یک جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون از طریق جهش‌زایی هدفمند مبتنی بر PCR و تبدیل کدون اسیدآمینه آرژنین شماره ۳۷ به آسپاراژین ایجاد شد. توالی رمزکننده فرم جهش‌یافته فاکتور ۹ انسانی به‌طور موزای با توالی طبیعی (به‌عنوان کنترل)، در وکتور بیانی pCEP4 مجهز به پروموتور ویروس سائیتومگالو (CMV)، همسانه‌سازی شد و بیان آنها در سلول‌های HEK293T مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی رخداد هایپرگلیکوزیلاسیون در نوع جهش‌یافته، از روش گرادیان SDS-PAGE دارای شیب غلظت آکریل‌آمید و به دنبال آن وسترن‌بلاتینگ استفاده شد که نشان‌دهنده سنگین‌تر بودن محصول جهش‌یافته نسبت به فرم طبیعی بود. همچنین پس از هضم با استفاده از آنزیم PNGase، هر دو محصول طبیعی و جهش‌یافته وزن مولکولی یکسانی کسب کردند. این نتایج نشان داد که افزایش وزن مولکولی پروتئین جهش‌یافته ناشی از اضافه‌شدن گلیکان جدید بوده و تاییدکننده رخداد هایپرگلیکوزیلاسیون است.

کلیدواژه‌ها: فاکتور ۹ انعقادی انسانی نوترکیب، هایپرگلیکوزیلاسیون، جهش‌زایی هدفمند، سلول‌های HEK293T

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۱

*نویسنده مسئول: zomorodi@nigeb.ac.ir

مقدمه

بیماری هموفیلی B یا کریسمس یک بیماری ارثی است که در نتیجه حذف یا کاهش سطح فاکتور ۹ در خون ایجاد می‌شود. این

بیماری به‌صورت وابسته به کروموزوم X به ارث می‌رسد و از هر ۳۰۰۰۰ مرد یک نفر را مبتلا می‌کند^[1]. درمان این بیماری مانند بسیاری از بیماری‌های سیستمیک دیگر به روش جایگزین درمانی انجام می‌شود که شامل تزریق دوره‌ای و منظم فاکتور ۹ مشتق‌شده از پلاسمای افراد نرمال یا فاکتور ۹ نوترکیب است^[2, 1]. استفاده از فرآورده‌های پلاسمایی علی‌رغم بهبود روش‌های ویروس‌زدایی، همچنان خطر انتقال بعضی از ویروس‌ها نظیر هپاتیت A، پاروویروس، پرپون‌ها و عوامل ناشناخته دیگر را به همراه دارد^[3-5]. در این راستا تولید فاکتور ۹ نوترکیب و ایمن برای حل مشکلات موجود در درمان هموفیلی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است^[6, 5].

فاکتور ۹ انسانی یک گلیکوپروتئین تک‌زنجیره‌ای است که به‌صورت پیش‌ساز توسط سلول‌های کبدی ساخته می‌شود^[7]. فرم بالغ آن با وزن مولکولی حدود ۵۷ کیلوالتون به‌صورت زیموئن وارد جریان خون می‌شود و دارای ۴ دامنه متمایز است. در انتهای آمینی فاکتور ۹ انسانی یک دامنه گلا با ۴۵ اسیدآمینه قرار دارد که غنی از گاما‌کربوکسی‌گلوتامیک اسید است. پس از آن، دو دامنه شبه فاکتور رشد اپیدرمی (EGF1 و EGF2) قرار گرفته‌اند. یک دامنه سرین‌پروتئازی نیز در انتهای کربوکسیل پروتئین واقع شده است^[8]. فعال‌سازی فاکتور ۹ زیموئن با پروتئولیز آن در پیوند پپتیدی Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ و Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ و رهاشدن یک پپتید فعال‌سازی ۳۵ اسیدآمینه‌ای رخ می‌دهد^[9].

فاکتور ۹ انسانی برای طی مراحل بلوغ خود متحمل تغییرات پس از ترجمه فراوانی می‌شود که برای کسب فعالیت زیستی آن قبل از ترشح به جریان خون لازم هستند^[10]. این تغییرات شامل گاما‌کربوکسیله‌شدن ۱۲ اسیدآمینه گلوتامیک اسید موجود در دامنه گلا، بتا‌هیدروکسیله‌شدن، سولفات‌شدن و اضافه‌شدن واحدهای قندی با اتصال از نوع N و O گلیکوزیدی هستند. فاکتور ۹ طبیعی دارای دو مکان N- گلیکوزیلاسیون در موقعیت اسیدآمینه‌های Asn¹⁵⁷ و Asn¹⁶⁷ در ناحیه پپتید فعال‌سازی است^[10]. با توجه به لزوم تغییرات پس از ترجمه متعدد بر روی فاکتور ۹ انسانی، رده سلول‌های پستانداران از جمله سلول‌های کلیه جنین انسان (HEK293)، سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) میزبان مناسبی برای تولید نوع نوترکیب آن هستند^[11].

N- گلیکوزیلاسیون از جمله تغییرات پس از ترجمه است که بر روی اغلب پروتئین‌های غشایی و ترشحاتی در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های یوکاریوتی اتفاق می‌افتد و در جریان آن الیگوساکارید به آسپاراژین موجود در توالی سه اسیدآمینه‌ای Asn-Xxx-Ser/Thr توسط الیگوساکاریل‌ترانسفراز متصل می‌شود. زنجیره‌های الیگوساکاریدی به‌عنوان بخش‌های مهمی از گلیکوپروتئین‌ها وظایف مهمی در فعالیت‌های زیستی آنها ایفا می‌کنند. وضعیت N- گلیکوزیلاسیون می‌تواند سرنوشت پروتئین سنتز شده را تعیین کند. پروتئین تازه سنتز شده بسته به وضعیت و الگوی N- گلیکوزیلاسیون می‌تواند ترشح، تجمع و یا تجزیه شود. در شرایط

۱- حداقل جهش در نظر گرفته شد، به‌طوری که فقط با یک جایگزینی اسیدآمینه‌ای بتوان جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون را ایجاد کرد، ۲- عدم استقرار جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون در مناطق ساختاری و عملکردی دامنه گلا، ۳- سطحی‌بودن آسپارازین پذیرنده N- گلیکان موجود در توالی N- گلیکوزیلاسیون. با درنظرگرفتن معیار اول یعنی حداقل جهش، توالی ۴۵ اسیدآمینه‌ای دامنه گلای فاکتور ۹ انسانی پایش شد و در مکان‌هایی که اسیدآمینه‌های Ser یا Thr وجود داشت، اسیدآمینه موجود در موقعیت ۲- نسبت به Ser/Thr، تبدیل به آسپارازین شد. در حالت عکس، در جایگاه‌هایی که اسیدآمینه آسپارازین وجود داشت، اسیدآمینه موجود در موقعیت ۲+ نسبت به Asn تبدیل به Thr شد. مدل‌سازی مقایسه‌ای با استفاده از نرم‌افزار MODELLER 9v10 برای هر یک از جهش‌یافته‌ها انجام شد^[20]. سطح در معرض حلال (ASA%) برای آسپارازین پذیرنده N- گلیکان در جایگاه‌های جدید N- گلیکوزیلاسیون با استفاده از نرم‌افزار ASAvIEW تعیین شد^[21, 22]. احتمال اتصال زنجیره الیگوساکاریدی به آسپارازین موجود در هر یک از جایگاه‌های N- گلیکوزیلاسیون با استفاده از برنامه NetNGlyc 1.0 پیش‌بینی شد^[23, 24].

به‌منظور ساخت توالی رمزکننده فرم جهش‌یافته فاکتور ۹ (فاکتور ۹ واجد یک جایگاه اضافی برای N- گلیکوزیلاسیون) از روش جهش‌زایی هدفمند بر پایه PCR (SOEing PCR) استفاده شد. در این روش طی سه مرحله واکنش PCR جهش مورد نظر در توالی کدکننده فاکتور ۹ طبیعی وارد شد. در این واکنش PCR از پلاسمید نوترکیب pCDNA3-hFIX حاوی توالی رمزکننده فرم طبیعی فاکتور ۹ انسانی به‌عنوان الگو استفاده شد^[25]. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در جدول ۱ ارائه شده است. پرایمرهای R37N-F و R37N-R پرایمرهای دربرگیرنده جهش R37N و جفت پرایمر HindIII-hFIX، XhoI-hFIX اختصاصی برای دو انتهای ۵ و ۳ توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی هستند.

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی	طول پرایمر
HindIII-hFIX	5' CCCA/AGCTTGCCACCATGCAGCGGTGAAC 3'	۳۰
XhoI-hFIX	5' CCGC/TCGAGATCCATCTTTTCATTAAGTGAGC 3'	۳۱
R37N-F	5' GAAACACTGAAACACAACTGAATTTTGG 3'	۳۰
R37N-R	5' CCAAAATTCAGTTGTGTTTTCAGTGTTTTC 3'	۳۰

توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی جهش‌یافته پس از برش با آنزیم‌های HindIII و XhoI در وکتور بیانی pCEP4 (ThermoFisher Scientific؛ ایالات متحده) و در پایین‌دست پروموتور CMV همسانه‌سازی شد. پلاسمید نوترکیب حاصل (pCEP4-R37N) پس از تایید صحت همسانه‌سازی با روش‌های

تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب، N- گلیکوزیلاسیون می‌تواند راندمان تولید و همچنین نیمه عمر و پایداری پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد^[12-14].

با رویکرد مهندسی گلیکوزیلاسیون و بهره‌گیری از روش‌های جهش‌زایی هدفمند می‌توان یک جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون درون توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین ایجاد کرد. در صورت اتصال گلیکان جدید به آسپارازین موجود در توالی سه اسیدآمینه‌ای Asn-Xxx-Ser/Thr، هایپرگلیکوزیلاسیون رخ می‌دهد. هایپرگلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب به‌ویژه پروتئین‌های درمانی، می‌تواند خصوصیات فارماکوکینتیک آنها را تحت تاثیر قرار دهد. این فرآیند نه تنها می‌تواند منجر به افزایش پایداری پروتئین‌ها شود، بلکه در مواردی نیز ترشح آنها به فضای خارج سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد^[15]. به‌عنوان مثال از روش مهندسی گلیکوزیلاسیون برای تولید نسل دوم اریتروپوئین به نام داربوپوئین آلفا که نیمه عمر بالاتری نسبت به فرم طبیعی دارد، استفاده شده است. این محصول جدید دارای دو گلیکان اضافی است که در فرم طبیعی وجود ندارد. همچنین هایپرگلیکوزیلاسیون اپی‌توپ‌های پروتئین را می‌پوشاند و از طریق افزایش حلالیت پروتئین، تجمع آنها را کاهش می‌دهد. علاوه بر این هایپرگلیکوزیلاسیون از طریق کاهش ایمونوژنیسیته پروتئین و کاهش خطر تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه پروتئین، کیفیت آن را افزایش می‌دهد^[16, 17]. N- گلیکوزیلاسیون همچنین بر کلیرانس پروتئین‌های دارویی موثر است. به‌عنوان مثال در مورد هورمون تحریک کننده فولیکولی (FSH) کاهش کلیرانس کلیوی به دلیل افزایش اندازه و بار منفی حاصل از اسیدسیالیک به دلیل اضافه کردن N- گلیکان اضافی مشاهده شده است^[18].

در مطالعه حاضر، مکان مناسب برای معرفی جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون در دامنه گلای فاکتور ۹ انسانی براساس مطالعات بیوانفورماتیکی انتخاب شد. با توجه به تایید این جایگاه با روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی^[19]، در بخش آزمایشگاهی این مطالعه جهش منتخب با روش جهش‌زایی هدفمند بر پایه PCR، در توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی اعمال شد. سپس رخداد هایپرگلیکوزیلاسیون بر روی فرم جهش‌یافته فاکتور ۹ انسانی تولیدشده در سلول بیانی HEK293T مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای مراحل کلونینگ، باکتری /شریشیا کلی سویه Top10 (Invitrogen؛ ایالات متحده) به‌عنوان میزبان در مراحل همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم‌های برشگر HindIII و XhoI، آنزیم T4لیگاز و همچنین نشانگر وزن مولکولی DNA از شرکت فرمنتاز خریداری شدند.

به‌منظور ایجاد جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون (Asn-Xxx-Ser/Thr) در دامنه گلای فاکتور ۹ انسانی (۴۵ اسیدآمینه اول از انتهای آمینی فاکتور ۹ انسانی بالغ) سه معیار مد نظر قرار گرفت:

PCR، هضم آنزیمی با آنزیم‌های HindIII و XhoI و توالی‌یابی، به سلول‌های HEK293T ترانسفکت شد.

پلاسمیدهای نوترکیب بیان‌کننده فاکتور ۹ طبیعی و جهش‌یافته، به‌طور موقت در پلیت‌های ۶ خانه به سلول‌های ازپیش‌آماده HEK293T با استفاده از ماده ترانسفکشن Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific؛ ایالات متحده) طبق روش استاندارد شرکت سازنده وارد شدند.

به‌منظور بررسی رخداد هایپرگلیکوزیلاسیون (اتصال گلیکان به آسپاراژین موجود در جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون) از روش گرادیان SDS-PAGE و به دنبال آن وسترن‌بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی فاکتور ۹ انسانی استفاده شد. برای تایید نهایی رخداد هایپرگلیکوزیلاسیون در جهش‌یافته فاکتور ۹ از روش تیمار گلیکوپروتئین با آنزیم PNGase (New England Biolabs؛ ایالات متحده) استفاده شد. این آنزیم به‌طور کاملاً اختصاصی گلیکان‌های متصل‌شده به زنجیره جانبی آسپاراژین را برش می‌دهد و از پروتئین جدا می‌کند.

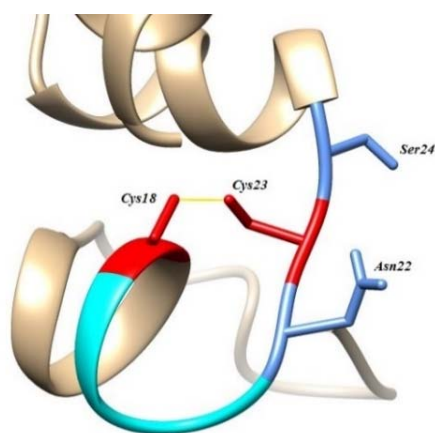
یافته‌ها

همان‌طور که گفته شد، ۸ محل برای ایجاد جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون شناسایی شد (جدول ۲). با توجه به این موضوع که وجود پرولین در موقعیت‌های +۱ و +۳ نسبت به اسیدآمینه آسپاراژین کارایی اتصال N- گلیکان به آسپاراژین را کاهش می‌دهد^[15]، در جایگاه‌های شناسایی‌شده از عدم وجود اسیدآمینه پرولین در این موقعیت‌ها اطمینان حاصل شد.

جدول ۲) جهش‌یافته‌های N- گلیکوزیلاسیون فاکتور ۹ انسانی و خصوصیات آنها

نام جهش‌یافته	پرولین در موقعیت +۱ یا +۳	پتانسیل N- گلیکوزیلاسیون	Asn یا Asn جایگزین‌شده پذیرنده N- گلیکان	جهش‌های مرتبط با هموفیلی B
Y1N	-	۰/۵۳۴۶	Y1	-
G4T	-	۰/۷۵۹۰	N2	G4S
E15T	-	۰/۷۷۷۷	N13	-
K22N	-	۰/۶۴۸۳	K22	-
E33N	-	۰/۵۲	E33	E33D, E33A, E33K, E33G, E33Q
E36N	-	۰/۷۳	E36	-
E36T	-	۰/۷۰۲۳	N34	-
R37N	-	۰/۶۴۳۹	R37	-

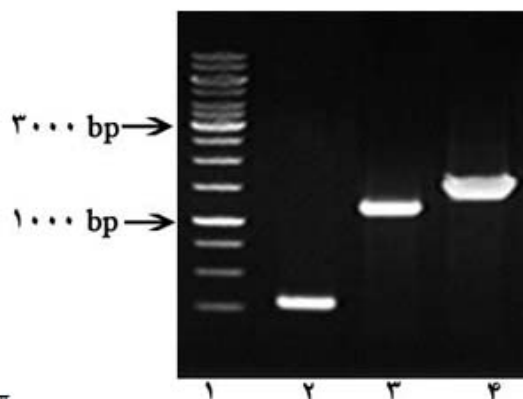
پذیرش N- گلیکان توسط آسپاراژین موجود در جایگاه N- گلیکوزیلاسیون بیشتر است. بر این اساس همه جایگاه‌های مورد مطالعه دارای احتمال بیش از ۵۰٪ برای پذیرش N- گلیکان بودند. سپس جایگزینی‌های انجام‌شده از نظر ارتباط آنها با جهش‌های منجر به هموفیلی B، مورد بررسی قرار گرفتند. هر یک از جهش‌ها با اطلاعات موجود در پایگاه داده <http://www.factorix.org/> که در آن کلیه جهش‌های هموفیلی B ثبت شده است، مقایسه شدند. این مطالعه نشان داد که از بین ۸ جهش جایگزینی اعمال‌شده، جایگزینی‌های G4T و E33N منجر به هموفیلی B می‌شوند که این دو جایگزینی در مراحل بعدی مطالعات حذف شدند (جدول ۲). یک جهش دیگر (Y1N) نیز به‌دلیل حضور اسیدآمینه تیروزین شماره ۱ در محل اتصال پروپیتید به بخش پروتئین بالغ فاکتور ۹، حذف شد، زیرا گلیکوزیلاسیون احتمالی در این محل، منجر به عدم جداسازی پروپیتید از قسمت بالغ فاکتور ۹ خواهد شد. همچنین جهش‌هایی که در آنها گلوتامیک‌اسید درگیر بود و با اسیدآمینه دیگری جایگزین می‌شوند (E15T، E36N و E36T) نیز از روند مطالعه حذف شدند، زیرا این اسیدآمینه در طی فرآیند تغییرات پس از ترجمه گاما‌کربوکسیله می‌شود و نقش ساختاری و عملکردی پیدا می‌کند. در صورت عدم رخداد گاما‌کربوکسیلاسیون، فاکتور ۹ فعالیت انعقادی نخواهد داشت. از میان دو جهش باقیمانده (K22N و R37N)، جهش K22N می‌توانست منجر به ایجاد جایگاه N- گلیکوزیلاسیونی شود که در آن آسپاراژین پذیرنده گلیکان درون لوپ حاصل از تشکیل باند دی‌سولفیدی به دام افتاده باشد (شکل ۱). مشخص شده است که وجود باند دی‌سولفیدی در نزدیکی محل N- گلیکوزیلاسیون مانع اتصال گلیکان می‌شود^[26]. بنابراین جهش K22N در ادامه مطالعات حذف شد. تنها گزینه باقیمانده برای معرفی جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون، جهش R37N بود. ساختار سه‌بعدی جهش‌یافته R37N با استفاده از نرم‌افزار MODELLER 9v10 پیش‌بینی شد (شکل ۲).



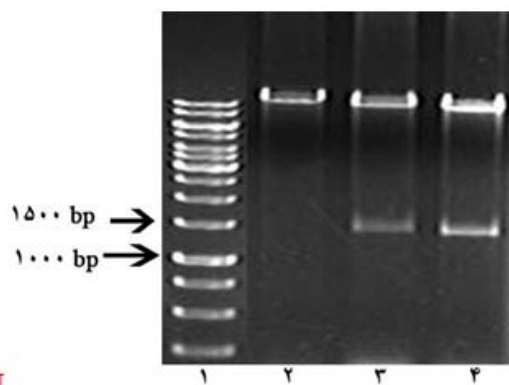
شکل ۱) ساختار سوم جهش‌یافته K22N در ناحیه تشکیل باند دی‌سولفیدی در جایگاه N- گلیکوزیلاسیون

سپس کارایی رخداد گلیکوزیلاسیون در هر یک از جایگاه‌های پیش‌بینی‌شده، با استفاده از نرم‌افزار NetNGlyc1.0 بررسی شد^[23] (جدول ۲). این نرم‌افزار کارایی N- گلیکوزیلاسیون را با امتیازدهی بین صفر تا یک تعیین می‌کند. در این روش امتیازدهی هر چه امتیاز به عدد یک نزدیک‌تر باشد احتمال

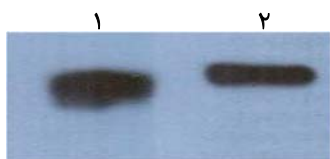
جدید، منجر به افزایش وزن مولکولی گلیکوپروتئین حاصل نسبت به فرم طبیعی فاکتور ۹ شده است. نتیجه به‌دست‌آمده از رخداد هاپرگلیکوزیلاسیون در جهش‌یافته R37N حمایت می‌کند. اضافه‌شدن N- گلیکان حدوداً یک تا دوکیلوالتون به وزن مولکولی آن اضافه می‌کند [15].



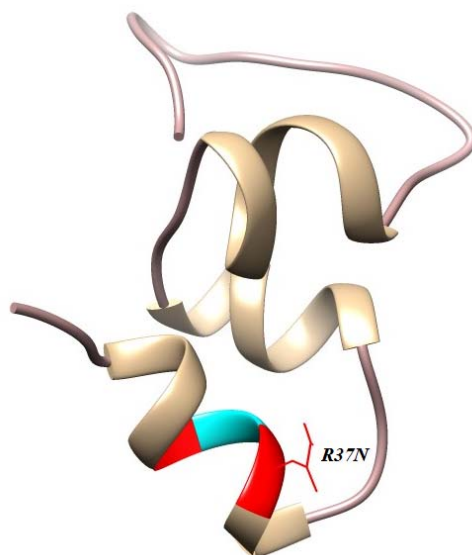
شکل ۳ مراحل SOEing PCR برای ساخت توالی کدکننده فاکتور ۹ انسانی جهش‌یافته R37N: ۱: نشانگر وزن مولکولی (۱kb); ۲: محصول PCR پرایمر رفتی خارجی (HindIII-hFIX) و پرایمر برگشتی داخلی (R37N-R); ۳: محصول PCR پرایمر رفتی داخلی (R37N-F) و پرایمر برگشتی خارجی (XhoI-hFIX); ۴: محصول SOEing PCR نهایی با استفاده از پرایمرهای HindIII-XhoI-hFIX و hFIX



شکل ۴ الگوی حرکتی پلاسمیدهای نوترکیب pCEP4- و pCEP4-hFIX R37N برش‌خورده با دو آنزیم XhoI و HindIII در مقایسه با پلاسمید pCEP4 برش‌خورده با همان آنزیم‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪: ۱: نشانگر وزن مولکولی (۱kb); ۲: پلاسمید pCEP4 (فاقد توالی رمزکننده فاکتور ۹); ۳: پلاسمید نوترکیب pCEP4-hFIX; ۴: پلاسمید نوترکیب pCEP4-R37N



شکل ۵ مشاهده الگوی حرکتی حرکتی فاکتور ۹ هاپرگلیکوزیله (جهش‌یافته R37N) در کنار فاکتور ۹ طبیعی نوترکیب با روش گرایان SDS-PAGE دارای شیب غلظت ۴-۱۲٪ آکریل‌آمید و تایید آن با روش وسترن‌بلاتینگ: ۱: فاکتور ۹ انسانی نوترکیب طبیعی; ۲: جهش‌یافته R37N



شکل ۲ ساختار سه‌بعدی مدل‌سازی شده جهش‌یافته R37N

درصد سطحی بودن آسپارازین موجود در جایگاه N- گلیکوزیلاسیون R37N با استفاده از نرم‌افزار ASAvie تعیین شد. نتیجه نشان داد که بیش از ۵۰٪ سطح در دسترس حلال برای آسپارازین شماره ۳۷ وجود داشت. بر این اساس جهش R37N به‌عنوان جهش مناسب برای معرفی جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون در دامنه گلای فاکتور ۹ انتخاب شد. مطالعات آزمایشگاهی از طریق اعمال جهش مورد نظر با استفاده از جهش‌زایی هدفمند مبتنی بر PCR انجام گرفت.

به‌منظور ساخت ژن‌های جهش‌یافته فاکتور ۹ انسانی، ابتدا با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند مبتنی بر SOEing PCR (PCR جایگزینی R37N طی سه مرحله PCR در توالی رمزکننده فاکتور ۹ طبیعی وارد شد. برای انجام این مراحل PCR از پلاسمید نوترکیب pCDNA3-hFIX کدکننده فاکتور ۹ طبیعی به‌عنوان الگو استفاده شد (شکل ۳). سپس توالی رمزکننده فاکتور ۹ جهش‌یافته R37N با آنزیم‌های HindIII و XhoI بریده شد و در همان جایگاه‌ها در وکتور بیانی pCEP4 و در پایین‌دست پروموتور CMV وارد و پلاسمید نوترکیب pCEP4-R37N ساخته شد. به‌منظور تایید صحت همسانه‌سازی، پلاسمیدهای نوترکیب و غیر نوترکیب با آنزیم‌های HindIII و XhoI بریده شدند و الگوی حرکتی قطعات حاصل بر روی ژل آگارز با هم مقایسه شدند (شکل ۴).

به‌منظور بررسی رخداد هاپرگلیکوزیلاسیون در پروتئین جهش‌یافته R37N، ۴۷ ساعت پس از ترنسفکشن سلول‌های HEK293T با پلاسمیدهای نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته، محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد و سپس با هدف بررسی اتصال گلیکان به جایگاه N- گلیکوزیلاسیون جدید از روش گرایان SDS-PAGE دارای شیب غلظتی ۴-۱۲٪ آکریل‌آمید استفاده شد. به‌منظور تایید اختصاصی بودن پروتئین‌های نوترکیب از روش وسترن‌بلاتینگ استفاده شد (شکل ۵). رخداد فرآیند N- گلیکوزیلاسیون در جایگاه

لیو و همکاران، جایگاه‌های جدید N- گلیکوزیلاسیون را با روش جهش‌زایی هدفمند به انتهای آمینی ۷ پروتئین مختلف معرفی کردند[12]. نتایج آنها نشان داد که جایگاه‌های جدید معرفی‌شده بر روی این پروتئین‌ها با درصد بالایی گلیکوزیل شدند. به علاوه گلیکوزیلاسیون ترشح اکثر آنها را به فضای خارج سلولی HEK293T افزایش داد.

در مهندسی گلیکوزیلاسیون یکی از چالش‌های اصلی انتخاب محل مناسب برای معرفی جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون است. به‌طوری که با معرفی این جایگاه جدید، ساختار و عملکرد پروتئین دستخوش تغییرات ناخواسته نشود. در پروتئین‌هایی که ساختار سوم آنها با روش‌های بلورنگاری اشعه X یا رزونانس مغناطیس هسته‌ای تعیین شده است، محل مناسب برای معرفی جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون را می‌توان با طراحی منطقی و با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی پیشگویی کرد[12].

در مطالعه حاضر از روش‌های بیوانفورماتیکی به‌منظور پیشگویی محل مناسب برای معرفی جایگاه‌های جدید N- گلیکوزیلاسیون در دامنه گلای فاکتور ۹ انسانی (۴۵ اسیدآمینو اول از انتهای آمینی فاکتور ۹ انسانی بالغ) استفاده شد. برای ایجاد جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون حداقل جهش از نوع جایگزینی اسیدآمینو‌ای در نظر گرفته شد. بر این اساس ۸ جایگزینی اسیدآمینو‌ای در نظر گرفته و ۸ جهش یافته N- گلیکوزیلاسیون فاکتور ۹ طراحی شد. یکی از معیارهای لازم برای یک جایگاه N- گلیکوزیلاسیون مناسب، عدم استقرار این جایگاه در مناطق عملکردی و ساختاری پروتئین است. بدین منظور ارتباط هر یک از جهش‌ها با هموفیلی B مورد بررسی قرار گرفت و دو جایگزینی G4T و E33N به‌دلیل ارتباط با هموفیلی B حذف شدند.

یکی از تغییرات پس از ترجمه‌ای که بر روی فاکتور ۹ انسانی اعمال می‌شود گاما‌کربوکسیلاسیون ۱۲ اسیدآمینو گلوتامیک‌اسید در دامنه گلای این پروتئین است. دامنه گلای فاکتور ۹ به واسطه گلوتامیک‌اسیدهای گاما‌کربوکسیله‌شده به یون کلسیم متصل شده و ساختار معینی به خود می‌گیرد و توانایی اتصال به فسفولیپید غشایی را کسب می‌کند[9]. بنابراین در صورت عدم گاما‌کربوکسیلاسیون فاکتور ۹ فاقد عملکرد خواهد بود. در این مطالعه جایگزینی‌هایی که گلوتامیک‌اسید در آن با اسیدآمینو دیگری جایگزین می‌شدند (E15T، E36N و E36T) نیز حذف شدند.

N- گلیکوزیلاسیون فرآیندی است که همزمان با ترجمه اتفاق می‌افتد. مشخص شده است که N- گلیکوزیلاسیون و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی ضمن ترجمه پروتئین در شبکه آندوپلاسمی با یکدیگر رقابت دارند[23، 31]. تحقیقات قبلی نشان داده است که در بسیاری از موارد چنانچه N- گلیکوزیلاسیون در محل تشکیل باند دی‌سولفیدی مستقر شده باشد اتصال N- گلیکان در آن رخ نمی‌دهد[26]. جهش K22N منجر به جایگاه N- گلیکوزیلاسیون با توالی Asn-Cys-Ser شده است که سیستمین موجود در موقعیت

فاکتور ۹ نوترکیب طبیعی و پروتئین جهش‌یافته R37N که رخداد هایپرگلیکوزیلاسیون در آن محتمل به نظر می‌رسید، توسط آنزیم PNGase تیمار شدند. آنزیم PNGase به‌طور اختصاصی پیوند آمیدی قند متصل‌شده به آسپارین را برش می‌دهد و آن را از اسکلت پروتئین جدا می‌سازد. بنابراین پروتئین باقیمانده وزن مولکولی کمتری از نمونه تیمارنشده با آنزیم PNGase خواهد داشت. الگوی حرکتی پروتئین‌ها قبل و بعد از تیمار با آنزیم PNGase بر روی گرادیان SDS-PAGE دارای شیب غلظتی ۱۲-۴% آکریل‌آمید مشاهده شدند و به دنبال آن با روش وسترن‌بلاتینگ مورد تایید قرار گرفتند (شکل ۶). نتایج نشان داد که فاکتور ۹ جهش‌یافته R37N قبل از برش با آنزیم PNGase سنگین‌تر از فاکتور ۹ طبیعی نوترکیب است (شکل ۶؛ ردیف‌های ۱ و ۳). پس از تیمار با آنزیم PNGase و جدا شدن N- گلیکان‌ها، هر دو گلیکوپروتئین (فرم طبیعی فاکتور ۹ و جهش‌یافته R37N) وزن مولکولی یکسانی به دست آورده‌اند (شکل ۶؛ ردیف‌های ۲ و ۴). این آزمایش رخداد هایپرگلیکوزیلاسیون را در جهش‌یافته R37N تایید می‌کند.

۱ ۲ ۳ ۴



شکل ۶) مشاهده الگوی حرکتی فاکتور ۹ نوترکیب طبیعی انسانی و جهش‌یافته R37N قبل و بعد از برش با آنزیم PNGase با روش گرادیان SDS-PAGE دارای شیب غلظت ۱۲-۴% آکریل‌آمید و تایید با روش وسترن‌بلاتینگ؛ ۱: فاکتور ۹ نوترکیب طبیعی قبل از برش با آنزیم PNGase؛ ۲: فاکتور ۹ نوترکیب طبیعی پس از برش با آنزیم PNGase؛ ۳: جهش‌یافته R37N قبل از برش با آنزیم PNGase؛ ۴: جهش‌یافته R37N پس از برش با آنزیم PNGase

بحث

گلیکوزیلاسیون یکی از متداول‌ترین اشکال تغییرات پس از ترجمه در پروتئین‌ها است. نیمی از پروتئین‌های انسانی و ۴۰% پروتئین‌های درمانی که تاییدیه سازمان جهانی غذا و دارو را دریافت کرده‌اند، گلیکوپروتئین هستند[27]. یکی از کاربردهای مهندسی گلیکوزیلاسیون، هایپرگلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها یا اتصال گلیکان اضافی به پروتئین مورد نظر است. هایپرگلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب مزایای فراوانی از جمله افزایش پایداری پروتئین دارویی و کاهش کلیرانس آن از خون دارد[28، 29]. به علاوه مشخص شده است که با معرفی جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون به انتهای آمینی یک پروتئین و اتصال یک گلیکان به آسپاراژین موجود در این توالی، در برخی از پروتئین‌ها ترشح به فضای خارجی افزایش یافته است. افزایش ترشح از طریق بهبود کارایی فولدینگ پروتئین در شبکه آندوپلاسمی صورت می‌گیرد. بر این اساس شبکه آندوپلاسمی به‌عنوان مرکز کنترل کیفیت پروتئین عمل می‌کند[12، 30].

- and function. *Transfus Sci.* 1998;19(2):177-89.
- 2- Kolkman JA, Mertens K. Surface-loop residue Lys316 in blood coagulation Factor IX is a major determinant for Factor X but not antithrombin recognition. *Biochem J.* 2000;350(3):701-7.
- 3- Franchini M, Capra F, Tagliaferri A, Rossetti G, De Gironcoli M, Rocca P, et al. Update on chronic hepatitis C in hemophiliacs. *Haematologica.* 2002;87(5):542-9.
- 4- Takahashi I, Kojima T, Sano M, Watanabe T, Kamiya T, Saito H. Detailed characterization of an anti-factor IX monoclonal antibody that neutralizes the prolonged ox brain prothrombin time of hemophilia BM by synthetic peptides. *Peptides.* 2000;21(5):603-8.
- 5- Chorba TL, Holman RC, Clarke MJ, Evatt BL. Effects of HIV infection on age and cause of death for persons with hemophilia A in the United States. *Am J Hematol.* 2001;66(4):229-40.
- 6- Franchini M, Frattini F, Crestani S, Sissa C, Bonfanti C. Treatment of hemophilia B: focus on recombinant factor IX. *Biologics.* 2013;7:33-8.
- 7- Zhong D, Smith KJ, Birktoft JJ, Bajaj SP. First epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX is required for its activation by factor VIIa/tissue factor but not by factor XIa. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(9):3574-8.
- 8- Geddes VA, MacGillivray RT. The molecular genetics of hemophilia B. *Transfus Med Rev.* 1987;1(3):161-70.
- 9- Huang M, Furie BC, Furie B. Crystal structure of the calcium-stabilized human factor IX Gla domain bound to a conformation-specific anti-factor IX antibody. *J Biol Chem.* 2004;279(14):14338-46.
- 10- Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, Heiman-Patterson T, Camire RM, Chu K, et al. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood J Am Soc Hematol.* 2001;97(1):130-8.
- 11- Jallat S, Perraud F, Dalemans W, Balland A, Dieterle A, Faure T, et al. Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and in derived trans-immortalized hepatic cell lines. *EMBO J.* 1990;9(10):3295-301.
- 12- Liu Y, Nguyen A, Wolfert RL, Zhuo S. Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering N-glycosylation sites. *Biotechnol Prog.* 2009;25(5):1468-75.
- 13- Sagt CM, Kleizen B, Verwaal R, De Jong MD, Müller WH, Smits A, et al. Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(11):4940-4.
- 14- Kar B, Verma P, Den Haan R, Sharma AK. Effect of N-linked glycosylation on the activity and stability of a β -glucosidase from *Putranjiva roxburghii*. *Int J Biol Macromol.* 2018;112:490-8.
- 15- Elliott S, Chang D, Delorme E, Eris T, Lorenzini T. Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human erythropoietin. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16854-62.
- 16- Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci.* 2005;94(8):1626-35.
- 17- Katla S, Yoganand KN, Hingane S, Kumar CR, Anand B, Sivaprakasam S. Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* and its biological activity: N-linked glycoengineering approach. *Enzyme Microb Technol.* 2019;128:49-58.
- 18- Li H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr Opin*

۱+ نسبت به آسپاراژین در تشکیل باند دی‌سولفیدی شرکت می‌کند. بنابراین این محل، برای ایجاد جایگاه N- گلیکوزیلاسیون جدید مناسب نخواهد بود و در نتیجه از ادامه مطالعات حذف شد. در نهایت جایگزینی R37N با بیش از ۵۰٪ سطح در دسترس حلال برای اسید آمینه آسپاراژین، به‌عنوان بهترین جایگزینی برای ایجاد جایگاه جدید N- گلیکوزیلاسیون معرفی شد. سپس با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند با PCR جایگزینی R37N در توالی رمزکننده فاکتور ۹ انسانی وارد و طی آن آرژنین شماره ۳۷ فاکتور ۹ انسانی به آسپاراژین تبدیل شد.

پس از ساخت توالی کدکننده و پلاسمید نوترکیب بیان‌کننده فاکتور ۹ جهش‌یافته، بیان آن در سلول‌های بیانی HEK293T در کنار فرم طبیعی فاکتور ۹ انسانی به‌عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته که به‌دلیل دارابودن پپتید راهنما به محیط کشت سلولی ترشح می‌شدند جمع‌آوری و الگوی حرکتی آنها بر روی گرادیان SDS-PAGE و وسترن‌بلاتینگ مشاهده شد. مقایسه الگوی حرکتی جهش‌یافته R37N با الگوی حرکتی فاکتور ۹ طبیعی نوترکیب با روش گرادیان SDS-PAGE قبل و پس از برش با آنزیم PNGase-F که به‌طور اختصاصی گلیکان‌های متصل‌شده به آسپاراژین را جدا می‌کند، نشان داد که جهش‌یافته R37N گلیکوزیله شده است، به‌دلیل آنکه قبل از برش با آنزیم PNGase-F دارای وزن مولکولی بیشتری نسبت به فرم طبیعی فاکتور ۹ است. این اختلاف اندازه پس از برش با آنزیم PNGase-F برطرف می‌شود که ثابت می‌کند که افزایش اندازه ناشی از N- گلیکوزیلاسیون پروتئین است. نتایج آزمایشگاهی به‌دست‌آمده تاییدکننده صحت پیشگویی‌های بیوانفورماتیکی بودند. مراحل بعدی مطالعات شامل بررسی تاثیر جهش بر روی میزان بیان، پایداری و ترشح فاکتور ۹ هایپرگلیکوزیله (R37N) در سلول‌های بیانی CHO نیز تاییدکننده نتایج این مطالعه است [32].

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی تهران برای تامین مالی این مطالعه (پروژه شماره ۱۸۱۵۵) و همچنین پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری به‌دلیل فراهم‌کردن امکانات انجام این مطالعه قدردانی و تشکر می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده است و در نشریه دیگری به فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به‌طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فهمیه قاسمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ محمدرضا خرمی‌زاده (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری (۱۵٪)؛ علی اصغر کارخانه (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ علیرضا زمردی‌پور (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۱۵٪).

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- White GC, Pickens EM, Liles DK, Roberts HR. Mammalian recombinant coagulation proteins: structure

expression of the human coagulation factor IX in cultured Chinese hamster ovary cells. *J Gene Med*. 2009;11(10):941-50.

26- Mathys L, Balzarini J. Several N-glycans on the HIV envelope glycoprotein gp120 preferentially locate near disulphide bridges and are required for efficient infectivity and virus transmission. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130621.

27- Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, et al. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol*. 2012;161(3):336-48.

28- Flintegaard TV, Thygesen P, Rahbek-Nielsen H, Levery SB, Kristensen C, Clausen H, et al. N-glycosylation increases the circulatory half-life of human growth hormone. *Endocrinology*. 2010;151(11):5326-36.

29- Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*. 2008;90(3):437-49.

30- McGinnes LW, Morrison TG. Disulfide bond formation is a determinant of glycosylation site usage in the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Virol*. 1997;71(4):3083-9.

31- Allen S, Naim HY, Bulleid NJ. Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion. *J Biol Chem*. 1995;270(9):4797-804.

32- Ghasemi F, Khorramizadeh MR, Karkhane AA, Zomorodipour A. The expression efficiency of recombinant human clotting factor IX analogs, rationally designed for hyperglycosylation. *Iran J Pharm Res*. 2020.

Biotechnol. 2009;20(6):678-84.

19- Ghasemi F, Zomorodipour A, Karkhane AA, Khorramizadeh MR. In silico designing of hyperglycosylated analogs for the human coagulation factor IX. *J Mol Graph Model*. 2016;68:39-47.

20- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinform*. 2006;15(1):5-6.

21- Ahmad S, Gromiha M, Fawareh H, Sarai A. ASAView: Database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinform*. 2004;5(1):51.

22- dna00.bio.kyutech.ac.jp/asaview/ [Internet]. Unknown Publisher city: <http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/asaview/>; 2013-2017 [cited 2020 2 5]. Available from: <http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/asaview/>

23- Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: Altman RB, Keith Dunker A, Hunter L. Pacific Symposium on Biocomputing 2002: Kauai, Hawaii, 3-7 January 2002. Singapore: World Scientific; 2001. pp. 310-22.

24- cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/. NetNGlyc 1.0 Server. Unknown Version [Software]. 2017 January 5 [cited 2020 2 15]. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.

25- Haddad-Mashadrizheh A, Zomorodipour A, Izadpanah M, Sam MR, Ataei F, Sabouni F, et al. A systematic study of the function of the human β -globin introns on the