



آنالیز آماری بیان آنتیژن MAGE-A4 در سرطان‌های وابسته و پیش‌بینی عرضه آنتیژن با مولکول HLA-B37 مبتنی بر روش‌های بیوانفورماتیکی

زهره سرگزی: دانشجوی تحصیلات تکمیلی زیست‌فناوری میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

علی اکبر حدادمشهدی‌بزه: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (*نویسنده مسئول) a.haddad@um.ac.ir

منصور‌مهری: استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

محمد رضاحسین دخت: استاد، گروه شمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

ایمونوتکسین،
آنتیژن MAGE4،
دایکینگ، شبیه سازی دینامیک
مولکولی،
آنتی‌بادی مونوکلونال،
پیتید

زمینه و هدف: ایمونوتکسین‌ها از جمله راهبردهای امیدوارکننده در درمان هدفمند سلول‌های سرطانی هستند که با مکانیسم اتصال اختصاصی به آنتیژن‌های توموری عمل می‌کنند. لذا اکاوای این نوع از آنتیژن‌ها و پایش ویژگی‌های ساختاری و عمرکردی آن‌ها فراهم کننده بستری در ارتباط با توسعه این نوع از داروها می‌باشد. در این تحقیق، مطالعه خانواده آنتیژنی MAGE بر اساس آزمون‌های بیوانفورماتیکی در دستور کار قرار گرفته است.

روش کار: در گام نخست، آنالیز‌های بیان آنتیژن‌های خانواده MAGE در انواع سرطان‌ها با استفاده از برنامه SPSS اجرا شد. بعد از تعیین MAGE-A4 به عنوان آنتیژن برتر، براساس معرف منابع، ابی‌توب‌های اتصالی با MAGE-A4 با ایزوفرم‌های مختلف HLA شناسایی شد. سپس با استفاده از برنامه‌های SYFPEITHI و BIMAS ابی‌توب‌های اتصالی گزارش شده در منابع تأیید شد. شاخص پایداری و ایمونوژنیتی ابی‌توب‌ها به ترتیب با استفاده از برنامه‌های PROTPRAM و IEDB انجام شد. به منظور تعیین میل اتصالی و پایداری کمپلکس HLA-B37-peptide در شرایط شبیه واقعی، نرم افزارهای اتوداک وینا و گرومکس ۵.۱ مورد داشتاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این آزمون منجر به آشکارسازی میزان و گستره بیانی بالای MAGE-A4 در مقایسه با سایر اعضای این خانواده شد. همچنین پیتید VDELAHFLL مشتق شده از MAGE-A4 با بالاترین میزان پایداری و ایمونوژنیتی مطلوب آشکارشده. از سوی دیگر کمپلکس HLA-B37-VDELAHFLL با پایین‌ترین میزان نمودار RMSD به عنوان پایدارترین کمپلکس ارزیابی گردید.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده که پیتید مورد نظر VDELAHFLL از آنتیژن-MAGE-A4 ممکن است در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و توسعه واکسن در درمان مدرن سرطان مدنظر قرار گیرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Sargazi Z, Haddad-Mashadrizeh A, Mashreghi M, Housaindokht MR. Statistical analysis of MAGE-A4 antigen expression in relative cancers and predicting antigen presentation by HLA-B37 molecule based on bioinformatics tools. Razi J Med Sci. 2019;25(12):74-83.

* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 1.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/1.0/) صورت گرفته است.



Original Article

Statistical analysis of MAGE-A4 antigen expression in relative cancers and predicting antigen presentation by HLA-B37 molecule based on bioinformatics tools

Zohreh Sargazi, MSc Student of Microbial Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Aliakbar Haddad-Mashadrizeh, Assistant Professor, Faculty of Science, Biology Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (*Corresponding author) a.haddad@um.ac.ir

Mansor Mashreghi, Professor, Faculty of Science, Biology Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Mohammad Reza Housaindokht, Professor, Faculty of Science, Chemistry Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Background: Immunotoxins, one of the promising therapeutic agents can be used in targeted of cancer therapy based on specific binding to tumor-related antigen. Evaluating and specifying the structural and functional features of these antigens provide new perspectives in the field of cancer therapy. In this study, we decipher the structure and function of MAGE antigen family based on in-silico and bioinformatic evaluation.

Methods: In the first step, using SPSS software statistical analysis of the MAGE family antigens expression in a variety of cancer types was performed. After determining the MAGE-A4 as a superior antigen with the highest expression level, based on the review of the literature, the MAGE-A4 binding epitopes were identified for HLA isoforms. Then bioinformatic databases such as BIMAS and SYFPEITHI programs were used to confirm the reported HLA-binding epitopes in literature. Stability index and immunogenicity of epitopes were defined by ProtPram and IEDB software respectively. To determine the binding affinity and stability of HLA-peptide complex, docking screening and molecular dynamic simulation was conducted using Autodock Vina and gromacs 5.1 softwares.

Results: Our results revealed that the MAGE-A4 antigen had high expression compared with other MAGE family members. Also, MAGE-A4 derived peptide, VDELAHFLL, with the highest stability and favorable immunogenicity was appeared. On the other hand, the most stable of HLA-B37- VDELAHFLL complex with the lowest amount of RMSD plot was Obtained.

Conclusion: Generally, our results indicated that VDELAHFLL desired peptide from MAGE-A4 antigen might be promising to generate the therapeutic monoclonal antibody and vaccine development in modern cancer therapy.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

Immunotoxin,
MAGE-A4 antigen,
Docking,
Molecular dynamic
simulation,
Monoclonal antibody,
Peptide

Received: 20/10/2018

Accepted: 12/01/2019

Cite this article as:

Sargazi Z, Haddad-Mashadrizeh A, Mashreghi M, Housaindokht MR. Statistical analysis of MAGE-A4 antigen expression in relative cancers and predicting antigen presentation by HLA-B37 molecule based on bioinformatics tools. Razi J Med Sci. 2019;25(12):74-83.

This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.



HLA به شکل پپتیدهای ۱۱-۹ آمینواسیدی از متن توالی می‌باشد، که نوع HLA به پراکنش نژادی بستگی دارد (۶). شناسایی پپتیدهای مشتق شده از این خانواده آنتیژنی بعداز عرضه توسط HLA به CTL منجر به ازبین رفتن سلول عرضه کننده پپتید خواهند شد (۷). بنابراین این پپتیدها دارای ارزش تشخیصی و درمانی هستند (۶) و شناسایی آنها از اعضاء مختلف خانواده آنتیژنی MAGE می‌تواند برای ایمونوتراپی سرطان بر پایه CTL به کار روند (۷). در میان اعضاء این خانواده، MAGE-A4 با گستره بیانی بالا در طیف وسیعی از سرطان‌ها از جمله کارسینومای اروتیال، سرطان‌های مثانه، ریه، تخمدان، سرودگردن و... (۸)، گزینه‌ای مناسب برای اهداف ایمونوتراپی تومور محسوب می‌شود. در همین راستا، عرضه چندین پپتید اپی‌توپی این آنتیژن توسط مولکول‌های HLA مختلف شامل HLA-A1, A24, HLA-A*0201, HLA-B37 گزارش شده است (۹). بر اساس داده‌ها، اختصاصیت پپتید‌ای توپی برای مولکول HLA وابسته به میل ترکیبی بالا و پایداری پپتید مورد نظر در مولکول HLA می‌باشد (۱۰). بنابراین سنجش توالی MAGE-A4 به منظور آشکارسازی اپی‌توپهای پپتیدی و تعیین HLA مربوطه در نژادهای مختلف می‌تواند راهکاری در جهت طراحی داروهای نوین بر علیه سرطان‌های وابسته به این آنتیژن باشد، که در این تحقیق بر اساس روش‌های محاسباتی در دستور کار قرار دارد. در این راستا، با توجه به حمل اپی‌توپهای پپتیدی مشتق شده از MAGE-A4 با واسطه مولکول HLA-B37 به سطح سلول (۱۱)، برهم‌کنش‌های محاسباتی پپتیدها با HLA-B37 انجام شد.

روش کار

بررسی میزان بیان آنتیژن: به منظور بررسی میزان بیان آنتیژن‌های خانواده MAGE از پایگاه PROTEIN ATLAS داد آدرس https://www.proteinatlas.org پایگاه در سال ۲۰۰۳ با هدف تهیه نقشه پروتئینی

چالش‌های درمانی رایج در حوزه سرطان، منجر به توسعه روش‌های هوشمند درمانی مانند ایمونوتوكسین‌ها شده است که با قابلیت هدف قرار دادن اختصاصی آنتیژن‌های سلول‌های سرطانی عمل می‌کنند (۱). لذا شناخت این نوع از مولکول‌های سطحی آنتیژنی گام مهمی در مسیر طراحی داروهای ایمونوتوكسینی و نیز روش‌های نوین تشخیصی می‌باشد. به طور کلی آنتیژن‌های سطح سلول سرطانی به دو دسته اختصاصی و مشترک تقسیم می‌شوند. نوع اختصاصی این آنتیژن‌ها فقط در سطح سلول‌های سرطانی بیان می‌شوند، در حالیکه آنتیژن‌های مشترک علاوه بر بیان در سلول‌های طبیعی در حالت بدخیمی بیان بیش از حد پیدا می‌کنند (۲). علاوه بر این، آنتیژن‌های ویروسی، آنتیژن‌های ایجاد شده در اثر تغییرات ژنتیکی و آنتیژن‌های کد شده توسط ژن‌های لایه زایای سرطان (Cancer-germline'genes) یا آنتیژن‌های سرطان بیضه (Cancer/testis antigens) به دلیل پتانسیل بالا در برآتگیختن پاسخ ایمنی بسیار حائز اهمیت هستند در میان اعضای مختلف آنتیژن‌های سرطان بیضه، خانواده آنتیژنی MAGE با ۲۵ عضو (۳) در حالت طبیعی تنها در سلول‌های جفت و لایه زایا در جنس مذکور بیان می‌شوند (۳). این سلول‌ها به دلیل عدم بیان مولکول‌های کمپکس عرضه کننده آنتیژن (MHC) که در انسان (HLA) نام دارد بدون تحریک پاسخ ایمنی و حذف سلولی به واسطه لنفوцит‌های T سایتوتوكسیک (Cytotoxic T lymphocyte: CTL) (۴). با این وجود، در حالت سرطانی شدن بیان می‌شوند (۴). در سلول‌های طبیعی به دلیل فرایندهای اپی‌ژنتیکی از سلول‌های دمتیلاسیون، این ژن‌ها در سطح طیف وسیعی از سلول‌های توموری با منشا بافتی مختلف ظاهر می‌شوند و ضمن تحریک سیستم ایمنی به منظور حذف سلول ناهنجار، در تهاجم، مهاجرت، مقاومت آپوپتوزی، سرکوب سیستم ایمنی و رگزایی نقش ایفا می‌کنند (۵). الگوی بیانی این نوع از آنتیژن‌ها در سلول‌های طبیعی و سرطانی نشان دهنده عرضه آن‌ها توسط مولکول‌های

کمپلکس پیتید-HLA با کمترین میزان انرژی اتصال یا بیشترین مقدار میل ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. پیوندهای هیدروژنی در گیر در اتصال پیتید به HLA توسط برنامه Ligplot (۱۹) شناسایی شد.

شبیه سازی دینامیک مولکولی: با هدف شناخت پایدارترین کمپلکس پیتید-HLA-B37، از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از برنامه Gromacs ۵.۱ (۲۰) استفاده شد. تمامی شبیه‌سازی‌ها درون یک جعبه مکعبی پر شده با مدل آب [TIP3P] با شرایط مرزی PBC انجام شد. برای اینکه بار کل سیستم صفر شود یون‌های سدیم و کلر بر اساس غلظت فیزیولوژیک ۱۵۰ میلی مولار به سیستم اضافه شدند. انرژی سیستم‌ها به پایین‌ترین سطح ممکن رسانده شد. سپس به مدت ۲۰۰ پیکو ثانیه برای متعادل‌سازی NVT و ۵۰۰ پیکو ثانیه برای متعادل سازی NPT شبیه‌سازی انجام شد. پس از اینکه تمام سیستم‌ها متعادل شدند، شبیه‌سازی به مدت ۱۰ نانو ثانیه و در شرایط ثابت دمایی ۳۰۰ درجه کلوین و ۱ اتمسفر اجرا شد.

ارزیابی‌های آماری داده‌ها: بررسی‌های آماری در این مطالعه با نسخه ۲۱.۰ نرمافزار SPSS Inc، SPSS Chicago, IL, USA صورت گرفت. همچنین، مقایسه میانگین داده‌ها با کمک آزمون Duncan و روش آنالیز واریانس یک طرف (One-Way ANOVA) انجام گردید. در همه محاسبات ارزش عددی P کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی میزان بیان آنتیژن‌های خانواده MAGE: نتایج بدست آمده از داده‌های آماری در ارتباط با MAGE میزان بیان اعضاء مختلف آنتیژن‌های خانواده MAGE دهنده میزان بیان متفاوت آن‌ها در سلول‌های سرطانی بود (شکل ۱). همانطوری که در این شکل نمایش داده شده است، MAGE-C3 کمترین و MAGE-A4 دارای بیشترین میزان بیان در انواع سرطان‌ها می‌باشد.

ارزیابی گستره بیانی آنتیژن MAGE-A4: بررسی سلول‌های سرطانی بیان کننده آنتیژن MAGE-A4 و MAGE-A4 میزان بیان آن منجر به آشکار شدن طیفی از سلول‌های بدخیم با قابلیت بیان این آنتیژن در حالت سرطانی به

انسان مبتنی بر روش‌های مختلف امیکس پایه‌گذاری شده است (۱۲).

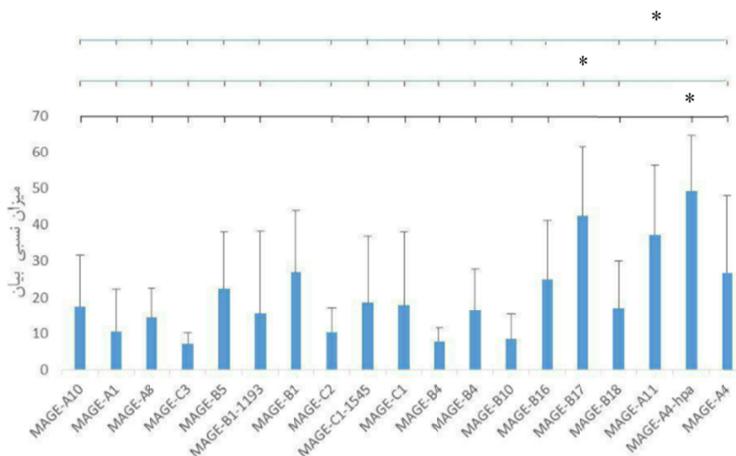
دستیابی به توالی‌های پروتئینی و ساختارها: توالی کامل آنتیژن MAGE-A4 از پایگاه NCBI (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (۱۳) دستیابی NP_001011550 دریافت شد. همچنین فرمت PDB این آنتیژن و HLA-B37 به ترتیب با شماره‌های RCSB 2WA0 و 2RFX از پایگاه RCSB (www.rcsb.org) گرفته شد.

تعیین ساختار دوبعدی آنتیژن: آشکارسازی ساختار دو بعدی با استفاده از پایگاه داده PDBSUM (PDBSUM) (۱۴) انجام شد. این پایگاه، حاوی اطلاعات ساختاری همه پروتئین‌های موجود در پایگاه داده پروتئین یا RCSB می‌باشد که با کمک این اطلاعات قادر به پیشگویی ساختارهای مدل شده نوین یا نوترکیب می‌باشد.

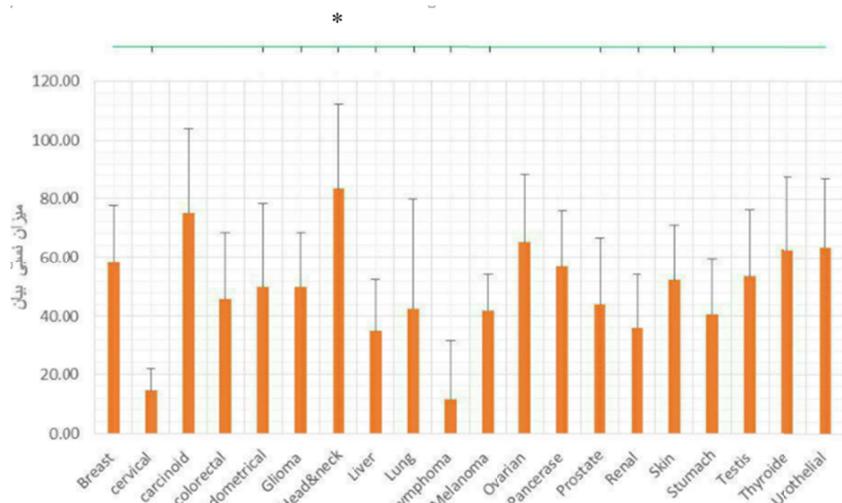
واکاوی و پیشگویی اپی‌توبی: واکاوی الیگوپیتیدهای اپی‌توبی مستتر در توالی MAGE-A4 بر اساس مرور منابع (۹) و با استفاده از برنامه‌های محاسباتی BIMAS (۱۵) SYFPEITHI (۱۶) برای تائید اپی‌توبه‌ای گزارش شده در مقالات با توجه به نوع HLA آن‌ها و پیش‌بینی اپی‌توبه‌ای اتصالی MAGE-A4 به مولکول HLA-B37 صورت پذیرفت.

ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی و ایمونوژنیتی: به منظور شناخت پایداری پیتیدهای مشتق شده از MAGE-A4، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این موتفیها با استفاده از برنامه تحت شبکه PROTPRAM تعیین شد. این برنامه ارزیابی پایداری پیتیدها، شاخص آلیفاتیک، PH ایزواکتریک (PI) و هیدروفوبیسیتی توالیهای پروتئینی و پیتیدی را مورد سنجش قرار میدهد. پیتیدیاپروتئین با شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ به عنوان پایدار در نظر گرفته می‌شود. همچنین شاخص آلیفاتیک بالا که مبنی درصد اسیدهای آمینه شاخه‌دار والین، لوسین، ایزولوسین و آلانین می‌باشد، به عنوان معیاری برای پایداری پروتئین/پیتید محسوب می‌شود (۱۷). ایمونوژنیتی اپی‌توبه‌ای اتصالی MAGE-A4 نیز توسط برنامه تحت شبکه IEEDB (۱۸) تعیین شد.

تعیین میل اتصالی: در این تحقیق برنامه AutoDock Vina (AutoDock Vina) (۱۹)، برای تعیین میزان انرژی اتصالی اپی‌توب به HLA-B37 به منظور تعیین



شکل ۱- بررسی مقایسه‌ای میزان بیان آنتی‌ژن‌های خانواده MAGE (علامت * نتایج با اختلاف معنای ۰/۰۵)



شکل ۲- میزان نسبی بیان MAGE-A4 در انواع بافت‌های سرطانی (علامت * نتایج با اختلاف معنای ۰/۰۵)

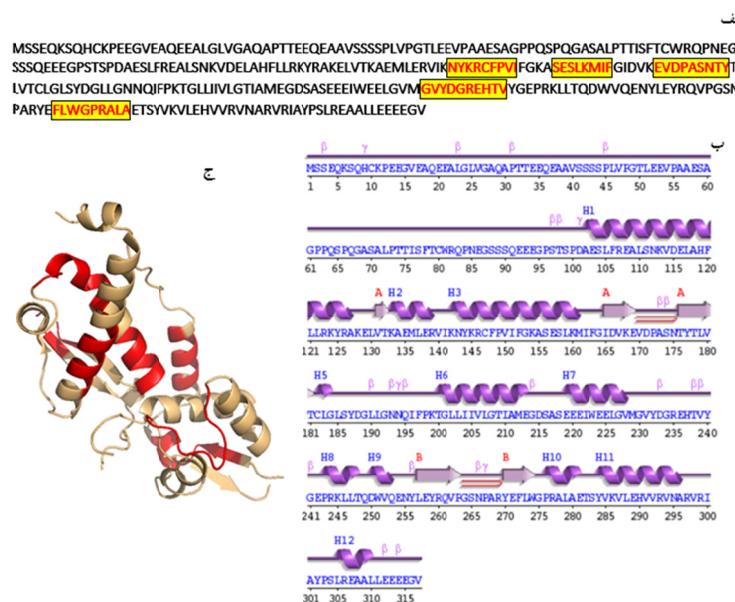
به انتهای C توالی و در مارپیچ‌های الفا ساختارهای ثانویه استقرار دارند.

پیشگویی اپی‌توب‌های MAGE-A4 قابل اتصال به HLA-B37: نتایج حاصل از پایش توالی MAGE-A4 منجر به آشکارسازی ۴ اپی‌توب اتصالی با موقعیت و امتیاز متفاوت در طول این توالی شد (جدول ۱ و شکل ۱). همانطوریکه در شکل ۲ نمایش داده شده است، بررسی مقایسه‌ای میل اتصالی این پیتیدها قابلیت بالای VDELAHFLL در اتصال به HLA-B37 را نشان داد.

بررسی ویژگی‌های پایداری و ایمونوژنیتی اپی‌توب‌ها: بررسی شاخص‌های ناپایداری، بیانگر پایداری بالای پیتید VDELAHFLL با عدد ۲۸.۷۷ و بیشترین ناپایداری برای پیتید NYKRCFPVI با شاخص ناپایداری ۸۷.۹۱ شد (جدول ۲). از سوی دیگر در این

میزان متفاوت شد. شکل ۲ نشان دهنده این است که در حالت سرطانی شدن، سلول‌های بافت‌های مختلف قابلیت بیان این آنتی‌ژن را دارا می‌باشند. با این وجود، بیشترین میزان بیان به قریب در سلول‌های سرطانی سروگردان، کارسینوئید، تخمدان، اروتیال، تیروئید و پستان مشاهده شد.

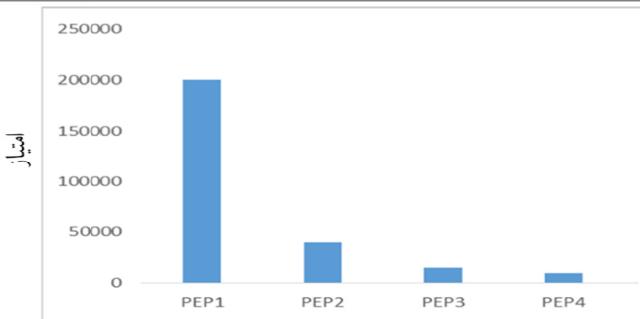
موقعیت‌یابی اپی‌توب‌های قابل اشتقاقد از MAGE-A4 مبتنی بر منابع: واکاوی منابع، منجر به آشکارسازی پیتیدهای اتصالی مختلف به مولکول‌های HLA متفاوت بر اساس پراکنش جمعیتی شد، که موقعیت و توالی آنها در ساختارهای اول، دوم و سوم در شکل ۳ نمایش داده شده است. یاتوجه به شکل، ۵ موتیف قابل اتصال به ایزوفرم‌های مختلف HLA در جمعیت‌ها نشان داده شده است که موقعیت آن‌ها در ساختار اولیه بیشتر



شکل ۳- موقعیت موتیف‌های آنتی‌زن مسستر در الف: ساختار اول، ب: ساختار دوم و ج: ساختار سوم توالی آنتی‌زن MAGE-A4

جدول ۱- نتایج حاصل از پیش‌بینی موتیف‌های آنتی‌زن قابل اشتراق از توالی MAGE-A4

		BIMAS برنامه	SYFPEITHI برنامه	
ردیف	جایگاه شروع	توالی	جایگاه شروع	توالی
1	114	VDELAHFLL	102	AESLFREAL
2	249	QDWVQENLY	114	VDELAHFLL
3	218	SEEEIWEEL	218	SEEEIWEEL



شکل ۴- امتیاز ناشی از میل اتصالی اپی توپ‌های مشتق از آنتی‌زن به HLA-B37 MAGE-A4

Abbreviation: PEP1:VDELAHFLL, PEP2:QDWVQENYL, PEP3:SEEEIWEEL, PEP4:AETSYVKVL

اتصالی یا کمترین سطح انرژی و همچنین بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی را برای موتیف VDELAHFLL نشان داد (جدول ۳ و شکل ۵). با توجه به این شکل مشاهده می‌شود که این سطح انرژی ناشی از پیوندهای هیدروژنی توسط آمینواسیدهای Tyr7, Glu63, Tyr73, Asn77, Asn66, Tyr84, Thr73, Asn77 با طول پیوندی ۲/۸۰ انگستروم می‌باشد.

جدول مشخص شده است که، در میان موتیف‌های آنتی‌زن پیش‌بینی شده، پپتید VDELAHFLL ایمونوژن ترین پپتید بعد از پپتید GVYDGREHTV ارزیابی شده است. ارزیابی میل اتصالی اپی توپ‌ها: نتایج حاصل از ارزیابی میل اتصالی موتیف‌های آنتی‌زن مشتق شده از MAGE-A4 با مولکول HLA-B37 بالاترین میزان میل

جدول ۲- شاخص‌های مقایسه‌ای پایداری و ایمنوژنسیتی پیتیدهای گزارش شده MAGE-A4 با مولکول HLA-B37.

پیتید	جایگاه	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	PI	هیدروفوئیستی / ایمونوژنیتی
NYKRCFPVI	143-151	87.91 ناپایدار	75.56	9.31	-0.089/ 0.05454
SESLKMIF	156-163	87.04 ناپایدار	97.50	5.72	0.500/ -0.32784
EVDPASNTY	169-177	4.16 پایدار	43.33	3.67	-0.989/ -0.10437
GVYDGREHTV	230-239	10.06 پایدار	58.00	5.32	-0.910/ 0.24875
FLWGPRALA	272-280	15.30 پایدار	108.89	9.75	0.733/ 0.17046
KVLEHVVVRV	286-294	-8.92 پایدار	172.22	8.75	0.611/ 0.23259
VDELAHFLL	114-123	-28.77 پایدار	173.33	4.35	1.111/ 0.18221

جدول ۳- سطح ابری^۱ ناشی از اتصال پستیدها با مولکول HLA-B-37

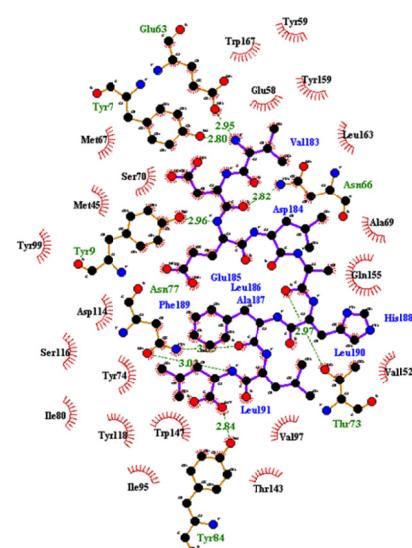
پیپید	انرژی اتصالی (kcal/mol)
NYKRCFPVI	-5.7
SESLKMIF	-5.6
EVDPASNTY	-5.9
GVYDGREHTV	-6.2
FLWGPRALA	-7.3
KVLEHVVRV	-5.8
VDELAHFLL	-8.6

HLAB-37 در شرایط شبه واقعی، پایدارترین کمپلکس رادر ارتباط با پپتید VDELAHFLL با پایین ترین میزان نمودار انحراف RMSD در مدت زمان ۱۰ نانو نشان داد (شکل ۶). تغییرات منحنی RMSD در فاصله ۰/۰ تا ۲۵/۰ نانومتر متغیر است، که در این میان کمپلکس مرتبط با VDELAHFLL دارای کمترین نوسانات از نقطه آغاز می‌باشد (نمودار ۶).

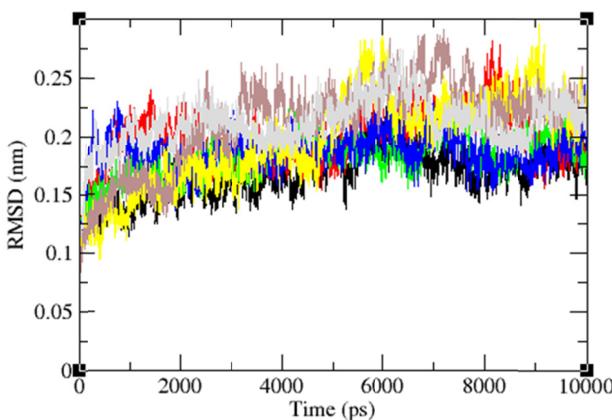
پخت و نتیجہ گیری

شناخت آنتیزن‌های سطح سلول‌های سرطانی از آن جهت حائز اهمیت است که می‌توانند اهداف ایمونوتراپی سرطان واقع شوند. در این میان، آنتیزن‌هایی که خاص سلول سرطانی باشند به دلیل عوارض جانبی کمتر برای طراحی داروهای هدفمند درمان سرطان مطلوب هستند (۲۱). خانواده آنتیزنی MAGE، از گروه آنتیزن‌های CTA خاص تومور هستند که در سلول‌های لایه زایای جنس مذکور و حفت د، حالت نرمال، سیان می‌باشند و در سلول‌های،

شبیه سازی دینامیک مولکولی: نتایج حاصل از بررسی پایداری کمپلکس پیتیدهای آنتیزنی با



شکل ۵- اسیدهای آمینه دخیل در اتصال پپتید VDELAHFLL به (Tyr9.Tyr84,Thr73,Asn77,Asn66,Tyr7,Glu63) مولکول HLA-B37. در این شکل اسیدهای آمینه در گیر در پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز نشان داده است.



شکل ۶- نمودار تغییرات RMSD کمپلکس‌های پروتئین و پیتید در طول شبیه‌سازی. در این نمودارها پایین‌ترین میزان RMSD برای پیتید VDELAHFLL به رنگ مشکی و ناپایدارترین پیتید مربوط به پیتید NYKRCFPVI است. پیتید FLWGPRALA به رنگ زرد نشان داده شده است. پیتید KVLEHVVRV (قمه ای)، پیتید EVDPASNTY (خاکستری)، پیتید GVYDGREHTV (آبی)، پیتید (آبی، پیتید) نمایش داده شده است.

و نوع HLA حامل آنها حائز اهمیت می‌باشد. در فرایند اتصال پیتید به مولکول HLA، پایداری ساختاری پیتید و ایمونوژنیتی آن از جمله عوامل موثر در انتخاب موتیف برای عرضه به سلول‌های CTL توسط HLA می‌باشند (۲۵). لذا در این تحقیق ارزیابی پایداری ساختاری پیتید بر اساس شاخص‌های پایداری و آلیفاتیک صورت گرفت که منجر به شناسایی پیتید VDELAHFLL با بالاترین شاخص پایداری (۷۷/۲۸) و بالاترین شاخص آلیفاتیک (۳۳,۱۷۳) شد (جدول ۲). فاکتور بعدی برای انتخاب یک پیتید به منظور ایمونوتراپی سرطان، توانایی پیتید در تحریک سیستم ایمنی به واسطه هردو نوع نوع سلول B و سلول T می‌باشد (۲۶). زیرا پیتیدهای با ایمونوژنیتی بالاتر شانس بیشتری در اتصال به مولکول HLA در سلول Immuno-دارند به طوریکه پیتیدهای ایمونودامیننت (Immuno-dominant) بهترین پیتیدها در این اتصال می‌باشند (۲۷). بدین منظور ایمونوژنیتی پیتیدهای گزارش شده در منابع و همچنین پیتید VDELAHFLL مورد ارزیابی قرار گرفت، که پیتید مذکور به لحاظ درجه ایمونوژنیتی در مرتبه دوم بعد از پیتید KVLEHVVRV قرار داشت (جدول ۲). مراحل ذکر شده مشابه تحقیقی است که در سال ۲۰۱۵ برای شناخت پیتیدهای آنتیژنی ایمونودامیننت در *Plasmodium falciparum* انجام گرفته است (۲۸).

از سویی دیگر با توجه به اینکه براساس گزارشات (۴، ۱۱) قابلیت مولکول HLA-B37 در عرضه آنتیژن‌های

سوماتیک سالم، خاموش هستند، از این جهت یک هدف درمانی ایده‌آل در درمان سرطان‌های وابسته محسوب می‌شوند (۲۲). MAGE-A4 کاندید مناسبی از اعضای این خانواده به دلیل بیان بالای آن در انواع سرطان‌ها با منشا بافتی مختلف می‌باشد که در این تحقیق مورد آزمون‌های محاسباتی در ارتباط با میزان و الگوی بیان قرار گرفت (۸). در این تحقیق با استفاده از روش‌های آماری میزان بیان این آنتیژن در سرطان‌های پستان، کارسینوئید، سروفگردن، تخمدان، پانکراس، تیروئید و برخی دیگر از بافت‌ها آشکار شد که از این میان بیشترین میزان بیان این آنتیژن در سرطان سروگردان مشاهده گردید (شکل ۲). این نتیجه با تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و rt-PCR بر روی خانواده آنتیژنی MAGE به منظور طراحی واکسن برای سرطان تخدمدن انجام شد مطابقت داشت و MAGE-A4 با بالاترین میزان بیان به عنوان کاندید مناسب طراحی واکسن معرفی شد (۲۳). علاوه بر میزان بیان آنتیژن‌های خانواده MAGE که در طراحی داروهای هوشمند ضد سرطان حائز اهمیت می‌باشند، الگوی بیانی این نوع از مولکول‌ها و شناخت پیتید آنتیژنی مشتق شده از آن در طراحی دارو تعیین کننده است. زیرا مکانیسم عرضه آنتیژن‌های خانواده MAGE به سطح سلول به صورت کمپلکس‌های پیتیدی ۹ تا ۱۱ اسید‌آمینه‌ای توسط HLA های مختلف به سطح سلول می‌باشد (۲۴). لذا شناخت این موتیف‌ها در متن توالي

2. Sensi M, Anichini A. Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy. *Clin Cancer Res*; 2006;12(17):5023-32.
3. Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol*; 2015;37:1-8.
4. Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens*; 2002;60(5):365-71.
5. Salmannejad A, Zamani MR, Pourvahedi M, Golchehre Z, Hosseini Bereshneh A, Rezaei N. Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. *Immunol Invest*; 2016;45(7):619-40.
6. Boon-Falleur T, van der Bruggen P, De Plaen E, Lurguin C, Traversari C, Gaugler B, et al. Isolated cytolytic T cells specific for complexes of MAGE related peptides and HLA molecules. *Google Patents*; 1997.
7. Maher J, Davies ET. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Br J Cancer*; 2004;91(5):817-21.
8. Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, et al. Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope Derived from Cancer-Testis Antigen MAGE-4 in Oesophageal Carcinoma. *Scand J Immunol*; 2011;74(6):561-7.
9. Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, et al. Identification of Two Novel HLA-A*0201-Restricted CTL Epitopes Derived from MAGE-A4. *Clin Develop Immunol*; 2010;2010:567594.
10. Calis JJA, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, et al. Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. *PLOS Comput Biol*; 2013;9(10):e1003266.
11. Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon-Falleur T, van der Bruggen P. MAGE-A4 antigenic peptides and uses thereof. *Google Patents*; 2007.
12. Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science*; 2017;356(6340).
13. Laskowski RA. PDBsum new things. *Nucleic Acids Res*; 2009;37(Database issue):D355-9.
14. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol (Baltimore, Md: 1950)*; 1994;152(1):163-75.
15. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NPN, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*; 1999;50(3):213-9.
16. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein

خانواده MAGE مشخص شده است، در این تحقیق با استفاده از آزمون‌های بیوانفورماتیکی بررسی میل ترکیبی پپتیدها و HLA-B37 براساس معیار انرژی اتصالی، با استفاده از داکینگ پروتئین-پپتید انجام شد. همچنین به دلیل اهمیت پایداری پپتید در مولکول HLA، ارزیابی پایداری این کمپلکس، توسط شبیه سازی دینامیک مولکولی انجام شد و پپتید VDELAHFLL به عنوان پپتید برتر در فرایند عرضه آنتیژن توسط HLA-B37 معرفی شد زیرا دارای کمترین میزان انرژی اتصالی بامولکول HLA-B37 و همچنین پایین ترین میزان نمودار RMSD در مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه در مقایسه با سایر پپتیدهای گزارش شده از MAGE-A4 بود. بنابراین کمپلکس-HLA-B37-VDELAHFLL پایدارترین کمپلکس بوده که این پایداری نقش بسیار مهمی در عرضه پپتید آنتیژنی به سلولهای CTL دارد (۲۹). در این راستا گزارش‌هایی از استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) به منظور ارزیابی پویایی متقابل مولکول‌های MHC-I در حالت اتصال با لیگاند (پپتید)، ارائه شده است (۳۰). به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که موتیف VDELAHFLL مستتر در ناحیه ۱۱۴ تا ۱۲۳ MAGE-A4114-(MAGE-A4-والی 123)VDELAHFLL می‌تواند به عنوان پپتید انتخابی در طراحی واکسن‌های درمانی، مونوکلونال آنتی‌بادی و ایمونوتوكسین درمانی برپایه CTL مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش به سبب فراهم شدن تفکرات و زیرساخت‌های محاسباتی پیشرفته و مشاوره‌های دقیق علمی در مجموعه دانش محور زیست اقتصاد خیام انجام شده است، لذا نویسندگان این مقاله از اعضاء این مجموعه کمال تشکر را دارند.

References

1. Nezafat N, Ghasemi Y, Javadi G, Khoshnoud MJ, Omidinia E. A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: an in silico approach. *J Theoret Biol*; 2014;349:121-34.

- Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editor. The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 571-607.
17. Peters B, Sidney J, Bourne P, Bui HH, Buus S, Doh G, et al. The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. *PLoS Biol*; 2005.3(3):e91.
18. Ngasundaram N, George Priya Doss C, Chakraborty Ch, Karthick V, Thirumal umar D, Balaji V, et al. Mechanism of artemisinin resistance for malaria PfATP6 L263 mutations and discovering potential antimalarials: An integrated computational approach. *Sci Reports*; 2016.6:30106.
19. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inform Model*; 2011.51(10):2778-86.
20. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*; 2015.1-2:19-25.
21. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*; 2014.515:577.
22. Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol*; 2015.37:1-8.
23. Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, et al. Expression and Immune Responses to MAGE Antigens Predict Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *PloS One*; 2014.9(8):e104099.
24. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Rev Cancer*; 2014.14:135.
25. Saha CK, Mahbub Hasan M, Saddam Hossain M, Asraful Jahan M, Azad AK. In silico identification and characterization of common epitope-based peptide vaccine for Nipah and Hendra viruses. *Asia Pacific J Tropic Med*; 2017.10(6):529-38.
26. Li W, Joshi MD, Singhania S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*; 2014.2(3):515-36.
27. Demento SL, Siefert AL, Bandyopadhyay A, Sharp FA, Fahmy TM. Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. *Trends Biotechnol*; 2011.29(6):294-306.
28. Longley RJ, Halbroth BR, Ewer KJ, Hill AV, Spencer AJ. Identification of Immunodominant Responses to the Plasmodium falciparum Antigens PfUIS3, PfLSA1 and PfLSAP2 in Multiple Strains of Mice. *PLoS One*; 2015.10(12):e0144515.
29. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-
- Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Frontiers Immunol*; 2017.8:292.
30. Zacharias M, Springer S. Conformational Flexibility of the MHC Class I $\alpha 1$ - $\alpha 2$ Domain in Peptide Bound and Free States: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophysic J*; 2004.87(4):2203-14.