مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۵، شماره ۱۲، اسفند ۱۳۹۷ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019

آنالیز آماری بیان آنتی‌ژن MAGE-A4 در سرطان‌های وابسته و پیش بینی 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 حدادمشهدریزه: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (*نویسنده مسئول) a.haddad@um.ac.ir

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

محمدرضاحسین دخت: استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: ایمونوتوکسین‌ها از جمله راهبردهای امیدوارکننده در درمان هدفمند سلول‌های سرطانی هستند که با مکانیسم اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن‌های توموری عمل می‌کنند. لذا واکاوی این نوع از آنتی‌ژن‌ها و پایش ویژگی‌های ساختاری و عمکردی 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، آنالیزآماری بیان آنتی‌ژن‌های خانواده MAGE در انواع سرطان‌ها با استفاده از برنامه SPSS انجام گرفت. بعد از تعیین MAGE-A4 به عنوان آنتی‌ژن برتر، براساس مرور منابع، اپی‌توپ‌های اتصالی MAGE-A4 با ایزوفرم‌های مختلف HLA شناسایی شد. سپس با استفاده از برنامه‌های BIMAS و SYFPEITHI اپی‌توپ‌های اتصالی گزارش شده در منابع تائید شد. شاخص پایداری و ایمونوژنسیتی اپی‌توپ‌ها به ترتیب با استفاده از برنامه‌های PROTPRAM وIEDB انجام شد. به منظورتعیین میل اتصالی و پایداری کمپلکس HLA-B37-peptide درشرایط شبه واقعی، نرم افزارهای اتوداک وینا وگرومکس 5.1 مورداستفاده قرارگرفت.

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

نتیجه‌گیری: به طورکلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادکه پپتید مورد نظر VDELAHFLL از آنتی‌ژن MAGE-A4ممکن است در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال وتوسعه واکسن در درمان مدرن سرطان مدنظر قرارگیرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

ایمونوتوکسین،
آنتی‌ژن MAGE4،
داکینگ، شبیه سازی دینامیک مولکولی،
آنتی‌بادی مونوکلونال،
پپتید

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۲

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.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019

Razi Journal of Medical Sciences.2019;25(12):74-83. http://rjms.iums.ac.ir

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

SID

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.

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019

مقدمه

چالش‌های درمانی رایج در حوزه سرطان، منجر به توسعه روش‌های هوشمند درمانی مانند ایمونوتوکسین‌ها 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 ایمونوتوکسینی و نیز روش‌های نوین تشخیصی می‌باشد. به طورکلی 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 بربیان در سلول‌های طبیعی در حالت بدخیمی بیان بیش از حد پیدا می‌کنند (۲). علاوه بر این،آنتی‌ژن های 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 برانگیختن 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 مذکر 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 لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (Cytotoxic T lymphocyte: CTL) بیان می‌شوند (۴). با این وجود، در حالت سرطانی شدن در سلول‌های طبیعی به دلیل فرایندهای اپی‌ژنتیکی ازجمله 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 HLA به شکل پپتیدهای ۹-۱۱ 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 منجربه ازبین رفتن سلول عرضه کننده پپتید خواهند شد (۷). بنابراین این پپتیدها دارای ارزش تشخیصی و درمانی هستند (۶) و شناسایی آنها ازاعضاء 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 اروتلیال، سرطان‌های مثانه، ریه، تخمدان، سروگردن 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-A24، HLA-A1، HLA-A*0201 گزارش شده است (۹). بر اساس داده‌ها، اختصاصیت پپتیداپی‌توپی 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 درنژادهای 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 باواسطه 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 داد PROTEIN ATLAS به آدرس https://www.proteinatlas.org استفاده شد. این پایگاه در سال ۲۰۰۳ با هدف تهیه نقشه پروتئینی

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019

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) با شماره دستیابی NP_001011550 دریافت شد. همچنین فرمت PDB این آنتی‌ژن و HLA-B37 به ترتیب با شماره‌های شناسایی 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 (۱۳) 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 اپی‌توپی: واکاوی الیگوپپتیدهای اپی‌توپی مستتر در توالی MAGE-A4 بر اساس مرور منابع (۹) و با استفاده از برنامه‌های محاسباتی BIMAS (۱۴) وSYFPEITHI (۱۵) برای تائید اپی توپ‌های گزارش شده درمقالات باتوجه به نوع HLA آن‌ها و پیش بینی اپی توپ‌های اتصالی MAGE-A4 به مولکول HLA-B37 صورت پذیرفت.

ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی و ایمونوژنسیتی: به منظور شناخت پایداری پپتیدهای مشتق شده از MAGE-A4، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این موتیف‌ها با استفاده ازبرنامه تحت شبکه PROTPRAM تعیین شد.این برنامه ارزیابی پایداری پپتیدها، شاخص آلیفاتیک، PH ایزوالکتریک (PI) و هیدروفوبیسیتی توالیهای پروتئینی وپپتیدی رامورد سنجش قرار میدهد. پتیدیاپروتئین با شاخص ناپایداری کمتر از ۴۰ به عنوان پایدار در نظر گرفته می‌شود.همچنین شاخص آلیفاتیک بالا که مبین درصد اسیدهای آمینه شاخه‌دار والین، لوسین، ایزولوسین و آلانین می‌باشد، به عنوان معیاری برای پایداری پروتئین/پپتید محسوب می‌شود (۱۶). ایمونوژنسیتی اپی‌توپ‌های اتصالی MAGE-A4 نیز توسط برنامه تحت شبکه IEDB (۱۷) تعیین شد.

تعیین میل اتصالی: در این تحقیق برنامه اتوداک وینا (AutoDock Vina) (۱۸)، برای تعیین میزان انرژی اتصالی اپی‌توپ به HLA-B37 به منظور تعیین کمپلکس پپتید-HLA با کمترین میزان انرژی اتصال یا بیشترین مقدار میل ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. پیوندهای هیدروژنی درگیر در اتصال پپتیدبه HLA توسط برنامه Ligplot (۱۹) شناسایی شد.

شبیه سازی دینامیک مولکولی: با هدف شناخت پایدارترین کمپلکس پپتید- HLA-B37، از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از برنامه Gromacs 5.1 (۲۰) استفاده شد. تمامی شبیه‌سازی‌ها درون یک جعبه مکعبی پرشده با مدل آب [TIP3P] با شرایط مرزی PBC انجام شد. برای اینکه بار کل سیستم صفر شود یون های 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 پیکوثانیه برای متعادل سازی NPT شبیه‌سازی انجام شد. پس از اینکه تمام سیستم‌ها متعادل شدند، شبیه‌سازی به مدت ۱۰ نانوثانیه 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 نرم‌افزارSPSS (SPSS Inc, Chicago, IL,USA) صورت گرفت. همچنین، مقایسه میانگین داده ها 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.

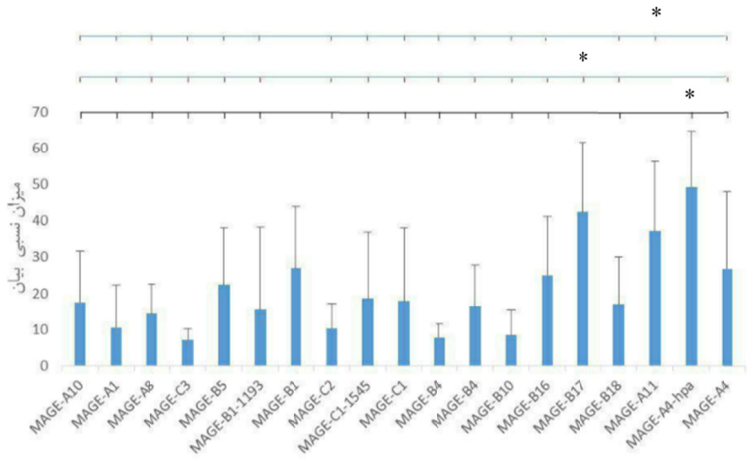
یافته‌ها

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

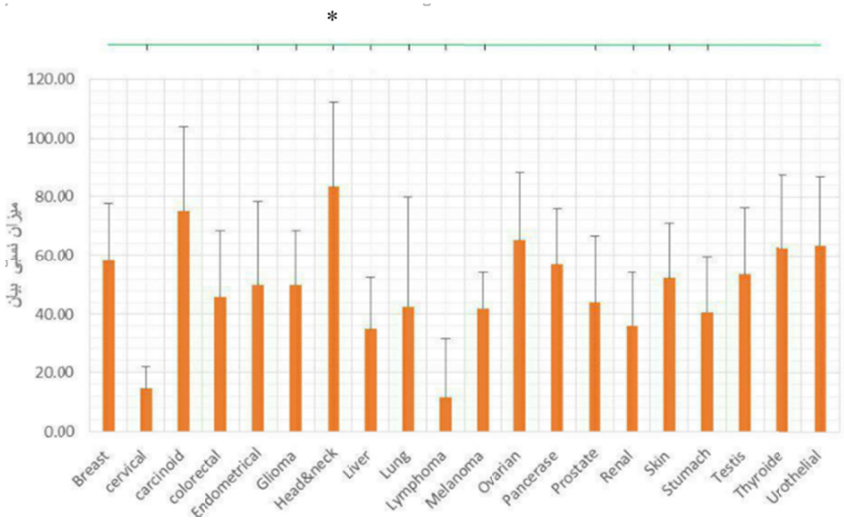
ارزیابی گستره بیانی آنتی‌ژن MAGE-A4: بررسی سلول‌های سرطانی بیان کننده آنتی‌ژن MAGE-A4 و میزان بیان آن منجربه آشکار شدن طیفی از سلول‌های بدخیم با قابلیت بیان این آنتی‌ژن در حالت سرطانی به

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019



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



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

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 ترتیب در سلول‌های سرطانی سروگردن، کارسینوئید، تخمدان، اروتلیال، تیروئید و پستان مشاهده شد.

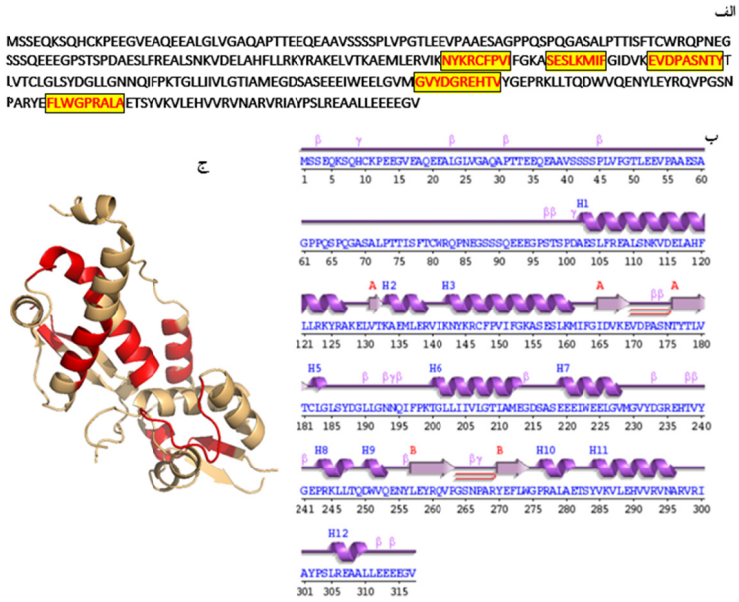
موقعیت‌یابی اپی‌توپ‌های قابل اشتقاق از MAGE-A4 مبتنی بر منابع: واکاوی منابع، منجربه آشکارسازی پپتیدهای اتصالی مختلف به مولکول‌های HLA متفاوت بر اساس پراکنش جمعیتی شد، که موقعیت و توالی آنها در ساختارهای اول، دوم و سوم در شکل ۳ نمایش داده شده است. باتوجه به شکل، ۵ موتیف قابل اتصال به ایزوفرم‌های مختلف HLA در جمعیت‌ها نشان داده شده است که موقعیت آن‌ها در ساختار اولیه بیشتر به انتهای C توالی و در مارپیچ‌های الفا ساختارهای ثانویه استقرار دارند.

پیشگویی اپی‌توپ‌های MAGE-A4 قابل اتصال به HLA-B37: نتایج حاصل از پایش توالی MAGE-A4 منجربه آشکارسازی ۴ اپی‌توپ اتصالی با موقعیت و امتیاز متفاوت در طول این توالی شد (جدول ۱ و شکل ۴). همانطوریکه در شکل ۴ نمایش داده شده است، بررسی مقایسه‌ای میل اتصالی این پپتیدها قابلیت بالای VDELAHFLL در اتصال به HLA-B37 رانشان داد.

بررسی ویژگی‌های پایداری و ایمونوژنسیتی اپی‌توپ‌ها: بررسی شاخص‌های ناپایداری، بیانگر پایداری بالای پپتید VDELAHFLL با عدد 28.77- و بیشترین ناپایداری برای پپتید NYKRCFPVI با شاخص ناپایداری 87.91 شد (جدول ۲). از سوی دیگر دراین

www.SID.ir

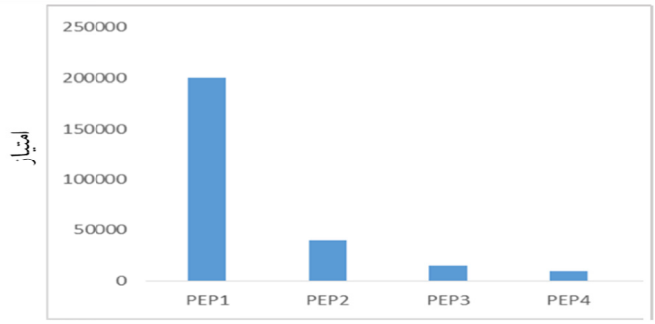
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019



شکل ۳- موقعیت موتیف‌های آنتی‌ژنی مستتر در الف: ساختار اول، ب: ساختار دوم و ج: ساختار سوم توالی آنتی ژنی MAGE-A4

جدول ۱- نتایج حاصل از پیش‌بینی موتیف‌های آنتی‌ژنی قابل اشتقاق از توالی MAGE-A4

	برنامه BIMAS		برنامه SYFPEITHI	
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 آنتی ژن MAGE-A4 به HLA-B37.
Abbreviation: PEP1:VDELAHFLL, PEP2:QDWVQENYL, PEP3:SEEEIWEEL, PEP4:AETSYVKVL

جدول مشخص شده است که، در میان موتیف‌های آنتی‌ژنی پیش‌بینی شده، پپتید VDELAHFLL ایمونوژن‌ترین پپتید بعد از پپتید GVYDGREHTV ارزیابی شده است.

ارزیابی میل اتصالی اپی توپ‌ها: نتایج حاصل از ارزیابی میل اتصالی موتیف‌های آنتی‌ژنی مشتق شده از MAGE-A4 با مولکول HLA-B37 بالاترین میزان میل اتصالی یاکمترین سطح انرژی وهمچنین بیشترین تعدادپیوندهیدروژنی رابرای موتیف VDELAHFLL نشان داد (جدول ۳ و شکل ۵). باتوجه به این شکل مشاهده می‌شود که این سطح انرژی ناشی از پیوندهای هیدروژنی توسط آمینواسیدهای Glu63، Tyr7، Asn66، Asn77، Thr73، ، Tyr84، Tyr9 با طول پیوندی ۲/۸۰ انگسترم می‌باشد.

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019

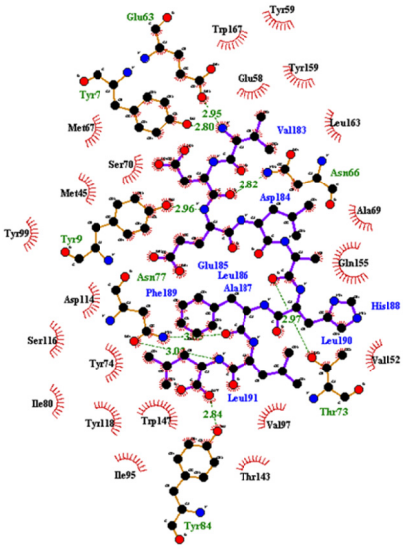
جدول ۲- شاخص‌های مقایسه‌ای پایداری وایمونوژنسیتی پپتیدهای گزارش شده MAGE-A4 باملوکول HLA-B37.

پپتید	جایگاه	شاخص ناپایداری	شاخص آلیفاتیک	PI	هیدروفوبیسیتی/ ایمونوژنسیتی
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
KVLEHVVRV	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 انرژی ناشی از اتصال پپتیدها با مولکولی HLA-B-37.

پپتید	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

شبیه سازی دینامیک مولکولی: نتایج حاصل از بررسی پایداری کمپلکس پپتیدهای آنتی‌ژنی با HLAB-37 در شرایط شبه واقعی، پایدارترین کمپلکس رادر ارتباط با پپتید VDELAHFLL با پایین‌ترین میزان نمودار انحراف RMSD در مدت زمان ۱۰ نانو نشان داد (شکل ۶). تغییرات منحنی RMSD در فاصله ۰/۱ تا ۰/۲۵ نانومتر متغییر است، که در این میان کمپلکس مرتبط با VDELAHFLL دارای کمترین نوسانات از نقطه آغاز می‌باشد (نمودار ۶).



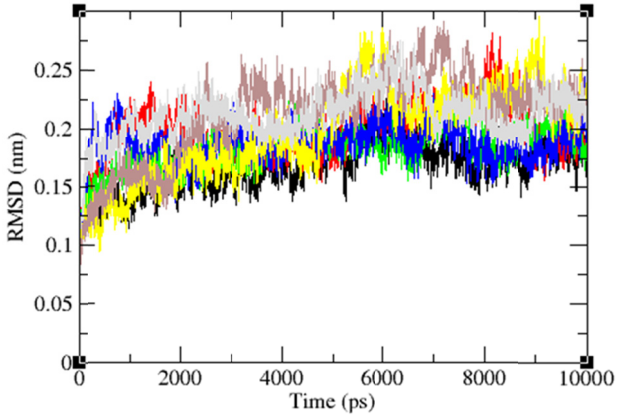
شکل ۵- اسیدهای آمینه دخیل در اتصال پپتید VDELAHFLL (Tyr9،Tyr84، Thr73،Asn77، Asn66 ،Tyr7، Glu63) به مولکول HLA-B37. دراین شکل اسیدهای آمینه درگیر در پیوندهای هیدروژنی با رنگ سبز نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

شناخت آنتی‌ژن‌های سطح سلول‌های سرطانی از آن جهت حائز اهمیت است که می‌توانند اهداف ایمونوتراپی سرطان واقع شوند. در این میان، آنتی‌ژن‌هایی که خاص سلول سرطانی باشند به دلیل عوارض جانبی کمتر برای طراحی داروهای هدفمند درمان سرطان مطلوب هستند (۲۱). خانواده آنتی‌ژنی MAGE، از گروه آنتی‌ژن‌های CTA خاص تومور هستند که در سلول‌های لایه زایای جنس مذکر و جفت در حالت نرمال بیان می‌شوند و در سلول‌های

Archive
www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019



شکل ۶- نمودار تغییرات RMSD کمپلکس‌های پروتئین و پپتید در طول شبیه سازی. در این نمودارها پایین‌ترین میزان RMSD برای پپتید VDELAHFLLبه رنگ مشکی و ناپایدارترین پپتید مربوط به پپتیدNYKRCFPVI به رنگ زرد نشان داده شده است. پپتید FLWGPRALA (آبی)، پپتیدGVYDGREHTV (خاکستری)، پپتیدEVDPASNTY (قرمز)، پپتیدKVLEHVVRV (قهوه ای) نمایش داده شده است.

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). دراین تحقیق با استفاده از روش‌های آماری میزان بیان این آنتی‌ژن در سرطان‌های پستان، کارسینوئید، سروگردن، تخمدان، پانکراس، تیروئید وبرخی دیگر از یافته‌ها آشکار شد که از این میان بیشترین میزان بیان این آنتی‌ژن درسرطان سروگردن مشاهده گردید (شکل ۲). این نتیجه با تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و rt-PCR بروی خانواده آنتی‌ژنی MAGE به منظور طراحی واکسن برای سرطان تخمدن 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 پپتید آنتی‌ژنی مشتق شده از آن در طراحی دارو تعیین کننده است. زیرا مکانیسم عرضه آنتی‌ژن‌های خانواده MAGE به سطح سلول به صورت کمپلکس‌های پپتیدی ۹ تا ۱۱ اسیدآمینه‌ای توسط HLA های مختلف به سطح سلول می‌باشد (۲۴). لذا شناخت این موتیف‌ها در متن توالی و نوع HLA حامل آنها حائز اهمیت می‌باشد. در فرایند اتصال پپتید به مولکول HLA، پایداری ساختاری پپتید و ایمونوژنسیتی آن از جمله عوامل موثر در انتخاب موتیف برای عرضه به سلول‌های CTL توسط HLA می‌باشند (۲۵). لذا در این تحقیق ارزیابی پایداری ساختاری پپتید بر اساس شاخص‌های پایداری و آلیفاتیک صورت گرفت که منجر به شناسایی پپتید VDELAHFLL با بالاترین شاخص پایداری (۲۸/۷۷-) و بالاترین شاخص آلیفاتیک (۱۷۳,۳۳) شد (جدول ۲). فاکتور بعدی برای انتخاب یک پپتید به منظورایمونوتراپی سرطان، توانایی پپتید درتحریک سیستم ایمنی به واسطه هردونوع نوع سلول B و سلول Tمی‌باشد (۲۶). زیرا پپتیدهای با ایمونوژنسیستی بالاتر شانس بیشتری در اتصال به مولکول HLA در سلول دارند به طوریکه پپتیدهای ایمونودامینت (Immuno-dominant) بهترین پپتیدها در این اتصال می‌باشند (۲۷). بدین منظور ایمونوژنسیتی پپتیدهای گزارش شده در منابع و همچنین پپتید VDELAHFLL مورد ارزیابی قرارگرفت، که پپتید مذکور به لحاظ درجه ایمونوژنسیستی در مرتبه دوم بعد از پپتید KVLEHVVRV قرار داشت (جدول ۲). مراحل ذکر شده مشابه تحقیقی است که درسال ۲۰۱۵ برای شناخت پپتیدهای آنتی‌ژنی ایمونودامینت در *Plasmodium falciparum* انجام گرفته است (۲۸).

ازسویی دیگر باتوجه به اینکه براساس گزارشات (۴، ۱۱) قابلیت مولکول HLA-B37 درعرضه آنتی‌ژن‌های

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019

خانواده MAGE مشخص شده است،دراین تحقیق با استفاده از آزمون‌های بیوانفورماتیکی بررسی میل ترکیبی پپتیدها وHLA-B37 براساس معیار انرژی اتصالی، بااستفاده ازداکینگ 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 باملکول HLA-B37 و همچنین پایین ترین میزان نمودارRMSD در مدت زمان ۱۰نانوثانیه 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 درعرضه 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 طورکلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که موتیف VDELAHFLL مستتر در ناحیه ۱۱۴ تا ۱۲۳ توالی MAGE-A4 (MAGE-A4114-123VDELAHFLL) می‌تواند به عنوان پپتید انتخابی در طراحی واکسن های درمانی، مونوکلونال آنتی‌بادی و ایمونوتوکسین 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.

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 Opinion 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. Salmaninejad 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

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 11:06 IRDT on Saturday May 11th 2019

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 α1-α2 Domain in Peptide Bound and Free States: A Molecular Dynamics Simulation Study. Biophysic J; 2004.87(4):2203-14.

Archive of SID

www.SID.ir