



## (عنوان مقاله: مطالعه برهمکنش HLA G با دو گیرنده LILRB1 و LILRB2)

مأده صدقیان

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس تهران  
Maede.sedghiyan@modares.ac.ir

پرویز عبدالمالکی

دانشیار دانشگاه تربیت مدرس تهران  
parviz@modares.ac.ir

فرامرز مهرنژاد

استادیار دانشگاه تهران  
mehrnejad@ut.ac.ir

### چکیده

HLA G مولکولی از کلاس یک MHC دسته غیر کلاسیک می باشد که برهمکنش آن با رسپتورهای LILRB1 و LILRB2 در مهار پاسخ ایمنی از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. تمایل اتصال HLA G به LILRB2 بیشتر از LILRB1 می باشد. در این میان شناخت دقیق این برهمکنش می تواند در درمان بیماری ها و اختلالات بسیاری همچون سقط جنین های خودبخودی، درمان بیماری های خودایمنی و ویروسی به محققین کمک کند. در این پژوهش با کمک تکنیک داکینگ کمپلکس HLA G و LILRB1 را مدلسازی کردیم. ساختار کریستالوگرافی کمپلکس HLA G-LILRB2 نیز در بانک داده پروتئین موجود می باشد. سپس جهت بررسی دقیق برهمکنش های مذکور، با استفاده از روش های شبیه سازی دینامیک مولکولی، رفتار این دو کمپلکس را در محیط آبی شبیه سازی کرده و رفتار کمپلکس ها بررسی نمودیم. سپس بوسیله نرم افزار PISA ساختار نهایی این شبیه سازی ها را مورد آنالیز و بررسی قرار دادیم. نتایج حاکی از پایداری و تراکم ساختاری بیشتر و انعطاف پذیری کمتر در کمپلکس 2 (HLA G-LILRB2) نسبت به کمپلکس 1 (HLA G-LILRB1) بود. علاوه بر این مشخص شد که سطوح برهمکنش در این کمپلکس نیز هیدروفوب تر و وسیع تر می باشند.

**واژگان کلیدی:** مهار پاسخ ایمنی، کمپلکس HLA G-LILRB2، شبیه سازی دینامیک مولکولی، هیدروفوب

#### مقدمه

آنتی ژن لکوسیتی انسانی HLA کلاس یک به دو گروه کلاسیک شامل HLA A, HLA B, HLA C و غیر کلاسیک شامل HLA G, HLA F, HLA H, HLA E تقسیم می شود. HLA ها توسط کمپلکس بزرگ سازگاری بافتی (MHC)<sup>۱</sup> کد می - شوند (Clements et al., 2005). HLA G یا آنتی ژن لکوسیت انسانی غیر کلاسیک اولین بار در سال 1986 توسط یک گروه تحقیقاتی در دانشگاه آکسفورد انگلستان کشف و بررسی گردید (Ellis, Sargent, Redman, & McMichael, 1986). به طور کلی کمپلکس سازگاری بافتی توسط ژنی با 8 اگزون که در بازوی کوتاه کروموزوم شش انسانی، جایگاه 6P21.3 واقع شده است، کد می گردد. این پروتئین به دلایلی که در ادامه آورده شده از پروتئین های کلاسیک این گروه متمایز شده و در دسته غیر کلاسیک دسته بندی می شود. RNA پیام رسان رونویسی شده از روی این ژن دارای 1578 باز است که تحت تاثیر پیرایش متناوب<sup>۲</sup> هفت پروتئین ایزوفرم را کد می کند. چهار ایزوفرم متصل به غشا و سه ایزوفرم باقیمانده بصورت محلول می باشند (Yamagami, 2008; LeMaout et al., 2003). پروتئین HLA G به دلایل زیر در دسته غیر کلاسیک دسته بندی می شوند: 1- محدودیت در پلی مرفیسم آلی که در نتیجه توالی یابی حاصل از چندین جمعیت انسانی بدست آمده است (Matte et al., 2000; Kovats et al., 1990; Bainbridge, Ellis, Le Bouteiller, & Sargent, 2001); 2- بیان 7 ایزوفرم که در سطح 4 غشای مختلف بیان می شوند شامل G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> و 3 ایزوفرم در حالت محلول شامل G<sub>5</sub>, G<sub>6</sub>, G<sub>7</sub> (Hviid, Hylenius, Rørbye, & Nielsen, 2003) و 3- محدودیت در توزیع بافتی (Kovats et al., 1990). نقش این مولکول در ایجاد تحمل ایمنی، پس از مشاهده بیان آن در سطح سلول های تروفوبلاست بین مادر و جنین مشخص گردید. در مواردی همچون سقط جنین مکرر و یا پریکلامیسی (Yie, Li, Li, & Peng, Zhang, Xing, Hu, & Liu, 2004) کاهش بیان و یا نقص خاصی در HLA G مشاهده شده است (Librach, 2004). این پروتئین در شرایط فیزیولوژیک و در انسان بالغ در بافت های خاصی از قبیل تیموس، قرنیه (Le Discorde, 2008) (Moreau, Sabatier, Legeais, & Carosella, 2003)، ماتریکس ناخن، تروفوبلاست (Kovats et al., 1990) و پانکراس و در جنین در بافت هایی همچون سلول های آمنیوتیک، پیش سازهای اریتروئیدی سیتوتروفوبلاست ها بیان می گردد (Curigliano, Criscitiello, Gelao, & Goldhirsch, 2013).

#### HLA G

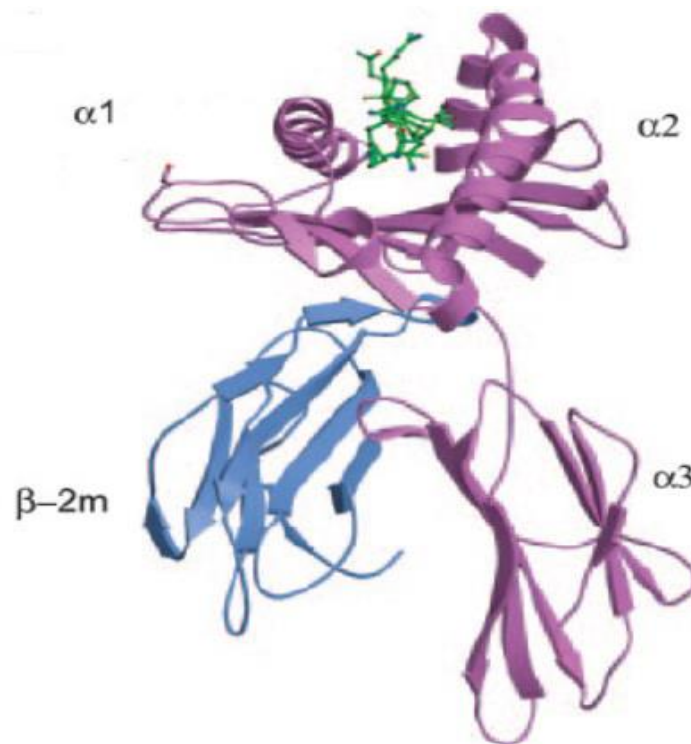
<sup>1</sup> Major Histocompatibility complex

<sup>2</sup> Alternative splicing



ساختار کلی این پروتئین که در شکل 2 نشان داده شده، همچون سایر مولکول‌های کلاس I از یک زنجیره سنگین (رنگ بنفش) تشکیل شده که با دمین  $\beta 2\mu$  (رنگ آبی) برهمکنش غیرکووالان دارد. این زنجیره سنگین خود از سه دمین  $\alpha 1$ ،  $\alpha 2$  و  $\alpha 3$  ساخته شده است (Clements et al., 2005). مولکول‌های HLA کلاسیک و غیرکلاسیک هر دو به پپتید متصل می‌شوند ولی HLA G پپتیدهای محدودتری را عرضه می‌کند تحقیقات انجام شده در زمینه پپتیدهای جدا شده از سلول‌های جفتی نشان داده است که این پپتید یا از یک پروتئین وابسته به سایتوکاین مشتق می‌شود و یا از پپتیدهای مشتق از پروتئین‌هایی شامل هیستون H2A، گیرنده‌های ریبوزومی و پروتئین‌های ریبوزومی و هسته‌ای می‌باشد (Ishitani et al., 2003). جایگاه اتصال این پپتیدها شکافی است که توسط دو آلفا هلیکس  $\alpha 1$  و  $\alpha 2$  ایجاد می‌شود. پپتید RIIPRHLQL که در شکل با رنگ سبز به نمایش درآمده، لیگاند طبیعی HLA G می‌باشد که از پروتئین هیستون H2A مشتق شده است. این پپتید در شکاف ایجاد شده توسط هلیکس‌های  $\alpha 1$  و  $\alpha 2$  و در بستری از ورقه‌های  $\beta$  غیرموازی جای می‌گیرد. این پپتید برهمکنش‌های قطبی و غیرقطبی زیادی شامل 2 پل نمکی، 17 پیوند هیدروژنی با پروتئین و 16 پیوند هیدروژنی با آب برقرار می‌کند. علاوه بر این‌ها برهمکنش‌های واندوالس دیگری نیز شناسایی شده است. این پپتید در اتصال به HLA G بصورت ساختار گسترده و برآمده‌ای است که در دو انتهای خود به بسترش متصل می‌باشد. مرکز این پپتید pro-4 می‌باشد و در ایجاد این ساختار برجسته نقش مهمی دارد به گونه‌ای که زنجیره جانبی این آمینواسید برهمکنش بسیار کمی با شکاف هیدروفوب HLA G برقرار می‌کند و بدین ترتیب ساختار برآمده‌ای را ایجاد می‌کند (Clements et al., 2005).

Archive of SID



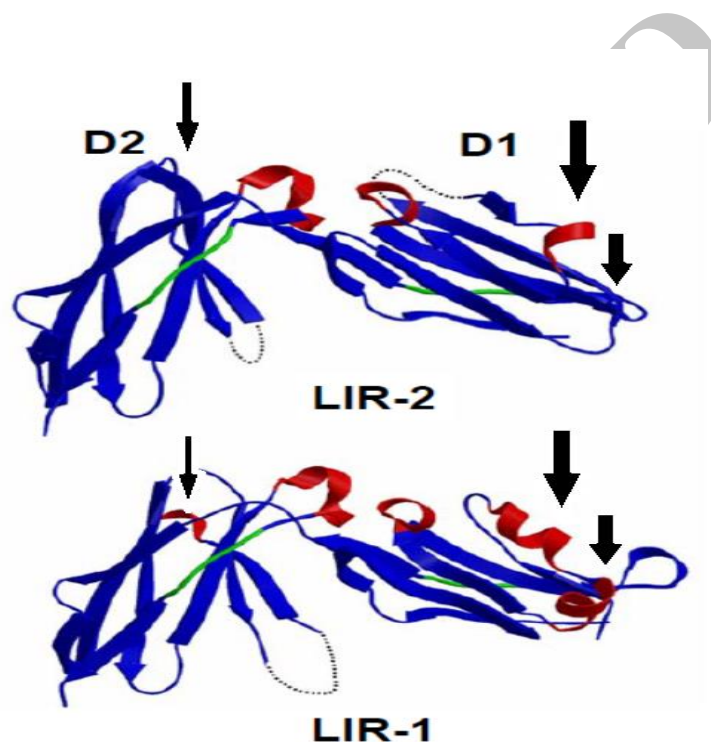
شکل 1: ساختار پروتئینی HLA G. تشکیل شده از زنجیره سنگین شامل  $\alpha 1$ ،  $\alpha 2$ ،  $\alpha 3$  که با رنگ بنفش نشان داده شده است و زنجیره سبک B2M با رنگ آبی. پپتید نانومری با رنگ سبز نشان داده شده است.

ایجاد پیوند دی سولفید میان  $cys-42$  واقع در دمین  $\alpha 1$  دو مولکول HLA G منجر به دایمریزاسیون این پروتئین می-گردد (Boyson et al., 2002). بررسی ساختاری HLA G با پروتئین های HLA کلاسیک و غیر کلاسیک نشان می دهد این پروتئین ها اختلاف قابل توجهی با هم ندارند. میزان اختلاف rmsd کل اتم های HLA G با HLA-A<sub>2</sub>، HLA-B<sub>44</sub> و HLA-E به ترتیب 94٪، 89٪ و 94٪ می باشد. نتایج حاصل از Pairwise alignment نشان داده است که اختلاف اساسی این پروتئین ها در شکاف مربوط به اتصال پپتید و جایگاه اتصال Lir-1,2 می باشد (Clements et al., 2005).

#### گیرنده های HLA G و چگونگی برهمکنش آن ها با HLA G:

مولکول های HLA G به مولکول های تنظیم سیستم ایمنی معروفند. این انتساب به دلیل نقش آن ها در کاهش التهاب و پاسخ ایمنی، افزایش تحمل ایمنی مادر در حاملگی، پیوند بافت و ... می باشد. آنتی ژن های HLA G چه در حالت متصل به غشا و چه در حالت محلول قادرند مسیرهایی را که سبب توقف فعالیت سیستم ایمنی می گردند را فعال کنند. در حقیقت این مولکول ها نسبت به اثرات حذفی سلول های ایمنی مانند سلول های کشنده طبیعی، لنفوسیت های T کشنده و ماکروفاژها حفاظت ایجاد می کنند و برهمکنش با رسپتورهای اختصاصی لازمه عملکرد کلیدی این مولکول ها می باشد (Colonna et al., 1997). گیرنده های اختصاصی HLA G از نوع گیرنده های مهاری می باشند و شامل KIR2DL4، LILRB1، و LILRB2 می باشند. این

پروتئین‌ها اعضای خانواده IgSF<sup>3</sup> می‌باشند که در بخش خارج سلولی شان دو، سه و یا چهار دامین دارند. LILRB1 در سطح سلول‌های دندریتیک، ماکروفاژها، منوسیت‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی، استئوکلاست‌ها، ائوزینوفیل‌ها و لنفوسیت‌های T و B بیان می‌گردد. LILRB2 نیز در سطح اکثر سلول‌های میلوئیدی قرار دارند (Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al., 2003a., 2006). ساختار LILRB2 نیز از بسیاری جهات با LIRB1 مشترک است. وجود ساختارهای هلیکسی بیشتر در LILRB1 نسبت به LILRB2 یکی از تفاوت‌های ساختاری میان این دو رسپتور میباشد.



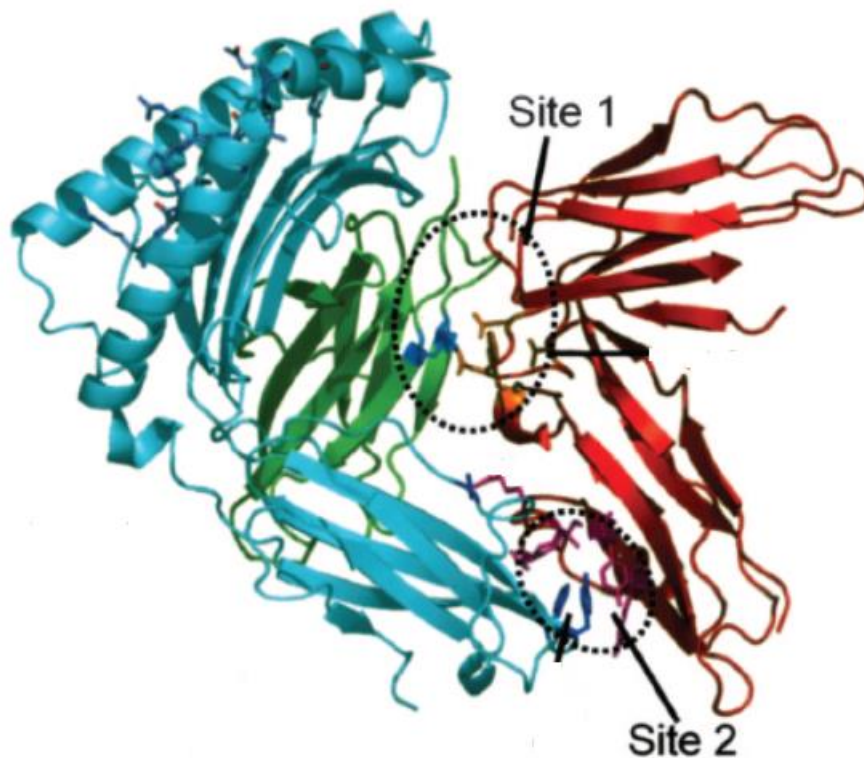
شکل 2: مقایسه ساختاری LILRB1 (پایین) و LILRB2 (بالا). همانطور که نشان داده شده محتوای هلیکسی در LILRB1 بیشتر از LILRB2 می‌باشد. فلش‌ها نشاندهنده تفاوت‌های دو ساختار از منظر محتوای هلیکسی می‌باشد.

HLA G نسبت به مولکول‌های HLA کلاس یک کلاسیک پایدارتر می‌باشد که علت آن دم سیتوپلاسمی کوتاه در این مولکول می‌باشد. دومین خارج سلولی این مولکول با دومین خارج سلولی گیرنده‌های شبه ایمنوگلوبولینی سلول‌های NK و عرضه کننده آنتی‌ژن شامل KIR2DL4 و گیرنده‌های منوسیتی و لکوسیتی همچون LILRB1 و LILRB2 واکنش می‌دهد. تمایل اتصال HLA G به LILRB2 نسبت به LILRB1 بیشتر است و علت آن در ساختار و توالی این پروتئین‌ها نهفته است. LILRB1 و LILRB2 هرکدام 4 دامین خارج سلولی دارند. ساختار کریستالی کمپلکس LILRB2 با HLA G در سال 2006 و توسط یک تیم علمی ژاپنی مشخص گردید. البته پیش از آن و در سال 2003 نیز ساختار کریستالی کمپلکس LILRB1 با HLA-A2 مشخص گردیده بود. به طور کلی دامین  $\alpha 3$  و  $\beta 2\mu$  در HLA G یا HLA-A2 بخش‌هایی هستند که توسط LILRB2 یا

<sup>3</sup> Immunoglobulin superfamily (IgSF)



LILRB1 مورد شناسایی قرار می‌گیرند. پس همانطور که در شکل 3 مشخص شده است در تشکیل این کمپلکس‌ها یعنی کمپلکس HLA A2-LILRB1 و HLA G-LILRB2، دو سطح اتصال نقش اساسی دارند. اسیدآمینوهای جایگاه 195 و 197 در مولکول HLA G که به ترتیب فنیل‌الانین و تیروزین می‌باشند و در دمین  $\alpha 3$  قرار گرفته‌اند، با هم لوپ تشکیل می‌دهند و بصورت مستقیم با دمین D1 رسپتور LILRB2 برهمکنش دارند. طی این برهمکنش فنیل‌الانین جایگاه 195 مولکول HLA G در تعامل هیدروفوب با اسیدآمینوهای جایگاه 48 و 47 (به ترتیب ترئونین و ایزولوسین) بوده و تیروزین جایگاه 197 این مولکول نیز با اسیدآمینوهای جایگاه 36 و 38 (به ترتیب آرژنین و تیروزین) در تعامل می‌باشند. علاوه بر این Val-183 در دمین D2 LILRB2 با Lys-91 در  $\beta 2\mu$  نیز برهمکنش هیدروفوب دارد. در LILRB1 اسیدآمینو Glu-184 معادل Val-183 در LILRB2 می‌باشد و با Lys-91 در  $\beta 2\mu$  پل نمکی ایجاد می‌کند. لوپ تشکیل شده با آمینواسیدهای جایگاه 195-197 در HLA-A2 با Tyr-76 و Tyr-38 برهمکنش می‌دهد. در این حالت از برهمکنش، Tyr-197 در فاصله دورتری از LILRB1 قرار می‌گیرد که این امر یکی از دلایل احتمالی است که برای تمایل اتصال پایین‌تر HLA G به LILRB1 بیان شده است (Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al., 2006; Willcox, Thomas, & Bjorkman, 2003).



شکل 3: ساختار کمپلکس HLA G-LILRB2. دو سایت اتصال در این کمپلکس دیده می‌شود. سایت اتصال میان B2M و LILRB2 و سایت اتصال میان دمین  $\alpha 3$  و LILRB2. ساختار کلی کمپلکس‌های دیگر این گروه همچون HLA A2-LILRB1 نیز از دو سایت اتصال ذکر شده تشکیل شده‌اند.



آمینواسید دیگری که در مطالعه این کمپلکس‌ها مورد توجه قرار گرفته‌است Lys-42 در LILRB2 می‌باشد که با Glu-299 در دمین  $\alpha 3$  برهمکنش دارد. این سطح تماس در کمپلکس LILRB1 با HLA-A2 مشاهده نشد و برهمکنشی که احتمالاً جایگزین آن شده است پل نمکی میان Lys-42 با Asp-96 واقع در دمین  $\beta 2m$  است. بر اساس این مشاهدات LILRB1 بیشتر در تماس با  $\beta 2m$  و LILRB2 غالباً در تماس با دمین  $\alpha 3$  می‌باشد ولی هر دو سطح اتصال در مورد LILRB2 وسیع‌تر می‌باشد. (Shiroishi, Kuroki, Rasubala, et al., 2006). در جدول 1 تک تک تماس‌های آمینوسیدی در جایگاه‌های اتصال این دو کمپلکس را بصورت خلاصه مشاهده می‌نماییم.

جدول ۱: لیست آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده برهمکنشها در دو کمپلکس HLA A2-LILRB1 و HLA G-LILRB2 با تفکیک دمینها. برای مثال Arg36 در دمین D1-LILRB2 با آمینواسیدهای Tyr198 و Asp197 در دمین  $\alpha 3$ -HLA G برهمکنش دارد. برهمکنشهایی که در روبروی یکدیگر نوشته شده‌اند، برهمکنشهای متناظر یکدیگر درین دو کمپلکس میباشند. آمینواسیدهایی از HLA G و LILRB1 که با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند، برهمکنشهایی هستند که در داکینگ HLA G به LILRB1 مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

LILRB2	HLA-G	LILRB1	HLA-A2
D1	$\alpha 3$	D1	$\alpha 3$
Arg-36	Tyr-198, Asp-197	Arg-36	Asp-196
Lue-37	Tyr-198		
Tyr-38	Glu-199, Tyr-198	Tyr-38	Tyr-, Ser-195, Val-194, 197
		Tyr-39	Val-194
Lys-41	Asp-228	Lys-41	Val-248, Glu-198
Lys-42	Val-249, Glu-230		
Ser-43	Val-249, Thr-201, Val-195	Thr-43	Ala-193
Thr48, Ile-47	Phe-196		
		Tyr-76	Tyr-197, Asp-196
D1	$\beta 2m$	D1	$\beta 2m$
Gln-18	Gln-90	Gln-18	Gln-89
Lys-42	Met-100	Lys-42	Asp-96
Trp-67	Lys-92	Trp-67	Val-93, Ile-92, Lys-91
Glu-68	Val-94	Glu-68	Lys-94
Gly-96	Ser-89	Gly-97	Ser-88
Ala-97	Ser-89, Lue-88	Ala-98	Lue-87, Ser-88
D2	$\beta 2m$	D2	$\beta 2m$
Tyr-98	Lue-88, Thr-87, Thr-5	Tyr-99	Lys-91, Thr-86, Thr-4
Pro-99	Val-86, Thr-87	Ile-100	Thr-86, Val-85
Gln-124	Gln-3, Ile-2, Met-1	Gln-125	Gln-2, Ile-1
Val-125	Gln-3, Thr-5	Val-126	Thr-4, Arg-3, Gln-2, Thr-86
Ala-126	Arg-4, Gln-3, Ile-2	Ala-127	Arg-3, Gln-2
Ser-153	Ile-2		
Ser-154	Ile-2		
Asp-177	Lys-7, Thr-5		
Asn-179	Lys-7		
Val-183	Lys-92	Glu-184	Lys-91
		Lue-187	Ser-88

### مطالعات دیگر در حوزه این برهمکنش ها

برهمکنش میان LILRB1 با پروتئین های گروه MHC کلاس یک مورد مطالعه سینتیکی ، ترمودینامیکی و آنالیزهای NMR و کریستالوگرافی قرار گرفته است. طی این مطالعات مشخص شده است که طی این برهمکنش  $\Delta S$  یا آنتروپی سیستم افزایش می یابد ، علاوه بر این زاویه بین دمینی در LILRB1 در این برهمکنش از انعطاف پذیری کمی برخوردار می باشد. به طور کلی طی ایجاد این برهمکنش که سرعت بالایی دارد، انعطاف پذیری در ناحیه اتصال کاهش قابل توجهی را نشان نمی دهد که نشانگر این است که روند ایجاد این اتصال با مدل induced-fit متفاوت می باشد زیرا در این مدل کاهش انعطاف پذیری به وضوح قابل مشاهده می باشد (Shiroishi, Kuroki, Tsumoto, et al., 2006). برهمکنش میان ILT2 و ILT4 با پروتئین های مختلفی از رده MHC کلاسیک یک به کمک تکنیک  $SPR^4$  مورد ارزیابی قرار گرفته است. طی این بررسی مشخص شد که تمایل اتصال این دو رسپتور به HLA G نسبت به سایر پروتئین های MHC کلاس یک شامل HLA-A ، HLA-B ، HLA-C و HLA-G دو تا سه برابر بیشتر می باشد. علاوه بر این تمایل اتصال LILRB2 به HLA-G حدودا دو برابر LILRB1 بود (Shiroishi et al., 2003).

مطالعات حاکی از تغییر غلظت پروتئین HLA-G در مشکلاتی همچون اختلالات بارداری، بیماری های ویروسی، سرطان و بیماری های خودایمنی و التهابی می باشد. در ادامه مکانیسم این مولکول در بعضی از این بیماری ها بطور خلاصه گردآوری گردیده است.

همانطور که می دانیم سلول های جنین برای سیستم ایمنی مادر نیمه آلوژن محسوب می شوند، ولی در حاملگی سالم شناسایی ایمونولوژیک آنتی ژن های جنینی از سوی سیستم ایمنی مادر نه تنها مضر و خطرناک نمی باشد بلکه لازمه بقاء حاملگی و رشد و تکامل جنین است. مولکول های HLA G در سطح تروفوبلاست جنینی ، در تماس مستقیم با مادر است و در ایجاد تحمل مادری موثر می باشند. بررسی ها نشان می دهد که میزان بیان پروتئین HLA G در جفت های ناسالم کاهش می یابد. همچنین زنان بارداری که سطح HLA G محلول در پلاسما خونشان پایین تر است بیشتر در معرض سقط جنین می باشند (Hara et al., 1996, O'brien et al., 2001a). HLA G از طریق سه مکانیسم اصلی شامل عملکرد مستقیم از طریق مهار سلول های موثر در سیستم ایمنی، اثر غیرمستقیم در تنظیم تولید سلول و در آخر فعالیت هایی که در نهایت به مهار سیستم ایمنی می انجامد، سیستم ایمنی را مهار می کند. در رابطه میان مادر و جنین ، این مولکول پس از ایجاد برهمکنش با رسپتورهای اختصاصی خود از هجوم دسیدووال یا سلول های NK به سلول های تروفوبلاست جلوگیری می کند (Ellis et al., 1986). این برهمکنش سبب فسفریله شدن تیروزین فسفاتاز و در ادامه فعال شدن این آنزیم کلیدی می باشد که در نهایت منجر به دفسفریله شدن مولکول های ضروری جهت فعالیت سلول های کشنده طبیعی و مهار فعالیت آن ها می گردد (Yu, Wang, & Feng, 2008).

سیستم دفاعی بدن میزبان در حالت طبیعی قادر به مقابله با عفونت های ویروسی است اما بعضی از ویروس ها به کمک استراتژی های خاصی سیستم ایمنی را شکست می دهند و در بدن میزبان منتشر می شوند. یکی از این استراتژی ها ممانعت از



حمله سلول‌های کشنده طبیعی به سلول‌های ویروسی می‌باشد. HIV-1 یا ایدز بیماری است که مبتلایان به آن نقص جدی و پیشرونده‌ای را در عملکرد سیستم ایمنی‌شان تجربه می‌کنند. در نتیجه تنظیم بیان بیشتر HLA G ، سلول‌های آلوده به این ویروس از شناسایی و لیز شدن توسط سلول‌های NK و لنفوسیت T در امان می‌باشند. علاوه بر این بیان بیشتری از HLA G در سطح منوسیت‌ها و سلول‌های لنفوسیت T دیده می‌شود (Tripathi & Agrawal, 2007). سایتومگالوویروس انسانی یا HCMV یک ویروس هرپس است که با روش‌های متفاوتی به سیستم ایمنی میزبان حمله می‌کند. مقادیر HLA G در بدن مبتلایان به عفونت HCMV فعال بیشتر از افراد سالم می‌باشد (Yan, Lin, Chen, & Chen, 2009). شواهد نشان می‌دهد ویروس‌های دیگری از قبیل HCV<sup>5</sup> (Cordero et al., 2009) ، HBV<sup>6</sup> (Park, Lim, Kim, Hong, & Kim, 2012) ، رابدو ویروس ، herpes simplex virus-1 (Megret et al., 2007) و HPV<sup>7</sup> (Ferguson et al., 2012) نیز به نوعی از این مولکول جهت مقاومت در برابر هجوم سیستم دفاعی میزبان و افزایش تکثیر در بدن میزبان بهره می‌برند.

این پروتئین چه در تومورهای جامد و چه در سرطان‌های خونی به مقدار زیاد یافت می‌شوند ازینرو گفته می‌شود که بین حضور مقادیر بالای این پروتئین و نتایج ضعیف بالینی در درمان سرطان رابطه‌ای وجود دارد (Paul et al., 1998). در حقیقت بیان این پروتئین توسط سلول‌های سرطانی جهت فرار از سیستم ایمنی بدن بسیار مهم می‌باشد. این مولکول در مایع گزودا ، از طریق ایجاد پل‌های نمکی ، کمپلکس‌های بزرگ با وزن مولکولی بالا را تشکیل می‌دهد که چه از نظر سایز و چه خواص دیگر همچون تحرک الکتروفورتیکی از حالت طبیعی خارج شده‌است. این حالت ازین پروتئین در بیماری‌های التهابی و سرطان به وفور دیده می‌شود (Gonzalez, Alegre, Arroyo, LeMaout, & Echeveste, 2011). طی مطالعه و بررسی‌های مدل‌های آزمایشگاهی مشخص شده‌است که برهمکنش میان HLA G با PIR-B در پیشرفت تومور و مهار سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی موثر می‌باشد (Kim et al., 2013). بر اساس مطالعات بسیاری که در جمعیت‌های انسانی متفاوت و در مورد انواع مختلف سرطان انجام شده‌است (Eskandari-Nasab et al., 2013; Ye et al., 2007) مشخص می‌شود که در استراتژی درمانی سرطان این مولکول نیز باید مورد توجه قرار گیرد. در این راستا یکی از مسیرهای درمانی، انسداد عملکردی HLA G می‌باشد (Loustau, Wiendl, Ferrone, & Kim et al., 2013; Carosella, 2013)

## روش تحقیق

### مدلسازی

ساختار بلورنگاری کمپلکس LILRB2/HLAG با کد pdb : 2DYP ، HLA G ، 1DYP : pdb و LILRB1 با کد pdb : 1UFU از بانک داده پروتئین<sup>8</sup> به آدرس <http://www.rcsb.org> دریافت شد. باقیمانده‌های آمینواسیدی مفقود شده حین کریستالوگرافی در این فایل‌های ساختاری، با استفاده از برنامه مدلر نسخه 9.13 به ساختار افزوده شدند (Eswar et al., 2006). در این پروژه کمپلکس 1 به کمپلکس HLA G-LILRB1 و کمپلکس 2 به کمپلکس HLA G-LILRB2 اشاره دارد.

<sup>5</sup> hepatitis C virus

<sup>6</sup> hepatitis B virus

<sup>7</sup> Human papilloma virus

<sup>8</sup> Protein Data Bank

## داکینگ HLA G با LILRB1

جهت مدلسازی این کمپلکس، برهمکنش‌های مشترک میان دو کمپلکس LILRB1/HLA-A2 و LILRB2/HLA G از جدول 1 استخراج گردید. داکینگ LILRB1 به HLA G با استفاده از سرور HADDOCK<sup>9</sup> به آدرس <http://haddock.science.uu.nl/services/HADDOCK/haddock.php> انجام شد. پیش از اجرای این نرم‌افزار، آمینواسیدهایی که در جدول یک به رنگ قرمز درآمده‌اند، به عنوان آمینواسیدهای مشارکت کننده در برهمکنش مشخص شدند. این آمینواسیدها در برهمکنش‌های مشترک دو کمپلکس شرکت داشته و طی مطالعات مربوط به تعیین ساختار کمپلکس HLA A2-LILRB1 و HLA G-LILRB2 مورد تاکید بیشتر قرار گرفته‌اند.

در نهایت 97 ساختار که در ده خوشه دسته‌بندی شده‌اند انتخاب شد. خوشه‌بندی<sup>10</sup> منجر به قرار گرفتن ساختارهای مشابه در یک خوشه و آنالیز بهتر این ساختارها می‌گردد. شباهت میان ساختارها جهت خوشه‌بندی، به کمک معیارهایی همچون RMSD یا FCC<sup>11</sup> صورت می‌گیرد. FCC که معیاری از برهمکنش‌های مشترک می‌باشد با مقایسه سطح‌های تماس بین مولکولی در جایگاه برهمکنش محاسبه می‌گردد. در حال حاضر HADDOCK بصورت پیشفرض از الگوریتم FCC با فاصله قطع 0.75 جهت خوشه‌بندی استفاده می‌کند. خوشه‌ای که دارای کمترین انرژی برهمکنش‌های ناپیوندی (واندروالس و الکترواستاتیک)، منفی‌ترین امتیاز HADDOCK و منفی‌ترین Z score بود به عنوان بهترین خوشه انتخاب گردید. HADDOCK score معیار است که محاسبه آن مستلزم جمع وزنی فاکتورهایی شامل انرژی‌های واندوالس و الکترواستاتیک بین مولکولی، انرژی desolvation و انرژی AIR<sup>12</sup> یا برهمکنش‌های بین مولکولی احتمالی می‌باشد پارامتر BSA<sup>13</sup> نیز جهت امتیاز دهی این خوشه تعیین شد. انرژی desolvation و پارامتر BSA هر دو معیاری از سطح در دسترس مولکول<sup>14</sup> می‌باشند.

$$1. \text{HADDOCK-score} = 1.0 \times E_{VDW} + 0.2 \times E_{ELEC} + 1.0 \times E_{\text{Desolvation}}$$

$$2. \text{BSA} = \text{SASA}_{\text{molecule1}} + \text{SASA}_{\text{molecule2}} - \text{SASA}_{\text{complex}}$$

$$3. E_{\text{solv}} = \sum_{i=1}^{N_{\text{atoms}}} a_{\text{atomtype}} \times \text{SASA}_i$$

$$4. E_{\text{desolv}} = E_{\text{solv}}^{\text{molecule1}} + E_{\text{solv}}^{\text{molecule2}} - E_{\text{solv}}^{\text{complex}}$$

<sup>9</sup> High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing

<sup>10</sup> clustering

<sup>11</sup> Fraction of Common Contacts

<sup>12</sup> Ambiguous Interaction Restraints

<sup>13</sup> Buried Surface Area

<sup>14</sup> Solvent Accessible Surface Area (SASA)

چگونگی محاسبه HADDOCK score و وزن مربوط به هریک از پارامترها در رابطه 1 آورده شده است. طبق رابطه 2-2 پارامتر BSA با توجه به SASA هر یک از مولکولها و کمپلکس محاسبه می گردد. در رابطه 3-2 انرژی solvation با توجه به نوع اتمها و سطح در دسترس آنها محاسبه می شود و در نهایت با استفاده از رابطه 4-2 انرژی desolvation کل با بکارگیری انرژی solvation هر یک از مولکولها و کمپلکس مورد نظر قابل محاسبه خواهد بود (De Vries, van Dijk, & Bonvin, 2010). 4 ساختار در نتیجه داکینگ دریافت شد. از معیار ERRat و Verify 3D جهت انتخاب بهترین مدل استفاده شد.

### شبیه سازی دینامیک مولکولی

شبیه سازی و آنالیز هر دو کمپلکس پروتئینی به کمک پکیج نرم افزاری GROMACS 4.5.6 انجام شد. جهت تعیین آمینواسیدهایی که بار نامتعارف دارند از سرور PROPKA 3.1 استفاده شد. در این شبیه سازیها از مدل آب SPCE استفاده شد و جهت محاسبه نیروهای بین مولکولی میدان نیروی GROMOS96 53a6 را به کار گرفتیم. جهت ایجاد بار خالص صفر، 6 اتم کلر در کمپلکس 1 و 9 اتم کلر در کمپلکس 2 را با مولکولهای محلول سیستم جابجا کردیم. سپس به منظور حذف میانکنشهای نامناسب در این سیستمها، کمپنزه سازی انرژی با روش تندترین شیب و به مدت 2500 پیکوثانیه اجرا گردید. سپس سیستم در شرایط دمای ثابت 300 درجه کلوین و فشار یک بار و بوسیله اجرای مراحل NVT و NPT و براساس روش برندنسن به تعادل رسید. سپس مرحله اجرای شبیه سازی برای هر کمپلکس و به مدت 200 نانوثانیه اجرا گردید. تفاوت میان مرحله قبل که در واقع نوعی به تعادل رساندن مولکولهای آب در اطراف ملکول غیر متحرک پروتئین بود و مرحله اجرای نهایی بسیار کم است. در این مرحله قیود فضایی اعمال نمی گردد و برنامه در واحدهای زمانی مشخص مختصات خروجی را جهت آنالیز گزارش می دهد

### یافته ها

#### آنالیز نتایج داکینگ

بهترین داکینگ با HADDOCK دارای Z score برابر 2- در خوشه ای از ساختارهایی با RMSD زنجیره اصلی برابر 1 آنگستروم قرار داشت که اطلاعاتی در ارتباط با انرژی و سطح در دسترس آن در جدول 2 آورده شده است.

جدول 2: آنالیز HADDOCK.

	Cluster 1
cluster population	35
RMSD from overall lowest-energy structure (Å)	1.0 ± 0.6
HADDOCK score (a.u)	-143.2 ± 6.5
Intermolecular van der walls energy ( $E_{vdw}$ ) (kcal mol <sup>-1</sup> )	-52.6 ± 1.6
Intermolecular electrostatic energy ( $E_{elec}$ ) (kcal mol <sup>-1</sup> )	-372.9 ± 40.3



Desolvation energy ( $E_{desol}$ ) (kcal mol <sup>-1</sup> )	-17.4 ± 6.6
Restraints violation energy ( $E_{AIR}$ ) (kcal mol <sup>-1</sup> )	14.4 ± 18.14
Buried surface area ( $\text{Å}^2$ )	2046.8 ± 116.6
Z-score	-2.0

این خوشه ساختاری دارای 35 ساختار بود که با کمک نرم افزار PYMOL سه ساختار بسیار نزدیک به یکدیگر انتخاب شد. سپس جهت انتخاب بهترین کمپلکس از میان این سه ساختار، از نرم افزارهای ERRAT و Verify 3D استفاده کردیم.

جدول 3: اعتبار مدل های منتج از HADDOCK به کمک نرم افزارهای ERRAT و verify 3D

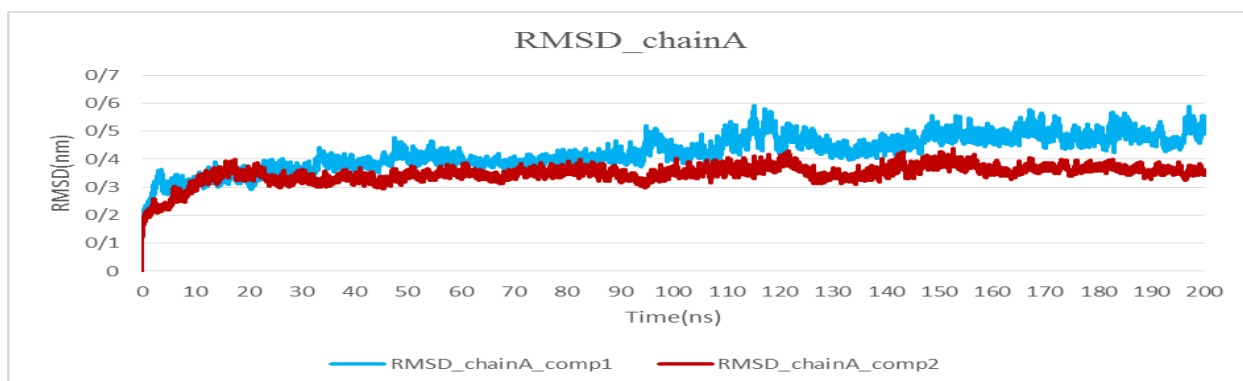
شماره کمپلکس	1		2		3		4	
	Ave 3D-1D score	96.90%	Ave 3D-1D score	97.59%	Ave 3D-1D score	96.63%	Ave 3D-1D score	95.01%
Verify 3D								
ERRAT	امتیاز کیفی کل	92.553	امتیاز کیفی کل	93.048	امتیاز کیفی کل	90.653	امتیاز کیفی کل	91.071

با توجه به آنالیزهای انجام شده که نتایج آن در جدول 3 آورده شده است، کمپلکس شماره دو، جهت ادامه شبیه سازی انتخاب شد.

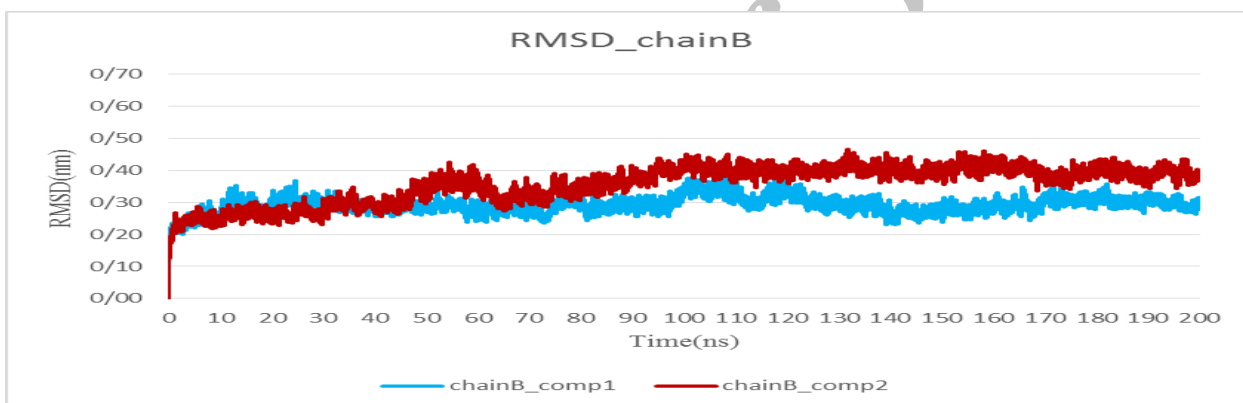
#### آنالیز شبیه سازی دینامیک مولکولی

در هر کمپلکس 4 زنجیره یا chain شامل زنجیره A یا زنجیره سنگین HLA G، زنجیره B یا زنجیره بتادومیکروگلوبولین، زنجیره C یا پپتید نانومری و زنجیره D یا LILRB1-LILRB2 وجود دارد. در این پژوهش جهت مطالعه تغییرات پایداری ساختاری سیستم، RMSD مربوط به هر زنجیره بصورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. پلات مربوط به این آنالیز در نمودارهای 1، 2، 3 و 4 نشان داده شده است. با توجه به نمودارها، تمامی زنجیره ها در انتهای شبیه سازی به وضعیت ثابت و پایداری رسیده اند. در هر یک از نمودارها رنگ قرمز مربوط به کمپلکس 2 و رنگ آبی مربوط به کمپلکس 1 می باشد. در زنجیره های A و D کمپلکس 1 از RMSD نسبتا کمتری برخوردار است. RMSD زنجیره C در کمپلکس دو در طول 200 نانوثانیه پس از نوسانات بسیار، نهایتا در 160 نانوثانیه به وضعیت نسبتا پایداری می رسد. انحرافات این زنجیره از ساختار اولیه در مورد کمپلکس 2 از کمپلکس 1 بیشتر می باشد. در مورد زنجیره B نیز انحرافات در کمپلکس دو به میزان اندکی نسبت به کمپلکس 1 بیشتر می باشد.

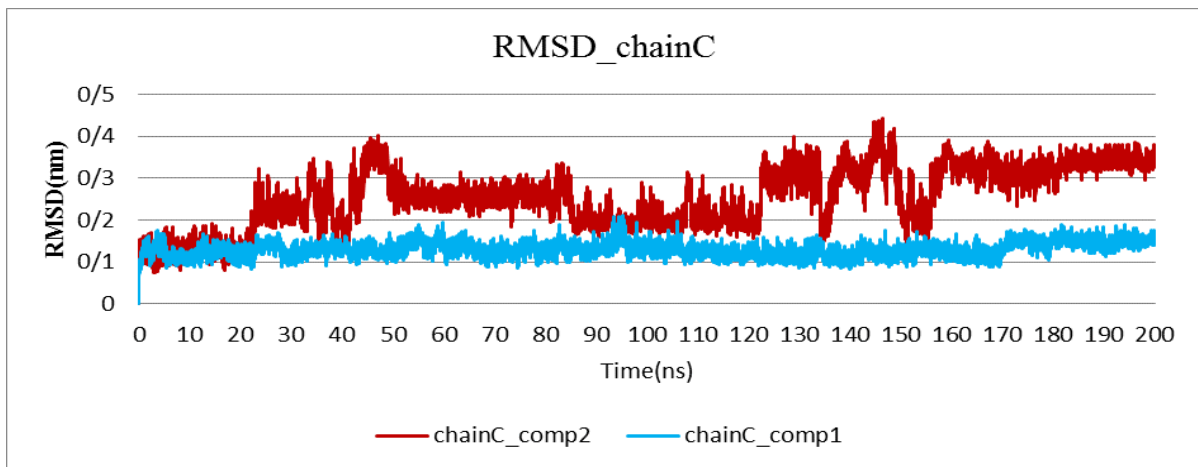




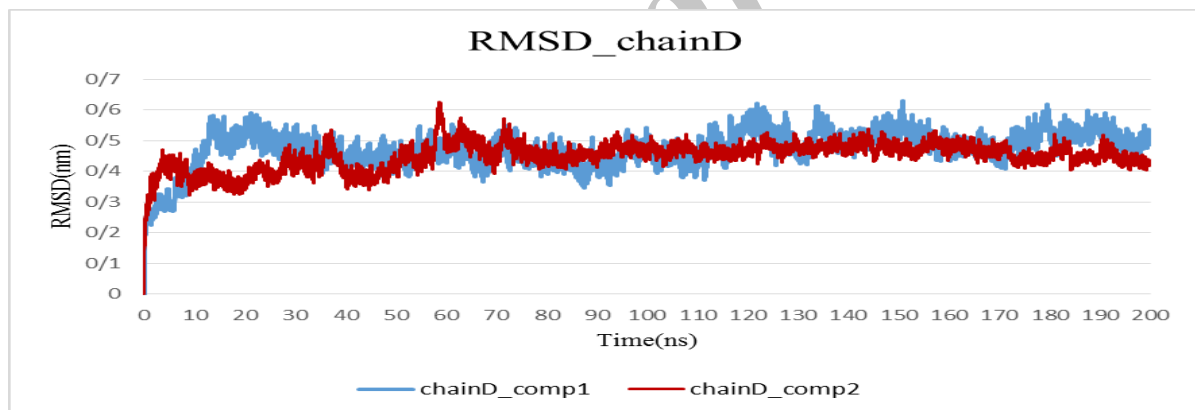
نمودار 1: تغییرات RMSD در زنجیره A کمپلکس 1 و 2 در طول زمان شبیه‌سازی (200 نانوثانیه) در دمای 300 درجه کلوین. خط قرمز مربوط به کمپلکس دو و خط آبی مربوط به کمپلکس 1 می‌باشد.



نمودار 2: تغییرات RMSD در زنجیره B کمپلکس 1 و 2 در طول زمان شبیه‌سازی (200 نانوثانیه) در دمای 300 درجه کلوین. خط قرمز مربوط به کمپلکس دو و خط آبی مربوط به کمپلکس 1 می‌باشد.

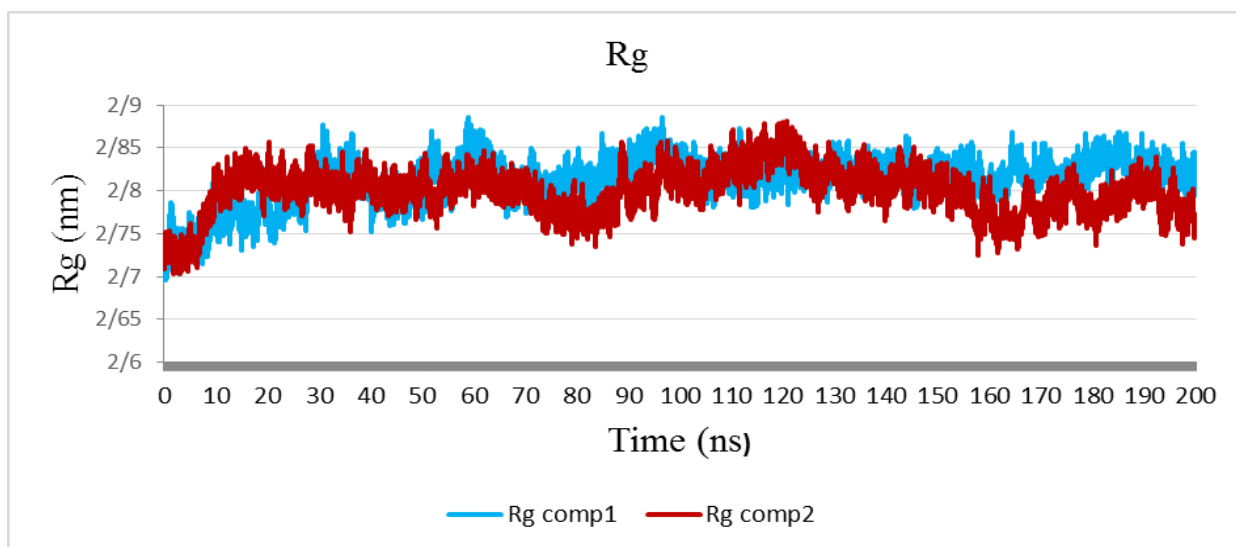


نمودار 3: تغییرات RMSD در زنجیره C کمپلکس 1 و 2 در طول زمان شبیه سازی (200 نانوثانیه) در دمای 300 درجه کلوین. خط قرمز مربوط به کمپلکس دو و خط آبی مربوط به کمپلکس 1 می باشد.



نمودار 4: تغییرات RMSD در زنجیره D کمپلکس 1 و 2 در طول زمان شبیه سازی (200 نانوثانیه) در دمای 300 درجه کلوین. خط قرمز مربوط به کمپلکس دو و خط آبی مربوط به کمپلکس یک می باشد.

پارامتر شعاع ژیراسیون یا جذر میانگین مربع جمعی از اتمها از مرکز جرمشان ، می تواند در ایجاد دید کلی نسبت به ساختار کمپلکس کمک کند. به همین دلیل شعاع ژیراسیون اتمهای کربن آلفای کمپلکسها در دمای 300 درجه کلوین را مورد مقایسه قرار دادیم.



نمودار 5: شعاع ژیراسیون دو کمپلکس 1 و 2 در طول زمان شبیه‌سازی (200 نانوثانیه). نمودار قرمز رنگ مربوط به کمپلکس دو و نمودار آبی رنگ مربوط به کمپلکس یک می‌باشد.

#### مطالعات ترمودینامیکی کمپلکس‌ها

در این مرحله ویژگی‌های ترمودینامیکی دو سیستم تخمین و مورد مطالعه قرار گرفت. اگرچه رسیدن به تعادل در یک سیستم نیازمند شبیه‌سازی‌های طولانی مدت است که از نظر محاسباتی بسیار زمان‌بر می‌باشد اما با توجه به گراف‌های RMSD می‌توان سیستم را در حالت تعادل فرض کرد.

همانطور که پیش از این گفته شد در این مطالعه برای هر دو سیستم 200 نانوثانیه شبیه‌سازی با نرم‌افزار گرومکس اجرا شد.

$$5. \Delta G = \Delta H - T \Delta S = \Delta U - T \Delta S$$

در این رابطه  $\Delta G$  تغییرات انرژی آزاد سیستم،  $\Delta H$  تغییرات آنتالپی،  $\Delta S$  تغییرات بی‌نظمی سیستم،  $\Delta U$  تغییرات انرژی درونی،  $T$ ،  $P$  نیز به ترتیب نشان‌دهنده فشار و دما می‌باشند. تغییرات حجم یا  $\Delta V$  در طول شبیه‌سازی بسیار کم می‌باشد بنابراین می‌توان از  $P \Delta V$  صرف نظر کرد. که در این صورت رابطه ... را بدین صورت می‌توان نوشت

$$6. \Delta G = \Delta H - T \Delta S = \Delta U - T \Delta S$$

$\Delta G$  در یک فرایند خودبخودی منفی و در حالت تعادل سیستم برابر صفر می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که کمترین مقدار  $\Delta S$  از رابطه زیر قابل محاسبه می‌باشد.

$$7. \Delta S_{\min} = \frac{\Delta U}{T}$$

پس اگر  $\Delta U$  مشخص شود می‌توان  $\Delta S_{\min}$  را تخمین زد. با محاسبه اختلاف انرژی پتانسیل بین حالت اولیه و حالت تعادلی می‌توان  $\Delta U$  را تخمین زد. داده‌های منتج از 50 نانوثانیه ابتدای شبیه‌سازی در آنالیز آورده نشد. میانگین انرژی پتانسیل ده نانو ثانیه بازه ابتدایی بعد از 50 نانوثانیه به عنوان انرژی اولیه و میانگین ده نانو ثانیه انتهایی یعنی 190 تا 200 به عنوان

پتانسیل نهایی در نظر گرفته شد. سپس خطای آماری محاسبات را محاسبه کرده و در نهایت با استفاده از معادله بالا مقدار  $\Delta S_{\min}$  برای هر کمپلکس بصورت جداگانه تخمین زده شد. مقادیر مربوط به هر کمپلکس در جدول 4 بصورت خلاصه نمایش داده شده است.

جدول 4: آنالیزهای ترمودینامیکی

سیستم	$\Delta U$	$\Delta S$
کمپلکس (1)	-287056.641	-10631.7
کمپلکس (2)	-302585.773	-11206.881

#### آنالیز PISA

ساختار میانگین 20 نانوثانیه آخر شبیه سازی هر کمپلکس به عنوان ساختار نهایی استخراج گردید. سپس برهمکنش های جایگاه های اصلی اتصال (دو سایت اتصال ذکر شده در شکل 3) به کمک سرور PISA مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که در جدول 5 و 6 مشخص شده است تعداد اتم ها و تعداد آمینواسیدها و سطح برهمکنش در هر دو جایگاه اتصال ذکر شده در شکل 3 در مورد کمپلکس 2 بیشتر می باشند. علاوه بر این  $\Delta G$  نیز در مورد این جایگاه های اتصال در کمپلکس 2 از مقدار کمتری برخوردار است که نشان دهنده پایداری و اتصال قویتر در این جایگاه اتصال می باشد.  $\Delta G$  P-value نیز که به نوعی خطای محاسبه  $\Delta G$  می باشد، در کمپلکس 2 مقدار کمتری دارد. مقادیر کمتر از 0.5 در این پارامتر نشان دهنده هیدروفوبیسیته بالای جایگاه اتصال می باشد. با توجه به اینکه مقدار  $\Delta G$  P-value در کمپلکس 2 زیر 0.5 می باشد پس می توان گفت هر دو جایگاه اتصال در کمپلکس 2 نسبت به کمپلکس 1 هیدروفوبیسیته بالاتری را دارا می باشند.

جدول 5: بررسی برهمکنش های میان زنجیره سنگین HLA G با LILRB1 و LILRB2. سطح برهمکنش،  $\Delta G$ ، تعداد اتم ها و تعداد آمینواسیدها درگیر پیوند در هر کمپلکس در این جدول باهم مقایسه شده اند.

	تعداد اتم های درگیر در زنجیره سنگین	تعداد آمینواسیدهای درگیر در زنجیره سنگین	تعداد اتم های درگیر در D1D2 دمین	تعداد آمینواسیدهای درگیر در دمین D1D2	سطح برهمکنش	$\Delta G$ Kcal/mol	$\Delta G$ P-value
کمپلکس							





کمپلکس 2	57	15	60	17	530.6	-3.5	0.336
کمپلکس 1	49	15	48	13	426.6	-1.2	0.523

جدول 6: بررسی برهمکنش های زنجیره سبک HLA G با LILRB1 و LILRB2. سطح برهمکنش،  $\Delta G$ . تعداد اتم ها و تعداد آمینواسیدها درگیر پیوند در هر کمپلکس در این جدول باهم مقایسه شده اند

کمپلکس	تعداد اتم های درگیر در زنجیره سبک	تعداد آمینواسیدهای درگیر در زنجیره سبک	تعداد اتم های درگیر در D1D2	تعداد آمینواسیدهای درگیر در D1D2	سطح برهمکنش	$\Delta G$ Kcal/mol	$\Delta G$ P-value
کمپلکس 2	67	18	82	24	650.9	-4.2	0.436
کمپلکس 1	69	18	62	19	648.3	-0.5	0.759

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه کمپلکس HLA G-LILRB1 به کمک تکنیک داکینگ مدلسازی شد. سپس رفتار دو کمپلکس HLA G-LILRB2 و HLA G-LILRB1 به مدت 200 نانوثانیه و بوسیله برنامه گرومکس در آب شبیه سازی شد. مطالعات پیشین حاکی از تمایل بالاتر HLA G در اتصال به LILRB2 نسبت به LILRB1 بود. با توجه به مقایسه پلات های RMSD و Rg در دو کمپلکس یاد شده نتیجه می گیریم که کمپلکس 2 از پایداری و فشردگی بیشتری برخوردار است. علاوه بر این بررسی مطالعات ترمودینامیکی انجام شده نیز در تایید این نتیجه می باشد. با توجه به آنالیزهای PISA و مقادیر مربوط به  $\Delta G$  P-value می توان گفت که برهمکنش های هیدروفوب در کمپلکس 2 بیشتر از کمپلکس 1 می باشد. علاوه بر این همانطور که در مطالعات پیشین ذکر شده در کمپلکس 1، برهمکنش میان دمین B2M و LILRB1 نسبت به جایگاه اتصال دیگر (زنجیره سنگین و LILRB1) از قدرت بیشتر و سطح برهمکنش بیشتری برخوردار می باشد.

با توجه به اهمیت بالای تشکیل کمپلکس 1 و 2 در ایجاد بسیاری از بیماری ها و اختلالات همچون پریکلامپسی یا سقط جنین های خودبخودی، شناخت بیشتر این برهمکنش ها می تواند در طراحی و تولید پپتیدهای دارویی با تمایل اتصال بالا به رسپتورهای LILRB و در نهایت جلوگیری از وقوع اینگونه اختلالات کمک کند. علاوه بر این یکی از راه های مقابله با بیماری های همچون سرطان، بیماری های ویروسی و یا خودایمنی می تواند بلوک کردن این برهمکنش باشد. که این امر نیز مستلزم شناخت دقیق این برهمکنش ها و اختلافات میان آن ها می باشد.



## منابع

- Bainbridge, David, Ellis, Shirley, Le Bouteiller, Philippe, & Sargent, Ian. (2001). HLA-G remains a mystery. *Trends in immunology*, 22(10), 548-552.
- Boyson, Jonathan E, Erskine, Robert, Whitman, Mary C, Chiu, Michael, Lau, Julie M, Koopman, Louise A, . . . Strominger, Jack L. (2002). Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16180-16185.
- Clements, Craig S, Kjer-Nielsen, Lars, Kostenko, Lyudmila, Hoare, Hilary L, Dunstone, Michelle A, Moses, Eric, . . . McCluskey, James. (2005). Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3360-3365.
- Colonna, Marco, Navarro, Francisco, Bellón, Teresa, Llano, Manuel, García, Pilar, Samaridis, Jacqueline, . . . López-Botet, Miguel. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *The Journal of experimental medicine*, 186(11), 1809-1818.
- Cordero, EAA, Veit, TD, Da Silva, MAL, Jacques, SMC, Silla, LMDR, & Chies, JAB. (2009). HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens*, 74(4), 308-313.
- Curigliano, Giuseppe, Criscitiello, Carmen, Gelao, Lucia, & Goldhirsch, Aron. (2013). Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clinical cancer research*, 19(20), 5564-5571.
- De Vries, Sjoerd J, van Dijk, Marc, & Bonvin, Alexandre MJJ. (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature protocols*, 5(5), 883-897.
- Ellis, SA, Sargent, IL, Redman, CW, & McMichael, AJ. (1986). Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology*, 59(4), 595.
- Eskandari-Nasab, Ebrahim, Hashemi, Mohammad, Hasani, Seyed-Shahaboddin, Omrani, Mohsen, Taheri, Mohsen, & Mashhadi, Mohammad-Ali. (2013). Association between HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Cancer Biomark*, 13(4), 253-259.
- Eswar, Narayanan, Webb, Ben, Marti-Renom, Marc A, Madhusudhan, MS, Eramian, David, Shen, Min-yi, . . . Sali, Andrej. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics*, 5.6. 1-5.6. 30.
- Ferguson, Rhea, Ramanakumar, Agnihotram V, Koushik, Anita, Coutlée, François, Franco, Eduardo, & Roger, Michel. (2012). Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix. *International Journal of Cancer*, 131(3), E312-E319.
- Gonzalez, Álvaro, Alegre, Estibaliz, Arroyo, Ainhoa, LeMaoult, Jöel, & Echeveste, José Ignacio. (2011). Identification of Circulating Nonclassic Human Leukocyte Antigen G (HLA-G)-Like Molecules in Exudates. *Clinical chemistry*, 57(7), 1013-1022.
- Hara, Naonori, Fujii, Tomoyuki, Yamashita, Takahiro, Kozuma, Shiro, Okai, Takashi, & Taketani, Yuji. (1996). Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5. 2". *American journal of reproductive immunology*, 36(6), 349-358.
- Hviid, Thomas Vauvert F, Hylenius, Sine, Rørbye, Christina, & Nielsen, Lone G. (2003). HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics*, 55(2), 63-79.



- Ishitani, Akiko, Sageshima, Noriko, Lee, Ni, Dorofeeva, Natalia, Hatake, Katsuhiko, Marquardt, Hans, & Geraghty, Daniel E. (2003). Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *The Journal of Immunology*, 171(3), 1376-1384.
- Kim, Taeho, Vidal, George S, Djuricic, Maja, William, Christopher M, Birnbaum, Michael E, Garcia, K Christopher, . . . Shatz, Carla J. (2013). Human LILRB2 is a  $\beta$ -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science*, 341(6152), 1399-1404.
- Kovats, Susan, Main, Elliott K, Librach, Clifford, Stubblebine, Marcia, Fisher, Susan J, & DeMars, Robert. (1990). A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, 248(4952), 220-223.
- Le Discorde, Magali, Moreau, Philippe, Sabatier, Patrick, Legeais, Jean-Marc, & Carosella, Edgardo D. (2003). Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Human immunology*, 64(11), 1039-1044.
- LeMaout, J, Le Discorde, M, Rouas-Freiss, N, Moreau, P, Menier, C, McCluskey, J, & Carosella, ED. (2003). Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness\*. *Tissue antigens*, 62(4), 273-284.
- Loustau, M, Wiendl, H, Ferrone, S, & Carosella, ED. (2013). HLA-G 2012 conference: the 15-year milestone update. *Tissue antigens*, 81(3), 127-136.
- Matte, Claudine, Lacaille, Julie, Zijenah, Lynn, Ward, Brian, Roger, Michel, & Group, ZVITAMBO Study. (2000). HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. *Human immunology*, 61(11), 1150-1156.
- Megret, Françoise, Prehaud, Christophe, Lafage, Mireille, Moreau, Philippe, Rouas-Freiss, Nathalie, Carosella, Edgardo D, & Lafon, Monique. (2007). Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. *Human immunology*, 68(4), 294-302.
- O'brien, M, McCarthy, T, Jenkins, D, Paul, P, Dausset, J, Carosella, ED, & Moreau, P. (2001). Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(12-13), 1943-1949.
- Park, Y, Lim, HS, Kim, YS, Hong, DJ, & Kim, HS. (2012). Soluble human leukocyte antigen-G expression in hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma. *Tissue antigens*, 79(2), 97-103.
- Paul, Pascale, Rouas-Freiss, Nathalie, Khalil-Daher, Iman, Moreau, Philippe, Riteau, Beatrice, Le Gal, Frederique Anne, . . . Carosella, Edgardo D. (1998). HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4510-4515.
- Peng, B, Zhang, L, Xing, AY, Hu, M, & Liu, SY. (2008). [The expression of human leukocyte antigen G and E on human first trimester placenta and its relationship with recurrent spontaneous abortion]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Sichuan University. Medical science edition*, 39(6), 976-979.
- Shiroishi, Mitsunori, Kuroki, Kimiko, Rasubala, Linda, Tsumoto, Kouhei, Kumagai, Izumi, Kurimoto, Eiji, . . . Maenaka, Katsumi. (2006). Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16412-16417.
- Shiroishi, Mitsunori, Kuroki, Kimiko, Tsumoto, Kouhei, Yokota, Akiko, Sasaki, Takashi, Amano, Kimie, . . . van der Merwe, P Anton. (2006). Entropically driven MHC class I recognition by human



- inhibitory receptor leukocyte Ig-like receptor B1 (LILRB1/ILT2/CD85j). *Journal of molecular biology*, 355(2), 237-248.
- Shiroishi, Mitsunori, Tsumoto, Kouhei, Amano, Kimie, Shirakihara, Yasuo, Colonna, Marco, Braud, Veronique M, . . . Willcox, Benjamin. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8856-8861.
- Tripathi, Piyush, & Agrawal, Suraksha. (2007). The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection. *Aids*, 21(11), 1395-1404.
- Willcox, Benjamin E, Thomas, Leonard M, & Bjorkman, Pamela J. (2003). Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nature immunology*, 4(9), 913-919.
- Yamagami, Takashi. (2008). *Exploiting molecules involved in fetal-maternal tolerance to overcome immunologic barriers*: ProQuest.
- Yamashita, Takahiro, Fujii, Tomoyuki, Watanabe, Yoshihisa, Tokunaga, Katsushi, Tadokoro, Kenji, Juji, Takeo, & Taketani, Yuji. (1996). HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics*, 44(3), 186-191.
- Yan, Wei-Hua, Lin, Aifen, Chen, Bao-Guo, & Chen, Shi-Yong. (2009). Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 820-826.
- Ye, Shang-rong, Yang, Hong, Li, Ke, Dong, Dan-dan, Lin, Xin-mei, & Yie, Shang-mian. (2007). Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Modern pathology*, 20(3), 375-383.
- Yie, Shang-mian, Li, Liang-hong, Li, Yue-mei, & Librach, Clifford. (2004). HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 191(2), 525-529.
- Yu, Yanrong, Wang, Yun, & Feng, Meifu. (2008). Human leukocyte antigen-G1 inhibits natural killer cytotoxicity through blocking the activating signal transduction pathway and formation of activating immunologic synapse. *Human immunology*, 69(1), 16-23.