



Molecular Dynamics Simulation of Influences of Solvent Ionic Concentration on the Binding of MUC1-G Peptide and Anti-MUC1 Aptamer

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Monsefi M.¹ MSc,
Erfan-Niya H.*¹ PhD,
Ghadari R.² PhD

How to cite this article

Monsefi M, Erfan-Niya H, Ghadari R. Molecular Dynamics Simulation of Influences of Solvent Ionic Concentration on the Binding of MUC1-G Peptide and Anti-MUC1 Aptamer. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):85-92.

¹Chemical Engineering Department, Faculty of Chemical & Petroleum Engineering, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Organic & Biochemistry Department, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Correspondence

Address: Faculty of Chemical & Petroleum Engineering, University of Tabriz, 29 Bahman Boulevard, Tabriz, Iran. Postal Code: 5166616471
Phone: +98 (41) 33392940
Fax: +98 (41) 33338497
herfan@tabrizu.ac.ir

Article History

Received: April 04, 2017

Accepted: November 15, 2017

ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

Aims Molecular insights into the analyte-bioreceptor interactions play a vital role in the efficacy of designing biosensors. Biosensors that utilize aptamers as bioreceptors are highly efficient with high specificity and reusability. Aptasensors can be used in a variety of conditions of *in vivo* or *in vitro*. The aim of this study was to study the changes in the solvent conditions of the binding of MUC1-G peptide and the anti-MUC1 aptamer.

Materials & Methods The molecular dynamics simulation method has been used to investigate the change of molecular interactions due to selective variations in solvent conditions. The results can be used to reflect a variety of environments, in which the aptasensor utilizes anti-MUC1 S2.2 aptamer as a bioreceptor and MUC1-G peptide as a biomarker.

Findings Based on the calculated binding energies, the medium containing 0.10M NaCl and anti-MUC1 S2.2 aptamer demonstrates the highest affinity toward the MUC1-G peptide among the studied concentrations of NaCl, and the arginine amino acid has a key role in the aptamer-peptide binding.

Conclusion The results of MD simulation indicated that the increase in the concentration of NaCl in the interaction environment leads to a decrease in binding energies; therefore, the binding affinity of the anti-MUC1 aptamer to MUC1-G peptide decreases. Insights from present modeling demonstrate the selectiveness and sensitivity to solvent conditions, which should be considered in the development of biosensors.

Keywords Molecular dynamics simulation; Peptide-aptamer binding; MUC1; Aptasensor

CITATION LINKS

[1] Biosensors and their applications - a review [2] The handbook of biomarkers [3] MUC1: A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression [4] Verification of WFA-sialylated MUC1 as a sensitive biliary biomarker for human biliary tract cancer [5] Aptamers and their significant role in cancer therapy and diagnosis [6] Nucleic acid aptamers: An emerging tool for biotechnology and biomedical sensing [7] A novel electrochemical biosensor based on polyadenine modified aptamer for label-free and ultrasensitive detection of human breast cancer cells [8] Molecular dynamics simulation analysis of anti-MUC1 aptamer and mucin 1 peptide binding [9] Analysis and understanding of aptamer and peptide molecular interactions: Application to mucin 1 (Muc1) aptasensor [10] Missailidis S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: Design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers [11] QGRS Mapper: A web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences [12] Apta-nanosensor preparation and in vitro assay for rapid Diazinon detection using a computational molecular approach [13] Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [14] Automated 3D structure composition for large RNAs [15] Crystal structure at 1.95 Å resolution of the breast tumour-specific antibody SM3 complexed with its peptide epitope reveals novel hypervariable loop recognition [16] Antibody targeting of cell-bound MUC1 SEA domain kills tumor cells [17] Pymol: An open-source molecular graphics tool [18] AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules [19] A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules [20] Simultaneous detection of organic and inorganic substances in a mixed aqueous solution using a microwave dielectric sensor [21] Analyzing the functions of large glycoconjugates through the dissipative properties of their absorbed layers using the gel-forming mucin MUC5B as an example [22] VMD: Visual molecular dynamics [23] Medicinal chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and molecular docking to drug discovery [24] Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure [25] Nucleic acid aptamers: New methods for selection, stabilization, and application in biomedical science

مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تاثیرات غلظت یونی حلال محیطی در اتصال پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1

مریم منصفی MSc

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

حمید عرفان‌نیا* PhD

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

رحیم قدری PhD

گروه شیمی آلی و بیوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

اهداف: مطالعه برهم‌کنش‌های آنالیت- زیست‌پذیرنده در سطح مولکولی در راندمان طراحی زیست‌حسگرها نقش اساسی دارد. زیست‌حسگرهایی که از آپتامرها به‌عنوان پذیرنده زیستی استفاده می‌کنند، بسیار کارآمد بوده و دارای اختصاصیت بالا و قابلیت استفاده مجدد هستند. آپتامرها می‌توانند در شرایط مختلف داخل بدن یا در شرایط آزمایشگاهی استفاده شوند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی تاثیرات غلظت یونی حلال محیطی در اتصال پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 است.

مواد و روش‌ها: روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای بررسی تغییر برهم‌کنش‌های مولکولی به‌علت تغییرات انتخابی در شرایط حلال، به کار گرفته شده است. نتایج می‌تواند برای منعکس‌کردن محیط‌های مختلف در آپتامسگری که از آپتامر anti-MUC1 S2.2 به‌عنوان زیست‌پذیرنده و از پپتید MUC1-G به‌عنوان زیست‌شناساگر استفاده می‌کند، به کار گرفته شوند.

یافته‌ها: براساس انرژی‌های اتصال محاسبه‌شده، آپتامر anti-MUC1 S2.2 بالاترین تمایل به پپتید MUC1-G را در محیط ۰/۱۰ مولار سدیم‌کلرید در میان غلظت‌های مطالعه‌شده سدیم‌کلرید نشان داده و اسیدآمینه آرژنین در اتصال پپتید-آپتامر نقش کلیدی ایفا می‌نماید.

نتیجه‌گیری: نتایج شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی نشان داد که افزایش غلظت حلال سدیم‌کلرید در محیط باعث کاهش انرژی‌های اتصال می‌شود و بنابراین تمایل اتصال آپتامر anti-MUC1 به پپتید MUC1-G با افزایش غلظت کمتر می‌شود. دیدگاه به‌دست‌آمده از مدل‌سازی حاضر انتخاب‌پذیری و حساسیت نسبت به شرایط حلال در مورد MUC1 را نشان می‌دهد که در توسعه زیست‌حسگرها باید ملاحظه شود.

کلیدواژه‌ها: شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، اتصال پپتید-آپتامر، MUC1، آپتامسگر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۴

*نویسنده مسئول: herfan@tabrizu.ac.ir

مقدمه

زیست‌حسگر با استفاده از یک مبدل و عنصر زیست‌شناساگر، اطلاعات کمی را درباره شناسایی و اندازه‌گیری ماده بیولوژیک خاص آنالیت ارائه می‌دهد. اصول الکتروشیمیایی، جرمی، نوری یا حرارتی اساس عملکرد مبدل است، در حالی که عنصر شناساگر/زیست‌پذیرنده براساس مکانیزم‌های بیوشیمیایی عمل می‌کند [1].

تغییرات فیزیولوژیک و گاه پاتولوژیک در سطوح سلولی و مولکولی در بیماری‌ها از جمله سرطان باعث شکل‌گیری مولکول‌هایی می‌شود که به اصطلاح شناساگر تومور نامیده می‌شوند، که می‌توانند احتمال وجود سرطان را تعیین کرده و در زیست‌حسگر مورد هدف واقع شوند [2].

گلیکوپروتئین تراغشایی MUC1 یک شناساگر تومور است که در انواع بدخیمی‌ها بیان شده و در تشخیص سرطان‌ها و نیز به‌عنوان هدف درمانی به کار گرفته می‌شود. این پروتئین جزو ترکیبات طبیعی سلول‌های سالم است که در اثر بدخیمی‌ها الگوی

گلیکوزیلاسیون آن نامنظم شده و کاهش می‌یابد. در نهایت پروتئین MUC1 دچار افزایش بیان شده و وارد گردش خون می‌شود [3, 4].

از جمله عناصر شناساگری که توانایی شناسایی و اتصال به پروتئین MUC1 را دارند، آپتامرها هستند. آپتامرها توالی‌های الیگونوکلوئیدی DNA یا RNA سنتز شده‌ای هستند که به‌عنوان عناصر شناساگر در زیست‌حسگرها به کار برده می‌شوند. ویژگی‌هایی مانند تنوع مولکول‌های هدف، اندازه کوچک و پایداری بالا و امکان ایجاد اصلاحات متنوع ساختاری باعث می‌شود که آپتامرها به‌صورت اختصاصی و با تمایل بالا به مولکول‌های هدف متصل شوند [5, 6]. در زیست‌حسگرهای بر پایه آپتامر، کارایی آپتامسگر تحت تاثیر نحوه قرارگیری و جهت‌گیری عنصر زیست‌شناساگر (آپتامر) و دسترسی آسان به محل اتصال در زیست‌شناساگر هدف است [7, 8].

مطالعه مکانیزم‌های سطح مولکولی از طریق مدل‌سازی محاسباتی می‌تواند اطلاعاتی در مورد چگونگی قرارگیری یا جهت‌گیری مولکول‌های آنالیت و شناساگر و به‌طور کلی نحوه برهم‌کنش آنها با هم ارائه دهد که امکان چنین بررسی جزئی با روش‌های تجربی مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس و NMR محلول بسیاری از ساختارهای DNA به‌دلیل محدودیت‌های اندازه و بار آنها سخت است. از این رو روش محاسباتی با حذف مرحله آزمون و خطا انتخاب تجربی می‌تواند در زمان کمتر با تقلیل هزینه‌ها و ساده‌کردن فرآیندهای آزمایشگاهی موثر واقع شود. علاوه بر نحوه قرارگیری و جهت‌گیری مولکول‌های آنالیت و زیست‌پذیرنده در یک زیست‌حسگر، شرایط محیطی نیز فرایند اتصال بین آنالیت- زیست‌پذیرنده را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه روی بازده و عملکرد زیست‌حسگر اثرگذار است [9].

در مطالعه آزمایشگاهی انجام‌شده توسط فریر و همکاران [10] آپتامر anti-MUC1 S2.2 به‌عنوان یک پذیرنده زیستی برای پروتئین MUC1 (شناساگر سرطان) طراحی و شناخته شده است. در بررسی تجربی مذکور اتصال قوی آپتامر anti-MUC1 و پپتید MUC1-G مشخص شده است. فریر و همکاران با استفاده از تصویربرداری تشدید پلاسمون سطحی دریافتند که ترکیبی از پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 ارتباط و تجمع نسبتاً سریع‌تری را در مقایسه با سایر پپتیدهای MUC1 نشان می‌دهد [10].

در مقاله حاضر نیز پپتید MUC1-G (APDTRPAPG) به‌عنوان شناساگر تومور در نظر گرفته شده است. زیست‌حسگرها در شرایط مختلف محیطی داخل بدن یا آزمایشگاهی قابل استفاده هستند. از این رو در مقاله حاضر از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای مطالعه و بررسی تغییرات برهم‌کنش‌های مولکولی در اثر تغییر غلظت حلال محیطی در شناسایی پپتید MUC1-G به‌عنوان شناساگر تومور توسط آپتامر anti-MUC1 S2.2 استفاده شده است، که در کار فریر و همکاران بدان پرداخته نشده است.

روش مدل‌سازی محاسباتی

در این کار، ابتدا توالی آپتامر anti-MUC1 S2.2 به‌صورت GCAGTTGATCCTTTGGATACCTGG که توانایی اتصال آن به پپتید MUC1-G در مقاله فریر و همکاران [10] گزارش شده است، از نظر تشکیل ساختار چهارتایی پیچیده امکان‌سنجی شد. با بارگذاری توالی آپتامر در سرور معتبر و بسیار دقیق QGRS Mapper این امکان‌سنجی انجام شد [11, 12]. این آپتامر قابلیت

تحلیل نتایج در محیط نرم‌افزار Amber بسیار آسان‌تر از نرم‌افزارهای دیگر همچون NAMD و GROMACS است.

سیستم پپتید-آپتامر در یک جعبه آب TIP3P، به شکلی که از هر طرف ۱۰ آنگستروم با دیواره جعبه فاصله داشته و کاملاً غوطه‌ور باشد قرار داده شد. همان‌طور که در مقدمه ذکر شد از زیست‌حسگرها در شرایط محیطی موجود زنده یا آزمایشگاهی استفاده می‌شود. با تغییر شرایط حلال می‌توان شرایط داخل بدن یا آزمایشگاهی را تا حد قابل قبولی در شبیه‌سازی‌ها اعمال نمود. بدین منظور از سه مدل با غلظت‌های مختلف ۰٫۱۰، ۰٫۱۵ و ۰٫۲۰ مولار سدیم کلرید (NaCl) استفاده شد. محلول ۰٫۱۵ مولار سدیم کلرید، مشابه با شرایط بیولوژیک سرم یا خون در فرد سالم است^[9]. در بعضی از زیست‌حسگرها نیز از محلول ۰٫۱۰ و ۰٫۲۰ مولار سدیم کلرید، به‌عنوان حلال محیطی استفاده می‌شود^[20, 21].

تعداد یون‌های سدیم (Na^+) و کلریدی (Cl^-) که برای ایجاد غلظت مولی مورد نظر به کمپلکس باید اضافه شود، از روابط زیر به دست می‌آیند^[8].

تعداد یون‌های سدیم = تعداد یون‌های سدیم برای خنثی‌سازی + تعداد یون‌های سدیم متناظر با غلظت نمک

تعداد یون‌های کلرید = تعداد یون‌های کلرید متناظر با غلظت نمک در گام بعدی مرحله حداقل‌سازی انرژی روی پیکربندی اولیه کمپلکس‌ها با اتخاذ ۲۰۰۰ گام انجام گرفت تا ساختار مورد نظر از نظر انرژی بهینه شود. در ۱۰۰۰ مرحله اول الگوریتم تندترین کاهش و در باقی‌مانده مراحل الگوریتم گرادیان‌های مزدوج استفاده شد.

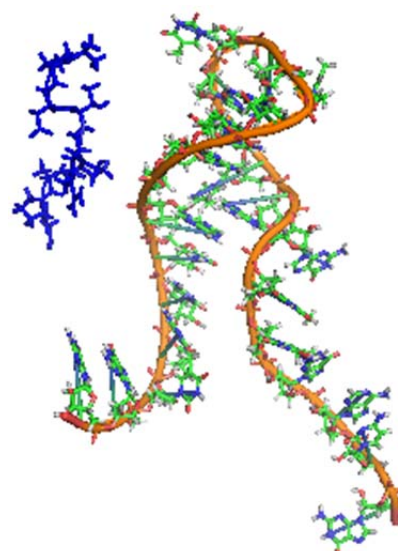
سیستم مورد بررسی زمانی به تعادل می‌رسد که رفتار آن نسبت به زمان، پایداری قابل قبولی از نظر دما، حجم، فشار و چگالی نشان دهد. برای نیل به این هدف پس از مرحله حداقل‌سازی انرژی با اعمال محدودیت روی سیستم و با استفاده از هنگردهای NVT و NPT مرحله به تعادل‌رسانی سیستم انجام پذیرفت. شبیه‌سازی‌های MD در دمای ۲۹۸٫۱۵ کلوین و با فشارمطلق ۱ بار انجام شد. افزایش تدریجی درجه حرارت در ۲۵۰۰۰ گام اول انجام شد. ۷۵۰۰۰ گام دیگر نیز برای اطمینان از پایداری سیستم در دمای به‌دست‌آمده در نظر گرفته شد. به‌منظور ثابت‌نگه‌داشتن دمای سیستم از ترموستات لانه‌زین استفاده شد. در مرحله بعد، دو اجرای پی‌درپی با تعداد مراحل ۱۰۰۰۰۰ برای هرکدام، برای رسیدن به چگالی ثابت و تعادل نهایی سیستم انجام شد. از باروستات برندنس نیز برای ثابت‌نگه‌داشتن فشار سیستم استفاده شد. برای تخمین برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک و نیروهای کوتاه‌برد، به‌ترتیب الگوریتم ذرات مش اوالد (PME) و تقریب نزدیک‌ترین همسایه با شعاع قطع ۱۲ آنگستروم اعمال شد. الگوریتم SHAKE نیز برای مقیدکردن پیوندهای شامل هیدروژن به کار گرفته شد. نهایتاً سیستمی که از نظر انرژی بهینه شده و به تعادل رسیده با گام زمانی ۲ فمتوثانیه، در مدت ۲۰ نانوثانیه شبیه‌سازی شد. پس از اتمام شبیه‌سازی‌ها، برنامه‌های VMD 1.9.1 و 2014.0901 MOE برای تحلیل مسیرها مورد استفاده قرار گرفتند^[22, 23].

نتایج و بحث

انرژی آزاد اتصال: تعیین انرژی آزاد اتصال پروتئین و لیگاند برای تعیین بازده فرآیند اتصال لازم بوده و می‌تواند تقریب بهتری از سیستم مورد بررسی ایجاد کند. در این مطالعه از روش MM/GBSA برای برآورد انرژی‌های آزاد اتصال بین پپتید و آپتامر استفاده شده است. نتایج محاسبات انرژی آزاد اتصال بین

تشکیل ساختار چهارتایی پیچیده را نداشت. در ادامه، محتمل‌ترین ساختار ثانویه DNA آپتامر توسط سرور معتبر و رایگان MFOLD ارزیابی شد. سرور مذکور ابزاری پیشرفته در پیش‌بینی ساختارهای ثانویه DNA و RNA براساس روش‌های ترمودینامیکی به شمار می‌رود^[12, 13]. در مرحله بعد، محتمل‌ترین ساختار دوبعدی پیش‌بینی‌شده به ساختار سوم ترجمه شد. بدین منظور با بارگذاری اطلاعات ساختار دوبعدی در سرور RNAComposer ساختار RNA متناظر با دقت بالا پیش‌بینی شد. تمامی این ساختارها با تبدیل اوراسیل به تیمین و پروتون‌دارکردن، به‌صورت ساختار سه‌بعدی با فرمت pdb ذخیره شد^[12, 14].

آنتی‌بادی SM3، میل ترکیبی بالایی با ایزوفرمن سرطانی MUC1 از خود نشان داده و با آنتی‌ژن پپتیدی APDTRPAP، تشکیل کریستال می‌دهد؛ بدین‌ترتیب که در موارد سرطانی این ایزوفرمن آزادانه در خون شناور بوده و می‌تواند توسط آنتی‌بادی SM3 مورد هدف قرار گیرد^[15, 16]. برای به‌دست‌آوردن ساختار پپتید مورد نظر، ساختار آنتی‌بادی SM3 کمپلکس‌شده با پپتید MUC1 از بانک اطلاعات پروتئین با کد pdb code=1SM3 گرفته شد. ساختار پپتیدی با استفاده از نرم‌افزار Pymol 2.3 از این کمپلکس جدا شده و سپس اسید آمینه گلیسین برای تولید پپتید MUC1-G به آن اضافه شد^[8, 17]. به‌منظور تولید پیکربندی اولیه سیستم مولکولی پپتید-آپتامر، ساختارهای ایجادشده در مرحله قبل در نرم‌افزار Pymol ترکیب شدند تا پپتید نسبت به آپتامر در موقعیت مناسبی قرار بگیرد. در شکل ۱ تصویری از پیکربندی اولیه کمپلکس پپتید MUC1-G با آپتامر anti-MUC1 S2.2 نشان داده شده است.



شکل ۱) پیکربندی اولیه کمپلکس پپتید MUC1-G (آبی) و آپتامر anti-MUC1 S2.2 (نارنجی)

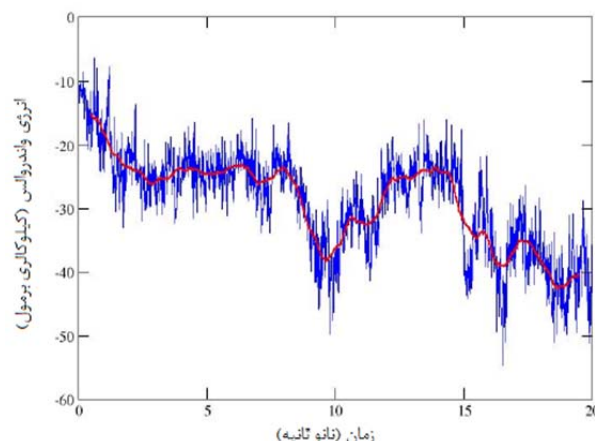
فایل‌های مورد نیاز برای شبیه‌سازی‌های MD با برنامه‌های AMBER12 و AmberTools 12 و انتخاب میدان نیروی ff99SB تهیه شد^[18, 19]. مزیت نرم‌افزار AMBER همانند نرم‌افزار شبیه‌سازی دیگری مثل GROMACS این است که میدان‌های نیروی این برنامه برای مطالعه پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها و به‌طور کلی زیست‌مولکول‌ها بسیار مناسب است. همچنین ایجاد ساختارها و تعیین پارامترهای میدان نیرو و نیز

پپتید و آپتامر به روش MM/GBSA در محیط‌های یونی مختلف در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱) انرژی‌های آزاد اتصال محاسبه‌شده برای کمپلکس پپتید MUC1-G/آپتامر anti-MUC1 S2.2 در محیط‌های یونی مختلف

غلظت مولی NaCl در محیط برهم‌کنش (مولار)	انرژی اتصال آپتامر anti-MUC1 S2.2 به پپتید MUC1-G (کیلوکالری بر مول)
۰.۱۰	-۱۶.۸۱
۰.۱۵	-۱۲.۰۴
۰.۲۰	-۱۰.۶۶

همان‌طور که داده‌های جدول ۱ نشان داده شده است، قوی‌ترین اتصال بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 در محیط با غلظت یونی ۰.۱۰ مولار سدیم‌کلرید است. همچنین با افزایش غلظت یونی محیط برهم‌کنش، انرژی آزاد اتصال بین پپتید و آپتامر کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر با بالا رفتن غلظت مولی محلول سدیم‌کلرید، تمایل آپتامر anti-MUC1 S2.2 به پپتید MUC1-G کم شده است. انرژی آزاد اتصال سیستم پپتید/آپتامر anti-MUC1 S2.2 در محیط با غلظت ۰.۱۰ مولار سدیم‌کلرید، برابر با -۱۶.۸۱ کیلوکالری بر مول است. برای بررسی بیشتر برهم‌کنش بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2، انرژی‌های وان‌دروالس در دمای ۲۹۸.۱۵ کلوین برای این سیستم محاسبه شده و در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲) انرژی‌های وان‌دروالس مربوط به برهم‌کنش‌های بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 در محیط با غلظت ۰.۱۰ مولار NaCl (مقادیر متوسط انرژی به رنگ قرمز نشان داده شده است)

در شکل ۲ مشخص است که مقدار انرژی وان‌دروالس در ابتدا در مدت ۳~ نانوثانیه اول کاهش یافته است، سپس روند ثابتی در دوره زمانی ۳~ تا ۸~ نانوثانیه از خود نشان داده و دوباره طی ۸~ تا ۱۰~ نانوثانیه مقدار آن کاهش یافته است. سپس یک روند افزایشی بین ۱۰~ تا ۱۵~ نانوثانیه در مقدار انرژی وان‌دروالس مشاهده می‌شود. نهایتاً در ۱۵~ نانوثانیه آخر، انرژی وان‌دروالس بین دو مولکول کاهش می‌یابد. با توجه به الگوی نوسانی نمودار انرژی وان‌دروالس، می‌توان متوجه شد که مولکول‌ها در شبیه‌سازی دستخوش تغییرات صورت‌بندی شده‌اند و در نتیجه برهم‌کنش‌های وان‌دروالس بین دو مولکول با زمان تغییر کرده است.

فاصله و پیوندهای هیدروژنی: برای بررسی در مورد منشا تمایل آپتامر anti-MUC1 S2.2 به پپتید هدف و بررسی روند

برهم‌کنش‌ها در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید، فاصله بین مراکز جرم پپتید MUC1-G و آپتامر محاسبه شده است.

با در نظر گرفتن فاصله مولکولی و برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی مشخص می‌شود که رابطه معکوسی بین فاصله مولکول‌ها و حضور برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی وجود دارد. فرآیند اتصال زمانی رخ می‌دهد که نیروی جاذبه‌ای بین دو مولکول همسایه وجود داشته باشد. در واقع وجود برهم‌کنش‌ها، مولکول‌ها را در نزدیکی همدیگر نگه می‌دارد. اندازه‌گیری پیوندهای هیدروژنی بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 نیز به همین دلیل انجام شده است. فاصله مراکز جرم مولکول‌ها و نیز پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی محاسبه شده در دمای ۲۹۸.۱۵ کلوین در شکل ۳ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که الگوی شناسایی و شکل‌گیری تمامی پیوندهای هیدروژنی از دو شرط زیر تبعیت می‌کند: (۱) فاصله اتم دهنده و گیرنده باید کمتر یا برابر با ۳.۲ آنگستروم باشد و

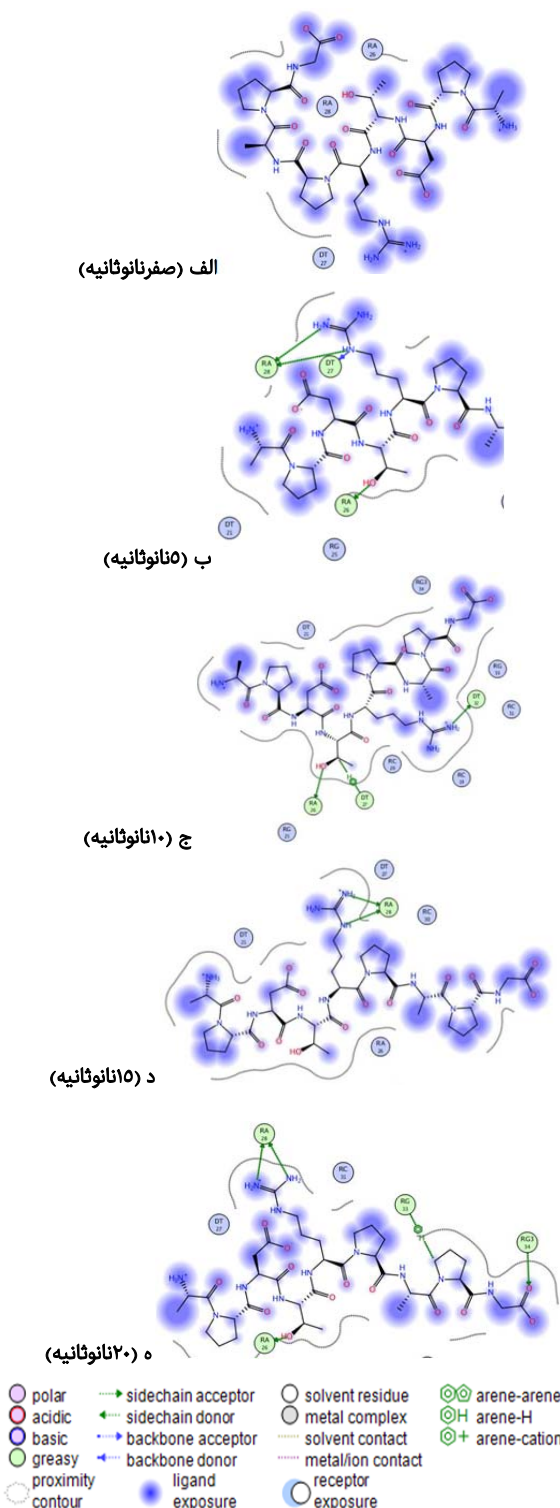
(۲) زاویه اتم دهنده و گیرنده باید کمتر یا برابر با ۳۰ درجه باشد. گروه‌های قطبی C=O، NH، و NH₂ اسیدهای نوکلئیک DNA آپتامر و گروه‌های عاملی کربوکسیل (COOH) و آمین (NH₂) اسید آمینه‌های پروتئین این توانایی را به واحدهای سازنده می‌دهند که در پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین‌مولکولی شرکت کنند.

مولکول‌های پپتید و آپتامر در محیط حاوی ۰.۱۰ مولار سدیم‌کلرید، در مقایسه با غلظت‌های بالاتر در فاصله کوتاه‌تری نسبت به هم قرار گرفته‌اند که می‌تواند بالا بودن مقدار انرژی اتصال این سیستم را توجیه کند. در نتیجه این فاصله کوتاه‌تر تعداد پیوندهای هیدروژنی تشکیل‌شده بین پپتید و آپتامر نیز افزایش یافته است (شکل ۳-الف). این افزایش نیز به نوبه خود سهم قابل توجهی در قوی‌تر شدن اتصال بین آپتامر و پپتید دارد. در شکل ۳-ب در شرایط محیطی ۰.۱۵ مولار سدیم‌کلرید، فرآیند اتصال بین پپتید و آپتامر در همان گام‌های اولیه شبیه‌سازی انجام شده است؛ برای اینکه اتصال برقرار شده بین دو مولکول پایداری بالایی داشته باشد به تدریج فاصله دو مولکول کم شده و نهایتاً در بخش انتهایی شبیه‌سازی (۵~ نانوثانیه آخر) فاصله بین آنها ثابت می‌شود.

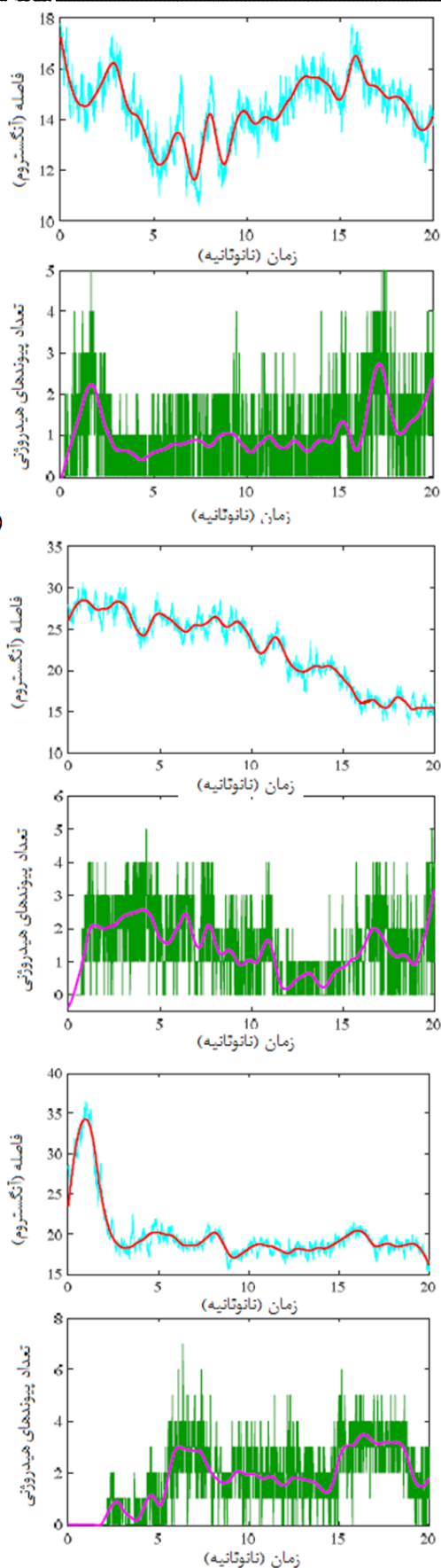
تحلیل و بررسی مسیر شبیه‌سازی در شکل ۳-ج نشان می‌دهد که فاصله بین مراکز جرم مولکول‌های ترکیب پپتید-آپتامر در شرایط یونی ۰.۲۰ مولار، در کمتر از ۳~ نانوثانیه به سرعت زیر ۸~ آنگستروم می‌افتد و تا انتهای شبیه‌سازی حول این مقدار نوسان می‌کند. کاهش ناگهانی فاصله مراکز جرم پپتید و آپتامر و نوسانات اندک آن تا انتها، نشان از برقراری اتصال بین دو مولکول و پایداری این اتصال در شبیه‌سازی است. در زیر ۳~ نانوثانیه که فاصله بین مراکز جرم دو مولکول در حال افزایش است، هیچ پیوند هیدروژنی بین آنها دیده نمی‌شود، تا اینکه در نقطه اولین تجمع (۳~ نانوثانیه) نیروی جاذبه موثر بین دو مولکول به دلیل نزدیکی و مجاورت آنها ایجاد می‌شود. از این نقطه به بعد دو مولکول اتصال خود را حفظ کرده و تعداد پیوندهای هیدروژنی آنها به تدریج افزایش یافته است. تغییرات مشاهده‌شده در تعداد پیوندهای هیدروژنی در شکل ۳-ج نیز به دلیل نوسان فاصله حول ۱۸ آنگستروم بوده است.

با توجه به مطالب ذکر شده، تغییر غلظت یونی محیط مستقیماً روی فرآیند اتصال سیستم پپتید-آپتامر، در این مورد خاص، اثری نگذاشته است. به عبارت دیگر در هر سه غلظت یونی اتصال رخ داده و تنها میزان پایداری اتصال و نحوه برهم‌کنش مولکول‌ها در فرآیند با هم متفاوت بوده است.

بررسی برهم‌کنش‌های بین پپتید MUC1-G و آبتامر anti-MUC1 ۲.۲ S2 در محیط حاوی ۰.۱۰ مولار سدیم کلرید: با توجه به اینکه بالاترین انرژی آزاد اتصال مربوط به غلظت از ۰.۱۰ مولار سدیم کلرید است، بررسی‌های بیشتر در این غلظت از سدیم کلرید انجام گرفته است. شکل ۴، مراحل برهم‌کنش‌های بین پپتید MUC1-G و آبتامر anti-MUC1 ۲.۲ S2 را در محیط ۰.۱۰ مولار سدیم کلرید، در فرآیند شبیه‌سازی MD نشان می‌دهد.



شکل ۴ برهم‌کنش‌های مولکولی بین پپتید MUC1-G و آبتامر anti-MUC1 ۲.۲ S2 در محیط ۰.۱۰ مولار NaCl (الف) صفر نانوثانیه (ب) ۵ نانوثانیه (ج) ۱۰ نانوثانیه (د) ۱۵ نانوثانیه (ه) ۲۰ نانوثانیه



شکل ۵ پیوندهای هیدروژنی و فاصله بین مراکز جرم پپتید MUC1-G و آبتامر anti-MUC1 ۲.۲ S2، تحت غلظت‌های مختلف NaCl. (الف) ۰.۱۰ مولار (ب) ۰.۱۵ مولار (ج) ۰.۲۰ مولار. (مقادیر متوسط فاصله و پیوندهای هیدروژنی به ترتیب به رنگ قرمز و ارغوانی نشان داده شده‌اند)

همچنین برای بررسی اجزای دخیل در برهم‌کنش بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 جزییات برهم‌کنش‌های بین دو مولکول در جدول ۲ آورده شده است. برای تعیین پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های یونی بین پپتید و آپتامر حداکثر فاصله قطع ۰٫۵ آنگستروم و انرژی قطع ۰٫۵ کیلوکالری بر مول در نظر گرفته شده است.

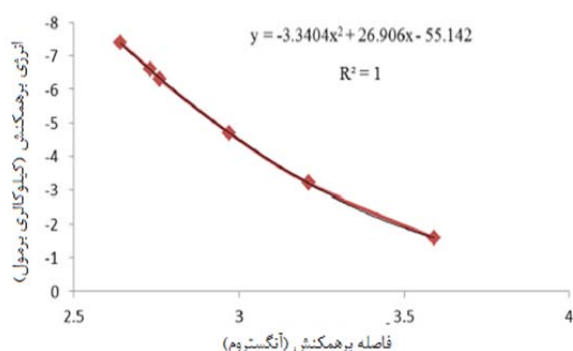
جدول ۲) باقی‌مانده‌های شرکت‌کننده در برهم‌کنش‌های مولکولی بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 در محیط ۰٫۱۰ مولار NaCl (ب) ۵ نانوانیون (ج) ۱۰ نانوانیون (د) ۱۵ نانوانیون (ه) ۲۰ نانوانیون.

متغیر	نوع	شماره	نوع	شماره	نوع	فاصله	انرژی
باقی‌مانده	باقی‌مانده	باقی‌مانده	باقی‌مانده	باقی‌مانده	باقی‌مانده	برهم‌کنش (آنگستروم)	برهم‌کنش (کیلوکالری بر مول)
THR	۴	RA	۱۷	H	۲٫۶۸	-۱٫۵	
ARG	۵	DT	۱۸	H	۲٫۹۹	-۳٫۰	
ARG	۵	RA	۱۹	H	۳٫۲۱	-۱٫۵	
ARG	۵	RA	۱۹	H	۲٫۶۴	-۸٫۱	
ARG	۵	RA	۱۹	I	۳٫۲۱	-۳٫۲	
ARG	۵	RA	۱۹	I	۲٫۶۴	-۷٫۴	
ARG	۵	RA	۱۹	I	۳٫۵۹	-۱٫۶	
THR	۴	RA	۱۷	H	۲٫۹۴	-۱٫۱	
ARG	۵	DT	۲۳	H	۲٫۷۹	-۴٫۶	
THR	۴	DT	۱۸	A-H	۳٫۷۱	-۱٫۱	
ARG	۵	RA	۱۹	H	۲٫۹۷	-۶٫۰	
ARG	۵	RA	۱۹	H	۲٫۷۳	-۶٫۸	
ARG	۵	RA	۱۹	I	۲٫۹۷	-۴٫۷	
ARG	۵	RA	۱۹	I	۲٫۷۳	-۶٫۶	
THR	۴	RA	۱۷	H	۳٫۰۳	-۰٫۹	
ARG	۵	RA	۱۹	H	۲٫۷۶	-۸٫۹	
ARG	۵	RA	۱۹	H	۳٫۲۱	-۲٫۸	
GLY	۹	RG3	۲۵	H	۲٫۶۹	-۲٫۱	
GLY	۹	RG3	۲۵	H	۲٫۶۹	-۲٫۷	
ARG	۵	RA	۱۹	I	۲٫۷۶	-۶٫۳	
ARG	۵	RA	۱۹	I	۳٫۲۱	-۳٫۲	
PRO	۸	RG	۲۴	A-H	۳٫۹۴	-۰٫۷	

H=اتصال I؛ یونی برهم‌کنش H=arene A-H

قابل مشاهده است. برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی مربوط به سیستم‌های π در وقایع بیولوژیک مانند فرآیند شناسایی پروتئین-لیگاند، نقش اساسی دارند. می‌توان نتیجه گرفت که پیوندهای هیدروژنی و سایر نیروهای بین‌مولکولی مانند یونی و پشته‌ای تشکیل شده بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2، باعث می‌شوند این آپتامر با تمایل بالا و به‌صورت انتخابی به پپتید MUC1-G متصل شود.

مطلب دیگری که در خصوص جدول ۲ می‌توان گفت این است که بین فاصله و انرژی برهم‌کنش‌های یونی رابطه معکوسی وجود دارد. شکل ۵ به‌خوبی این رابطه معکوس را نشان می‌دهد. مطابق نمودار شکل ۵ با کاهش فاصله برهم‌کنش‌های یونی، انرژی این برهم‌کنش‌ها افزایش می‌یابد و بالعکس. براساس قانون کولن که در محاسبه برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین ذرات باردار استفاده می‌شود، نیرو با مجذور فاصله افت می‌کند. طبق این قانون رابطه به‌دست آمده در شکل ۵ تایید می‌شود.



شکل ۵) رابطه معکوس بین فاصله و انرژی برهم‌کنش‌های یونی بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 در دمای ۲۹۸٫۱۵ کلوین

پیوندهای هیدروژنی درون‌آپتامری و شعاع ژیراسیون: شعاع ژیراسیون، شعاعی از مرکز ثقل مولکول است که تمامی اتم‌ها را در بر می‌گیرد^[24]. شعاع ژیراسیون به‌خوبی می‌تواند میزان تراکم یا تاخوردگی مولکول‌ها را در شبیه‌سازی MD نشان دهد. هرچه میزان نوسانات شعاع ژیراسیون کم و روند پیشروی آن نزولی باشد نمایانگر این است که مولکول مورد نظر در حال تراکم است و بالعکس^[25].

آپتامر در نتیجه برهم‌کنش‌های درون‌مولکولی، شکل فضایی خاصی به خود می‌گیرد که به آن توانایی اتصال به لیگاند را می‌بخشد. وقتی که آپتامر به لیگاند خود متصل شود شکل فضایی آن تغییر می‌کند^[25]. برای بررسی تغییرات ساختاری آپتامر anti-MUC1 S2.2، پیوندهای هیدروژنی درون‌آپتامری و شعاع ژیراسیون DNA آپتامر مطالعه شده در غلظت‌های مختلف، محاسبه شده است که در شکل ۶ نشان داده شده‌اند. در شکل ۶-ج، بین نمودارهای پیوند هیدروژنی درون‌مولکولی و شعاع ژیراسیون آپتامر anti-MUC1 S2.2 یک رابطه معکوس مشاهده می‌شود. در حقیقت در محیط با بیشترین غلظت یونی، با افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی درون‌مولکولی، آپتامر نیز به سمت متراکم شدن پیش می‌رود و برعکس. فاصله بین مراکز جرم مولکول‌ها در غلظت ۰٫۲۰ مولار، حالت پایاتری نسبت به دو غلظت دیگر نشان داده است که بیانگر پایداری بیشتر فرآیند اتصال در این غلظت نسبت به دو غلظت دیگر است؛ بنابراین انتظار می‌رود که تغییرات صورت‌بندی اجزای برهم‌کنش در غلظت ۰٫۲۰ مولار نسبت به غلظت‌های پایین‌تر، کمتر باشد.

در پیکربندی اولیه مربوط به کمپلکس پپتید MUC1-G / آپتامر anti-MUC1 S2.2 در شکل ۴-الف، هیچ برهم‌کنشی بین دو مولکول مشاهده نمی‌شود. در آغاز شبیه‌سازی مولکول‌ها دور از یکدیگر بوده‌اند و هیچ برهم‌کنش مستقیمی بین آنها ایجاد نشده است. همان‌طور که جدول ۲ و شکل ۴ نشان می‌دهند، اسیدهای آمینه (آرژنین، ترئونین، گلیسین، و پرولین) پپتید MUC1-G و نوکلئوتیدهای (گوانین، آدنین و تیمین) آپتامر anti-MUC1 S2.2 در برهم‌کنش‌های بین پپتید و آپتامر در پیکربندی‌های بررسی شده، شرکت کرده‌اند. بین آنها، اسید آمینه آرژنین پپتید و نوزدهمین نوکلئوتید آپتامر (آدنین)، در همه پیکربندی‌ها در ایجاد برهم‌کنش‌های بین پپتید و آپتامر حضور دارند. اسید آمینه آرژنین دارای بار مثبت است که در ایجاد برهم‌کنش‌های پایدار با DNA کمک شایان توجهی می‌کند. به همین دلیل آرژنین در برهم‌کنش‌های بین پپتید و آپتامر anti-MUC1 S2.2 حضور موثر داشته است. داده‌های ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که برهم‌کنش‌های پیوند هیدروژنی نقش مهمی برای حفظ پپتید و آپتامر در کنار یکدیگر داشته‌اند. تمامی برهم‌کنش‌های یونی نیز بین اسید آمینه آرژنین و آدنین نوزدهم دیده می‌شود. در شکل ۴-ج و ۴-ه (به‌ترتیب متناظر با ثانیه‌های نوزدهم بیستم شبیه‌سازی)، نوع دیگری از برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی شناخته شده به‌عنوان arene-H که نوعی برهم‌کنش پای (π) است،

مطابق شکل ۶، نوسانات شدیدتری در نمودارهای شعاع ژیراسیون آپتامر anti-MUC1 S2.2 در غلظت‌های ۰.۱۰ و ۰.۱۵ مولار نسبت به شکل متناظر در غلظت ۰.۲۰ مولار مشاهده می‌شود. بنابراین تغییرات صورت‌بندی ساختار آپتامر در محیط با غلظت ۰.۲۰ مولار سدیم‌کلرید، نسبت به دو محیط دیگر پایین‌تر و ثبات بیشتری با گذشت زمان دارد. شعاع متوسط تراکم (۱۵.۰۷ آنگستروم) آپتامر در شکل ۶-ج، نسبت به شعاع‌های متوسط (۱۶.۸۷ و ۱۶.۶۳ آنگستروم) به‌ترتیب در محیط‌های ۰.۱۰ و ۰.۱۵ مولار کمتر است. متوسط تعداد پیوندهای هیدروژنی (~۱۸) در غلظت بالاتر نیز از مقادیر متوسط متناظر (~۱۰ و ~۱۴) به‌ترتیب در دو غلظت ۰.۱۰ و ۰.۱۵ مولار بیشتر است. بنابراین آپتامر anti-MUC1 S2.2 در غلظت ۰.۲۰ مولار سدیم‌کلرید در مقایسه با دو غلظت دیگر، به‌دلیل داشتن مقادیر شعاع ژیراسیون کمتر و پایدارتر و همچنین تعداد پیوندهای هیدروژنی بالاتر، صورت‌بندی محکم‌تری در تعامل با پپتید داشته است. با توجه به تحلیل نتایج شبیه‌سازی‌های انجام‌شده در غلظت‌های یونی مختلف، آپتامر anti-MUC1 S2.2 توانایی شناسایی پپتیدهایی MUC1 را در هر دو محیط داخل بدن و آزمایشگاهی دارد.

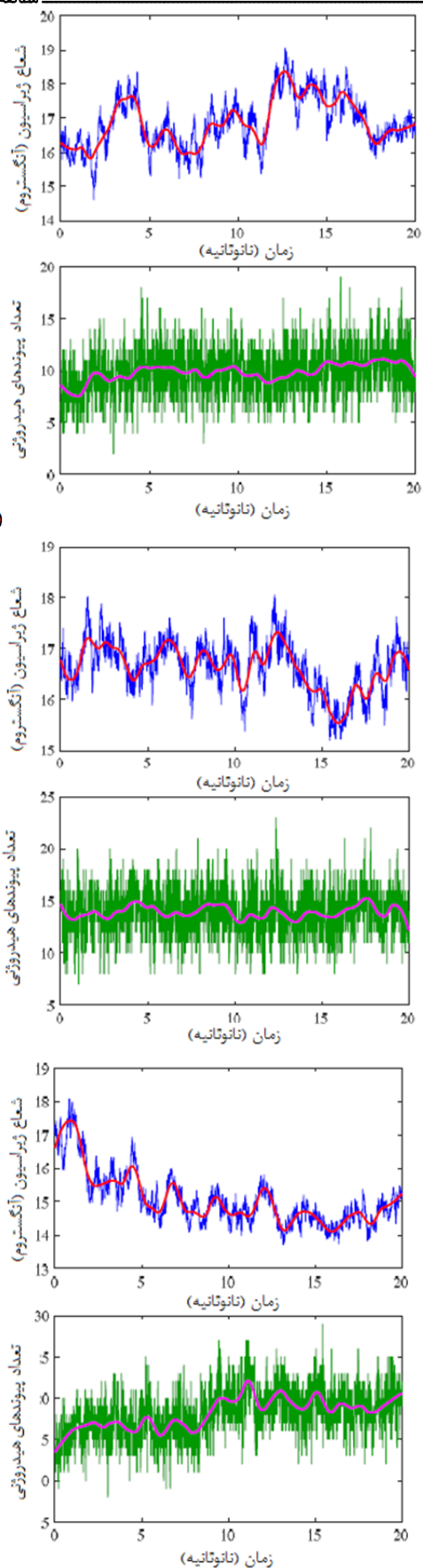
نتیجه‌گیری

استفاده از مدل‌سازی محاسباتی و شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی در مطالعه و بررسی اتصالات بین زیست‌شناساگر و آپتامرها که به‌عنوان مکانیزم تشخیصی آنتی‌حسگرها شناخته می‌شود، روشی موثر است. در این مقاله با استفاده از برنامه AMBER، تغییر در برهم‌کنش‌های مولکولی به‌علت تغییر غلظت یونی حلال محیطی، با ترکیب پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 در سه غلظت ۰.۱۰، ۰.۱۵ و ۰.۲۰ مولار سدیم‌کلرید مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. بعد از اتمام شبیه‌سازی‌ها، انرژی‌های آزاد اتصال برای تعیین بازده فرآیند اتصال با روش MM/GBSA محاسبه شد. همچنین فاصله بین مراکز جرم پپتید و آپتامر، شعاع ژیراسیون آپتامر و پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی برای بررسی انعطاف‌پذیری ساختارها و پایداری برهم‌کنش‌ها در کمپلکس‌های محلول اندازه‌گیری شد.

نتایج شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی در محیط‌هایی با غلظت متفاوت سدیم‌کلرید نشان داد با افزایش غلظت یونی محیط برهم‌کنش، انرژی آزاد اتصال بین پپتید MUC1-G و آپتامر anti-MUC1 S2.2 کاهش می‌یابد. در هر سه غلظت یونی اتصال بین پپتید و آپتامر مشاهده شد و تنها میزان پایداری اتصال و نحوه برهم‌کنش مولکول‌ها در فرآیند با هم متفاوت بود. اسید آمینه آرژنین و آندین نوزدهم نیز در اتصال بین پپتید و آپتامر میان‌کنش کلیدی داشتند. با در نظر گرفتن مطالب بالا می‌توان گفت نتایج شبیه‌سازی‌های MD مطابقت خوبی با نتیجه مطالعه تجربی فریر و همکاران^[10] دارد.

نتایج شبیه‌سازی‌های انجام‌شده در این مقاله در بررسی نحوه اتصال آپتامر anti-MUC1 S2.2 به پپتیدهایی MUC1 می‌تواند در طراحی آنتی‌حسگرهای پربازده و کارآمد و همچنین سیستم‌های دارورسانی هدفمند با هدف قراردادن MUC1 به‌عنوان شناساگر تومور و آپتامر anti-MUC1 S2.2 به‌عنوان مولکول کاوشگر استفاده شود.

تشکر و قدردانی: تحقیق حاضر در قالب پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد خانم مریم منصفی در آزمایشگاه شبیه‌سازی مولکولی دانشکده مهندسی شیمی و نفت دانشگاه تبریز انجام شده است. لذا



شکل ۶ شعاع ژیراسیون و پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی برای آپتامر anti-MUC1 S2.2 تحت غلظت‌های مختلف NaCl: (الف) ۰.۱۰ مولار (ب) ۰.۱۵ مولار (ج) ۰.۲۰ مولار. (مقادیر متوسط فاصله و پیوندهای هیدروژنی به ترتیب به رنگ قرمز و ارغوانی نشان داده شده‌اند.)

Issue):W676-82.

12- Jokar M, Safaralizadeh MH, Hadizadeh F, Rahmani F, Kalani MR. Apta-nanosensor preparation and in vitro assay for rapid Diazinon detection using a computational molecular approach. *J Biomol Struct Dyn*. 2017;35(2):343-53.

13- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3406-15.

14- Popena M, Szachniuk M, Antczak M, Purzycka KJ, Lukasiak P, Bartol N, et al. Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(14):e112.

15- Dokurno P, Bates PA, Band HA, Stewart LM, Lally JM, Burchell JM, et al. Crystal structure at 1.95 Å resolution of the breast tumour-specific antibody SM3 complexed with its peptide epitope reveals novel hypervariable loop recognition. *J Mol Biol*. 1998;284(3):713-28.

16- Pichinuk E, Benhar I, Jacobi O, Chalikh M, Weiss L, Ziv R, et al. Antibody targeting of cell-bound MUC1 SEA domain kills tumor cells. *Cancer Res*. 2012;72(13):3324-36.

17- DeLano WL. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*. 2002; 40(1):82-92.

18- Pearlman DA, Case DA, Caldwell JW, Ross WS, Cheatham III TE, DeBolt S et al. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput Phys Commun*. 1995;91(1-3):1-41.

19- Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J Am Chem Soc*. 1995;117(19):5179-97.

20- Li LJ. Simultaneous detection of organic and inorganic substances in a mixed aqueous solution using a microwave dielectric sensor. *Prog Electromagn Res C*. 2010;14:163-71.

21- Kesimer M, Sheehan JK. Analyzing the functions of large glycoconjugates through the dissipative properties of their absorbed layers using the gel-forming mucin MUC5B as an example. *Glycobiology*. 2008;18(6):463-72.

22- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33-8.

23- Vilar S, Cozza G, Moro S. Medicinal chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and molecular docking to drug discovery. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(18):1555-72.

24- Lobanov Mlu, Bogatyreva NS, Galzitskaia OV. Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure. *Mol Biol (Mosk)*. 2008;42(4):701-6. [Russian]

25- Kong HY, Byun J. Nucleic acid aptamers: New methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013;21(6):423-34.

نویسندگان از دانشگاه تبریز به دلیل حمایت از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مریم منصفی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ حمید عرفان‌نیا (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ رحیم قدری (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

منابع

- 1- Mehrotra P. Biosensors and their applications - a review. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2016;6(2):153-9.
- 2- Jain KK. The handbook of biomarkers. New York: Springer Science & Business Media; 2010.
- 3- Nath S, Mukherjee P. MUC1: A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med*. 2014;20(6):332-42.
- 4- Yamaguchi T, Yokoyama Y, Ebata T, Matsuda A, Kuno A, Ikehara Y, et al. Verification of WFA-sialylated MUC1 as a sensitive biliary biomarker for human biliary tract cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(2):671-7.
- 5- Prakash JS, Rajamanickam K. Aptamers and their significant role in cancer therapy and diagnosis. *Biomedicine*. 2015;3(3):248-69.
- 6- Ku TH, Zhang T, Luo H, Yen TM, Chen PW, Han Y, et al. Nucleic acid aptamers: An emerging tool for biotechnology and biomedical sensing. *Sensors (Basel)*. 2015;15(7):16281-313.
- 7- Wang K, He MQ, Zhai FH, He RH, Yu YL. A novel electrochemical biosensor based on polyadenine modified aptamer for label-free and ultrasensitive detection of human breast cancer cells. *Talanta*. 2017;166:87-92.
- 8- Rhinehardt KL, Srinivas G, Mohan RV. Molecular dynamics simulation analysis of anti-MUC1 aptamer and mucin 1 peptide binding. *J Phys Chem B*. 2015;119(22):6571-83.
- 9- Rhinehardt K, Mohan R, Srinivas G, Kelkar A. Analysis and understanding of aptamer and peptide molecular interactions: Application to mucin 1 (Muc1) aptasensor. 2nd International Symposium on Physics and Technology of Sensors (ISPTS), 7-10 March, 2015, Pune, India. Piscataway: IEEE; 2015.
- 10- Ferreira CS, Matthews CS, Missailidis S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: Design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol*. 2006;27(6):289-301.
- 11- Kikin O, D'Antonio L, Bagga PS. QGRS Mapper: A web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server