

جداسازی و کلونینگ ژن انسانی MAGEA۴ در پلاسمید بیانی pRUF

زهرا حجازی^۱، محمد رضا عباس زادگان^۲، مهران غلامین^۲، محمد مهدی فرقانی فرد^{۴*}

۱- دانشجوی کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان

۲- استاد تمام، دکترای ژنتیک انسانی، آزمایشگاه ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

۳- استاد یار، دکترای ایمونولوژی، آزمایشگاه ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

۴- دکترای تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: کنسر تستیس آنتی ژن ها دست های از آنتی ژن ها می باشند که به طور ویژه بیان آن ها در سلول های زایا و انواع مختلفی از سرطان ها دیده شده است. یکی از اعضای این خانواده MAGEA۴ می باشد که این آنتی ژن با انواع تومورها در ارتباط است. از آنجا که عملکرد این ژن هنوز به درستی مشخص نشده است، هدف از این مطالعه تکثیر و کلونینگ این ژن در وکتور بیانی به منظور تولید پروتئین نوترکیب بیان کننده MAGEA۴ است.

مواد و روش ها: از طریق PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حاوی برش آنزیم محدود کننده ژن MAGEA۴ تکثیر شد. محصول PCR خاص شده بین سایت های BamH۱ و Xho۱ وکتور pTZ۵۷/R قرار گرفت و در سویه Top۱۰ اشرشیاکلی ترانسفورم گردید و توسط IPTG و X-Gal غربالگری شد. صحیح قرا گرفتن قطعه MAGEA۴ توسط برش آنزیمی و تعیین توالی بررسی گردید. سپس ساب کلونینگ این ژن در وکتور بیانی pRUF با همان جایگاه های برش آنزیمی صورت پذیرفت.

یافته ها: تایید نهایی از طریق PCR کلنی و برش آنزیمی، تعیین توالی صورت گرفت. بنابراین ژن MAGEA۴ در جایگاه برشی آنزیمی پلاسمید pRUF کلون شد.

نتایج: مطالعه حاضر گام مهمی جهت تولید پروتئین نوترکیب و استفاده از آن جهت پی بردن به عملکرد این ژن و اهداف درمانی به منظور درمان سرطان می باشد.

کلمات کلیدی: کنسر تستیس آنتی ژن، MAGEA۴، کلونینگ، وکتوربیانی pRUF

مقدمه:

کنسر تستیس آنتی ژن ها^۱ دسته ای از آنتی ژن ها هستند که دارای محدودیت بیان در سلول های نرمال نسبت به جرم لاین انسانی^۲ و تروفوبلاست هستند (۱۶).

شواهد زیادی بیانگر این نکته است که بین سلول های توموری و سلول های جرم لاین وجوه اشتراک زیادی وجود دارد که از آن جمله می توان به ویژگی های تهاجم، تخریب و متاستاتیک و بیان کنسر تستیس آنتی ژن ها اشاره نمود (۶).

بیان کنسر تستیس آنتی ژن ها در بافت هایی نظیر کبد، طحال و لوزالمعده نیز به کمک تکنیک ایمونوهیستوشیمی به میزان بسیار کم دیده شده است و کمتر از ۱٪ است. از سوی دیگر، بیان کنسر تستیس آنتی ژن ها در طیف وسیعی از سرطان های انسانی از قبیل ملانوما، کارسینومای مثانه، ریه و کبد دیده شده

سرطان بیماری است که در آن بنا به دلایل مختلفی چون علل ژنتیکی و محیطی رشد سلول ها از کنترل خارج می شود. در یک جاندار سالم همیشه بین میزان تقسیم سلول، مرگ طبیعی سلولی و تمایز، یک تعادل وجود دارد. خارج شدن سلول از حالت تعادل موجب سرطانی شدن سلول می شود (۷).

نویسنده مسئول : گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان،

دامغان، ایران

پست الکترونیکی : forghanifard@gmail.com

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۰۹/۱۶

تاریخ پذیرش : ۱۳۹۴/۰۳/۲۳

Cancer Testis Antigens ۱

Germ Line ۲

نشده است به طوری که نتایج ضد و نقیضی در ارتباط با نقش این ژن گزارش شده است. هدف در این مطالعه این است که از طریق کلونینگ کامل این ژن توسط پرایمرهای طراحی شده در وکتورهای بیانی زمینه لازم جهت پی بردن به عملکرد این ژن و هم چنین تولید پروتئین نوترکیب به عنوان اهداف درمانی جهت تولید واکسن و یا استفاده از آن به عنوان آنتی ژن تشخیصی جهت پیش آگاهی از سرطان را فراهم نماییم.

مواد و روش ها:

استخراج RNA و سنتز cDNA:

RNA رده سلولی HEK293 با استفاده از تریزول^{۱۰} بر طبق دستورالعمل (کیت کیاژن)، استخراج گردید. کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل ۱٪ بررسی شد. cDNA توسط آنزیم ترانس کریپتاز طبق طبق دستورالعمل کیت (فرمنتاز) سنتز گردید.

طراحی پرایمر:

اطلاعات مربوط به ژن انسانی MAGEA4 (NM-001015481) (از بانک مرجع مرکزی اطلاعات بیوتکنولوژی^{۱۱} تهیه شد. طول ژن، توالی mRNA، ناحیه کدینگ^{۱۲} و تعداد اگزون های این ژن مشخص شدند. بلست^{۱۳} ژن نیز در این بانک ژنی^{۱۴} انجام گرفت.

RT-PCR:

غلظت مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR از جمله آغازگرها بر اساس واکنش استاندارد PCR تنظیم شد. پس از مخلوط کردن کلیه موارد مورد نیاز بر طبق روش استاندارد با آنزیم Taq پلی مرز از شرکت فرمنتاز PCR طبق برنامه (جدول ۱) آغاز گردید. به منظور بهینه سازی شرایط PCR و به دست آوردن دمای اتصال (annealing) مناسب، PCR در دماهای متفاوت انجام شد که بهترین دما با توجه به باند مشاهده شده روی ژل آگاروز انتخاب گردید. محصول PCR در کنار نشانگر DNA^{۱۵} بر روی ژل ۱٪ الکتروفورز گردید.

است (۳) این آنتی ژن ها اگر چه در بدن انسان به طور طبیعی تولید می شوند، اما به دلیل مصون بودن و دور از دسترس بودن بافت های جنسی از سیستم ایمنی بسیار ایمونوژنیک بوده و در نتیجه قابلیت استفاده به عنوان واکسن های توموری را دارا می باشند (۹).

از جمله مهم ترین کنسر تستیس آنتی ژن ها خانواده MAGE می باشد. اولین کنسر تستیس آنتی ژن شناسایی شده MZTE بود که امروزه آن را MAGEA1 می نامند که اولین بار در سال ۱۹۹۱ توسط مولکول MHC ارائه شده در سطح سلول های T سایتولیتیک در سطح سلول های ملانوم تشخیص داده شد (۱۹). پس از آن اعضای خانواده MAGE نیز از طریق هومولوژی با سکانس MAGEA1 شناسایی شدند (۲).

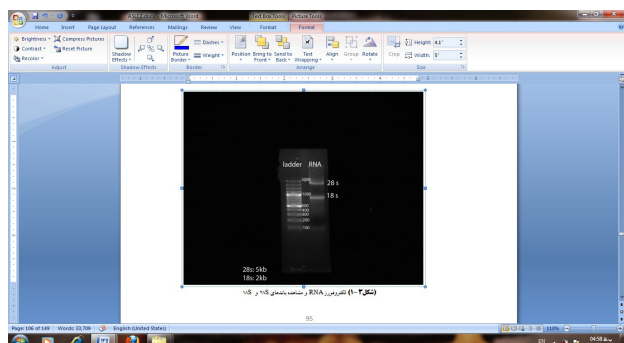
از اعضای مهم خانواده MAGE ژن MAGEA4 می باشد. این ژن در سال ۱۹۹۴ توسط پلن^۳ و همکارانش با استفاده از لنفوسیت های T سایتولیتیک در ملانومای انسانی شناسایی شد (۵). ناحیه انتهایی C^۴ از این ژن بخش فعال این ژن در فعل و انفعالات سلولی است (۱۸). این بخش بطور موثری با فاکتورهای دخیل در فرایند رونویسی در سلول نظیر HDAC^۵ و SNW^۶ میانکنش داده و در ارتباط است (۸). این ژن می تواند نقش انکوژن داشته باشد که این عمل را از طریق بلوک کردن پروتئین p21 اعمال می کند. بخش انتهایی C این پروتئین می تواند از طریق اتصال به فاکتور رونویسی PIAS^۷ موجب مهار رونویسی از ژنهای هدف شود (۱۵). این ناحیه در القا عمل آپوپتوزیس از طریق p53^۸ نیز ایفای نقش می کند. این ژن توانایی اتصال به پروتئین اسکایپ^۹ را داشته که از این طریق به DNA متصل شده و موجب القا یا سرکوب رونویسی ژن های مربوطه می شود. از جمله مسیرهای پیام رسانی سلولی که این ژن می تواند در آن موثر باشد می توان به مسیر های تولید ویتامین D، رتینوئیک اسید، گلوکورتیکوئیدها و نیز مسیر پیام رسانی ناچ^۹ اشاره کرد. هم چنین این ژن به انکوپروتئین گانکرین متصل شده و آن را فعال می کند (۱۲).

بیان این ژن در سرطان های مختلف از جمله سرطان ریه، مری، سر و گردن و بیماری هوچکین دیده شده است (۱۰). با این وجود عملکرد این ژن در سرطان های مختلف مشخص

۱۰	Trizol
۱۱	National Center for Biotechnology Information
۱۲	Coding region
۱۳	BLAST
۱۴	GeneBank
۱۵	DNA Ladder

۳	Pleam
۴	C-termina
۵	Histone deacetylase 1
۶	SNW domain-containing protein 1
۷	protein inhibitor of activated STAT, 2
۸	splicing-associated c-Ski-interacting protein
۹	Notch

روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و پس از مشاهده باندهای S₁₈ و S₂₈ جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. (شکل ۱)



(شکل ۱) الکتروفورز RNA و مشاهده باندهای S₂₈ و S₁₈

پرایمرهای مورد استفاده:

از آنجا که هدف کلونینگ کامل قطعه ژنی می باشد، پرایمرها به نحوی طراحی می شود که پرایمر بالادست^{۱۶} قبل از کدن آغازین است و جایگاه پرایمر پایین دست^{۱۷} بعد از کدن پایانی است. هم چنین به منظور کلونینگ این ژن در پلاسמיד بیانی، پرایمرها باید به گونه ای طراحی شوند که دارای جایگاههای برش آنزیمی باشند که آن جایگاه ها عیناً در جایگاه کلونینگ^{۱۸} پلاسמיד مورد نظر نیز وجود داشته باشند، وجود جایگاه های برش موجب میشود که بتوانیم قطعه کامل ژن MAGEA۴ را از پلاسמיד pTZ۵۷R جداسازی و در پلاسמיד pRUF که دارای جایگاه های برش آنزیمی مشابه است ساب کلون نماییم. طبق بررسی های صورت گرفته و بررسی جایگاه های آنزیمی مشابه در هر دو پلاسמיד pTZ۵۷R و pRUF، در پرایمر بالادست جایگاه برش آنزیمی (GGATCC) BamH۱ و در پرایمر پایین دست جایگاه برش (CTCGAG) Xho۱ قرار داده شد. پرایمر های مورد استفاده پس از طراحی پرایمر در (جدول ۲) نشان داده شده است.

پرایمر بالادست	5'- CCAGGATCCCTGTGAGGAGT - 3'
پرایمر پایین دست	5'- CATGTTACTCGAGGCAAGGGA - 3'

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR

تکثیر قطعه مورد نظر جهت انجام کلونینگ:

قطعات مورد نظر برای ژن MAGEA۴ با سایز ۱۲۰۸ bp

Forward Primer	۱۶
Reverse Primer	۱۷
Multi cloning site	۱۸

Stage	Temp.	Time	No.cycle
Hot start	۹۵°C	۵min	۱
Cycle	Denaturation	۹۴°C	۳۰s
	Annealing	۵۸°C	۳۰s
	Extention	۴۵°C	۴۵s
Final extention	۷۲°C	۷min	۱

جدول ۱

کلونینگ ژن MAGEA۴ در وکتور pTZ۵۷R:

محصول PCR توسط کیت استخراج پلاسמיד از شرکت Invitex تخلیص گردید و مطابق دستورالعمل کیت T/A Cloning (فرمنتاز) در وکتور خطی pTZ۵۷R کلون شد. سویه E.coli Top۱۰ با روش بیوشیمیایی کلرید کلسیم جهت پذیرش وکتور نو ترکیب مستعد گردید سپس بر روی محیط حاوی آمپی سیلین کشت داده شد.

کلونی-PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی:

۱۸ الی ۲۴ ساعت پس از پایان ترانسفورم، کلونی های منفرد روی پلیت به طور مجزا برداشته شد و در ۵ میلی لیتر محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کشت داده و در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از حدود ۱۶ ساعت ساعت استخراج پلاسמיד از باکتری های کشت داده شده انجام گرفت. در صورت وجود قطعه ژنی مورد نظر در پلاسמיד نو ترکیب این قطعه از طریق پرایمرهای طراحی شده قابل تکثیر است در نتیجه بر روی پلاسמידهای استخراج شده PCR جهت مشاهده باند مربوطه انجام شد. از برش آنزیمی BamH۱ و Xho۱ جهت تایید پلاسמידهای نو ترکیب استفاده کرده و در نهایت از تعیین توالی توسط شرکت کیژن جهت تایید نهایی پلاسמיד حاوی قطعه مورد نظر استفاده شد.

ساب کلونینگ ژن MAGEA۴ در وکتور بیانی pRUF:

ژن MAGEA۴ توسط دو آنزیم BamH۱ و Xho۱ از وکتور نو ترکیب pTZ۵۷R/MAGEA۴ جدا شده و در وکتور بیانی pRUF هضم شده با آنزیم های مذکور ساب کلون و در سلول های مستعد E.coli Top۱۰ ترانسفورم و روی محیط حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. صحت انجام کلونینگ از طریق PCR بر روی کلنی های شسته شده حاوی پلاسמיד نو ترکیب و هضم آنزیمی توسط دو آنزیم BamH۱ و Xho۱ صورت پذیرفت.

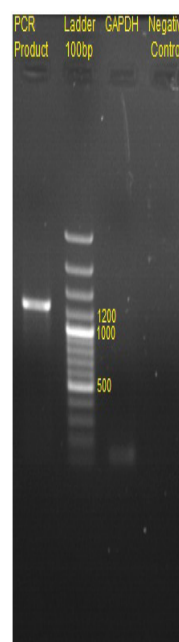
یافته ها:

استخراج RNA:

جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده ul۱ از RNA را بر

نوکلوتیدو با استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase تکثیر

شد. (شکل ۲)

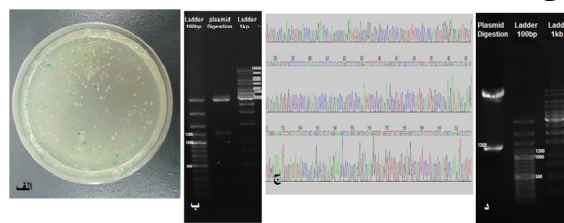


(شکل ۲) الکتروفورز محصول RT-PCR بر روی ژل آگارز و مشاهده باند

MAGEA۴ ژن ۱۲۰۸ bp

کلونینگ:

قطعه ژنی ۱۲۰۸bp استخراج شده از ژل در پلاسمید pTZ۵۷R کلون شد، کلنی های نو ترکیب بر روی محیط کشت به رنگ سفید رشد کرده (شکل ۳- الف) از طریق برش آنزیمی توسط ۲ آنزیم BamHI و XhoI وجود قطعه ژنی در پلاسمید pTZ۵۷R مورد تایید قرار گرفت (شکل - ب) و تعیین توالی جهت وجود قطعه مورد نظر تایید شد. (شکل - ج) پس از ساب کلون در پلاسمید pRUF جهت تایید وجود ژن در این پلاسمید از برش آنزیمی استفاده گردید. (شکل - د)



شکل ۳: الف: پلیت حاوی کلنی های سفید/آبی ب: هضم آنزیمی پلاسمید های pTZ۵۷ R/T نو ترکیب حاوی ژن MAGEA۴ توسط دو آنزیم BamHI و XhoI جهت تایید وجود ژن در این پلاسمید ج: نتیجه تعیین توالی پلاسمید های pTZ۵۷ R/T نو ترکیب حاوی ژن MAGEA۴ توسط پرایمرهای M۱۳ د: برش آنزیمی پلاسمید pRUF توسط دو آنزیم BamHI و XhoI جهت تایید وجود ژن در این پلاسمید

بحث:

با توجه به مطالعه جهانی در زمینه سرطان، افزایش این بیماری در جهان مشاهده گردیده است به طوری که میزان شیوع با افزایش جمعیت و افزایش سن در ارتباط است، ۵۶٪ موارد ابتلا به سرطان منجر به مرگ می شود (۷). در بیماری سرطان نیز مانند دیگر بیماری ها شناسایی آنتی ژن های سلول های سرطانی حائز اهمیت است. شناسایی این آنتی ژن ها نه تنها در درمان بیماری بلکه تشخیص زود به هنگام سرطان کمک شایان ذکری خواهد کرد (۱).

از جمله این آنتی ژن ها کنسر تستیس آنتی ژن ها می باشند. بیان این دسته از آنتی ژن ها در سلول های جرم لاین انسانی چون سلول های بیضه و تخمدان و انواع مختلفی از سرطان هادیده شده در حالی که بیان آن ها در سلول های نرمال کمتر از ۱٪ می باشد (۱۶).

از جمله مهم ترین کنسر تستیس آنتی ژن ها مربوط به خانواده MAGE می باشد. ژن MAGEA۴ از اعضای خانواده MAGE یکی از ژن های مهم دخیل در فرایند گامتوژن است (۱۳). بیان و نقش این ژن در سرطان های مختلف مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

بیان بالایی از ژن MAGEA۴ در افراد مبتلا به سرطان دهان مشاهده شده است. یافته هادر این سرطان نشان داده است که محصول این ژن به پروتئین گانکرین توموری متصل شده و ایجاد یک اثر بی ثباتی بر روی پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) می کند. اتصال گانکرین به pRb موجب افزایش فسفریلاسیون و به دنبال آن رهاسازی فاکتور رونویسی E2F که به نوبه خود موجب فعال شدن سنتز DNA و ورود به سیکل سلولی خواهد شد. علاوه بر این بیان این ژن با تخریب P۵۳ موجب محدود شدن آپوپتوز می شود (۱۱).

در مطالعات انجام شده در سرطان کبد نشان داده شد که ژن MAGEA۴ از طریق نیمه دوم ناحیه C-terminal با گانکرین کبد که یک انکو پروتئین است و به تازگی شناسایی شده است واکنش داده و فعالیت انکوژنی را مهار می کند. هم چنین از طریق القا P۵۳ موجب القا آپوپتوز می شود (۱۲).

از آنجایی که بیان ژن MAGEA۴ در افراد مبتلا به سرطان ریه بالا بود، طی کلونینگ و بیان این ژن در رده سلولی ریوی نشان داده شد که این ژن در القا آپوپتوز نقش دارد و هم چنین پروتئین آن دارای نقش مهارکننده رشد تومور است (۱۴). در کل بیان این ژن در سرطان های مختلف از جمله سرطان

ریه، مری، سر و گردن و بیماری هوچکین دیده شده است (۱۰). علی رغم آنالیزهای بیانی مختلف صورت گرفته از این ژن در سرطانهای مختلف، هنوز نقش این پروتئین در روند سرطانیایی مشخص نشده است. در نتیجه به منظور بررسی نقش احتمالی این ژن در روند کارسینوژنز، کلونینگ و بیان این ژن از اهمیت پایه ای برخوردار است. به طوری که در نهایت از طریق کلون کردن این ژن در یک پلاسمید بیانی قادر به تولید پروتئین نوترکیب خواهیم بود که به نوبه خود نقش بسزایی در حیطه سرطان بالاخص پیشگیری و درمان این بیماری خواهد داشت. در این مطالعه شناسایی ژن MAGEA۴ از طریق پرایمرهای اختصاصی در بافت بیان کننده ژن صورت گرفت. نکته حائز اهمیت در انجام PCR طراحی پرایمر است، به منظور شناسایی اختصاصی ژن مورد نظر است بدین منظور پرایمرها به گونه ای طراحی شد که توانایی شناسایی ناحیه کدینگ^{۱۹} ژن MAGEA۴ را داشته باشد. این ژن دارای ۴ رونشت می باشد که از این بین با توجه به مطالعات صورت گرفته رونوشت حائز اهمیت جهت مطالعه رونوشت ۴ این ژن می باشد. پرایمرها باید به گونه ای طراحی می شدند که پرایمر بالادست در قبل از کدون آغازین و پرایمر پایین دست پس از کدون پایانی قرار گیرند، هم چنین دارای جایگاه های برش آنزیمی باشند به طوری که این جایگاه ها در هر دو پلاسمید مورد استفاده وجود داشته باشد بدین منظور جایگاه برش آنزیمی BamH۱ در پرایمر بالادست و Xho۱ در پرایمر پایین دست تعبیه شد. در نتیجه با توجه به طراحی پرایمر برای ناحیه کدینگ ژن مورد نظر از طریق استخراج RNA از بافت بیان کننده ژن MAGEA۴ و انجام PCR ژن MAGEA۴ را به صورت کامل تکثیر و به وکتور همسانه سازی pTZΔYR/T کلون و توسط برش آنزیمی و ترادف یابی صحت کلونینگ در این پلاسمید تایید شد. سپس ساب کلونینگ ژن MAGEA۴ در پلاسمید بیانی MLV (pRUF) صورت گرفت و تایید نهایی ژن MAGEA۴ انجام گردید.

نتیجه گیری :

از طریق کلونینگ و بیان این ژن در سلول هدف می توان به عملکرد آن پی برد. علاوه بر آن از طریق کلونینگ این ژن قادر به تولید پروتئین نوترکیب MAGEA۴ خواهیم بود.

تولید پروتئین نوترکیب گام مهمی در تشخیص زود به هنگام و درمان سرطان خواهد بود به طوری که می توان از این طریق واکسن های ضد تومور جهت درمان انواع سرطان ها را تهیه کرد. برای نمونه موفق به تولید واکسن هایی شدند که دارای پروتئین نوترکیب MAGEA۴ بوده و در دمان سرطان روده از

آن استفاده کردند (۱۷). هم چنین از این نمونه از واکسن ها در درمان بیماری هوچکین نیز بهره بردند (۴).

در بیماری سرطان تشخیص زود به هنگام بیماری کمک شایانی در روند درمان بیماری خواهد کرد، به طوری که امروزه از مارکر های مختلف تشخیصی چون CA۱۵-۳ جهت تشخیص سرطان پستان، CA۱۲۵ جهت تشخیص سرطان تخمدان، CA۱۹-۹ جهت تشخیص سرطان پانکراس و غیره استفاده می شود. در نتیجه استفاده از این آنتی ژن MAGEA۴ به عنوان یک مارکر تشخیصی مورد توجه و حائز اهمیت است. به طوری که از طریق تولید پروتئین نوترکیب MAGEA۴ می توان از آن به عنوان آنتی ژن در تست های آزمایشگاهی چون تست الایزا جهت تشخیص آنتی بادی علیه این آنتی ژن در سرم افراد مبتلا بهره برد.

هم چنین از طریق پی بردن به عملکرد دقیق این ژن می توان از طریق سرکوب یا القا بیان این ژن مانع از گسترش بیماری سرطان شد. به طوری که چنانچه بیان این ژن در سرطان موجب القا متاستاز شود از طریق خاموش کردن این ژن مانع از گسترش سرطان شویم و اگر موجب القا آپوپتوز شود از طریق افزایش بیان این ژن موجب از بین رفتن سلول های سرطانی شویم.

مطالعه حاضر گام مهمی جهت تولید پروتئین نوترکیب و استفاده از آن جهت پی بردن به عملکرد این ژن و اهداف درمانی می باشد. به طوری که این پروتئین نوترکیب را می توان در تولید واکسن علیه سرطان های مختلف و به عنوان آنتی ژن تشخیصی جهت تشخیص زود به هنگام سرطان به کار برد.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از بخش ژنتیک انانی پژوهشکده بوعلی مشهد که طی تمامی مراحل آزمایش با تمام وجود همکاری لازم را داشته کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

1. Anand, P., A. B. Kunnumakkara, et al. "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes." 2008, *Pharm Res* 25(9): 2097-2116.
2. Bertoni, F., A. Conconi, et al, "Immunoglobulin heavy chain genes somatic hypermutations and chromosome 11q22-23 deletion in classic mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research.", *Br J Haematol* 124(3): 2004, 289-298..
3. Caballero, O. L. and Y. T. Chen (2009). "Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy." *Cancer Sci* 100(11): (2009), 2014-2021.
4. Cruz, C. R., U. Gerdemann, et al. "Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4." *Clin Cancer Res* 17(22): 2011, 7058-7066.
5. De Plaen, E., K. Arden, et al. "Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family." *Immunogenetics* 40(5): 1994, 360-369.
6. Ghafouri-Fard, S. and M. H. Modarressi. "Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy." *Arch Iran Med* 12(4): 2009, 395-404.
7. Jemal, A., F. Bray, et al. "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* 61(2): 2011, 69-90.
8. Laduron, S., R. Deplus, et al. "MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription." *Nucleic Acids Res* 32(14): 2004, 4340-4350.
9. Modarressi, M. H. "Potential of cancer-testis antigens as targets for cancer immunotherapy." *Bridging Cell Biology and Genetics to the Cancer Clinic*, 2011. 978-81-7895-518-6: 83-98.
10. Monji, M., S. Senju, et al. "Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system." *Biochem Biophys Res Commun* 294(3): 2002, 734-741.
11. Muller-Richter, U. D., A. Dowejko, et al.. "Analysis of expression profiles of MAGE-A antigens in oral squamous cell carcinoma cell lines." *Head Face Med* 5: 2009, 10.
12. Nagao, T., H. Higashitsuji, et al. "MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity." *J Biol Chem* 278(12): 2003, 10668-10674.
13. Ohkuri, T., D. Wakita, et al. "Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells." *Br J Cancer* 100(7): 2009, 1135-1143.
14. Peikert, T., U. Specks, et al. "Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis." *Cancer Res* 66(9): 2006, 4693-4700.
15. Sakurai, T., K. Itoh, et al. "A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells." *J Biol Chem* 279(15): 2004, 15505-15514.
16. Simpson, A. J., O. L. Caballero, et al. "Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer." *Nat Rev Cancer* 5(8): 2005, 615-625.
17. Takahashi, N., T. Ohkuri, et al. "First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen." *Cancer Sci* 103(1): 2012, 150-153.
18. Taniura, H., M. Kobayashi, et al. "Functional domains of necdin for protein-protein interaction, nuclear matrix targeting, and cell growth suppression." *J Cell Biochem* 94(4): 2005, 804-815..
19. van der Bruggen, P., C. Traversari, et al. "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* 254(5038): 1991, 1643-1647.