



مقاله پژوهشی

طراحی سازه بیانی حاوی ژن دیس اینتگرین شناسایی شده از ترانسکریپتوم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس و بررسی عملکرد آن در مدل بروون تنی

سحر ابوالقاسمی^{۱*}، مهدی بهدانی^۱، فاطمه کاظمی لمعه‌دشت^۱

۱. آزمایشگاه نوم و بیومولکول های درمانی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انتیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پذیرش: ۷ خرداد ۱۴۰۳

دریافت: ۱۴ فروردین ۱۴۰۳

چکیده

زمینه و هدف: چسبندگی سلول نقش مهمی در تهاجم سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند. دیس اینتگرین‌ها ابزار درمانی مناسبی برای سرطان محسوب می‌گردد. هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ژن دیس اینتگرین شناسایی شده از ترانسکریپتوم زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در میزان باکتریایی و بررسی عملکرد آن در مدل بروون تنی می‌باشد.

روش‌ها: در ابتدا ساختارهای اول، دوم و سوم پروتئین دیس اینتگرین با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت. سپس ژن سنتز و در وکتور pET-22b pKLON شد. سازه بدست آمده به میزان باکتری اشريشيا کلاي BL-21 ترانسفورم شد. بیان پروتئین توسط نیم میلی مولار ایزوپروپیل- بتا-D-تیوگالاکتوپیرانوسید القا شد. بیان با استفاده از ژل سدیم دودسیل سولفات‌پلی اکریل آمید و سترن بلات بررسی و تایید شد. پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل در شرایط دناتوره خالص‌سازی شد. پس از خالص‌سازی، پروتئین با حذف تدریجی اوره از طریق دیالیز دوباره تا شد. پس از بیان پروتئین و خالص سازی، اثر مهاری دیس اینتگرین بر بقا و مهاجرت رده‌های سلولی HUVEC به ترتیب با استفاده از روش MTT و Transwell مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج تجزیه و تحلیل ساختاری نشان داد که ساختار پیش‌بینی شده دیس اینتگرین ویژگی‌های معمولی را نشان می‌دهد و با الگوهای ساختاری مورد انتظار مشاهده شده در پروتئین‌های دیس اینتگرین مطابقت دارد. بالاترین سطح بیان پروتئین با غلظت ایزوپروپیل- بتا-D-تیوگالاکتوپیرانوسید ۵/۵ میلی مولار و انکوباسیون ۵ ساعتی مشاهده شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده تقریباً ۱۲ کیلو دالتون بود. دیس اینتگرین رشد سلول‌های HUVEC را با ۳۷ IC₅₀ میکروگرم در میلی لیتر پس از یک دوره انکوباسیون ۴۸ ساعتی مهار کرد. علاوه بر این، دیس اینتگرین خالص شده، مهاجرت ۷۰ درصد از سلول‌های HUVEC را به سمت منبع فاکتور رشد اندوتیلیای عروقی، در مقایسه با گروه کنترل بدون دیس اینتگرین، مهار کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از پتانسیل دیس اینتگرین در مهار رشد و مهاجرت سلول‌های اندوتیلیال انسان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ترانسکریپتوم، دیس اینتگرین، عقرب همیسکورپیوس لپتوروس

مقدمه

سرطان، آرتربیت، ترومبوز، مالتیپل اسکلروزی، درد، اختلالات عصبی-عضلانی، خون و اختلالات قلبی و عروقی، عفونت‌ها و بیماری‌های التهابی، مورد استفاده قرار گیرد. سم مار شامل همو توکسین، کاردیوتوكسین، سایوتوتوكسین، نوروتوكسین، فاکتورهای رشد عصبی، کاتیون‌های معدنی مانند (روی، کلسیم، پتاسیم، سدیم و منیزیم)، فسفولیپاز A2، سم سلول‌ها

در سال‌های اخیر، گزارشات متعددی درخصوص خواص انقادی، ضد توموری و ضد سرطانی سمهای زیستی ارائه شده است [۱]. زهر جانوران سمی مخلوطی پیچیده از آنزیم‌ها، پپتیدها، کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم با فعالیت‌های بیولوژیکی و شیمیایی خاص است [۲]. به طور مثال، ترکیباتی از زهر مارها می‌تواند در درمان

$\alpha 1\beta 1$ و $\alpha v\beta 3$ را شناسایی کند [۱۱]. در این مطالعه ساختارهای اول و دوم و سوم دیس اینتگرین شناسایی شده از ترانسکرپتوم غده زهر عقرب همیسکورپیوس لپتروس^{۱۳} با کمک بیوانفورماتیک شناسایی شد. ژن دیس اینتگرین درون میزبان باکتریایی کلون و بیان گردید و عملکرد آن در مدل برون تنی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

رده سلولی HUVEC (NCBI code: C554) از بانک سلولی انسستیتو پاستور ایران تهیه گردید. محیط کشت DMEM^{۱۴} و سرم جنین گاوی از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد. آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین/استرپتومایسین از شرکت Gibco خریداری شد. معروف MTT (۳ و ۴ و ۵ دی متیل تیازول ۲- ۵ دی فنیل ترازاولیوم بروماید) از شرکت سیگما خریداری شد.

بررسی ساختارهای اول و دوم و سوم

دیس اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتروس^{۱۵} از مطالعه ترانسکرپتوم غده زهر عقرب شناسایی گردید [۱۲]. ابتدا یک همترازی بین توالی دومین دیس اینتگرین شناسایی شده با سایر دیس اینتگرین‌ها انجام گرفت. سپس پارامترهای مختلف ساختار اول دیس اینتگرین مانند وزن مولکولی، ترکیب اسید‌آمینه‌ای، نقطه ایزوکتریک، نیمه‌عمر و پایداری پروتئین مورد بررسی قرار گرفت [۱۳]. ساختار دوم پروتئین با کمک (PSIPRED)^{۱۶} مورد بررسی قرار گرفت [۱۴]. ساختار سه بعدی و عملکردی بودن پروتئین با کمک سور آنالاین SWISS MODEL مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت ساختار پیش‌بینی شده با کمک (ProSA-web) مورد بررسی قرار گرفت [۱۵].

سترن ژن

توالی نوکلئوتیدی دیس اینتگرین عقرب درون وکتور pET-22b⁺ بین آنزیم‌های محدود‌الاثر XhoI و NdeI توسط

^{۱۳} *Hemiscorpius lepturus*

^{۱۴} Dulbecco's Modified Eagle Medium

^{۱۵} *Hemiscorpius lepturus*

^{۱۶} PSI-blast based secondary structure PREDiction

کروتوکسین، ال آمینو اسید اکسیدازها، لکتین‌ها، متالوپروتئین‌ها، دیس اینتگرین‌ها، و هیالورونیدازها می‌باشد [۳]. در خانواده اسکورپیونیده^۱ عقربی با نام علمی همیسکورپیوس لپتروس^۲ وجود دارد که اسمی کشنه دارد [۴]. دیس اینتگرین‌ها^۳ به اینتگرین^۴ روی سطح سلول متصل می‌شوند و تعداد زیادی از عملکردهای زیستی سلول را بلاک می‌کنند. این پروتئین‌ها به طور عمده در زهر جانوران سمی بویژه زهر مار خانواده ویپرا^۵ و کروتالیدا^۶ یافت می‌شوند [۵]. ویژگی دیس اینتگرین به موتیف^۷ تری‌پیتیدی واقع در حلقه بستگی دارد که به وسیله جفت باز سیستین تشکیل می‌شود. اکثر دیس اینتگرین‌ها یک تری‌پیتید موتیف آرژینین-گلایسین-آسپارتیک اسید هستند که به اینتگرین α IIb β 3 سطح پلاکت متصل می‌شوند [۶]. بعضی از دیس اینتگرین‌ها قادر هستند به اینتگرین β 3 و $\alpha v\beta 5$ و $\alpha v\beta 3$ روی سطح سلول بعضی از سلول‌های توموری متصل شوند و مهاجرت سلولی و متاباستاز را در انواع سلول‌های توموری مانند ریه و پستان و استخوان مهار کنند [۷]. گزارش شده است دیس اینتگرین نوترکیب که به گیرنده اینتگرین $\alpha v\beta 3$ و $\alpha v\beta 5$ یا به $\alpha v\beta 3$ متصل می‌شود خواص ضد رگزایی دارد [۸]. اولین دیس اینتگرین شناخته شده زهر تریگرامین^۸ از زهر تریمرسروس گرامینوس^۹ است که به عنوان یک مهارکننده رقابتی اتصال فیرینوژن به اینتگرین $\alpha v\beta 3$ پلاکت (که توسط آذوین دی سفقات فعال می‌شود) عمل می‌کند [۸]. پس از این تعداد دیگری از دیس اینتگرین‌ها از زهر مارهای مختلف دیگر جدا شد [۹]. ساترروانت^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که دیس اینتگرین نوترکیب کلون شده از زهر مار کروتالوس ادامانتوس^{۱۱} که حاوی موتیف آرژینین-گلایسین-آسپارتیک اسید است دارای اثر خدمتجمع پلاکتی قوی می‌باشد [۱۰]. اولین دیس اینتگرین جداسده از زهر عقرب بوتوس اسیتانوس توتنانوس^{۱۲} قادر است اینتگرین‌های

^۱ Scorpionidae

^۲ *Hemiscorpius lepturus*

^۳ Disintegrin

^۴ Integrin

⁵ Vipera

⁶ Crotalidae

⁷ Motif

⁸ Trigamin

⁹ *Trimeresurus gramineus*

¹⁰ Suntravat

¹¹ *Crotalus adamanteus*

¹² *Buthus occitanus tunetanus*

تخلیص شده با ژل پلی آکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات و وسترن بلاط انجام گرفت. سپس به منظور حذف لیپوبلی ساکاراید باقیمانده در محلول پروتئین، از روش شستشو با تراپتیون X-114²² استفاده گردید. محلول پروتئینی با تراپتیون X-114 درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ فورس جی سانتریفیوژ گردید.

بررسی سمیت سلولی

به منظور بررسی اثر دیس اینتگرین بر روی بقای رده‌ی سلولی HUVEC²³ از روش MTT Assay²⁴ استفاده شد. در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حدود ۱۰۴ سلول اضافه گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دارای دی‌اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM به همراه غلظت‌های مختلف دیس اینتگرین (۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد. از بافر فسفات به عنوان کنترل استفاده گردید. پلیت برای دو زمان متفاوت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در تاریکی انکوبه گردید. سپس جذب چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر (طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان رفرنس در نظر گرفته شد) قرائت گردید. این تست به صورت سه بار تکرار انجام گرفت و غلظتی از دارو که قادر به مهار تقسیم سلولی به میزان ۵۰ درصد بود (IC₅₀) بدست آمد. درصد مهار رشد با فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد مهار} = \frac{\text{میزان جذب چاهک‌ها در گروه تست}}{\text{میزان جذب چاهک‌ها در گروه کنترل}} \times 100$$

بررسی مهاجرت سلول‌های اندوتیال

اثر مهاری دیس اینتگرین بر روی مهاجرت سلول‌های HUVEC با روش Transwell assay مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها (۵۰۰ هزار سلول در میلی‌لیتر) در محیط کشت به همراه غلظت ۳٪ میکروگرم در میلی‌لیتر

²² Triton X-114

²³ Human umbilical vein endothelial cells

²⁴ 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)

شرکت ژن ری¹⁷ کانادا سنتز گردید. توالی متیونین و برچسب هیستیدینی به ترتیب در انتهای آمینی و انتهای کربوکسیلی سازه نهایی قرار گرفت. همچنین به منظور بیان در میزبان بیانی، بهینه‌سازی کدون توسط شرکت سازنده صورت گرفت.

بیان و تخلیص پروتئین

سازه سنتز شده به درون میزبان بیانی اشريشيا كلاي¹⁸ BL-21 با کمک شوک حرارتی و کلرید کلسیم ترانسفورم گردید. به منظور بیان پروتئین، یک تک کلون ترانسفورم شده از روی پلیت برداشته شد و به درون محیط کشت لوریا براث¹⁹ مایع (۵ میلی‌لیتر) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تلقیح گردید و تا رسیدن به فاز لگاریتمی (OD₆₀₀ ~ ۰.۰۶) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ انکوبه گردید. سپس بیان پروتئین با افزودن ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید نیم میلی‌مولاو و انکوباسیون به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد القا گردید. بیان با ژل پلی آکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات ایزوفلورین (۰:۵:۱) مورد بررسی قرار گرفت. کونتروگه با پراکسیداز (رقت ۱:۵۰۰) براحتی از بقایه بروکسین می‌گذرد. به منظور تخلیص پروتئین، بیان با شرایط ذکر شده در حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر صورت گرفت. رسوب باکتری‌ها با کمک سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ فورس جی به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری گردید. سپس بافر لیزکننده (نمک سدیم ۳۰۰ میلی‌مولاو، تراپتیون ایکس ۱۰۰ با غلظت ۰/۱ درصد، تریس‌اسید ۵۰ میلی‌مولاو) به رسوب باکتری‌ها اضافه گردید و برای ۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه پالس و ۳۰ ثانیه استراحت) سونیکه گردید. سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ فورس جی به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و انکلیوژن بادیها²⁰ با بافر شستشو حاوی اوره ۶ مولاو، شستشو داده شد و دوباره با همان دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل طبق روش شرکت سازنده صورت گرفت. برای با آرایی مجدد²¹ پروتئین دناتوره شده از روش حذف گردید. برای اوره با کمک دیالیز استفاده گردید. بررسی پروتئین

¹⁷ Generay

¹⁸ Escherichia coli

¹⁹ Luria Broth

²⁰ Inclusion bodies

²¹ Refolding

نتایج آنالیز ساختار سه بعدی نشان داد که ساختار سه بعدی پروتئین در محدوده نرمال (محدوده ای که ساختار سایر پروتئین های موجود در طبیعت با روش کریستالوگرافی و Z-score NMR مشخص گردیده است) و دارای -4.03 می باشد (شکل ۳ج).

بیان و تخلیص پروتئین

در شکل ۴ سازه طراحی شده به منظور سنتز درون وکتور pET-22b pET نشان داده شده است. نتایج بیان نشان داد که بهترین بیان پروتئین بعد از انکوباسیون ۵ ساعته و ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید نیم میلی مولار صورت گرفته است (شکل ۵الف). نتایج تخلیص پروتئین نیز حضور باند پروتئینی تقریبی ۱۲ کیلودالتون را نشان داد (شکل ۵ب). نتایج وسترن بلات نیز تایید کننده حضور برچسب هیستیدینی در پروتئین بیان شده بود (شکل ۵ج).

بررسی سمیت سلولی

نتایج سمیت سلولی نشان داد که با افزایش غلظت دیساینتگرین، تعداد سلول های زنده اندوتیال کاهش پیدا کرد. IC₅₀ برای دیساینتگرین به ترتیب ۵۰ و ۳۷ میکرو گرم در میلی لیتر برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون بدست آمد (نمودار ۱الف و ۱ب).

مهاجرت سلولی

نتایج تست مهاجرت سلولی نشان داد که دیساینتگرین اثر مهاری بر روی مهاجرت سلول های اندوتیال انسان به سمت فاکتور رشد دارد. دیساینتگرین در غلظت ۳۷ میکرو گرم در میلی لیتر و مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون توانسته بود از مهاجرت ۷۰ درصد سلول های اندوتیال به قسمت پایینی پلیت (که حاوی سرم جنین گاوی و فاکتور های رشد می باشد) جلوگیری کرد. از بافر فسفات به عنوان کنترل استفاده گردید (نمودار ۱ج).

بحث

باتوجه به اثرات مهاری دیساینتگرین روی سلول های سلطانی به نظر می رسد که این پروتئین ابزار بسیار مفیدی در فارماکولوژی و توسعه داروهای جدید ضدسرطان باشد [۱۶].

(غلظت IC₅₀ بدست آمده از نتایج MTT) از دیساینتگرین در قسمت بالایی پلیت اضافه گردید. همچنین در قسمت پایینی پلیت FBS^{۲۵} ده درصد اضافه گردید. از بافر فسفات به عنوان کنترل استفاده گردید. پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس سلول های مهاجرت کرده به قسمت پایینی پلیت با تریپسینه کردن^{۲۶} مورد شمارش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار پریسیم نسخه ۹ برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. نتایج با استفاده از آزمون تی^{۲۷} مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار (در هر گروه) \pm خطای معیار بیان شد.

یافته ها

آنالیز ساختارهای

توالی ناحیه دیساینتگرین و نتایج همترازی چندگانه در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج همترازی بین توالی دیساینتگرین عقرب همیسکورپیوس لیپتوروس و سایر دیساینتگرین ها در گونه های مختلف عقرب نشان داد که حدوداً ۴۰ الی ۷۰ درصد مشابهت بین توالی ها وجود دارد. بعد از افزودن متیونین و توالی هیس به ابتدا و انتهای ژن بررسی توالی نشان داد که ژن دیساینتگرین عقرب همیسکورپیوس لیپتوروس دارای ۲۶۱ نوکلئوتید و ۸۷ اسید آمینه می باشد. بررسی ساختار اول پروتئین نشان داد که پروتئین دیساینتگرین دارای وزن مولکولی پیش بینی شده حدود ۹۵۰/۸/۵۱ دالتون، نقطه ایزو الکتریک ۵/۸۰ و دارای نیمه عمر حدود ۱۰ ساعت در میزبان اشریشیا کلای، ۲۰ ساعت در مخمر و ۳۰ ساعت در شرایط برون تنی و شاخص آلفا تیک ۲۸/۰۵ می باشد. بررسی ساختار دوم پروتئین نشان داد پروتئین دارای دو ساختار مارپیچ آلفا و سه صفحه بتا می باشند (شکل ۲). بررسی ساختار سوم پیش بینی شده (شکل ۳الف) نیز نشان داد که ۹۶/۱۵ درصد از اسید آمینه ها در ناحیه مطلوب، ۲/۸۵ درصد در ناحیه مجاز و صفر درصد در ناحیه غیر مجاز بودند (شکل ۳ب). همچنین

²⁵ Fetal bovine serum

²⁶ Trypsinization

²⁷ T-test

ATGGAAGTTGGGAACAGTGTGATGCTGGCTAATTGGGAGTGAAGATAATGACCCATGTTGTGATACAAACTGCACCTT	
TAGAAAAAATGTCACATGCAGTGACAAGAATTCTCCTTGTGCGTGGATGCAAATACGTAAGGAAGGTGAAAATGCA	
GAGAGGCCAGCCAACAGCATGTAAAAGGAGGCACTTGTAECTGGGAGTCATCTGATTGCCCTCCTCACCTCAG	
CCT	
XP_023218512.1	EIGEECDCGSRESCSL LDPCCNPPGT-----NYECNLKEEMSCSFREGKCKEDCT
XP_023243347.1	---ETCDCGYDGK-ECSDKCCYP RDVKPYKL ANPNAERCTLRPGAH C PSQGPCCLPSCN
AM002515.1	EEGEQCDGSIEECLQSDPCCDP-----ITCKLRVEAECS--TGPCEE-NCK
XP_037602285.1	EEGEECDPGLL-H-LNNDRCCSA-----DCKFKRNAQCSDRNSPCCI-NCV
HemiDis	EVGEQCDAGLIGS-EDNDPCCDT-----NCFRKRVNTCSDKNSPCCR-GCK
AM002512.1	EEGEECDAGLIGS-EDNDPCCDT-----NCRLRPDVICSDKNAPCCR-DCR
XP_023216172.1	EEGEECDAGLIGS-EDNDLCCDT-----NCRLREGVICSDKNAPCCR-GCR
XP_023216169.1	EEGEECDAGLIGS-EDNDLCCDT-----NCRLREGVICSDKNAPCCR-GCR
	* *** * * ** * : * ** . ** . *
XP_023218512.1	LVPKVERRICFVNTPCRKEYALCDGISSYCP-----82
XP_023243347.1	FVKFGDMCRAE-AEC-TLSSFCNGRSAICPMSEPKP 90
AM002515.1	LKHAGHLCRPA-SEC-DIPEYCDGKVQCP-----73
XP_037602285.1	FELAGTRCQEPIINATC-KGISTCTGNSSKCPP-----74
HemiDis	YVKEGEKCREAQPTAC-KKEALCTGESSDCPPSSPQP 80
AM002512.1	LVREREVCREAQQTAC-KQEAHCNGESPDCCPPSSPQP 80
XP_023216172.1	LVQRREVCRAQPLAC-KQEAHCTGESPDCCPPSPAQP 80
XP_023216169.1	LVQRREVCRAQPLAC-KQEAHCTGESPDCCPPSPAQP 80
	* * * *

شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی و همترازی چندگانه بین توالی‌های دیس اینتگرین. همانطور که نشان شده است، توالی دیس اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس با سایر دیس اینتگرین‌ها (دومین دیس اینتگرین در ADAM پروتئین‌ها) بین ۴۰ الی ۷۰ درصد مشابهت دارد. HemiDis: دیس اینتگرین شناسایی شده از ترانسکریپتوم عقرب همیسکورپیوس لپتوروس. شناسه توالی‌ها به شرح زیر می‌باشد:

AM002512.1: ADAM 17-like protein [Tityus serrulatus]

XP_023216172.1: ADAM 17-like protease isoform X5 [Centruroides sculpturatus]

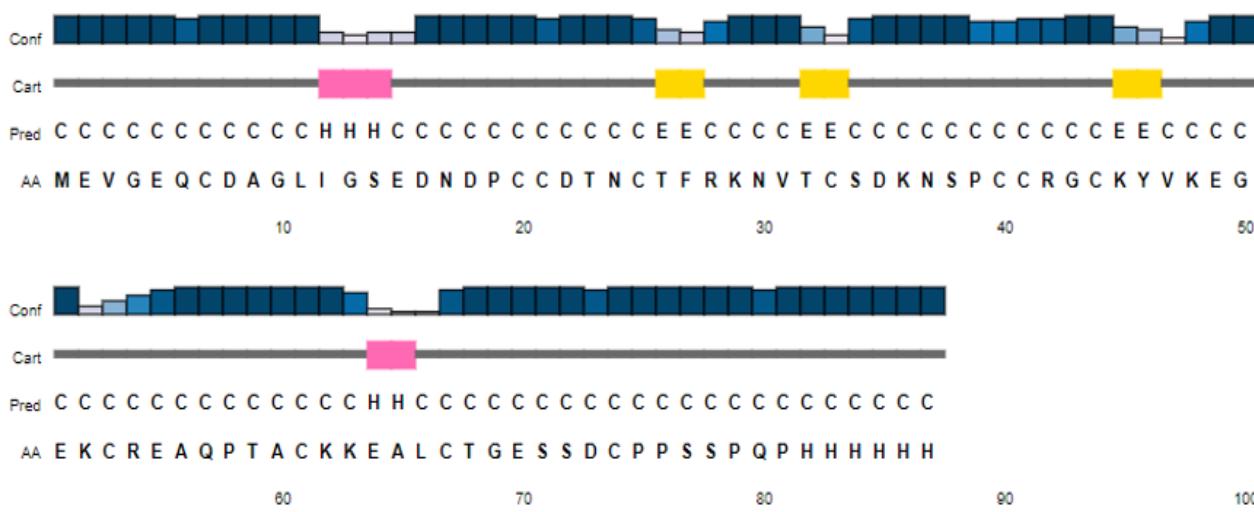
XP_023216169.1: ADAM 17-like protease isoform X2 [Centruroides sculpturatus]

XP_037602285.1: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17-like isoform X1 [Sebastes umbrosus]

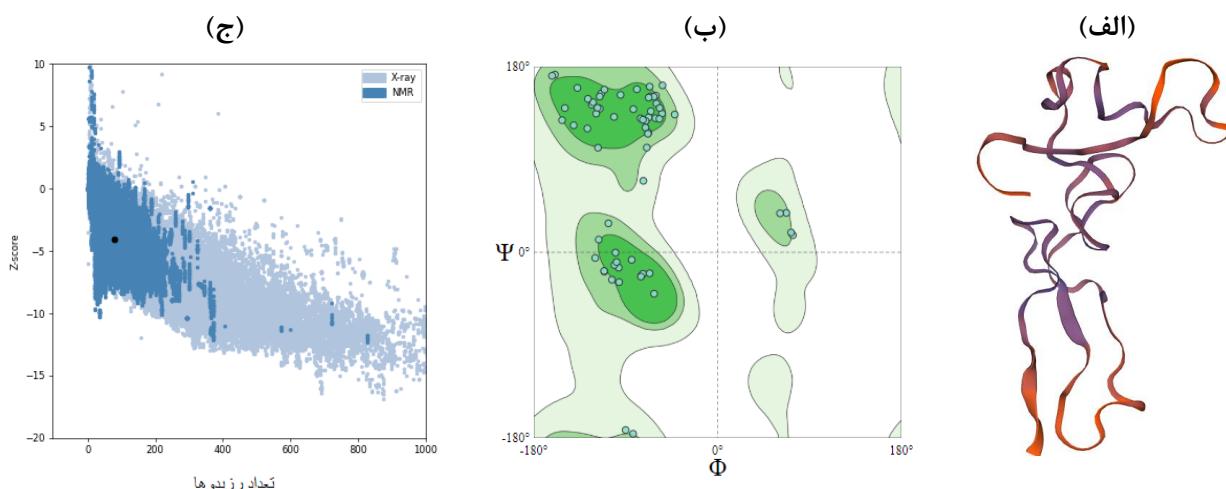
XP_023243347.1: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10-like [Centruroides sculpturatus]

AM002515.1: disintegrin and metalloproteinase 3, partial [Tityus serrulatus]

XP_023218512.1: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10-like [Centruroides sculpturatus]



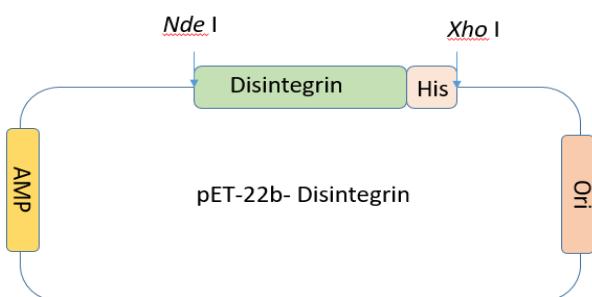
شکل ۲- بررسی ساختار دوم پروتئین دیس اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس با کمک PSIPRED. آنالیز ساختار دوم پروتئین نشان داد که از بین اسید امینه پروتئین دیس اینتگرین، ۵ اسید امینه دارای ساختار هلیکس، ۶ اسید امینه دارای ساختار رشته و ۷۶ اسید امینه دارای ساختار کوبیل می‌باشد.



شکل ۳- ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده با سرور سویس مدل (الف) و نمودار راماچاندران (ب). درصد اسید‌آمینه‌ها در ناحیه غیرقابل قبول صفر درصد می‌باشد. آنالیز ساختار سه بعدی با پروساوب (ج). بررسی ساختار سوم پیش‌بینی شده نشان داد که ساختار سه بعدی در محدوده نرمال ($Z\text{-score} = -4.03$) می‌باشد.

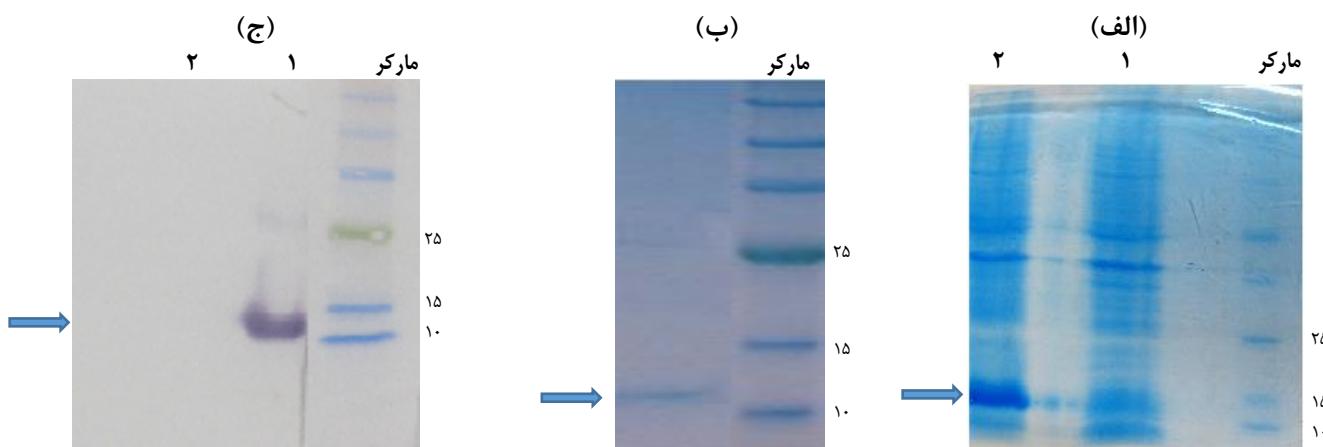
می‌کند [۱۸]. مطالعات ذکر شده براساس جداسازی پروتئین‌ها بدست‌آمده از زهر خام با روش‌های کروماتوگرافی و طیف‌سنجی می‌باشد [۱۹، ۲۰]. درنتیجه، تنها فعالیت بیولوژیکی این پروتئین‌ها و پیتیدها در اختیار قرار می‌گیرد و به منظور مطالعات بیشتر نیاز به توالی کامل این پروتئین‌ها شناخته شده و سایر پروتئین‌های ناشناخته موجود در غده زهری عقرب همیسکورپیوس می‌باشد. از طرفی، با مطالعات پروتومیکی^{۳۱} قادر به شناسایی بخشی از اجزای زهر که با غلظت بسیار پایینی در زهر توtal وجود دارند نمی‌باشیم [۲۱، ۲۲]. از این‌رو آنالیز ترانسکریپتوم غده‌ی زهر با تکنولوژی

همین موضوع سبب شد در این تحقیق دیسایتگرین زهر عقرب مورد توجه قرار گیرد و این زن از زهر عقرب جداسازی و با موفقیت کلون و بیان گردد تا در تحقیقات بعدی عملکرد این پروتئین روی سلول‌های سرطان مورد ارزیابی قرار گیرد. زهر عقرب مخلوطی پیچیده از مواد دارویی فعال است که شامل پلی‌پیتیدهای آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. پروتئین‌ها و پیتیدها حدود ۹۰ درصد وزن خشک زهر را تشکیل می‌دهند که این پلی‌پیتیدها می‌توانند سمی یا غیرسمی باشند [۲۷]. کشف مولکول‌ها با پتانسیل دارویی از منابع طبیعی یکی از موارد با اهمیت بشمار می‌رود. از طرفی، به علت شکستهای پی‌درپی در درمان سرطان، تلاش‌ها در جهت یافتن داروی مناسب‌تر و کاراتر همچنان ادامه دارد. با کلونینگ و بیان زن دیسایتگرین زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس امید می‌رود بتواند به عنوان کاندیدای پیشنهادی با پتانسیل دارویی معرفی گردد. اولین مولکول شناسایی شده از زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس^{۲۸}، پیتید همی‌کلسین^{۲۹} می‌باشد که یک پیتید نوروتوکسیک بوده و ۶ درصد از وزن کل زهر خام را تشکیل داده و از ۳۳ اسید‌آمینه تشکیل می‌شود و وزن مولکولی آن حدود ۴ کیلو Dalton می‌باشد. این پیتید کانال‌های کلسیم حساس به راینوداین^{۳۰} (RyR1) را در غلظت ۴۰ نانومولار مهار گردیده است.



شکل ۴- سازه نهایی حاوی زن دیس ایتگرین به منظور سنتز و کلونینگ درون و کنترل pET-22b. همانطور که در شکل نشان داده شده است زن دیس ایتگرین بین آنزیم‌های محدود‌الاثر *Nde* I و *Xho* I کلون گردیده است.

³¹ Proteomics



شکل ۵- نتایج بیان پروتئین. (الف): ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات ۱۵ درصد با کوماسی بلورنگ آمیزی شده است. ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط احیا با ۲ مرکاپتو اتانول انجام شده است. مارکر پروتئین، ستون ۱: نمونه قبل از القا با ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید و ستون ۲ نمونه بعد از القا با ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید می باشد. بیان پروتئین در ستون ۲ در محدوده ۱۲ کیلو دالتون مشاهده گردید. نتایج تخلیص پروتئین با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل. (ب): ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات بعد از تخلیص با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل. (ج): وسترن بلاط با آنتی بادی علیه برچسب هیستیدینی انجام شده است. مارکر پروتئین، ستون ۱: پروتئین تخلیص شده. ستون ۲: کترل منفی. پروتئین تخلیص شده در ستون ۲ در محدوده ۱۲ کیلو دالتون مشاهده گردید.

می کنند. این پروتئین ها به طور عمده در زهر جانوران سمی به ویژه زهر مار یافت می شوند [۵].

دیس ایتنگرین نوترکیب که به گیرنده ایتنگرین $\alpha\gamma\beta 3$ و $\alpha\gamma\beta 5$ متصل می شود خواص ضدرگزایی دارد. مطالعات روی برهمنکش خاص دیس ایتنگرین نوترکیب با چندین ایتنگرین دیگر نادر است [۲۱]. به منظور شناسایی پیتید دیس ایتنگرین جدا شده از روش اسپکتروفوتومتری استفاده می شود که در این روش توالی اسید آمینه ای قسمت توالی آمینی پیتید موردنظر مورد شناسایی قرار می گیرد [۲۰]. لذا در روش فوق هر بار باستی از جانور موردنظر زهرگیری انجام شود که این پروسه علاوه بر هزینه بر و زمان بریدن نیاز به صید جانور موردنظر نیز دارد. همچنین روش زهرگیری یک فرایند پرخطر برای فرد زهر گیرنده محسوب می شود. بنابراین به منظور آنالیزهای بیشتر بر روی ترکیبات مختلف زهر از جمله دیس ایتنگرین ها باستی به دنبال روش های تولید آن ها به صورت نوترکیب برویم. به طوری که در مطالعات اخیر توالی ژنی مولکول مورد نظر (دیس ایتنگرین) با کمک روش های مختلفی مانند واکنش زنجیره ای پلیمراز و سنتز ژن در وکتور بیانی کلون شده و سپس در میزبان باکتریایی بیان می گردد. به طور مثال، در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، ژن دیس ایتنگرین زهر مار با کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر

توالی یابی نسل جدید رویکرد جدید و مقرن به صرفه ای جهت شناسایی کلیه ای اجزای زهر اعم از پروتئین ها، پیتیدهای سمی، آنزیم ها و غیره می باشد [۲۱، ۱۸]. مطالعات مختلفی در مورد آنالیز ترانسکریپتوم غده زهر عقرب (عقرب های خانواده بوتیدا^{۳۲} و غیر بوتیدا^{۳۳}) انجام شده است. با مطالعات صورت گرفته تنها درصد بسیار پایینی (کمتر از یک درصد) از توatal زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس مورد شناسایی قرار گرفته است. نتایج مطالعه توالی یابی نسل جدید به منظور آنالیز ترانسکریپتوم زهر عقرب خانواده همیسکورپیونیده^{۳۴} مولکول های ارزشمندی را شناسایی کرده که تاکنون ناشناخته باقی مانده اند. یکی از این مولکول های ارزشمند دیس ایتنگرین می باشد. در مطالعات قبلی دیس ایتنگرین ها از زهر مار جداسازی می شده اند. لبین^{۳۵}، دیس ایتنگرین جداسده از ونوم مار است که تکثیر سلول های سلطانی روده انسان و رگزایی تومور را از طریق توقف چرخه سلول و القا آپوپتوز و مهار بیان VEGF^{۳۶} سرکوب می کند [۲۰]. دیس ایتنگرین ها به ایتنگرین روی سطح سلول متصل می شوند و تعداد زیادی از عملکردهای زیستی سلول را مهار

³² Buthidae

³³ Non- Buthidae

³⁴ Hemiscorpiidae

³⁵ Lebein

³⁶ Vascular Endothelial Growth Factor

گشته و در میزبان باکتریایی 21-BL بیان گردید. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که دیس اینتگرین بیان شده توانسته بود از تهاجم سلول‌های سلطانی جلوگیری نماید [۲۲]. نتایج سمیت سلولی نشان داد که دیس اینتگرین اثر مهاری بر روی بقا سلول‌های اندوتیال انسان دارد و افزایش غلظت دیس اینتگرین منجر به کاهش تعداد سلول‌های زنده اندوتیال گردید. براساس داده‌های به دست آمده، میزان IC_{50} برای دیس اینتگرین برای داده‌های ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۵۰ و ۳۷ میکروگرم در ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون به ترتیب ۵۰ و ۳۷ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. همچنین دیس اینتگرین توانست مهاجرت ۷۰ درصد از سلول‌های اندوتیال به سمت فاکتور رشد را مهار نماید. درکل، این نتایج نشان می‌دهند که دیس اینتگرین می‌تواند به عنوان یک هدف مهم در مطالعات آینده مرتبط با تنظیم مهاجرت و زنده‌مانی سلول‌های اندوتیال درنظر گرفته شود. استفاده از دیس اینتگرین به عنوان یک مهارکننده موثر می‌تواند در کنترل برخی از پروسه‌های بیماری‌زاوی مرتبط با این سلول‌ها، مانند آنزیوژن و متاستاز، موثر باشد. این نتایج می‌توانند به توسعه‌ی روش‌های جدید درمانی و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با عملکرد نامناسب سلول‌های اندوتیال کمک کنند.

نتیجه‌گیری

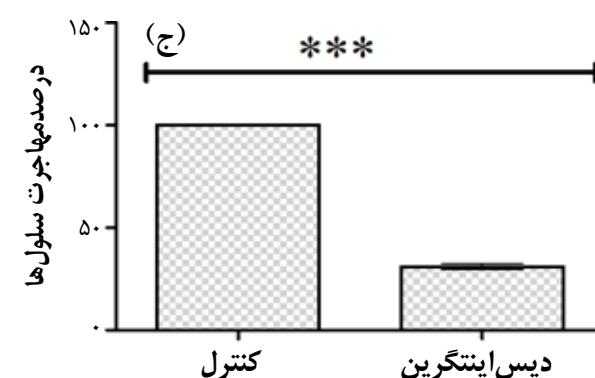
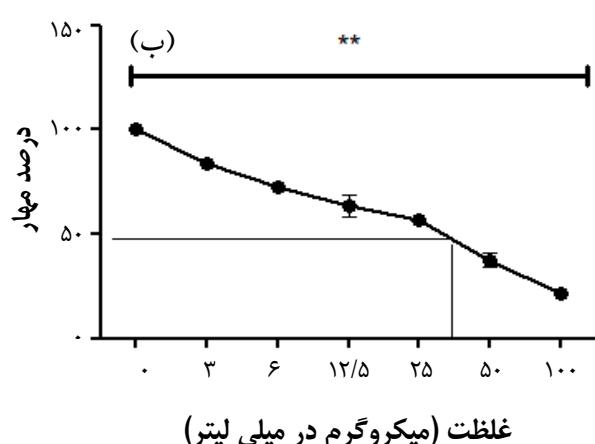
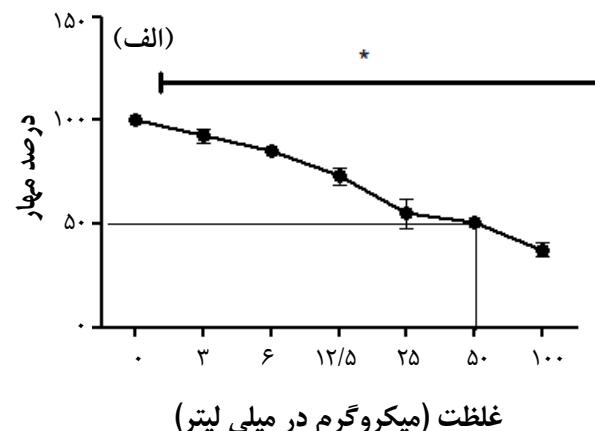
نتایج ما نشان داد که دیس اینتگرین قادر است رشد سلول‌های اندوتیال را مهار نموده و از مهاجرت سلول‌های اندوتیال به سمت فاکتور رشد جلوگیری کند. این یافته‌ها می‌توانند به پیشرفت و توسعه روش‌های جدید درمانی و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با عملکرد نامناسب سلول‌های اندوتیال کمک کنند.

سپاسگزاری

از حمایت مالی انسستیتو پاستور ایران قدردانی می‌گردد.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی انسستیتو پاستور ایران (شماره طرح ۸۵۴، کد اخلاق: IR.PII.REC.1394/42) انجام شد و بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سحر ابوالقاسمی (با شماره ۹۵/۰۱۱۰/۴۷۵) از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات می‌باشد.



نمودار ۱ - نتایج سمیت سلولی دیس اینتگرین. (الف): سمیت سلولی بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون. (ب): سمیت سلولی بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت سه بار تکرار انجام شده است. (ج): نتایج مهاجرت ۷۰ درصد سلول‌های اندوتیال به سمت فاکتور رشد را بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون مهار نمود. *: تفاوت معنی‌داری با $p < 0.05$. **: تفاوت معنی‌داری با $p < 0.01$. ***: تفاوت معنی‌داری با $p < 0.001$. نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار \pm خطای معیار بیان شد. نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار \pm خطای معیار بیان شد.

نقش نویسندها

س.ا.: انجام مطالعه؛ م.ب.: نظارت بر حسن اجرای
مطالعه؛ ف.ک.: ایده، طراحی و نگارش مقاله.

عارض در منافع

نویسندها این مقاله عارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

- [1] Kool J, Pharmaceutical properties of venom toxins and their potential in drug discovery. *Indonesian J Pharm* 27 (2016) 1-8.
- [2] Utkin YN, Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World J Biol Chem* 6 (2015) 28-33.
- [3] Chan YS, Cheung RCF, Xia L, Wong JH, Ng TB, Chan WY, Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 100 (2016) 6165-6181.
- [4] Ghafourian M, Ganjalikhahkemi N, Hemmati AA, Dehghani R, Kooti W, The Effect of Hemiscorpius lepturus (Scorpionida: Hemiscorpiidae) Venom on Leukocytes and the Leukocyte Subgroups in Peripheral Blood of Rat. *J Arthropod Borne Dis* 10 (2016) 159-167.
- [5] Saviola AJ, Modahl CM, Mackessy SP, Disintegrins of *Crotalus simus tzabcan* venom: Isolation, characterization and evaluation of the cytotoxic and anti-adhesion activities of tzabcanin, a new RGD disintegrin. *Biochimie* 116 (2015) 92-102.
- [6] Lucena S, Castro R, Lundin C, Hofstetter A, Alaniz A, Suntravat M, Sánchez EE, Inhibition of pancreatic tumoral cells by snake venom disintegrins. *Toxicon* 93 (2015) 136-143.
- [7] Chakrabarty D, Chanda C, Snake Venom Disintegrins. In: Inagaki H, Vogel CW, Mukherjee A, Rahmy T, eds, *Snake Venoms. Toxinology*. Dordrecht: Springer, 2017.
- [8] Souza D, Iemma M, Ferreira L, Faria J, Oliva M, Zingali R, Niewiarowski S, Selistre-de-Araujo H, The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha\beta$ integrin-mediated cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* 384 (2000) 341-350.
- [9] Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ, Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol* 31 (1994) 289-300.
- [10] Suntravat M, Jia Y, Lucena SE, Sánchez EE, Pérez JC, cDNA cloning of a snake venom metalloproteinase from the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*), and the expression of its disintegrin domain with anti-platelet effects. *Toxicon* 64 (2013) 43-54.
- [11] Khamessi O, Ben Mabrouk H, Othman H, ElFessi-Magouri R, De Waard M, Hafedh M, Marrakchi N, Srairi-Abid N, Kharrat R, RK, the first scorpion peptide with dual disintegrin activity on $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 3$ integrins. *Int J Biol Macromol* 120 (2018) 1777-1788.
- [12] Kazemi-Lomedasht F, Khalaj V, Bagheri KP, Behdani M, Shahbazzadeh D, The first report on transcriptome analysis of the venom gland of Iranian scorpion, *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon* 125 (2017) 123-130.
- [13] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112 (1999) 531-552.
- [14] McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT, The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinform* 16 (2000) 404-405.
- [15] Wiederstein M, Sippl MJ, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 407-410.
- [16] David V, Wermelinger LS, Frattani FS, Lima AGF, Santos YFS, de Souza Mourão PA, Almeida FCL, Kurtenbach E, Zingali RB, rJararacina, a recombinant disintegrin from Bothrops jararaca venom: Exploring its effects on hemostasis and thrombosis. *Arch Biochem Biophys* 738 (2023) 109557.
- [17] Rodríguez de la Vega RC, Corzo G, Possani LD, Scorpion venoms as a platform for drug development. In: King GF, ed, *Venoms to drugs: Venom as a source for the development of human therapeutics*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015: 204-220.
- [18] Shahbazzadeh D, Srairi-Abid N, Feng W, Ram N, Borchani L, Ronjat M, Akbari A, Pessah IN, De Waard M, El Ayeb M, Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus* which is active on ryanodine-sensitive Ca^{2+} channels. *Biochem J* 404 (2007) 89-96.
- [19] de la Vega RCR, Schwartz EF, Possani LD, Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56 (2010) 1155-1161.
- [20] Zakraoui O, Marcinkiewicz C, Aloui Z, Othman H, Grépin R, Haoues M, Essafi M, Srairi-Abid N, Gasmi A, Karoui H, Pagès G, Essafi-Benkhadir K, Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression. *Mol Carcinog* 56 (2017) 18-35.
- [21] Kele Arruda Macedo J, W Fox J, de Souza Castro M, Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. *Curr Protein Pept Sc* 16 (2015) 532-548.
- [22] Lima-dos-Santos I, Della-Casa M, Portes-Junior J, Calabria P, Magalhães G, Moura-da-Silva A, Characterization of Neuwiedin, a new disintegrin from *Bothrops neuwiedi* venom gland with distinct cysteine pattern. *Toxicon* 104 (2015) 57-64.

Research paper

Designing an expression construct containing the disintegrin gene identified from the transcriptome of the scorpion *Hemiscorpius lepturus* and evaluation of its function in an *in vitro* model

Sahar Abolghasemi^{1,2}, Mahdi Behdani¹, Fatemeh Kazemi-Lomedasht^{*1}

¹ *Laboratory of Venom and Biotherapeutics Molecules, Biotechnology Research center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

²*Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

Received: 2 April 2024

Accepted: 27 May 2024

Abstract

Background and Aim: Cell adhesion plays an important role in the invasion of cancer cells. Disintegrins are considered a suitable therapeutic tool for cancer. This study aims to clone and express the disintegrin gene identified from the transcriptome of *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom in a bacterial host and to investigate its function in an *in vitro* model.

Methods: Initially, the first, second and third structures of disintegrin protein were investigated using bioinformatics tools. Then, the gene was synthesized and cloned into pET-22b vector. The resulting construct was transformed into *E.coli* BL-21 bacterial host. The protein expression was induced by 0.5mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside. The expression was checked and confirmed by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and western blot. The protein was purified using nickel affinity chromatography under denaturing conditions. Following purification, the protein was refolded by gradually removing urea through dialysis. After protein expression and purification, the inhibitory effect of disintegrin on the survival and migration of HUVEC cell lines was investigated using MTT and transwell assay, respectively.

Results: The results of structural analysis showed that the predicted disintegrin structure exhibits typical characteristics and conforms to expected structural patterns observed in disintegrin proteins. The highest level of protein expression was observed with Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside concentration of 0.5mM and 5-hour incubation. The molecular weight of the expressed protein was approximately 12 kDa. The disintegrin inhibited the growth of HUVEC cells with an IC₅₀ of 37 µg/ml after a 48-hour incubation period. Furthermore, the purified disintegrin inhibited the migration of 70% of HUVEC cells towards the vascular endothelia growth factor source, compared to the control group without disintegrin.

Conclusion: These findings demonstrate the potential of the disintegrin identified from the transcriptome of the scorpion *Hemiscorpius lepturus* to inhibit the growth and migration of HUVEC cells.

Keywords: Transcriptome, Disintegrin, *Hemiscorpius lepturus* scorpion.

Please cite this article as follows:

Abolghasemi S, Behdani M, Kazemi-Lomedasht F, Designing an expression construct containing the disintegrin gene identified from the transcriptome of the scorpion *Hemiscorpius lepturus* and evaluation of its function in an *in vitro* model. *Iran J Physiol Pharmacol* 8 (2024) 32-41.

*Corresponding authors: fa_kazemi@pasteur.ac.ir, fatemeh1044@yahoo.com (ORCID: 0000-0002-5832-1822)