

مقاله پژوهشی

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

سحر ابوالقاسمی^{۱،۲}، مهدی بهدانی^۱، فاطمه کاظمی لمعه‌دشت^{۱*}

۱. آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو 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 می‌گردند. هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ژن دیس اینتگرین شناسایی شده از ترانسکریپتوم زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس در میزبان باکتریایی و بررسی عملکرد آن در مدل برون 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 کلون شد. سازه بدست آمده به میزبان باکتری اشریشیا کلاهی BL-21 ترانسفورم شد. بیان پروتئین توسط نیم میلی مولار ایزوپروپیل-بتا-D-تیوگالاکتوپیرانوسید القا شد. بیان با استفاده از ژل سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید و وسترن بلات بررسی و تایید شد. پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل در شرایط دناتوره خالص سازی شد. پس از خالص سازی، پروتئین با حذف تدریجی اوره از طریق دیالیز دوباره تا شد. پس از بیان پروتئین و خالص سازی، اثر مهاردی 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 ۰/۵ میلی مولار و انکوباسیون ۵ ساعته مشاهده شد. وزن مولکولی پروتئین بیان شده تقریباً ۱۲ کیلو دالتون بود. دیس اینتگرین رشد سلول‌های HUVEC را با IC_{50} ۳۷ میکروگرم در میلی لیتر پس از یک دوره انکوباسیون ۴۸ ساعته مهار کرد. علاوه بر این، دیس اینتگرین خالص شده، مهاجرت ۷۰ درصد از سلول‌های HUVEC را به سمت منبع فاکتور رشد اندوتلیای عروقی، در مقایسه با گروه کنترل بدون دیس اینتگرین، مهار کرد.

نتیجه گیری: نتایج حاکی از پتانسیل دیس اینتگرین در مهار رشد و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال انسان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ترانسکریپتوم، دیس اینتگرین، عقرب همیسکورپیوس لپتوروس

مقدمه

سرطان، آرتريت، ترومبوز، مالتیپل اسکلروزی، درد، اختلالات عصبی-عضلانی، خون و اختلالات قلبی و عروقی، عفونت‌ها و بیماری‌های التهابی، مورد استفاده قرار گیرد. سم مار شامل هموتوکسین، کاردیوتوکسین، سایتوتوکسین، نوروتوکسین، فاکتورهای رشد عصبی، کاتیون‌های معدنی مانند (روی، کلسیم، پتاسیم، سدیم و منیزیم)، فسفولیپاز A2، سم سلول‌ها

در سال‌های اخیر، گزارشات متعددی درخصوص خواص انعقادی، ضدتوموری و ضدسرطانی 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]. به‌طورمثال، 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 ترانسکریپتوم غده زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس^{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 انستیتو 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. معرف MTT (۳ و ۴ و ۵ دی متیل تیازول -۲-یل -۲-و ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید) از شرکت سیگما خریداری شد.

بررسی ساختارهای اول و دوم و سوم

دیس اینتگرین عقرب همیسکورپیوس لپتوروس^{۱۵} از مطالعه ترانسکریپتوم 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 اسید آمینه‌ای، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر 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 سرور آنلاین SWISS MODEL مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت ساختار پیش بینی شده با کمک (ProSA-web) مورد بررسی قرار گرفت [۱۵].

سنتز ژن

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

(CT1, CT2, CT3)، کروتوکسین، ال آمینو اسید اکسیدازها، لکتین‌ها، متالوپروتئین‌ها، دیس اینتگرین‌ها، و هیالورونیدازها می‌باشد [۳]. در خانواده اسکورپیونیده^۱ عقربی با نام علمی همیسکورپیوس لپتوروس^۲ وجود دارد که سمی کشنده 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 به‌طور عمده در زهر جانوران سمی بویژه زهر مار خانواده وپیرا^۵ و کروتالیدا^۶ یافت می‌شوند [۵]. ویژگی دیس اینتگرین به موتیف^۷ تری‌پپتیدی واقع در حلقه بستگی دارد که به وسیله جفت باز سیستئین تشکیل می‌شود. اکثر دیس اینتگرین‌ها یک تری‌پپتید موتیف آرژنین-گلایسین-آسپارتیک اسید هستند که به اینتگرین $\alpha IIb\beta 3$ سطح پلاکت متصل می‌شوند [۶]. بعضی از دیس اینتگرین‌ها قادر هستند به اینتگرین $\alpha v\beta 3$ و $\alpha v\beta 5$ روی سطح سلول بعضی از سلول‌های توموری متصل شوند و مهاجرت سلولی و متاستاز را در انواع سلول‌های توموری مانند ریه و پستان و استخوان مهار کنند [۷]. گزارش شده است دیس اینتگرین نو ترکیب که به گیرنده اینتگرین $\alpha v\beta 3$ و یا به $\alpha v\beta 5$ 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 فیبرینوژن به اینتگرین $\alpha v\beta 3$ پلاکت (که توسط آدنوزین دی فسفات فعال می‌شود) عمل می‌کند [۸]. پس از این تعداد دیگری از دیس اینتگرین‌ها از زهر مارهای مختلف دیگر جدا شد [۹]. سانتروانت^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که دیس اینتگرین نو ترکیب کلون شده از زهر مار کروتالوس ادامانتوس^{۱۱} که حاوی موتیف آرژنین-گلایسین-آسپارتیک اسید است دارای اثر ضد تجمع پلاکتی قوی می‌باشد [۱۰]. اولین دیس اینتگرین جدا شده از زهر عقرب بوتوس اسپتانوس تونتانوس^{۱۲} قادر است اینتگرین‌های

¹ Scorpionidae

² *Hemiscorpius lepturus*

³ Disintegrin

⁴ Integrin

⁵ Vipera

⁶ Crotalidae

⁷ Motif

⁸ Trigramin

⁹ *Trimeresurus gramineus*

¹⁰ Suntravat

¹¹ *Crotalus adamanteus*

¹² *Buthus occitanus tunetanus*

¹³ *Hemiscorpius lepturus*

¹⁴ Dulbecco's Modified Eagle Medium

¹⁵ *Hemiscorpius lepturus*

¹⁶ PSI-blast based secondary structure PREDiction

تخلیص شده با ژل پلی آکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات و وسترن بلات انجام گرفت. سپس به منظور حذف لیپوپلی ساکارید باقیمانده در محلول پروتئین، از روش شستشو با تریتون X-114²² استفاده گردید. محلول پروتئینی با تریتون X-114 (۱ 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 دی اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM به همراه غلظت‌های مختلف دیس اینتگرین (۱۰۰-۰ 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.

درصد مهار = ۱ - میزان جذب چاهک‌ها در گروه تست / میزان جذب چاهک‌ها در گروه کنترل × ۱۰۰

بررسی مهاجرت سلول‌های اندوتلیال

اثر مهار 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 ۳۷ میکروگرم در میلی‌لیتر

شرکت ژن ری^{۱۷} کانادا سنتز گردید. توالی متیونین و برجسب 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 اشریشیا کلائی^{۱۸} BL-21 (DE3) 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 براث^{۱۹} مایع (۵ میلی‌لیتر) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تلقیح گردید و تا رسیدن به فاز لگاریتمی (OD₆₀₀ ~ ۰/۶) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ انکوبه گردید. سپس بیان پروتئین با افزودن ایزوپروپیل بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید نیم میلی‌مولار و انکوباسیون به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد القا گردید. بیان با ژل پلی آکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات ۱۵ درصد و وسترن بلات با آنتی بادی علیه برجسب هیستیدینی کونژوگه با پراکسیداز (رقت ۱:۵۰۰) مورد بررسی قرار گرفت. 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 میلی‌مولار، تریتون ایکس ۱۰۰ با غلظت ۰/۱ درصد، تریس-اسید ۵۰ میلی‌مولار) 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 بادیها^{۲۰} با بافر شستشو حاوی اوره ۶ مولار، 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 آرایبی مجدد^{۲۱} پروتئین دناتوره شده از روش حذف گرادینتی اوره با کمک دیالیز استفاده گردید. بررسی پروتئین

¹⁷ Generay

¹⁸ *Escherichia coli*

¹⁹ Luria Broth

²⁰ Inclusion bodies

²¹ Refolding

²² Triton X-114

²³ Human umbilical vein endothelial cells

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

نتایج آنالیز ساختار سه بعدی نشان داد که ساختار سه بعدی پروتئین در محدوده نرمال (محدوده‌ای که ساختار سایر پروتئین‌های موجود در طبیعت با روش کریستالوگرافی و NMR مشخص گردیده است) و دارای $Z\text{-score} = -4.03$ می‌باشد (شکل ۳ج).

بیان و تخلیص پروتئین

در شکل ۴ سازه طراحی شده به منظور سنتز درون وکتور pET-22b 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 تاییدکننده حضور برجسب هیستیدینی در پروتئین بیان شده بود (شکل ۵ج).

بررسی سمیت سلولی

نتایج سمیت سلولی نشان داد که با افزایش غلظت دیس اینتگرین، تعداد سلول‌های زنده اندوتلیال کاهش پیدا کرد. IC_{۵۰} برای دیس اینتگرین به ترتیب ۵۰ و ۳۷ میکروگرم در میلی لیتر برای ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون بدست آمد (نمودار الف و ب).

مهاجرت سلولی

نتایج تست مهاجرت سلولی نشان داد که دیس اینتگرین اثر مهاری بر روی مهاجرت سلول‌های اندوتلیال انسان به سمت فاکتور رشد دارد. دیس اینتگرین در غلظت ۳۷ میکروگرم در میلی لیتر و مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون توانسته بود از مهاجرت ۷۰ درصد سلول‌های اندوتلیال به قسمت پایینی پلیت (که حاوی سرم جنین گاوی و فاکتورهای رشد می‌باشد) جلوگیری کرد. از بافر فسفات به عنوان کنترل استفاده گردید (نمودار ج).

بحث

باتوجه به اثرات مهاری دیس اینتگرین روی سلول‌های سرطانی به نظر می‌رسد که این پروتئین ابزار بسیار مفیدی در فارماکولوژی و توسعه داروهای جدید ضدسرطان باشد [۱۶].

(غلظت IC_{۵۰} بدست آمده از نتایج MTT) از دیس اینتگرین 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 سلول‌های مهاجرت کرده به قسمت پایینی پلیت با ترپسینه کردن^{۲۶} مورد شمارش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار پریم 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.

یافته‌ها

آنالیز ساختارها

توالی ناحیه دیس اینتگرین و نتایج همترازی چندگانه در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج همترازی بین توالی دیس اینتگرین عقرب همیسکوپپوس لپتوروس و سایر دیس اینتگرین‌ها در گونه‌های مختلف عقرب نشان داد که حدوداً ۴۰ الی ۷۰ درصد مشابهت بین توالی‌ها وجود دارد. بعد از افزودن متیونین و توالی هیس به ابتدا و انتهای ژن بررسی توالی نشان داد که ژن دیس اینتگرین عقرب همیسکوپپوس لپتوروس دارای ۲۶۱ نوکلئوتید و ۸۷ اسید آمینه می‌باشد. بررسی ساختار اول پروتئین نشان داد که پروتئین دیس اینتگرین دارای وزن مولکولی پیش‌بینی شده حدود ۹۵۰۸/۵۱ دالتون، نقطه ایزوالکتریک ۵/۸۰ و دارای نیمه عمر حدود ۱۰ ساعت در میزبان اشیریشیا کالای، ۲۰ ساعت در مخمر و ۳۰ ساعت در شرایط برون تنی و شاخص آلیفاتیک ۲۸/۰۵ می‌باشد. بررسی ساختار دوم پروتئین نشان داد پروتئین دارای دو ساختار ماریپیچ آلفا و سه صفحه بتا می‌باشند (شکل ۲). بررسی ساختار سوم پیش‌بینی شده (شکل ۳ الف) نیز نشان داد که ۹۶/۱۵ درصد از اسید آمینه‌ها در ناحیه مطلوب، ۲/۸۶ درصد در ناحیه مجاز و صفر درصد در ناحیه غیر مجاز بودند (شکل ۳ب). همچنین

²⁵ Fetal bovine serum

²⁶ Trypsinization

²⁷ T-test

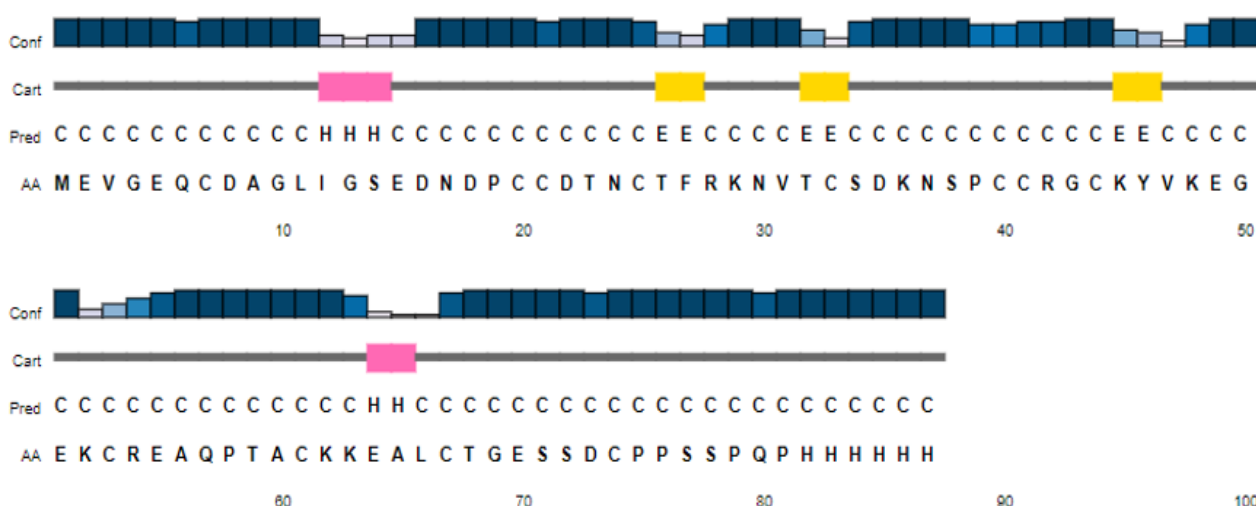
```

ATGGAAGTTGGGGAACAGTGTGATGCTGGCTTAATTGGGAGTGAAGATAATGACCCATGTTGTGATACAAACCTGCACCTT
TAGAAAAAATGTCACATGCAGTGACAAGAATTCCTCTTGTGGCCGTGGATGCAAATACGTAAGGAAGGTGAAAAATGCA
GAGAGGCCAGCCAACAGCATGTAAAAAGGAGGCACCTTTGTACTGGGGAGTCATCTGATTGCCCTCCTTCTTCACCTCAG
CCT
XP_023218512.1      EIGEECDGCSRESCSLLDPCCNPPGT-----NYECNLKEEMSCSFREGKCKEDCT      51
XP_023243347.1      ---ETCDGCGYDGK-ECSDKCCYPRDVKPYKLANPNAERCTLRPGAHCSPSQGPCCLPSCN    56
AMO02515.1          EEQEQCDCGSIEECLQSDPCCDP-----ITCKLRVEAECS--TGPCCE-NCK          44
XP_037602285.1      EEQEEDPGLL-H-LNDRCCSA-----DCKFKRNAQCSDRNSPCCI-NCV            43
HemiDis            EVGEQCDAGLIGS-EDNDPCCDT-----NCTFRKNTVCSDKNSPCCR-GCK          44
AMO02512.1          EEQEEDAGLIGS-EDNDPCCDT-----NCRLRPDVICSDKNAPCCR-DCR          44
XP_023216172.1      EEQEEDAGLIGS-EDNDLCCDT-----NCRLREGVICSDKNAPCCR-GCR          44
XP_023216169.1      EEQEEDAGLIGS-EDNDLCCDT-----NCRLREGVICSDKNAPCCR-GCR          44
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
XP_023218512.1      LVPKVERRICFVNTPCRKEYALCDGISSYCP----- 82
XP_023243347.1      FVKFGDMCRAE--AEC-TLSSFCNGRSAICPMSEPKP 90
AMO02515.1          LKHAGHLCRPAA-SEC-DIPEYCDGKVGQCP----- 73
XP_037602285.1      FELAGTRCQEPINATC-KGISTCTGNSKCPP----- 74
HemiDis            YVKEGEKCREAQPTAC-KKEALCTGESSDCPPSPQP 80
AMO02512.1          LVREREVCREAQQTAC-KQEAHCNGESPDCCPPSPQP 80
XP_023216172.1      LVQRREVCREAQPLAC-KQEAHCTGESPDCCPPSPAQP 80
XP_023216169.1      LVQRREVCREAQPLAC-KQEAHCTGESPDCCPPSPAQP 80
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

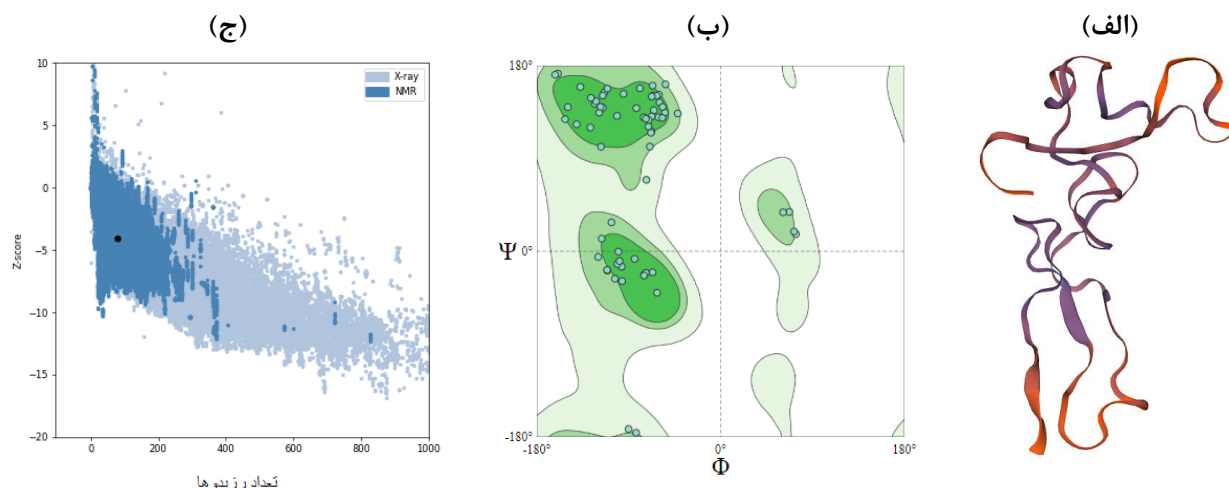
```

شکل ۱- توالی نوکلئوتیدی و همترازی چندگانه بین توالی‌های دیس اینتگرین. همانطور که نشان داده 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:

AMO02512.1: 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]
 AMO02515.1: 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 ۸۷ اسید آمینه پروتئین دیس اینتگرین، ۵ اسید آمینه دارای ساختار هلیکس، ۶ اسید آمینه دارای ساختار رشته و ۷۶ اسید آمینه دارای ساختار کوئل می‌باشند.

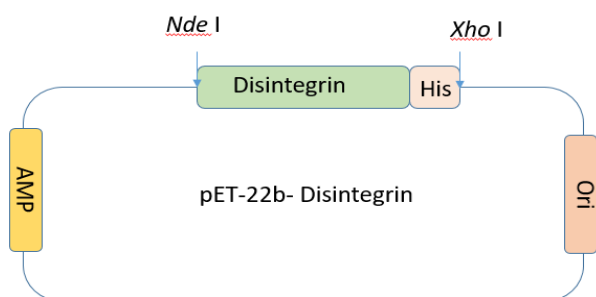


شکل ۳- ساختار سه بعدی پیش بینی شده با سرور سوییس مدل (الف) و نمودار رامچاندردان (ب). درصد اسید آمینه‌ها در ناحیه غیر قابل قبول صفر درصد می‌باشد. آنالیز ساختار سه بعدی با پروساب (ج). بررسی ساختار سوم پیش بینی شده نشان داد که ساختار سه بعدی در محدوده نرمال ($Z\text{-score} -4.03$) می‌باشد.

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

همین موضوع سبب شد در این تحقیق دیس اینتگرین زهر عقرب مورد توجه قرار گیرد و این ژن 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 پلی‌پپتیدهای آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد. پروتئین‌ها و پپتیدها حدود ۹۰ درصد وزن خشک زهر را تشکیل می‌دهند که این پلی‌پپتیدها می‌توانند سمی یا غیر سمی باشند [۱۷]. 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 کارا تر همچنان ادامه دارد. با کلونینگ و بیان ژن دیس اینتگرین 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}، پپتید همی کلسین^{۲۹} می‌باشد که یک پپتید نوروتوکسیک بوده و ۶ درصد از وزن کل زهر خام را تشکیل داده و از ۳۳ اسید آمینه تشکیل می‌شود و وزن مولکولی آن حدود ۴ کیلودالتون می‌باشد. این پپتید کانال‌های کلسیم حساس به راینوداین^{۳۰} (RyR1) را در غلظت ۴۰ نانومولار مهار



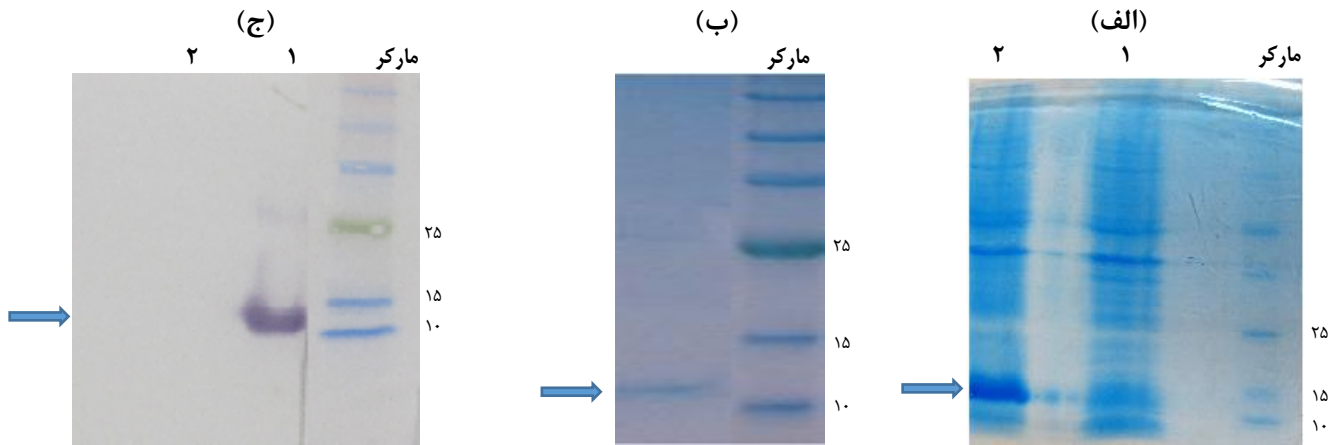
شکل ۴- سازه نهایی حاوی ژن دیس اینتگرین به منظور سنتز و کلونینگ درون وکتور pET-22b. همانطور که در شکل نشان داده شده است ژن دیس اینتگرین بین آنزیم‌های محدودالایر *Nde I* و *Xho I* کلون گردیده است.

²⁸ *Hemiscorpius lepturus*

²⁹ Hemicalcin

³⁰ Ryanodine

³¹ Proteomics



شکل ۵- نتایج بیان پروتئین. (الف): ژل پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات ۱۵ درصد با کوماسی بلو رنگ 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 بلات. وسترن بلات با آنتی بادی علیه برجسب هیستیدینی انجام شده است. مارکر پروتئین، ستون ۱: پروتئین تخلیص شده. ستون ۲: کنترل 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 اینتگرین نو ترکیب که به گیرنده اینتگرین $\alpha\beta 3$ و یا به $\alpha\beta 5$ متصل می شود خواص ضد رگ زایی دارد. مطالعات روی برهم کنش خاص دیس اینتگرین نو ترکیب با چندین اینتگرین دیگر نادر است [۲۱]. به منظور شناسایی پپتید دیس اینتگرین جدا شده از روش اسپکتروفتومتری استفاده می شود که در این روش توالی اسید آمینه ای قسمت توالی آمینی پپتید مورد نظر مورد شناسایی قرار می گیرد [۲۰]. لذا در روش فوق هر بار بایستی از جانور مورد نظر زهر گیری انجام شود که این پروسه علاوه بر هزینه بر و زمان بردن نیاز به صید جانور مورد نظر نیز دارد. همچنین روش زهر گیری یک فرایند پرخطر برای فرد زهر گیرنده محسوب می شود. بنابراین به منظور آنالیزهای بیشتر بر روی ترکیبات مختلف زهر از جمله دیس اینتگرین ها بایستی به دنبال روش های تولید آن ها به صورت نو ترکیب برویم. به طوری که در مطالعات اخیر توالی ژنی مولکول مورد نظر (دیس اینتگرین) با کمک روش های مختلفی مانند واکنش زنجیره ای پلیمرز 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 اینتگرین زهر مار با کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز تکثیر

توالی یابی نسل جدید رویکرد جدید و مقرون به صرفه ای جهت شناسایی کلبه ای اجزای زهر اعم از پروتئین ها، پپتیدهای 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 توتال 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 اینتگرین می باشد. در مطالعات قبلی دیس اینتگرین ها از زهر مار جداسازی می شده اند. لبین^{۳۵}، دیس اینتگرین جدا شده از ونوم مار است که تکثیر سلول های سرطانی روده انسان و رگ زایی تومور را از طریق توقف چرخه سلول و القا آپوپتوز و مهار بیان VEGF^{۳۶} سرکوب می کند [۲۰]. دیس اینتگرین ها به اینتگرین روی سطح سلول متصل می شوند و تعداد زیادی از عملکردهای زیستی سلول را مهار

³² Buthidae

³³ Non- Buthidae

³⁴ Hemiscorpionidae

³⁵ Lebein

³⁶ Vascular Endothelial Growth Factor

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

نتیجه‌گیری

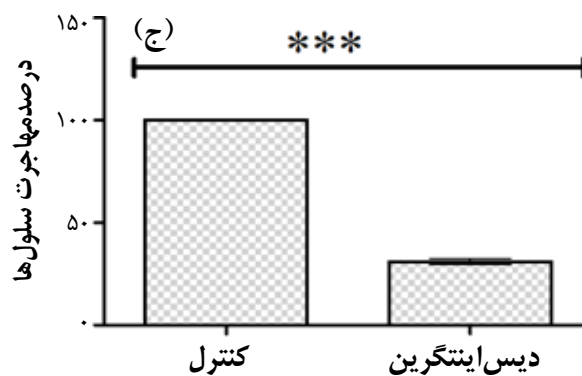
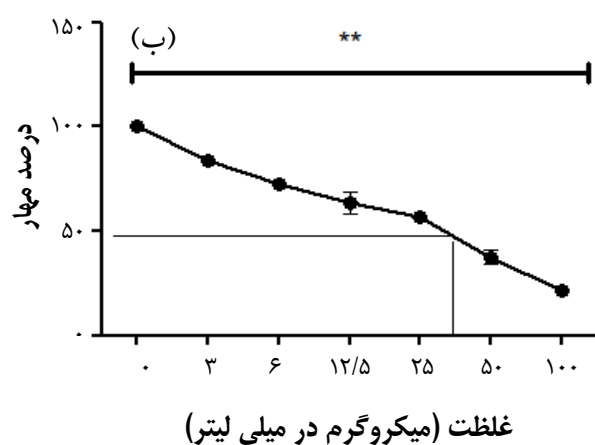
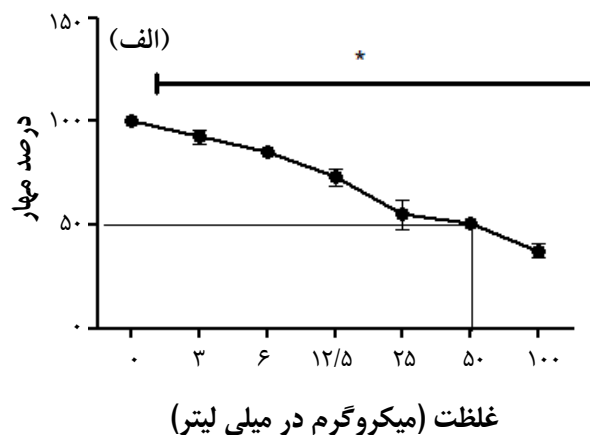
نتایج ما نشان داد که دیس اینتگرین قادر است رشد سلول‌های اندوتلیال را مهار نموده و از مهاجرت سلول‌های اندوتلیال به سمت فاکتور رشد جلوگیری کند. این یافته‌ها می‌توانند به پیشرفت و توسعه روش‌های جدید درمانی و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با عملکرد نامناسب سلول‌های اندوتلیال کمک کنند.

سپاسگزاری

از حمایت مالی انستیتو پاستور ایران قدردانی می‌گردد.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران (شماره طرح ۸۵۴ کد اخلاق: IR.PIL.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 ۲۴ ساعت انکوباسیون. (ب): سمیت سلولی بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون. نتایج به صورت سه بار تکرار انجام شده است. (ج) نتایج مهاجرت سلولی. دیس اینتگرین مهاجرت ۷۰ درصد سلول‌های اندوتلیال به سمت فاکتور رشد را بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون مهار نمود. *: تفاوت معنی‌داری با $p < 0.05$. **: تفاوت معنی‌داری با $p < 0.01$. نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار \pm خطای معیار بیان شد. ***: تفاوت معنی‌داری با $p < 0.001$. نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار \pm خطای معیار بیان شد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

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

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, Ganjalikhanhakemi N, Hemmati AA, Dehghani R, Kooti W, The Effect of Hemiscorpius lepturus (Scorpionida: Hemiscurpiidae) 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 $\alpha1\beta1$ and $\alpha\beta3$ 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, rJararacin, 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 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)