بررسی محتوای اسیدآمینه‌ای، ساختار و ارتباطات فیلوژنتیکی توکسینهای دیس‌اینتگرین گونه‌های مار افعی

مریم ربیعی و فرزانه محمدی فارسانی*

ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

سموم حیوانات حاوی توکسینهای متعدد با فعالیتهای فیزیولوژیک مختلف می‌باشند که مشکلاتی همچون واکنشهای آلرژیک، لخته شدن خون، نکروز، ایست تنفسی ایجاد می‌نمایند. با این حال بررسیها نشان داده است که این سموم می‌توانند به عنوان دارو برای درمان بسیاری از بیماریها مانند سرطان مورد استفاده قرار گیرند. این مولکولهای زیستی می‌توانند سبب مهار یک پروتئین سلولی، القای آپوپتوز و فرآیندهای دیگر شوند. دیس‌اینتگرینها، یک خانواده از پروتئینهای کوچک هستند که از سم گونه‌های مار افعی به دست می‌آیند. بررسیها نشان داده است این پپتیدها با ایجاد تداخل در مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی می‌توانند فعالیتهای ضدسرطانی ایفاء کنند. در این تحقیق محتوای اسیدآمینه و ساختار توکسینهای دیس‌اینتگرین به دست آمده از سم گونه‌های مار افعی بررسی شده و ارتباط فیلوژنتیکی آنها ترسیم گردید. جهت بررسی محتوای اسیدآمینه‌ای این توکسینها؛ توالیهای پروتئینی پپتید مورد نظر، از پایگاه اطلاعاتی *NCBI* دریافت شد. بررسیهای مقایسه‌ای این توالیها و رسم درخت فیلوژنتیکی آنها توسط نرم‌افزار *MEGA6* صورت گرفت. سپس ساختار تعدادی از این پپتیدها با استفاده از نرم‌افزار *Modeller* شبیه‌سازی و با استفاده از نرم‌افزار *SPDBV* آنالیز شدند. بررسی توالی و محتوای اسیدآمینه‌ای این پپتیدها، منجر به شناسایی ریشه‌های حفاظت شده و مهم در تشکیل ساختار و عملکرد آنها شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داد که دیس‌اینتگرینهای مورد بررسی را می‌توان در سه گروه تکاملی تقسیم‌بندی نمود. بررسیهای ساختاری پپتیدهای این سه گروه نیز نشان داد که دیس-اینتگرینهای دو گروه با جد تکاملی نزدیکتر، دارای شباهت ساختاری قابل توجهی هستند که تأیید کننده نتایج به دست آمده از بررسیهای فیلوژنتیکی است.

واژه های کلیدی: دیس‌اینتگرین، سرطان، محتوای آمینواسیدی، ارتباطات فیلوژنتیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۰۳۶۳۴۳۰۷، پست الکترونیکی: f.mohamadi@sci.ui.ac.ir

مقدمه

بسیاری از ترکیبات تولیدشده توسط حیوانات، گیاهان و باکتریها برای توسعه روشهای درمانی جدید به کار گرفته می‌شوند. از جمله این کاربردها می‌توان به تولید دارو برای درمان بیماریهایی مانند ترومبوز، سرطان و ایدز اشاره کرد. چنین مولکولهای زیستی فعال دارویی می‌توانند در مهار القای رگزایی، مهار یا القای سنتز پروتئین توسط سلول، القای آپوپتوز و همچنین فعالیتهای ضد ویروسی نقش به سزایی ایفاء کنند (۹). استفاده واقعی از سم مار در اواخر قرن ۱۹ آغاز شد، زمانی که آلبرت دانشمند فرانسوی به این نتیجه رسید که سم حیوان اگر به مقدار کم در سرم خون تزریق شود، به یک پادزهر قوی تبدیل می‌شود (۱). زهر مار در ابتدا در بیماران مبتلا به تشنج صرع مورد استفاده قرار گرفت، زمانی که دیده شد فرد مبتلا به صرع بعد از گاز گرفتگی یک مار زنگی بهبود یافت. در سال ۱۹۳۴ مشخص شد که زهر مار کبری در دزهای کوچک دارای فعالیت ضد درد قوی چندین بار قوی‌تر از مورفین

می‌باشد، با این تفاوت که این سم اعتیاد به همراه ندارد. در گذشته، زهر مار کبری به عنوان دارو برای درمان آسم، فشار خون بالا و حتی جذام مورد استفاده قرار می‌گرفت و هنوز هم در بسیاری از کشورها در صنعت داروسازی کاربرد دارد (۴). طبق اولین یافته ها در قرن ۱۸و۱۷ میلادی فلیس فونتانا غدد سمی مار را کشف کرد و از سم مار به دست آمده برای انواع آزمایشات استفاده کرد. نظریه فونتانا برخلاف نظریه ردی بود که عنوان کرد سم در معده اثر خود را می‌گذارد. در اواخر قرن ۵۰ و اوایل قرن ۶۰ یک مطالعه گسترده از پروتئین سم مار آغاز شد (۱۶). در مجموع شصت و دو سم مار شناسایی شده که به طور خالص مانع از اتصالات پروتئینی، عملکردهای پیچیده گلیکوپروتیینی، وتجمع پلاکتی می‌شود (۷ و ۱۲). سم مار افعی مخلوطی از ترکیبات پیچیده شامل پروتئینها، پپتیدها و برخی از آنزیمهاست که بسته به گونه مار متفاوت و متنوع می‌باشند (۲۲). بررسیها نشان داده است که پپتیدهای موجود در سموم مار، با ایجاد تداخل در مسیرهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی می‌توانند فعالیتهای ضدسرطانی ایفاء نماید. دیس‌اینتگرین به عنوان مهارکننده قوی اینتگرینی، از هر دو عمل تجمع پلاکت و چسبندگی سلولی ممانعت می‌کند. تأثیر سم دیس‌اینتگرین در پیام رسانیهای داخل سلولی ازجمله عوامل وابسته به مرگ برنامه ریزی شده سلولی، تحرک، تکثیر سلولی و پاتوژن ویروسی روشن شده است (۱۶). دیس‌اینتگرین به عنوان آنتاگونوسیت‌های گیرنده؛ بازدارنده‌های ناشی از تجمع *ADP*، ترومبین، و فاکتور فعال کننده پلاکت و کلاژن عمل می‌کند (۲۳). به‌علاوه دیس‌اینتگرین به عنوان یک ضدانعقاد مورد توجه پزشکان و محققان می‌باشد (۱۵ و ۱۷). این مهار کننده‌های اینتگرینی انواع مختلف دارند و در ۵ طبقه دسته‌بندی می‌شوند: دیس‌اینتگرین کوچک حاوی ۵۱-۴۹ آمینواسید و ۴ پیوند دی‌سولفیدی، دیس‌اینتگرین متوسط حاوی ۷۰ آمینواسید و ۶ پیوند دی‌سولفیدی، دیس‌اینتگرین بزرگ حاوی ۸۴ آمینواسید ۷ پیوند دی‌سولفیدی، دیس‌اینتگرین دیمریک حاوی ۶۷ آمینواسید و ۴ پیوند دی‌سولفیدی درون مولکولی، متالوپروتئیناز حاوی ۱۰۰ آمینواسید و ۸ پیوند دی‌سولفیدی (۲). در سالهای اخیر سانز و سایر پژوهشگران طی بررسیهای خود ساختار و عملکرد سموم مار افعی را مورد بررسی قرار داده و جایگاه فعال پپتید دیس‌اینتگرین را شناسایی کرده و برای مهار اتصالات بین سلولی که عامل اصلی پیشرفت انواع سلولهای سرطانی می‌باشد و همین طور مهار متاستاز آینده روشنی را پیش‌بینی کردند (۳ و ۲۱). پپتیدهای مورد نظر در این بررسی خانواده دیس‌اینتگرینهای متوسط از زهر افعی در گونه‌های مختلف است. این پپتیدها شامل موتیفهای *RGD (Arg-Gly- Asp)* یا *KGD (Lys-Gly-Asp)* می‌باشند. این موتیفها به توالیهای خاصی از اینتگرین *IIa-IIb* در سطح پلاکت متصل می‌شوند (۲۳). در هنگام آسیب بافتی و یا پارگی رگهای خونی پیامهایی ایجاد می‌شود که اینتگرینهای موجود در غشای سلولی پلاکتها را فعال کرده و موجب اتصال پلاکتها به یکدیگر از طریق پروتئینهای اتصالی به نام فیبرینوژن می‌شود. این اتصال و تعاملات باعث کنترل خونریزی می‌گردد. فیبرینوژن موجب اتصال مولکولهای دیگر مانند *G-alpha* به اینتگرین می‌شود و گسترش بیشتر لخته را به همراه دارد، مهارکننده‌های ایجاد لخته مانع اتصالات اینتگرینی می‌شوند و از گسترش لخته جلوگیری می‌کنند (۱۱). اینتگرینها به فرآیند متاستاز در سلولهای سرطانی نیز کمک می‌کنند و در حرکت تومور اولیه از محل اولیه خود به سایر نقاط نقش دارند و در نتیجه ایستگاههای جدید سرطانی ایجاد می‌کنند. همراه با ورود سلولهای سرطانی به جریان خون، بیان مولکولهای سطحی مثل اینتگرینها به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، اینتگرین میان سلول سرطانی و لایه داخلی رگهای خونی تغذیه کننده بافتها تعامل برقرار می‌کند (۱۰). بررسیها نشان داده است که دیواره‌های یک رگ خونی معمولی در سمتی که خون جریان دارد، اینتگرین تولید نمی‌کند مگر اینکه سلولهای سرطانی در

آنجا قرار داشته باشند (۱۳)، بنابراین یکی از مسیرهای درمانی که برای سرطان در نظر گرفته شده است؛ هدف قرار دادن اینتگرینهاست. هدف در این مطالعه، بررسی توالی و محتوای آمینواسیدی دیس‌اینتگرینهای گونه‌های مختلف مار افعی جهت یافت شباهتها و تفاوتهای موجود در این پپتیدهاست. انجام چنین مطالعاتی می‌تواند به منظور توسعه طراحی دارو و تولید پپتیدهای مشابه و حتی به صورت مؤثرتر در جهت درمان سرطان کمک نماید.

مواد و روشها

در این مطالعه، جهت بررسی توالی و محتوای اسیدآمینه‌ای توکسینهای دیس‌اینتگرین؛ توالیهای پروتئینی پپتید مورد نظر در گونه‌های حاوی این سم، از پایگاه اطلاعاتی *NCBI* دریافت شد. بررسیهای مقایسه‌ای میان این توالیها و رسم درخت فیلوژنتیکی آنها، توسط نرم افزار *MEGA6* صورت گرفت. شبیه‌سازی و بررسیهای ساختاری این پپتیدها نیز به ترتیب توسط نرم‌افزارهای *Modeller9.12* و *Swiss PDB viewer3.7 (SPDBV)* انجام پذیرفت.

در قدم اول، به منظور بررسی محتوای اسیدآمینه‌ای پپتیدها، توالی پروتئینی دیس‌اینتگرین در گونه *Bothrops alternatus* با کد دسترسی *Q801Z4.2* از سایت *NCBI* دریافت شد. سپس برای دریافت سایر پپتیدهای مشابه دیس‌اینتگرین، روی توالی پپتید مورد نظر در همین سایت، *Blast* پروتئینی صورت گرفت. در مرحله بعد، توالی پروتئینی تمام پپتیدهای مشابه دریافت شد و مجموعه اطلاعات به دست‌آمده از این پایگاه، وارد نرم‌افزار *MEGA 6* شدند. به منظور مقایسه این توالیها، از ابزار Clustal W نرم‌افزار *MEGA* استفاده شد و هم‌ترازی چندگانه توالیها با استفاده از ماتریس Gonnet صورت گرفت. درخت فیلوژنتیکی این پپتیدها نیز توسط *MEGA* ترسیم شد. در نهایت محتوای آمینواسیدی آنها توسط همین نرم افزار مشخص گردید و از طریق برنامه *Excel*، نمودار مربوط به میانگین اسیدآمینه‌ها در این پپتیدها، رسم شد.

در مرحله بعد، به منظور انجام مقایسه ساختاری میان این پپتیدها، ساختار سه پپتید دیس‌اینتگرین با کدهای دسترسی توالی *Q801Z4.2*، *P23323* و *Q7LZI5.1* با استفاده از نرم‌افزار *Modeller* شبیه‌سازی شد. به منظور انجام این شبیه‌سازی و با هدف یافتن ساختار الگو، ابتدا برای هر کدام از این پپتیدها *Blast* پروتئینی انجام شد و نزدیکترین ساختار مورد شناسایی قرار گرفت. در نهایت ساختار دیس‌اینتگرینهای گونه *Gloydius brevicaudus* و *Protobothrops flavoviridis* (به ترتیب با کدهای دسترسی PDB ID: 1L3X و 1J2L) به عنوان ساختارهای الگو مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت ساختارهای به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار *SPDBV* مورد آنالیز و ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

به منظور آنالیز توالیها و محتویات پروتئینی و آمینواسیدی پپتید دیس‌اینتگرین لازم است توالیهای این پپتید را در گونه‌های مختلف از مار باهم مقایسه و همتراز کرد. نرم‌افزار *MEGA*، ابزاری بسیار مناسب برای همترازی و بررسی محتوای توالیهای *DNA* و پروتئین است و توسط آن می‌توان ارتباطات تکاملی این نوع توالیها را نیز مورد بررسی قرار داد.

در این مطالعه توالی پروتئینی ۲۰ گونه مار افعی، از پایگاه اطلاعاتی *NCBI (www.ncbi.org)* دریافت شد. نام پپتید، نام گونه،کد دسترسی و تعداد اسیدهای آمینه هر کدام از این پپتیدها، در جدول ۱ نشان داده شده است. پروتئین الگو، پپتیدی ۱۲ کیلو دالتونی و طول ۷۸ آمینواسید با نام *Disintegrin DisBa-01* و کد دسترسی *Q801Z4.2* از کتابخانه *cDNA* حاصل از غده مار گونه *Bothrops alternatus* استخراج شده است، این پروتئین به طور خاص با اینتگرین αv β3 تعامل دارد و همچنین خواص ضد متاستاتیک و ضدرگ زایی دارد (۱۲).

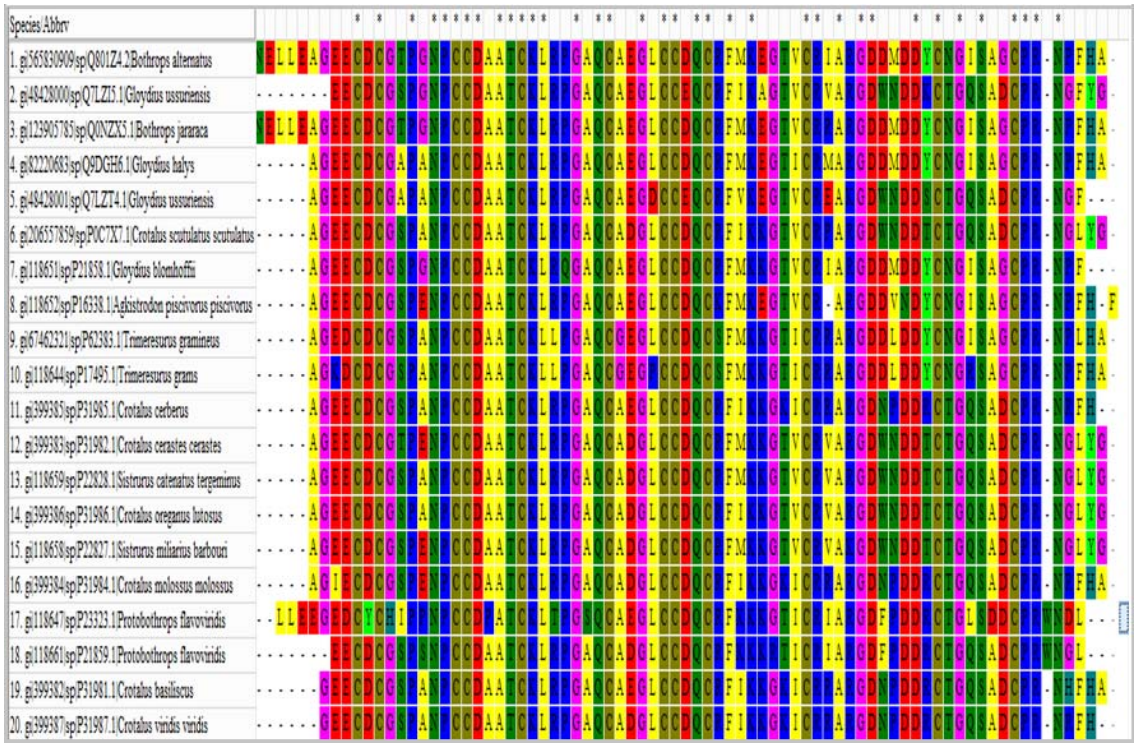
جدول ۱- نام پپتید، نام گونه،کد دسترسی و تعداد اسیدهای آمینه پپتیدهای دیس اینتگرین مورد مطالعه.

نام پپتید	نام گونه	کد دسترسی	تعداد اسیدهای آمینه موجود در پپتید	عملکرد
Disintegrin DisBa-01	*Bothrops alternatus*	*Q801Z4.2*	۸۷ آمینواسید	ضمن تعامل با اینتگرین $\alpha_v \beta_3$ با خواص ضد متاستاتیک و ضدرگ زایی در مهار سرطان نقش به سزایی ایفاء می‌کند (۱).
Disintegrin ussuristatin-1	*Gloydius ussuriensis*	*Q7LZI5.1*	۷۱ آمینواسید	مانع تجمع پلاکت ناشی از ترومبین، کلاژن و *ADP* هست و همچنین باعث مهار چسبندگی سلولهای ملانوم انسان به فیبرینوژن و فیبرونکتین می‌شود (۲-۴)
Disintegrin jarastatin	*Bothrops jararaca*	*Q0NZX5.1*	۸۸ آمینواسید	
Disintegrin saxatilin	*Gloydius halys*	*Q9DGH6.1*	۷۳ آمینواسید	
Disintegrin ussuristatin-2	*Gloydius ussuriensis*	*Q7LZT4.1*	۷۱ آمینواسید	از سه فرایندهای درگیر در عملکرد پلاکت (چسبندگی، فعال سازی و تجمع) جلوگیری می‌کند و همین طور مانع تجمع پلاکتی می‌شود (۵, ۶)
Disintegrin mojastin-2	*Crotalus scutulatus scutulatus*	*P0C7X7.1*	۷۳ آمینواسید	از تعامل فیبرینوژن با پلاکت جلوگیری می‌کنند و با اتصال به *alpha-IIb/beta-3* بر روی سطح پلاکت باعث مهار تجمع پلاکت ناشی از *ADP* ترومبین، فاکتور فعال کننده پلاکت و کلاژن می‌شوند (۷، ۸، ۱۴، ۱۹ و ۲۰)
Disintegrin halysin	*Gloydius blomhoffii*	*P21858.1*	۷۱ آمینواسید	
Disintegrin applaggin	*Agkistrodon piscivorus piscivorus*	*P16338.1*	۷۱ آمینواسید	
Disintegrin trigramin –gamm	*Trimeresurus gramineus*	*P62383.1*	۷۳ آمینواسید	
Disintegrin trigramin-beta-2	*Trimeresurus grams*	*P17495.1*	۷۳ آمینواسید	
Disintegrin cereberin	*Crotalus cerberus*	*P31985.1*	۷۲ آمینواسید	
Disintegrin cerastin	*cerastes cerastes Crotalus*	*1.P31982*	۷۲ آمینواسید	
Disintegrin tergeminin	*Sistrurus catenatus tergeminus*	*P22828.1*	۷۳ آمینواسید	
Disintegrin lutosin	*Crotalus oreganus lutosus*	*P31986.1*	۷۳ آمینواسید	
Disintegrin barbourin	*Sistrurus miliarius barbouri*	*P22827.1*	۷۳ آمینواسید	
Disintegrin molossin	*Crotalus molossus molossus*	*P31984.1*	۷۳ آمینواسید	
Disintegrin CTF-II	*Protobothrops flavoviridis*	*P23323.1*	۷۵ آمینواسید	
Disintegrin triflavin	*Protobothrops flavoviridis*	*P21859.1*	۷۰ آمینواسید	
Disintegrin basilicin	*Crotalus basiliscus*	*P31981.1*	۷۲ آمینواسید	
Disintegrin viridin	*Crotalus viridis viridis*	*P31987.1*	۷۱ آمینواسید	

مقایسه توالیهای پروتئینی با استفاده از نرم افزار *MEGA6*در شکل ۱ نشان داده شده است. سیستئین در این پپتیدها کاملاً حفاظت شده‌است. چون این آمینواسیدها در تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و در نتیجه تشکیل ساختار صحیح پروتئین نقش دارد (۷).

ترتیب و تعداد انواع آمینو اسیدهای موجود در ایزوفرمهای مختلف پروتئین دیس‌اینتگرین با استفاده از نرم‌افزار *MEGA6* مورد بررسی قرار گرفت و میانگین وجود هر آمینو اسید در هر فرم و توالی به دست آمد. با توجه به محاسبات و اطلاعات به دست آمده مشاهده شد آمینواسید سیستئین با میانگین ۱۶/۳۹ بیشترین میزان را در توالیها

شامل می‌شود و آمینواسید تریپتوفان با میانگین ۰/۶۲ کمترین مقدار را دارد. در این بررسی می‌توان دید که توالیها از غلظت سیستئینی بالایی برخوردارند، که پیوندهای دی‌سولفیدی را سبب می‌شوند. توالیهای مربوط به هر گروه در موتیف مربوط به خود مشترک می باشند، به طوری که این موتیفها به هر پپتید خاصیت ضد سرطانی جدیدی می‌بخشد که به اینتگرین مربوط به خود باند شده و عملکرد مهاری خود را بر فعالیت اینتگرینی اعمال می کند بنابراین ریشه‌های سیستئین نقش مهمی در عملکرد پروتئین ایفاء می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده است که تغییرات کوچک در توالی آمینواسیدی پپتیدهای دیس‌اینتگرین می‌تواند سبب تغییرات بزرگ در عملکرد این پپتیدها شود (۱۸).



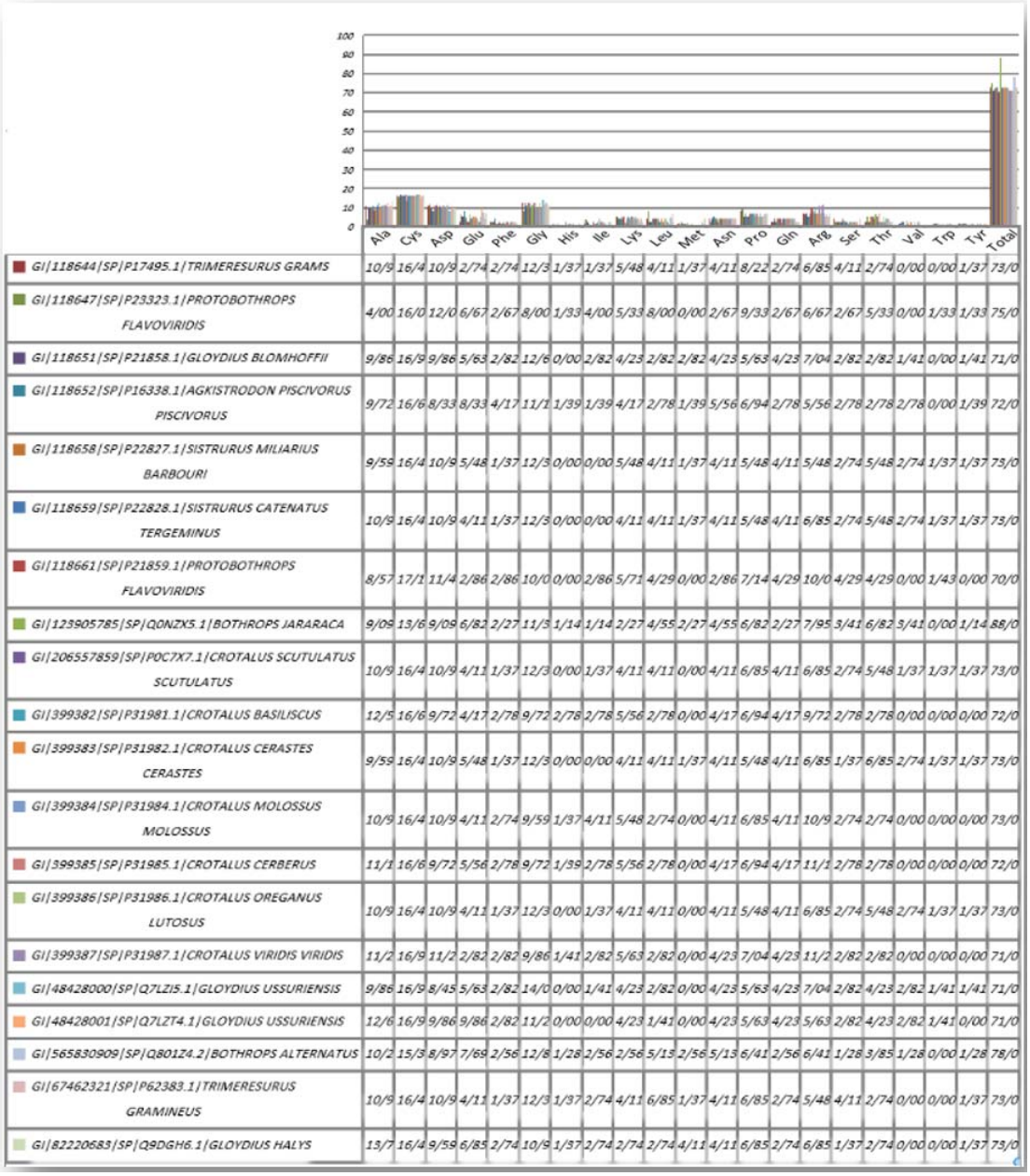
شکل ۱- مقایسه توالی پروتئینی دیس‌اینتگرین و پپتیدهای مشابه توسط نرم افزار MEGA6.

در نهایت بعد از ذکر ویژگیهای هر توالی پروتئینی و انواع پلی‌مورفیسمهای پپتید دیس‌اینتگرین و همچنین محاسبه و نمایش میزان وجود هر آمینواسید به صورت مجزا در هر توالی با استفاده از نرم افزار *MEGA6* محتویات آمینواسیدی و میزان حفاظت شدگی توالیها به دست آمد و نمودار مربوطه (شکل ۲) توسط برنامه *Excel* طراحی شد.

درخت فیلوژنی رسم شده از طریق روش Neighbor-joiningنشان می‌دهد که ایزوفرمهای مختلف پروتئین دیس‌اینتگرین از مضاعف شدن یک ژن اجدادی اولیه مشتق شده‌اند (شکل ۳). به عبارتی ژن اجدادی، ژن اولیه ایزوفرمهای گروه ۱ و ۲ و ژن اولیه کد کننده گروه۳ را ایجاد کرده است. همچنین با ادامه روند مضاعف شدن در مسیر تکاملی، ژن اولیه ایزوفرمهای گروه ۱ و ۲ از هم مشتق شده‌اند. با توجه به ساختار به دست آمده از درخت فیلوژنتیکی می‌توان دریافت که پپتیدهای گروه ۱ و ۲ شباهت بیشتری با یکدیگر داشته و می‌توانند با مکانیسم مشابهی در مهار سلولهای سرطانی ایفای نقش کنند. در

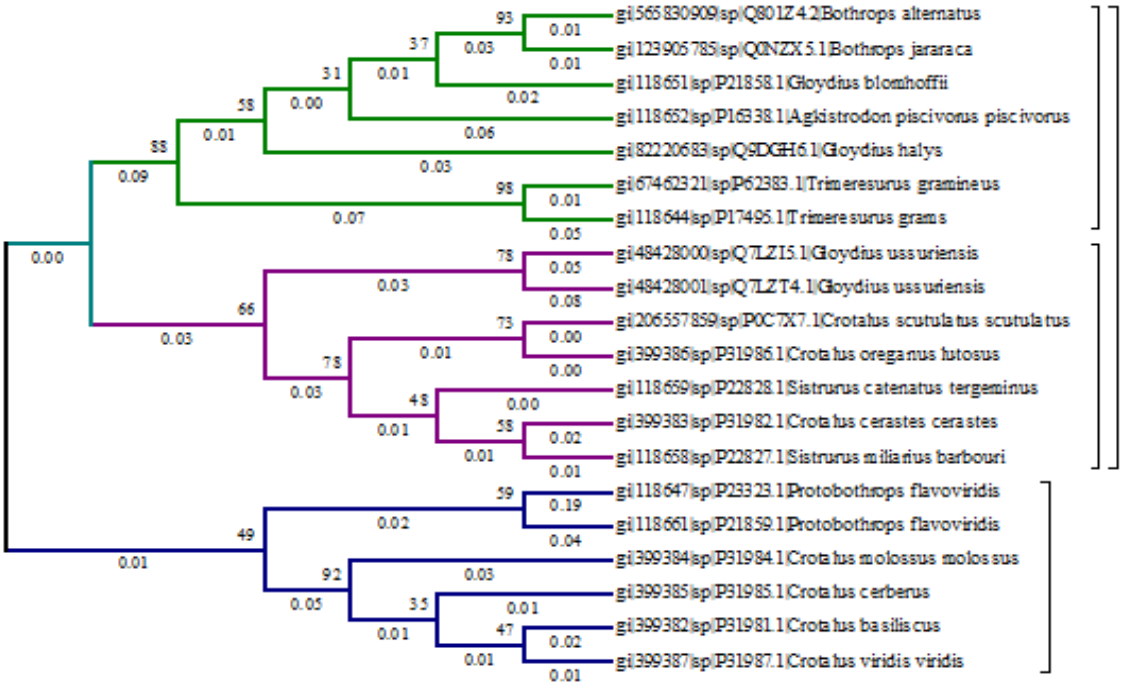
نهایت به منظور بررسی شباهتها و تفاوتهای میان پپتیدهای گروه ۱ و ۲ با گروه ۳، مقایسه ساختاری میان این پپتیدها انجام شد. با این هدف، یک پپتید از هر گروه انتخاب شده و ساختار آن مورد شبیه‌سازی و آنالیز قرار داده شد.

نتایج حاصل از شبیه‌سازی ساختار سه پپتید دیس‌اینتگرین با کد دسترسی توالی Q801Z4.2، P23323 و Q7LZI5.1 با استفاده از نرم‌افزار *Modeller* در شکل ۴ نشان داده شده است. همان گونه که در بخش قبل اشاره شد، به منظور شبیه‌سازی ساختار این سه پپتید، ابتدا *Blast* پروتئینی انجام شده و نزدیکترین ساختارهای دیس اینتگرین به عنوان الگوی شبیه‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

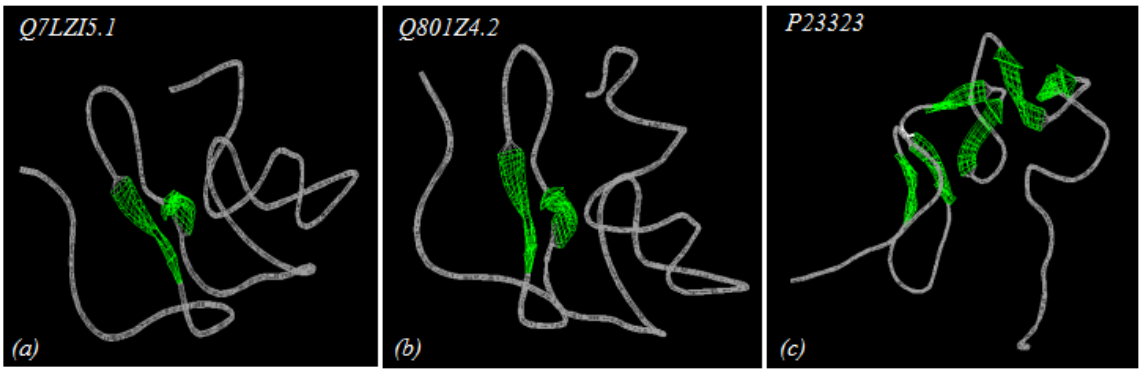


	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total
GI|118644|SP|P17495.1|TRIMERESURUS GRAMS	10/9	16/4	10/9	2/74	2/74	12/3	1/37	1/37	5/48	4/11	1/37	4/11	8/22	2/74	6/85	4/11	2/74	0/00	0/00	1/37	73/0
GI|118647|SP|P23323.1|PROTOBOTHROPS FLAVOVIRIDIS	4/00	16/0	12/0	6/67	2/67	8/00	1/33	4/00	5/33	8/00	0/00	2/67	9/33	2/67	6/67	2/67	5/33	0/00	1/33	1/33	75/0
GI|118651|SP|P21858.1|GLOYDIUS BLOMHOFFII	9/86	16/9	9/86	5/63	2/82	12/6	0/00	2/82	4/23	2/82	2/82	4/23	5/63	4/23	7/04	2/82	2/82	1/41	0/00	1/41	71/0
GI|118652|SP|P16338.1|AGKISTRODON PISCIVORUS PISCIVORUS	9/72	16/6	8/33	8/33	4/17	11/1	1/39	1/39	4/17	2/78	1/39	5/56	6/94	2/78	5/56	2/78	2/78	2/78	0/00	1/39	72/0
GI|118658|SP|P22827.1|SISTRURUS MILIARIUS BARBOURI	9/59	16/4	10/9	5/48	1/37	12/3	0/00	0/00	5/48	4/11	1/37	4/11	5/48	4/11	5/48	2/74	5/48	2/74	1/37	1/37	75/0
GI|118659|SP|P22828.1|SISTRURUS CATENATUS TERGEMINUS	10/9	16/4	10/9	4/11	1/37	12/3	0/00	0/00	4/11	4/11	1/37	4/11	5/48	4/11	6/85	2/74	5/48	2/74	1/37	1/37	73/0
GI|118661|SP|P21859.1|PROTOBOTHROPS FLAVOVIRIDIS	8/57	17/1	11/4	2/86	2/86	10/0	0/00	2/86	5/71	4/29	0/00	2/86	7/14	4/29	10/0	4/29	4/29	0/00	1/43	0/00	70/0
GI|123905785|SP|Q0NZX5.1|BOTHROPS JARARACA	9/09	13/6	9/09	6/82	2/27	11/3	1/14	1/14	2/27	4/55	2/27	4/55	6/82	2/27	7/95	3/41	6/82	5/41	0/00	1/14	88/0
GI|206557859|SP|P0C7X7.1|CROTALUS SCUTULATUS SCUTULATUS	10/9	16/4	10/9	4/11	1/37	12/3	0/00	1/37	4/11	4/11	0/00	4/11	6/85	4/11	6/85	2/74	5/48	1/37	1/37	1/37	73/0
GI|399382|SP|P31981.1|CROTALUS BASILISCUS	12/5	16/6	9/72	4/17	2/78	9/72	2/78	2/78	5/56	2/78	0/00	4/17	6/94	4/17	9/72	2/78	2/78	0/00	0/00	0/00	72/0
GI|399383|SP|P31982.1|CROTALUS CERASTES CERASTES	9/59	16/4	10/9	5/48	1/37	12/3	0/00	0/00	4/11	4/11	1/37	4/11	5/48	4/11	6/85	1/37	6/85	2/74	1/37	1/37	73/0
GI|399384|SP|P31984.1|CROTALUS MOLOSSUS MOLOSSUS	10/9	16/4	10/9	4/11	2/74	9/59	1/37	4/11	5/48	2/74	0/00	4/11	6/85	4/11	10/9	2/74	2/74	0/00	0/00	0/00	73/0
GI|399385|SP|P31985.1|CROTALUS CERBERUS	11/1	16/6	9/72	5/56	2/78	9/72	1/39	2/78	5/56	2/78	0/00	4/17	6/94	4/17	11/1	2/78	2/78	0/00	0/00	0/00	72/0
GI|399386|SP|P31986.1|CROTALUS OREGANUS LUTOSUS	10/9	16/4	10/9	4/11	1/37	12/3	0/00	1/37	4/11	4/11	0/00	4/11	5/48	4/11	6/85	2/74	5/48	2/74	1/37	1/37	73/0
GI|399387|SP|P31987.1|CROTALUS VIRIDIS VIRIDIS	11/2	16/9	11/2	2/82	2/82	9/86	1/41	2/82	5/63	2/82	0/00	4/23	7/04	4/23	11/2	2/82	2/82	0/00	0/00	0/00	71/0
GI|48428000|SP|Q7LZI5.1|GLOYDIUS USSURIENSIS	9/86	16/9	8/45	5/63	2/82	14/0	0/00	1/41	4/23	2/82	0/00	4/23	5/63	4/23	7/04	2/82	4/23	2/82	1/41	1/41	71/0
GI|48428001|SP|Q7LZT4.1|GLOYDIUS USSURIENSIS	12/6	16/9	9/86	9/86	2/82	11/2	0/00	0/00	4/23	1/41	0/00	4/23	5/63	4/23	5/63	2/82	4/23	2/82	1/41	0/00	71/0
GI|565830909|SP|Q801Z4.2|BOTHROPS ALTERNATUS	10/2	15/3	8/97	7/69	2/56	12/8	1/28	2/56	2/56	5/13	2/56	5/13	6/41	2/56	6/41	1/28	3/85	1/28	0/00	1/28	78/0
GI|67462321|SP|P62383.1|TRIMERESURUS GRAMINEUS	10/9	16/4	10/9	4/11	1/37	12/3	1/37	2/74	4/11	6/85	1/37	4/11	6/85	2/74	5/48	4/11	2/74	0/00	0/00	1/37	73/0
GI|82220683|SP|Q9DGH6.1|GLOYDIUS HALYS	13/7	16/4	9/59	6/85	2/74	10/9	1/37	2/74	2/74	2/74	4/11	4/11	6/85	2/74	6/85	1/37	2/74	0/00	0/00	1/37	73/0

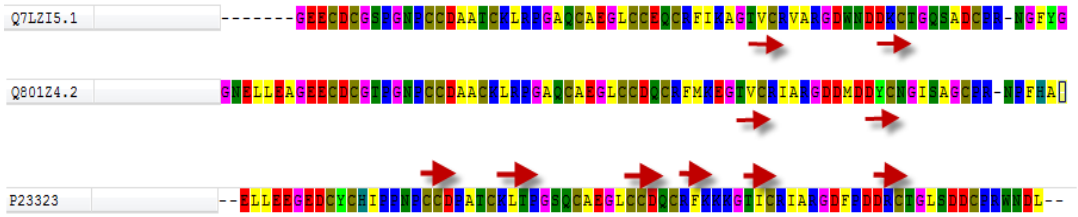
شکل ۲- میزان محتوای وجود هر آمینو اسید در توالیهای مورد بررسی



شکل ۳- ارتباطات فیلوژنتیکی میان دیس‌اینتگرین و سایر پپتیدهای مشابه. ایزو فرم گروه ۱ با رنگ سبز، ایزو فرم گروه ۲ با رنگ بنفش و ایزو فرم گروه ۳ با رنگ ابی نشان داده شده است.

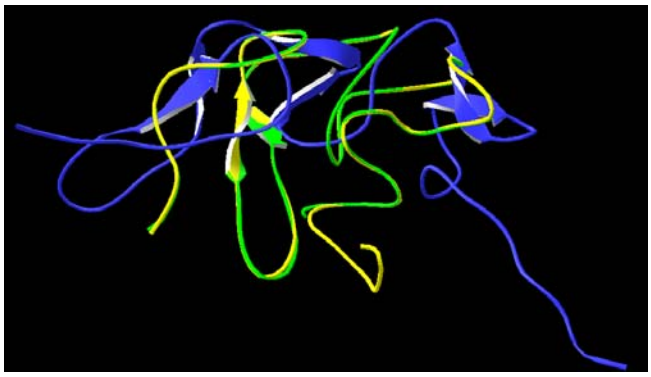


(e)



شکل ۴- (a تا c) ساختارهای شبیه‌سازی شده برای سه پپتید دیس‌اینتگرین *Q801Z4.2*، *P23323* و *Q7LZI5.1* با استفاده از نرم‌افزار *Modeller* و (e) ترادف امینواسیدی معادل با تشکیل ساختار بتا در سه پپتید مورد بررسی. همان گونه که دیده می‌شود، دیس‌اینتگرینهای *Q801Z4.2* و *Q7LZI5.1* در ساختار خود حاوی دو صفحه بتا و دیس‌اینتگرین *P23323* دارای ۶ صفحه بتا می‌باشند.

نتایج حاصل از این Blast نشان داد که ساختار 1L3X با داشتن ۹۳ و ۸۰ درصد یکسانی توالی، می‌تواند به ترتیب به عنوان الگو برای شبیه‌سازی دیس‌اینتگرینهای *Q801Z4.2* و *Q7LZI5.1* مورد استفاده قرار گیرد. به علاوه ساختار 1J2L با داشتن ۸۲ درصد یکسانی توالی با پپتید P23323، بهترین ساختار برای شبیه‌سازی این پروتئین است. همان گونه که در شکل ۴ دیده می‌شود، دیس‌اینتگرینهای Q801Z4.2 و Q7LZI5.1 در ساختار خود حاوی دو صفحه بتا و دیس‌اینتگرین P23323 دارای ۶ صفحه بتا می‌باشند. برای هر پپتید، نواحی آمینواسیدی معادل با ایجاد صفحات بتا نیز در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از همترازی ساختاری سه پپتید مورد بررسی نیز در شکل ۵ نشان داده شده است. همان گونه که دیده می‌شود، پپتیدهای دیس‌اینتگرین Q801Z4.2 و Q7LZI5.1 شباهت ساختاری قابل توجهی داشته و با یکدیگر همپوشانی ساختاری بالایی دارند. در عین حال ساختار پپتید P23323 با دو پپتید دیگر متفاوت است که می‌تواند نشانه تفاوت عملکردی این پپتید با دو نوع دیگر باشد. به طور کلی نتایج حاصل از بررسیهای ساختاری تأیید کننده نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنتیکی بوده و براساس آن می‌توان دیس‌اینتگرینهای مورد بررسی را به سه گروه تکاملی تقسیم‌بندی نمود.



شکل ۵- همترازی ساختاری سه پپتید دیس‌اینتگرین Q801Z4.2، P23323 و Q7LZI5.1 با استفاده از نرم‌افزارSPDBV.

منابع

1-Calmette A. 1896. The treatment of animals poisoned with snake venom by the injection of antivenomous serum. British medical journal. 1859:399.

2-Calvete JJ. 2005. Structure-Function Correlations of Snake Venom Disintegrins#. Current pharmaceutical design. 7:829-35.

3-Calvete JJ, Escolano J, Sanz L. 2007. Snake venomics of Bitis species reveals large intragenus venom toxin composition variation : application to taxonomy of congeneric taxa. Journal of proteome research. 7:2732-2745.

4-Casewell NR, Wüster W, Vonk FJ, Harrison RA, Fry BG. 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. Trends in ecology & evolution. 4:219-29.

5-Chao BH, Jakubowski JA, Savage B, Chow EP, Marzec UM, Harker LA, et al. 1989. Agkistrodon piscivorus piscivorus platelet aggregation inhibitor: a potent inhibitor of platelet activation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 20:8050-8054.

6-Coelho ALJ, De Freitas MS, Oliveira-Carvalho AL, Moura-Neto V, Zingali RB, Barja-Fidalgo C. 1999. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. Experimental cell research. 2:379-87.

7-Coelho ALJ, De Freitas MS, Mariano-Oliveira A, Rapozo DCM, Pinto LFR, Niewiarowski S, et

al. 2004. RGD-and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. Experimental cell research. 2:371-384.

8-Dennis MS, Henzel WJ, Pitti RM, Lipari MT, Napier MA, Deisher TA, et al. 1990. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 7:2471-2475.

9-Harvey R, Degryse E, Stefani L, Schamber F, Cazenave J, Courtney M, et al. 1986. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, Hirudo medicinalis. Proceedings of the National Academy of Sciences.4:1084-1088

10-Hong S-Y, Koh Y-S, Chung K-H, Kim D-S. 2002. Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. Thrombosis research. 1:79-86.

11-Horwitz AF. 1997. Integrins and health. Sci Am. 5:68-75.

12-Kauskot A, Cominetti MR, Ramos O, Bechyne I, Renard J-M, Hoylaerts MF, et al. 2008. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from Bothrops alternatus. Front Biosci. 13:6604-6616.

13-Kawano H, Cody RJ, Graf K, Goetze S, Kawano Y, Schnee J, et al. 2000. Angiotensin II enhances integrin and α-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. Hypertension. 1:273-279.

14-Kisiel DG, Calvete JJ, Katzhendler J, Fertala A, Lazarovici P, Marcinkiewicz C. 2004. Structural determinants of the selectivity of KTS-disintegrins for the α1β1 integrin. FEBS letters. 3:478-4821.

15-Lu X, Lu D, Scully M, Kakkar V. 2006. Integrins in drug targeting-RGD templates in toxins. Current pharmaceutical design. 22:2749-69.

16-Maeno H, Mitsuhashi S, Sato R. 1960. STUDIES ON HABU SNAKE VENOM. Japanese journal of microbiology. 2:173-80.

17-McLane MA, Sanchez EE, Wong A, Paquette-Straub C, Perez JC. Disintegrins. 2004. Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders. 4:327-355.

18-Oshikawa K, Terada S. 1999. Ussuristatin 2, a novel KGD-bearing disintegrin from Agkistrodon ussuriensis venom. Journal of Biochemistry. 1:31-35.

19-Sánchez EE ,Galán JA, Russell WK, Soto JG, Russell DH, Pérez JC. 2006. Isolation and characterization of two disintegrins inhibiting ADP-induced human platelet aggregation from the venom of Crotalus scutulatus scutulatus (Mohave Rattlesnake). Toxicology and applied pharmacology. 1:59-68.

20-Sánchez EE, Lucena SE, Reyes S, Soto JG, Cantu E, Lopez-Johnston JC, et al. 2010. Cloning, expression, and hemostatic activities of a disintegrin, r-mojastin 1, from the mohave rattlesnake (Crotalus scutulatus scutulatus). Thrombosis research. 3: 211-219.

21-Sanz L, Ayvazyan N, Calvete JJ. 2008. Snake venomics of the Armenian mountain vipers Macrovipera lebetina obtusa and Vipera raddei. Journal of Proteomics. 2:198-209.

22-Utkin YN. 2015. Animal venom studies: Current benefits and future developments. World journal of biological chemistry. 2:28.

23-Xu C-S, Rahman S. 2001. Identification by site-directed mutagenesis of amino acid residues flanking RGD motifs of snake venom disintegrins for their structure and function. ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA-CHINESE EDITION-.2:153-157.

Study of amino acid composition, structure and evolutionary relationships of Disintegrin toxins from Vipera species

Rabiee M. and Mohamadi Farsani F.

Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Animal venoms contain numerous toxins with various physiological activities that cause problems such as allergic reactions and/or more severe reactions including as blood clots, necrosis, pulmonary arrest. Nevertheless, research has shown these venoms can be used as a medicine for treating many diseases including cancer. Disintegrins are a family of small protein from Vipera species venoms. Studies have shown that these peptides can exhibit anticancer activities by interfering with intracellular signaling pathways. In this study amino acid composition of Disintegrin toxins from different Vipera venoms were studied and phylogenetic relationship between them was depicted. In order to analysis of the sequence and amino acid composition, the sequence of these peptides were obtaianed from NCBI. MEGA6 software was also used to compare of these peptides and phylogenetic studies. In the next step, the structure of some of these peptide were modelled with Modeller and were analyzed by SPDBV. Study of sequence and amino acid composition lead to identification of conserved and important residues involved in the structure and the function these peptides. Phylogenetic analysis showed that disintegrins could also classified in 3 evolutionary groups. Structural analysis also showed that disintegrins with a most recent common ancestor have significant structural similarity which confirm the results obtained from phylogenetic studies.

Key words: Disintegrin, Cancer, amino acid composition, Phylogenetic relationship