مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۱۱، بهمن ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

کلونینگ و بیان دو ژن مهار کننده متالوپروتئیناز عقرب *همیسکور پیوس لپتوروس* (عقرب خطرناک خوزستان)

مهرداد احدی: کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مهدی بهدانی: دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دلاور شهباز زاده: دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

فاطمه کاظمی لمعه دشت: استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول)
fa_kazemi@pasteur.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: یکی از خطرناک‌ترین گون‌های عقرب بومی ایران *همیسکورپیوس لپتوروس* می‌باشد که زهر آن بسیار سمی و مسئول بیشتر مرگ و میرهای ناشی از گزش عقرب در ایران است. چهار مهارکننده متالوپروتئیناز (HLMetInhibit1-4) در زهر این عقرب یافت می‌شود. مهارکننده‌های متالوپروتئیناز از مهم‌ترین پروتئین‌های دخیل در بسیاری از فرایندهای سلولی مانند بقای ماتریکس خارج سلولی می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی ساختار و ویژگی‌های دو مورد از این مولکول‌ها و در ادامه کلونینگ و بیان آن‌ها برای اولین بار می‌باشد.

روش کار: مطالعات بیوانفورماتیکی و داکینگ مولکولی روی توالی‌های HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2 (با شماره دسترسی MG764541 و MG764542 در NCBI)، صورت پذیرفت. پلاسمیدهای نوترکیب pET-22b-(HLMetInhibit1,2) پس از طراحی و سنتز، به میزبان *E. coli* BL21 منتقل شدند، Colony-PCR و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد انجام گردید و القا بیان پروتئین‌ها در غلظت‌های متفاوت IPTG و زمان‌های مختلف صورت گرفت. سپس SDS-PAGE و رنگ آمیزی با کوماسی بلو و لکه گذاری وسترن انجام شد.

یافته‌ها: نتایج داکینگ تمایل اتصالی بیشتری را برای HLMetInhibit1 پیش‌بینی می‌کرد. کلونینگ ژن‌ها صورت گرفت. بیشترین میزان بیان پس از ۵ ساعت و در غلظت ۱ میلی مولار IPTG مشاهده گردید. صحت بیان پروتئین‌های HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2 با وزن‌های مولکولی ۲۶ و ۱۷ کیلو دالتون پس از SDS-page و لکه گذاری وسترن تایید شد.

نتیجه‌گیری: کلونینگ و بیان ژن مهارکننده‌های متالوپروتئیناز ۱ و ۲ عقرب *همیسکورپیوس لپتروس* به عنوان پروتئین‌هایی نوین که تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته‌اند انجام پذیر می‌باشد و امید است پس از انجام آزمایشات آتی *in vitro* و *in vivo* بتوان به کاندیدی مناسب برای تحقیق در زمینه‌های مختلف درمانی دست یافت.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

کلیدواژه‌ها
کلونینگ و بیان،
سرطان،
مهارکننده متالوپروتئیناز،
همیسکورپیوس لپتوروس

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۰۵
تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۰۷

شیوه استناد به این مقاله:
Ahadi M, Behdani M, Shahbazzadeh D, Kazemi-Lomedasht F. Cloning and expression of two metalloproteinase inhibitors of Hemiscorpius lepturus (Khuzestan dangerous scorpion). Razi J Med Sci. 2020;26(11):9-19.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

Razi Journal of Medical Sciences.2020;26(11):9-19. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Cloning and expression of two metalloproteinase inhibitors of *Hemiscorpius lepturus* (Khuzestan dangerous scorpion)

Mehrdad Ahadi, Msc, Biotechnology Research Center, Venom & Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Mahdi Behdani, Associate Professor, Biotechnology Research Center, Venom & Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Delavar Shahbazzadeh, Associate Professor, Biotechnology Research Center, Venom & Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Fatemeh Kazemi-Lomedasht, Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Venom & Biotherapeutics Molecules Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran (* Corresponding author) fa_kazemi@pasteur.ac.ir

Abstract

Background: One of the most dangerous endemic scorpions of Iran is *Hemiscorpius lepturus* that its venom is very toxic and known as responsible for most of scorpion sting dependent deaths in Iran. There are four Metalloproteinase inhibitors in the venom gland transcriptome of this scorpion (HLMetInhibit1-4). Metalloproteinase inhibitors are involved in some of the critical cells activity including the stability and surviving of ECM. This study aimed to investigate the structure and functions of a pair of these molecules and subsequently their cloning and expression for the first time.
Methods: Bioinformatics analysis and molecular docking on sequences of HLMetInhibit1 and HLMetInhibit2 performed (with the MG764541 and MG764542 NCBI accession numbers). The recombinant plasmids (pET-22b- HLMetInhibit 1,2) designed and synthesized, then transformed into the *E. coli* BL21 bacterial host. The colony-PCR and electrophoresis on one percent agarose gel performed and protein expression induced by different concentrations of IPTG at different times. Then SDS-PAGE and staining by coomassie brilliant blue and western blotting performed.
Results: The highest binding affinity predicted for HLMetInhibit1 by molecular docking results. Gene cloning performed. Highest protein expression detected after 5 hours and with 1 mM concentration of IPTG. SDS-PAGE and western blotting confirmed the protein expression correctness for HLMetInhibit1 and HLMetInhibit2 with 26 and 17 KD of molecular weights.
Conclusion: Gene cloning and protein expression of *Hemiscorpius lepturus* metalloproteinase inhibitors 1 and 2 as the novel proteins that have not been studied so far, is approachable and it is hoped that after further *in vitro* and *in vivo* investigations, they will be the suitable candidates for research in the Various therapeutic fields.

Conflicts of interest: None
Funding: Pasteur Iran Institute

Keywords
Cloning and Expression,
Cancer,
Hemiscorpius lepturus,
Metalloproteinase inhibitors

Received: 27/07/2019
Accepted: 28/12/2019

Cite this article as:
Ahadi M, Behdani M, Shahbazzadeh D, Kazemi-Lomedasht F. Cloning and expression of two metalloproteinase inhibitors of Hemiscorpius lepturus (Khuzestan dangerous scorpion). Razi J Med Sci. 2020;26(11):9-19.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

مقدمه

به‌طورکلی عقرب‌های ایران شامل ۴۴ گونه از ۲۳ جنس مختلف هستند که در دو خانواده‌ی کلی بوتیده (Buthidae) و اسکورپیونیده (Scorpionidae) دسته‌بندی می‌شوند (۱). یکی از خطرناک‌ترین آن‌ها ازنظر میزان گزش بخصوص در فصول سرد سال (۲) و خطرناک‌ترین ازنظر آمار تلفات و مرگ و میر ناشی از گزش (۳)، همیسکورپیوس لپتوروس (Hemiscorpius lepturus) است. تاکنون در زهر این عقرب ترکیبات متعددی از جمله همیکلسین (Hemicalcin)، همیتوکسین (Hemitoxin)، همینکرولایزین (Heminecrolysin) و همیلیپین (Hemilipin) شناسایی شده است (۷-۴).

متالوپروتئینازها (Matrix metalloproteinases- MMPs)، اندوپپتیدازهایی وابسته به کلسیم هستند که برای انجام نقش کاتالیکی خود به یک یون روی (Zinc) نیازمندند. در مهره‌داران ۲۳ پارالوگ متالوپروتئیناز یافت شده که در هشت گروه دسته‌بندی می‌گردند. پنج گروه از آن‌ها ترشحی و سه گروه از انواع غشایی (membrane-type MMPs) می‌باشند. آن‌ها غالباً به صورت غیرفعال (Zimogen) تولید می‌شوند و پس از پروتئولیز به شکل نهایی و فعال خود تغییر می‌یابند. مهم‌ترین نقش متالوپروتئینازها تشکیل و تخریب ماتریکس خارج سلولی (Extra cellular matrix - ECM) می‌باشد (۸) اما عملکردهای دیگری مانند ترمیم زخم، رگ زایی و آپوپتوز برای آن‌ها شناسایی شده است. مهارکننده‌های متالوپروتئیناز (Matrix metalloproteinase inhibitors - MMPIs) باعث مهار مهاجرت و رگ زایی سلول می‌شوند و به دو صورت اندوژن و اگزوژن وجود دارند. مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز (Tissue inhibitors of metalloproteinases - TIMPs) یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های اندوژن بدن جانوران می‌باشد (۹). هنگامی که تعادل بین میزان متالوپروتئینازها و مهارکننده‌هایشان از بین برود این امر به افزایش بیان متالوپروتئینازها و متعاقب آن عوارض پاتولوژیک ناشی از آن منجر می‌گردد (۱۰).

خانواده TIMPs در مهره‌داران شامل ۴ دسته TIMP1، TIMP-2،TIMP-3 و TIMP-4 می‌باشند و نقش حیاتی در بقا و پایداری ECM دارند (۱۱). تعامل مهارکننده‌های متالوپروتئیناز با اجزای ماتریکس خارج سلولی، پروتئین‌های غشای پلاسما، گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTK) و گیرنده‌های چسبندگی سلول مسیرهای انتقال را تحت تأثیر قرار می‌دهد که روی سیگنالینگ سلول تأثیر می‌گذارند و تغییراتی را القا می‌کنند که منجر به مهار آنژیوژنز می‌شود (۱۲). به‌طور مثال کاهش بیان مهارکننده‌های متالوپروتئیناز ۱ و ۲ موجب افزایش فعالیت بالقوه‌ی اریتروئیدها (Erithroids) خواهد بود و این افزایش فعالیت خود موجب افزایش هم‌زمان رشد سلولی و کاهش میزان آپوپتوز در سلول‌ها است که در نتیجه تغییراتی در میزان رگ زایی در سلول‌ها و تومور زایی (Tumorigenesis) رخ می‌دهد (۱۳).

مهارکننده‌های متالوپروتئیناز چه انواع انسانی و چه مشابه‌های آن‌ها در سایر رده‌های جانوری علی‌رغم تفاوت‌هایی که با یکدیگر دارند، خصوصیت‌های کم و بیش مشابهی را نیز از خود به نمایش می‌گذارند. به‌طور مثال همگی دارای توالی NTR در ساختار خود هستند و با نسبت ۱:۱ به تنظیم MMP ها و سایر متالوپروتئینازهایی مانند دیس اینتگرین متالوپروتئیناز (Disintegrin - ADAM metalloproteinases) و دیس اینتگرین متالوپروتئینازهایی با موتیف ترومبواسپوندین (Disintegrin metalloproteinases with- ADAMTS thrombospondin motifs) می‌پردازند. همگی آن‌ها به فرم محلول و نیز در سطح سلول وجود دارند بجز TIMP-3 که در ECM و نیز در سطح سلول وجود دارد؛ و در نهایت همگی آن‌ها دارای توالی SYN (Gene Synapsin) هستند بجز TIMP-2 (۱۴).

تلاش‌هایی در جهت استفاده از مهارکننده‌های متالوپروتئیناز به‌عنوان داروهای ضد سرطان انجام شده که از این میان می‌توان به دو مهارکننده متالوپروتئیناز اگزوژن با نام‌های Batimastat و Marimastat اشاره

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

کرد. داروی Batimastat اولین مهارکننده متالوپروتئیناز می‌باشد که قادر به مهار متالوپروتئینازهای ۱،۲،۳،۷،۹ و ۱۴ بود اما توسعه آن به دلیل پایین بودن حلالیت و دسترسی زیستی در فاز ۳ کارآزمایی بالینی متوقف شده است (۸، ۱۵). علیرغم اثربخشی بالای داروی Marimastat در تأخیر در پیشرفت بیماری، توکسیسیتی وابسته به دوز، درد عضلانی و ایجاد التهاب باعث توقف توسعه این دارو در فاز ۳ کارآزمایی بالینی گردید(۱۶).

کاظمی و همکاران در انستیتو پاستور ایران طی توالی یابی ترانسکریپتوم غدد زهری عقرب همیسکورپیوس وجود ترکیبات متعددی را گزارش نمودند (SRASRX1584448) (۱۷). مطالعات اولیه حاکی از وجود چهار مهارکننده متالوپروتئیناز (HLMetInhibit1-4) در زهر این عقرب بود.

هدف از مطالعه‌ی حاضر ابتدا بررسی مقدماتی ساختار و ویژگی‌های دو مورد از این مهارکننده‌ها (HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2) و سپس پیش‌بینی میزان انرژی اتصال آن‌ها به گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF-R2) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیرنده‌های آن در سلول در مقایسه با مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز ۱ انسانی (TIMP-1) بود. در ادامه کلونینگ و بیان سایر مهارکننده‌های متالوپروتئیناز زهر این عقرب در پژوهش‌های بعدی مدنظر است.

روش کار

مطالعات مقدماتی: پیش از این توالی یابی ترانسکریپتوم غدد زهری عقرب همیسکورپیوس در انستیتو پاستور صورت پذیرفته و وجود ترکیبات متعددی در زهر این عقرب گزارش شده بود (۱۷). مطالعات اولیه حاکی از وجود چهار مهارکننده متالوپروتئیناز (MG764541) HLMetInhibit1، (MG764542) HLMetInhibit2، HLMetInhibit3 (MG764543) و HLMetInhibit4 (MG764544) در زهر این عقرب بود. این توالی‌ها در پایگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) (National Center for Biotechnology Information) با شماره دسترسی‌های فوق ثبت گردیده است.

توالی‌های نوکلئوتیدی پس از ترجمه به‌منظور تصدیق تعلق آن‌ها به ابر خانواده مهارکننده‌های متالوپروتئیناز به‌وسیله‌ی دیتابیس PANTHER (http://www.pantherdb.org/tools/hmmScoreFor m.jsp) مورد بررسی قرار گرفتند. توالی و نوع دامین‌های محافظت شده (Conserved Domain) به‌وسیله پایگاه Conserved Domain Database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/do cs/cdd_search.html) و ساختار ثانویه ی آن‌ها ازنظر وجود مارپیچ های آلفا (Alpha helix) و رشته های بتا (Beta strand) به‌وسیله پایگاه Phyre (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2) مشخص شدند. سپس ساختار ۳ بعدی دو مهارکننده ی عقرب توسط پایگاه I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) شبیه سازی شد(۱۸). ساختار ۳ بعدی گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF-R2) و مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز ۱ انسانی (TIMP-1) نیز از پایگاه RSCB (https://www.rcsb.org/) با شماره های دسترسی 3V2A و 3V96 در قالب PDB (Protein Data Bank) دریافت و ذخیره گردید. تمامی فایلها توسط نرم افزار SPDBV V1.4 اصلاح شدند، به این صورت که ابتدا زنجیره ها و مولکولهای آب و سایر لیگاندها و یونهای اضافی حذف شدند و سپس فایل های نهایی انرژی مینیمایز شدند. بررسی کیفیت توالی‌ها به‌وسیله نمودار راماچاندران و از طریق پایگاه Ramachandran Plot Analysis (http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapp er/rampage.php) صورت پذیرفت. در نهایت با استفاده از سرور محاسباتی دانشگاه بوستون ClusPro (https://cluspro.bu.edu/home.php) داکینگ مولکولی انجام شد و میزان انرژی تمایلی اتصال مهارکننده‌های عقرب به گیرنده در مقایسه با مهارکننده انسانی محاسبه شد (۱۹). نمایش این ساختار ها به‌وسیله نرم افزار Discovery studio visualizer 2017 انجام شد (۲۰).

طراحی و سفارش وکتور و ترانسفورماسیون آن به میزبان باکتریایی: پلاسمیدهای نوترکیب pET-22b-HLMetInhibit1 و pET-22b-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

توسط نرم افزار SnapGene V. 3.2.1 طراحی و جهت سنتز به شرکت سازنده سفارش داده شدند (شرکت GENE Ray با شماره محصول VNTDATE 11060165-66). ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب حاوی ژن های مورد نظر به میزبان باکتریایی (*E. coli* BL21 (DE3 با استفاده از روش شوک حرارتی و در محیط LB broth (Sigma) حاوی آمپی سیلین - (5µl 100 µg/ml) انجام شد. از آنجا که پلاسمید نوترکیب حامل ژن مقاومت به آمپی سیلین میباشد رشد باکتری نشان دهنده انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری میباشد.

Colony PCR و ژل الکتروفورز: جهت تایید صحت ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب،Colony PCR با استفاده از پرایمرهای T7 (T7 Promoter: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' و T7 Terminator: 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3') انجام گردید. واکنش PCR درحجم نهائی ۱۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۵ میکرولیتر از هر ۱۰ پیکومولار)، ۱۲,۵میکرولیتر بافر 10X، ۵ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار)، ۵ میلی مول از هر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰,۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمراز (۱۰ واحد بر میکرولیتر) و ۹۲,۵ میکرو لیتر dd H2O انجام شد و شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، دناتوراسیون ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، گسترش به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۲۳ چرخه و گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. پس از انجام واکنشPCR، الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ % انجام شد و رنگ آمیزی به‌وسیله اتیدیوم بروماید ودر حضور مارکر مولکولی استاندارد (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder) صورت پذیرفت. ژل با دستگاه ژل داک(BioRad USA) در طول موج ۳۶۵- ۲۵۴ نانومتر مشاهده شد و تکثیر محصول مورد نظر در مقایسه با مارکرمولکولی ارزیابی شد.

بیان پروتئین محصول: بیان باکتری حامل پلاسمید نوترکیب در محیط LB broth حاوی آمپی سیلین (100 µg/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و هوادهی ۲۵۰ دور بر دقیقه انکوبه شد تا به چگالی نوری ۰,۶ (Epoch™ Microplate Spectrophotometer) در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید. سپس القا ی بیان پروتئین با غلظت های مختلف IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و هوادهی ۲۵۰ دور بر دقیقه انجام شد(۲۱). از نمونه های قبل از القا ،۲ ساعت پس از القا و ۵ ساعت پس از القا با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه بمدت ۶۰ ثانیه رسوب گیری انجام شد ، سپس رسوب حاصله در ۱۰۰ میکرولیترPBS حل و ۶ میکرولیتر لودینگ بافر به ۲۴ میکرولیتر از نمونه ها افزوده شد و در نهایت نمونه ها بمدت ۱۵ دقیقه جوشانیده شدند. بیان پروتئین محصول ابتدا به‌وسیله SDS-PAGE (Bio Rad) روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد و با رنگ امیزی کوماسی بلو بررسی و متعاقب آن وسترن بلات روی کاغذ نیتروسلولوز و با آنتی بادی Anti-His متصل به HRP (۱:۱۰۰۰)و سوبسترای 4-chloro-1-naphthol انجام شد.

یافته‌ها

آنالیز های مقدماتی و داکینگ مولکولی: نتایج پایگاه PANTHER تعلق توالی‌های مورد بررسی را به ابرخانواده‌ی مهارکننده‌های متالوپروتئیناز تایید نمود (جدول ۱). همچنین نتایج پایگاه Conserved Domain Database نیز وجود دامین های NTR را که از ویژگی‌های مهارکننده‌های متالوپروتئیناز میباشد تصدیق نمود (جدول ۲). ساختار ثانویه مولکول ها ازنظر وجود مارپیچ های آلفا و رشته های بتا بررسی شد (شکل ۱). سپس داکینگ مولکولی به‌وسیله سرور محاسباتی دانشگاه بوستون (ClusPro)، به‌منظور پیش‌بینی انرژی اتصالی بین توالی‌های مهارکننده ی عقرب و گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسانی انجام شد و با میزان انرژی اتصالی پیش‌بینی شده برای مهارکننده ۱ انسان مقایسه شد. نتایج نشان دهنده ی میل اتصالی مناسب مهارکننده‌های عقرب، علی الخصوص HLMetInhibit1 نسبت به گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسان بود (جدول ۳). کمپلکس‌های مهارکننده/ گیرنده محصول آنالیز نتایج داکینگ مولکولی توسط نرم افزار Discovery studio

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

جدول ۱- نتایج پایگاه PANTHER برای بررسی تعلق توالی‌های ژن‌های HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2 به ابرخانواده ی مهارکننده‌های متالوپروتئیناز

Protein	Subfamily identified	PANTHER Hit	HMM E-value score	Notes
HLMetInhibit1	METALLOPROTEASE INHIBITOR	PTHR11844	1.6e-41	closely related
HLMetInhibit2	METALLOPROTEASE INHIBITOR	PTHR11844	3.8e-19	related

جدول ۲- نتایج پایگاه Conserved Domain Database برای بررسی وجود دامین‌های NTR در توالی‌های ژن‌های HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2

Protein	Domain Name	Accession	Interval	E-value
HLMetInhibit1	NTR_like super family	cl02512	22-197	2.12e-35
HLMetInhibit2	NTR_like super family	cl02512	28-143	3.43e-16

جدول ۳- نتایج داکینگ مولکولی بین مهارکننده های عقرب و انسان (بعنوان لیگاند) و گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسان (بعنوان گیرنده)

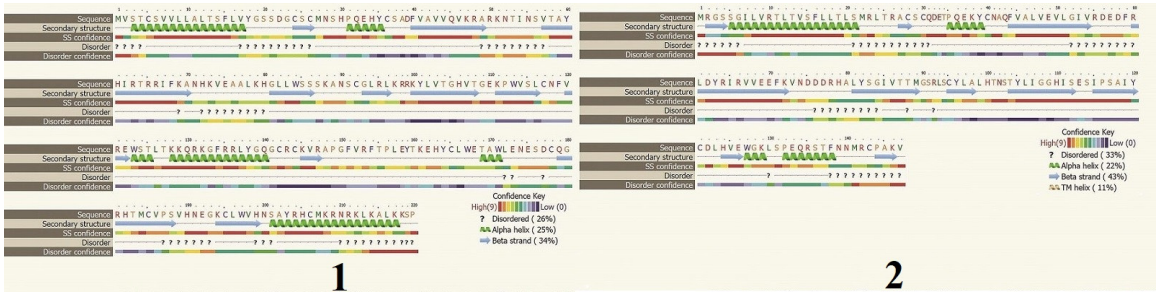
Receptor	Ligand	Weighted Score: Center	Weighted Score: Lowest Energy
Human VEGFR-2(3V2A)	HLMetInhibit1(Predicted)	-1168.6	-1346.9
Human VEGFR-2(3V2A)	HLMetInhibit1(Predicted)	-776.8	-913.7
Human VEGFR-2(3V2A)	Human TIMP-1(3V96)	-831.6	-1111.7

اعداد منفی‌تر نشان دهنده میل اتصالی بیشتر بین گیرنده و لیگاند می‌باشد.

visualizer مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

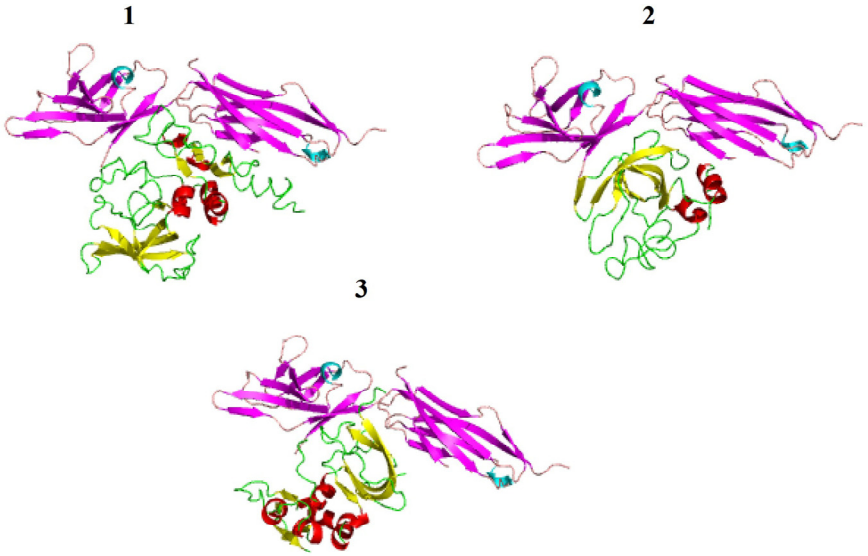
تایید انتقال وکتور حاوی ژنهای HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2 به میزبان باکتریایی: بمنظور تایید انتقال پلاسمید نوترکیب pET-22b- HLMetInhibit1 و pET-22b- HLMetInhibit1 (شکل-۳) به باکتری میزبان *E. coli* BL21 Colony PCR انجام شد و پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از مارکر مولکولی استاندارد مشاهده شدند. از آنجا که طول قطعه ی ژنی کد کننده HLMetInhibit1 برابر با ۶۸۴ جفت باز و HLMetInhibit2 برابر با ۴۶۵ جفت باز بود حظور باند در ناحیه ی بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز تایید کننده ی تکثیر ژن مورد نظر و صحت ترانسفورماسیون بود (شکل ۴).

بیان پروتئین‌های HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2: از رسوب نمونه ها که در PBS حل و لودینگ بافر به آن‌ها افزوده شد بود و بمدت ۱۵ دقیقه جوشانیده شدند جهت SDS-PAGE روی ژل پلی اکریل آمید و متعاقب آن وسترن بلات استفاده شد. از آنجا که پروتئین HLMetInhibit1 دارای ۲۲۰ اسید آمینه و وزن مولکولی تخمینی ۲۶,۲ کیلو دالتون و پروتئین HLMetInhibit2 نیز دارای ۱۴۷ اسید آمینه و وزن تخمینی ۱۷,۵ کیلودالتون می‌باشد مشاهده ی باند در محدوده ی وزنی ۲۴-۳۱ کیلودالتونی برای HLMetInhibit1 و در محدوده وزنی ۱۵-۲۴ کیلو دالتونی برای HLMetInhibit2 روی ژل و کاغذ تایید کننده ی بیان موفقیت آمیز پروتئین است (شکل های ۵ و ۶). بیشترین میزان بیان پس از ۵ ساعت و با غلظت ۱mM از IPTG مشاهده شد.

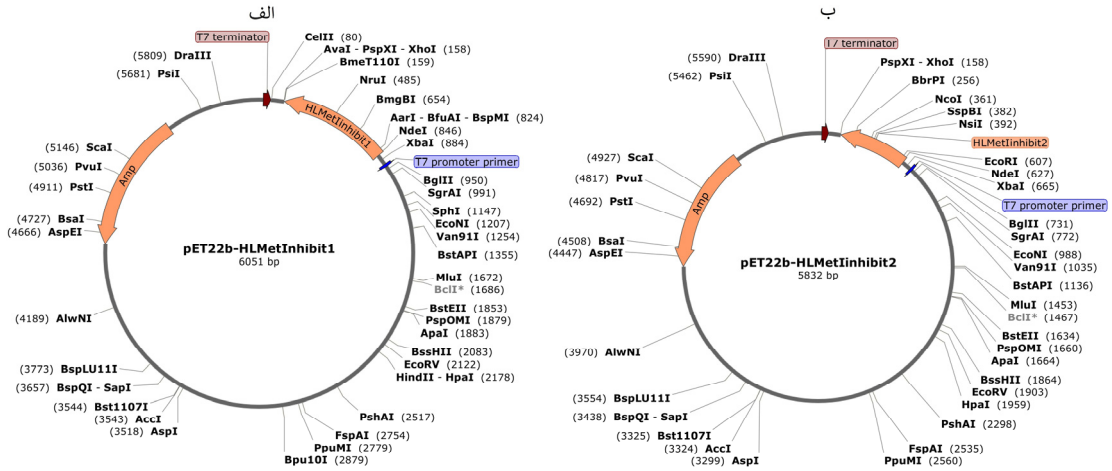


شکل ۱- ساختار ثانویه پیش بینی شده مولکولهای مهار کننده متالوپروتئیناز عقرب همیسکورپیوس توسط پایگاه Phyre ۲ . HLMetInhibit1(۱ HLMetInhibit2

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]



شکل ۲- مجموعه *گیرنده* و لیگاند نمایش داده شده توسط Discovery studio visualizer محصول آنالیز نتایج داکینگ مولکولی.۱) HLMetInhibit1 بعنوان لیگاند و گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسان بعنوان گیرنده(مولکول بنفش). ۲) HLMetInhibit2 بعنوان لیگاند و گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسان بعنوان گیرنده(مولکول بنفش). ۳) Human TIMP-1 بعنوان لیگاند و گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسان بعنوان گیرنده(مولکول بنفش)



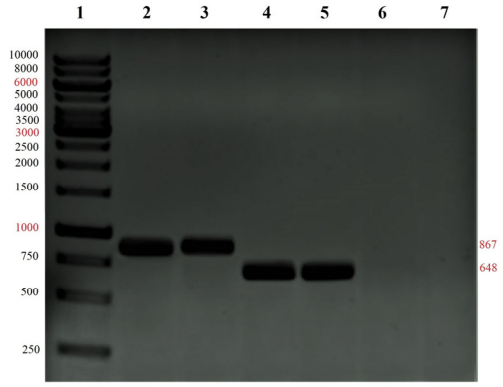
الف: pET-22b- HLMetInhibit1 ب: pET-22b- HLMetInhibit2

شکل ۳- شماتیک پلاسمیدهای نوترکیب طراحی شده توسط نرم افزار SnapGene

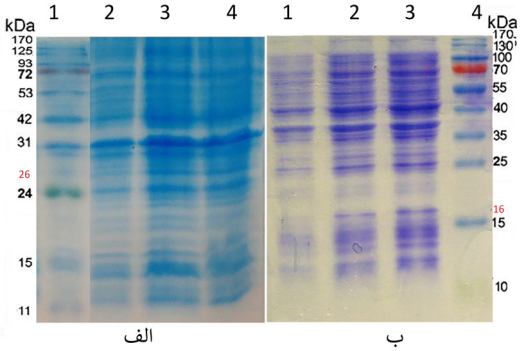
بحث و نتیجه‌گیری

از دیرباز زهر جانوران سمی، علی الخصوص عقرب به عنوان یک ماده ی درمانی مورد استفاده بوده و امروزه نیز طی مطالعات متعدد *in vitro* و *in vivo* خواص متعدد ضد سرطانی برای زهر عقرب اثبات گردیده است(۲۲). به‌طور مثال Iberiotoxin موجود در سم عقرب مزوبوتوس تامولوس (Mesobuthus tamulus) خواص مهاری در سرطان پستان رده MCF-7 از خود نشان داده است(۲۲). طی مطالعه ای دیگر، ترکیبی از سم چند عقرب (Leiurus quinquestriatus, Androctonus bicolor, Androctonus crassicauda) دارای اثر مهاری بر تحرک سلول‌ها وتشکیل کلونی در سرطان پستان رده MDA-MB-231 بود (۲۳). همیسکورپیوس لپتوروس یکی از خطرناک‌ترین

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

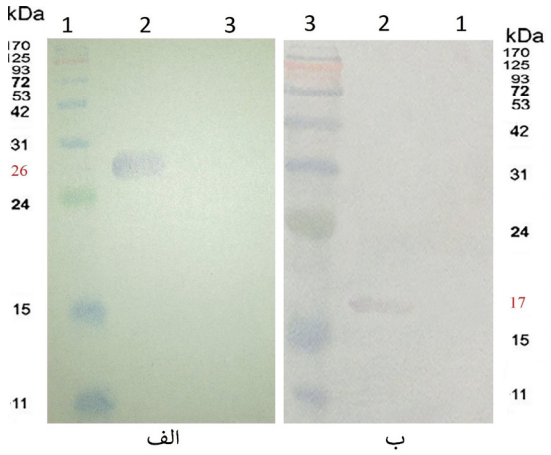


شکل ۴- الکتروفورز محصولات Colony PCR روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱ مارکر مولکولی 1 kb DNA Ladder، ستون های ۲ و ۳ نمونه‌های کلون های انتخابی ژن HLMetInhibit1 با ۶۸۴ جفت باز (باند تخمینی محصول ۸۶۷ جفت باز) و ستونهای ۴ و ۵ نمونه های کلون‌های انتخابی ژن HLMetInhibit2 با ۴۶۵ جفت باز (باند تخمینی محصول ۶۴۸ جفت باز) و ستون های ۶ و ۷ کنترل منفی.



شکل ۵- SDS-PAGE در ژل ۱۲٪ و رنگ آمیزی با کوماسی بلو. الف. پروتئین HLMetInhibit1 با وزن مولکولی ۲۶,۲ کیلودالتون، ستون ۱: نشانگر مولکولی، ستون ۲: پیش از القا، ستون ۳: دو ساعت پس از القا و ستون ۴: پنج ساعت پس از القا. ب . پروتئین HLMetInhibit2 با وزن مولکولی ۱۷,۵ کیلودالتون: ستون۱: پیش از القا، ستون ۲: دو ساعت پس از القا ستون ۳: پنج ساعت پس از القا و ستون۴: نشانگر مولکولی. القای بیان پروتئین در باکتری *E. coli* BL21 با IPTG 1mM و در دمای ۳۰ درجه.

گونه‌های عقرب بومی ایران می‌باشد که زهر آن بسیار سمی و مسئول بیشتر مرگ و میرهای ناشی از گزش عقرب در ایران است (۱). مطالعاتی که تا کنون بر روی خواص ضد سرطانی زهر این عقرب صورت گرفته محدود است. به‌طور مثال، در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد که همی نکرولایزین زهر همیسکورپیوس تاثیر مهاری بر روی رشد سلول سرطان پروستات (PC-3) دارد (۲۴). خاصیت ضد رگ زایی Hemilipin2 که یکی از ترکیبات زهر همیسکورپیوس میباشد (۲۵) و اثر ضد



شکل ۶- لکه گذاری وسترن روی کاغذ نیتروسلولوز. قسمت الف ستون ۱: نشانگر مولکولی، ستون ۲: پروتئین HLMetInhibit1 با وزن مولکولی تخمینی ۲۶,۲ کیلودالتون و ستون ۳: کنترل منفی. قسمت ب. ستون ۱: نمونه کنترل منفی. ستون ۲: پروتئین HLMetInhibit2 با وزن مولکولی تخمینی ۱۷,۵ کیلودالتون و ستون۳ : نشانگر مولکولی

رگ زایی پپتیدهای HL-7 and HL-10 سم این عقرب نیز در ۲۰۱۷ مورد بررسی قرار گرفت (۲۶).

ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) و مهارکننده‌های آن‌ها از مهم‌ترین پروتئینهای دخیل در فرایند رگ زایی می‌باشند که اثر خود را از طریق مهار مستقیم فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یا مهار گیرنده‌های آن اعمال می‌کنند (۹). به‌طور مثال مطالعات از نقش متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ در سرطان پستان و یا متالوپروتئینازهای ۹ و ۱۰ و ۱۳ در ملانوما (Melanoma) حکایت دارد (۲۹-۲۷). افزایش بیان متالوپروتئینازهای ۱۱ و ۱۴ و ۱۵ نیز در تومور های سرطان پستان مشاهده شده است(۳۲-۳۰). کاهش بیان مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز۱ (TIMP) در سرطان پستان گزارش شده (۳۳). کاهش بیان مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز۳ نیز در مراحل پیشرفته ی بسیاری از سرطان ها از جمله روده، پستان، مثانه و مغز حکایت دارد. تغییرات بیان مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز۲ در سرطانهای معده، روده، پستان و ریه و تغییرات بیان مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز۴ در برخی سرطانها مانند پستان ، مغز ، مثانه و پروستات تایید شده است (۳۴). بنا بر این مهارکننده‌های متالوپروتئیناز از طریق ایفای نقش در مهار رگ زایی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

میتوانند در راستای کاهش گسترش سرطان به عنوان یک استراتژی درمانی مورد استفاده قرار گیرند (۳۵).

در این مطالعه دو مورد از مهارکننده‌های متالوپروتئیناز موجود در زهر عقرب همیسکورپیوس لپتوروس (عقرب خطرناک خوزستان) با نامهای HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2 مورد مطالعه قرار گرفتند. توالی این مهارکننده‌ها از مطالعه قبلی توالی یابی ترانسکریپتوم غدد زهری این عقرب که در سال ۲۰۱۷ توسط کاظمی و همکاران در انستیتو پاستور ایران انجام رفته بود استخراج شد (۱۷). این توالی‌ها در پایگاه مرکز ملی بیوتکنولوژیک ایالات متحده (NCBI) با شماره دسترسی های MG764541 و MG764542 به ثبت رسیدند. توالی HLMetInhibit1 پروتئینی به طول ۲۲۰ اسید آمینه با وزن تقریبی ۲۶ کیلو دالتون و توالی HLMetInhibit2 پروتئینی به طول ۱۴۷ اسید آمینه با وزن تقریبی ۱۷ کیلو دالتون را کد می نمایند. آنالیز نتایج پایگاه PANTHER تعلق ساختار هر دو پروتئین HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2 را به ابرخانواده‌ی مهارکننده‌های متالوپروتئیناز تایید می کرد که HLMetInhibit1 از این نظر شباهت ساختاری بیشتری به نمایش می گذاشت. نتایج پایگاه Conserved Domain Database نیز حضور دامین پروتئینی NTR که از خصایص ساختاری ابرخانواده‌ی مذکور بود. در ساختار ثانویه ی HLMetInhibit1 حضور ۶ مارپیچ آلفا و ۱۱ رشته ی بتا و در ساختار ثانویه ی HLMetInhibit2 حضور ۴ مارپیچ آلفا و ۱۰ رشته ی بتا توسط پایگاه Phyre پیش‌بینی شد. از آنجا که یکی از مهم‌ترین مولکول های هدف مهارکننده‌های متالوپروتئیناز در سلول، گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسانی هستند لذا با انجام داکینگ مولکولی پیش‌بینی مناسبی از میزان انرژی اتصالی HLMetInhibit1 و HLMetInhibit2 با گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسانی در مقایسه با مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز ۱ انسانی بدست می آمد. بر اساس نتایج این پیش‌بینی HLMetInhibit1 بیشترین تمایل اتصالی نسبت به گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی انسانی را دارا می‌باشد که از این رو در صورت تایید این نتایج توسط تست های آزمایشگاهی در شرایط *in vitro* و سپس *in vivo*، این ملکول را به کاندید مناسبی به عنوان یک داروی نوترکیب برای مهار رگ زایی و درمان سرطان تبدیل می نماید. کلونینگ ژن های HLMetInhibit1 با طول ۶۸۴ و HLMetInhibit2 با طول ۴۶۵ جفت باز و بیان پروتئین‌های محصول آن در میزبان باکتریایی برای اولین بار در این پژوهش با موفقیت انجام شد. بیشترین بیان پروتئین‌های محصول در حضور IPTG با غلظت ۱ میلی مولار، در دمای ۳۰ درجه و ۵ ساعت پس از القا به‌وسیله SDS-PAGE روی ژل و رنگ امیزی با کوماسی بلو مشاهده شد. دمای ۳۰ درجه علاوه بر افزایش بیان فرم محلول پروتئین، موجب کاهش متابولیسم و تقسیم سلولی باکتری گردیده و بخش عمده انرژی باکتری صرف بیان پروتئین می‌گردد (۲۱). پروتئین ها به‌وسیله‌ی روش نیمه خشک از ژل به کاغذ نیتروسلولوز منتقل و با لکه گذاری وسترن صحت بیان پروتئین‌های نوترکیب محصول تایید شدند. پیش از این نیز تلاش هایی جهت کلونینگ و بیان مهارکننده‌های متالوپروتئیناز انسانی یا حیوانی صورت گرفته است. به‌طور مثال مهارکننده‌های ۱ و ۲ انسانی در سال ۲۰۱۷ توسط لی و همکاران در میزبانی باکتریایی اشرشیاکلی کلون و بیان گردیدند که پروتئین محصول به صورت فعال و قادر به مهار متالوپروتئینازهایی مانند ۱،۲،۷ و ۱۴ بود (۳۶).

در این پژوهش برای اولین بار به بررسی ساختاری دو مورد از مهارکننده‌های متالوپروتئیناز عقرب همیسکورپیوس لپتروس و پیش‌بینی میل اتصالی آن‌ها به گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی پرداخته شد که صورت وجود امکان بررسی تاثیر مهاری پروتئین‌های محصول بر گیرنده ی خود در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه نتایج با پیش‌بینی ها، امکان اظهار نظر دقیق تر درمورد صحت پیش‌بینی بیوانفورماتیکی و میزان اثرگذاری آن‌ها فراهم می بود. کشف مولکول ها با پتانسیل دارویی از منابع طبیعی یکی از موارد با اهمیت بشمار میرود و با توجه به شکست های پی در پی در درمان بسیاری بیماری ها منجمله سرطان، تلاش جهت یافتن داروی مناسب تر و کاراتر همچنان ادامه دارد. کلونینگ و بیان یک ژن و تولید محصولات نوترکیب در میزبان باکتریای در مقایسه با استخراج مولکول ها از منابع

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

طبیعی آن‌ها مزایای متعددی به ارمغان می آورد که تولید مقادیر متنابهی از محصول مورد نظر با خلوص بالا، سرعت استحصال زیاد، قیمت تمام شده مناسب، ویژگی‌های بیوشیمیایی کاملا از پیش مشخص شده و یکسان برای تمامی محصولات از مهم‌ترین آن‌ها بشمار می آیند. اگرچه درصورتی که تغییرات پس از ترجمه ای مانند گلیکوزیلاسیون در محصول مورد نظر حیاتی باشد میزبان های باکتریایی شاید قادر به اعمال این ویرایش ها نبوده و نیاز به انتخاب سایر میزبان ها ضروری بنظر برسد (۳۷). در این پژوهش کلونینگ و بیان ژن مهارکننده‌های متالوپروتئیناز ۱ و ۲ عقرب همیسکورپیوس لپتروس به‌عنوان پروتئین‌هایی نوین که تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته اند انجام پذیرفت و امید است پس از انجام مطالعات آتی *in vitro* و *in vivo* بتوان به کاندیدی مناسب برای تحقیق در زمینه های مختلف درمانی دست یافت.

تقدیر و تشکر

از انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران بابت تامین هزینه‌های مالی و امکانات آزمایشگاهی لازم برای انجام این پروژه سپاسگزاریم.

References

1. Pipelzadeh MH, Jalali A, Taraz M, Pourabbas R, Zaremirakabadi A. An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion Hemiscorpius lepturus. Toxicon. 2007;50(7):984-92.
2. Kassiri H, Kasiri N, Dianat A. Species composition, sex ratio, geographical distribution, seasonal and monthly activity of scorpions and epidemiological features of scorpionism in Zarrin-dasht County, Fars Province, Southern Iran. Asian Pac J Tropic Dis. 2015;5:S99-S103.
3. Borchani L, Sassi A, Gharsa HB, Safra I, Shahbazzadeh D, Lasfar ZB, et al. The pathological effects of Heminecrolysin, a dermonecrotic toxin from Hemiscorpius lepturus scorpion venom are mediated through its lysophospholipase D activity. Toxicon. 2013;68:30-9.
4. Shahbazzadeh D, Srairi-Abid N, Feng W, Ram N, Borchani L, Ronjat M, et al. Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion Hemiscorpius lepturus which is active on ryanodine-sensitive Ca2+ channels. Biochem J. 2007;404(1):89-96.
5. Srairi-Abid N, Shahbazzadeh D, Chatti I, Mlayah-Bellalouna S, Mejdoub H, Borchani L, et al. Hemitoxin, the first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion Hemiscorpius lepturus. FEBS J. 2008;275(18):4641-50.
6. Borchani L, Sassi A, Shahbazzadeh D, Strub J-M, Tounsi-Guetteti H, Boubaker MS, et al. Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. Toxicon. 2011;58(1):130-9.
7. Jridi I, Catacchio I, Majdoub H, Shahbazeddah D, El Ayeb M, Frassanito MA, et al. Hemilipin, a novel Hemiscorpius lepturus venom heterodimeric phospholipase A2, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Toxicon. 2015;105:34-44.
8. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: bringing new life to old ideas. Genes & diseases. 2015;2(1):26-34.
9. Löffek S, Schilling O, Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. Eur Respiratory Soc. 2011.
10. CT Palei A, P Granger J, E Tanus-Santos J. Matrix metalloproteinases as drug targets in preeclampsia. Curr Drug Targets. 2013;14(3):325-34.
11. Qi JH, Ebrahem Q, Ali M, Cutler A, Bell B, Prayson N, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 peptides inhibit angiogenesis and choroidal neovascularization in mice. PLoS One. 2013;8(3):e55667.
12. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG, editors. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. Seminars in cancer biology; 2010: Elsevier.
13. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. Oncogene. 2002;21(14):2245.
14. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. Gen Biol. 2011;12(11):233.
15. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FeBS J. 2011;278(1):16-27.
16. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer—trials and tribulations. Science. 2002;295(5564):2387-92.
17. 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. 2017;125:123-30.
18. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nature Methods. 2015;12(1):7.
19. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. Nature Protocols. 2017;12(2):255.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

20. Biovia DS. Discovery studio modeling environment. San Diego: Dassault Systèmes. 2017.
21. Jiang X, Zhang H, Yang J, Liu M, Feng H, Liu X, et al. Induction of gene expression in bacteria at optimal growth temperatures. Appl Microbiol biotechnol. 2013;97(12):5423-31.
22. Ding J, Chua P-J, Bay B-H, Gopalakrishnakone P. Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. Experim Biol Med. 2014;239(4):387-93.
23. Al‐Asmari AK, Islam M, Al‐Zahrani AM. In vitro analysis of the anticancer properties of scorpion venom in colorectal and breast cancer cell lines. Oncol Lett. 2016;11(2):1256-62.
24. Shahbazzadeh D, Yardehnavi N, Kazemi-Lomedasht F, Bagheri KP, Behdani M. Anticancer activity of H. lepturus venom and its hemolytic fraction (heminecrolysin). Health Biothechnol Biopharm. 2017;1(1):45-52.
25. Jridi I, Catacchio I, Majdoub H, Shahbazzadeh D, El Ayeb M, Frassanito MA, et al. The small subunit of Hemilipin2, a new heterodimeric phospholipase A2 from Hemiscorpius lepturus scorpion venom, mediates the antiangiogenic effect of the whole protein. Toxicon. 2017;126:38-46.
26. Setayesh-Mehr Z, Asoodeh A. The inhibitory activity of HL-7 and HL-10 peptide from scorpion venom (Hemiscorpius lepturus) on angiotensin converting enzyme: Kinetic and docking study. Bioorgan Chem. 2017;75:30-7.
27. Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. Oncotarget. 2014;5(9):2736.
28. Bhattacharyya N, Mondal S, Ali MN, Mukherjee R, Adhikari A, Chatterjee A, editors. Activated Salivary MMP-2-A Potential Breast Cancer Marker. Open Conference Proceed J. 2017.
29. Orgaz JL, Pandya P, Dalmeida R, Karagiannis P, Sanchez-Laorden B, Viros A, et al. Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. Nature Commun. 2014;5:4255.
30. Gonzalez L, Pidal I, Junquera S, Corte M, Vazquez J, Rodriguez J, et al. Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. Br J Cancer. 2007;97(7):957-63.
31. Perentes JY, Kirkpatrick ND, Nagano S, Smith EY, Shaver CM, Sgroi D, et al. Cancer cell–associated MT1-MMP promotes blood vessel invasion and distant metastasis in triple-negative mammary tumors. Cancer Res. 2011;71(13):4527-38.
32. McGowan P, Duffy M. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. Ann Oncol. 2008;19(9):1566-72.
33. Kuvaja P, Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. The absence of immunoreactivity for tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), but not for TIMP-2, protein is associated with a favorable prognosis in aggressive breast carcinoma. Oncology. 2005;68(2-3):196-203.
34. Jackson HW, Defamie V, Waterhouse P, Khokha R. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. Nature Rev Cancer. 2017;17(1):38.
35. Radisky ES, Sarmazdeh MR, Radisky DC. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. J Cell Biochem. 2017.
36. Lee KB, Nam DH, Nuhn JA, Wang J, Schneider IC, Ge X. Direct expression of active human tissue inhibitors of metalloproteinases by periplasmic secretion in Escherichia coli. Microb Cell Factor. 2017;16(1):73.
37. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol. 2006;72(2):211.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]