**مجله دانشکده پزشکی اصفهان**
**سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۹۷/هفته‌ی اول آبان ماه ۱۳۹۵**

**تاریخ دریافت:** ۱۳۹۵/۳/۱۵
**تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۴/۹

# بررسی مولکولی cDNAی کد کننده‌ی سم مؤثر بر ایزوفرم دوم گیرنده‌ی ریانودین حاصل از کتابخانه‌ی cDNAی غده‌ی زهری عقرب زرد ایرانی Odontobuthus doriae

مریم نادری سورکی[۱]، امیر جلالی[۲]، حمید گله‌داری[۳]

**مقاله پژوهشی**

## چکیده

**مقدمه:** زهر عقرب‌ها، از پپتیدهای فعال زیستی تشکیل شده است که ارزش پزشکی در کشف دارو دارند. امروزه، بسیاری از مطالعات به آینده‌ی درمان با ترکیبات زهر عقرب‌ها بر اساس فعالیت طبیعی که در زهر دارند، اشاره می‌کنند. یکی از انواع پپتیدهای زهری، سموم مؤثر بر کانال‌های کلسیمی است که گیرنده‌های کلسیمی حساس به ریانودین (Ryanodine sensitive $Ca^{+2}$-receptors یا RyRs) را مهار می‌کنند. فعالیت کنترل نشده‌ی ایزوفرم-۲ این کانال‌ها (RyR2) در مشکلاتی مانند آریتمی قلبی مشاهده شده است. سموم کلسیمی مهار کننده‌ی این گیرنده‌ی یونی، می‌تواند به عنوان دارویی طبیعی در جهت درمان این عارضه باشد.

**روش‌ها:** کتابخانه‌ی complementary DNA (cDNA) از غده‌ی زهری ۶ عقرب Odontobuthus doriae ساخته شد. cDNAی مربوط به ODCaTx1 از این کتابخانه جدا و تعیین ترادف نوکلئوتیدی شد. توالی حاصل مورد ارزیابی‌های مولکولی به کمک برخی نرم‌افزارها نظیر ORF finder، BlastP، DISULFIND، signalP4.1، ProtParam و Phyre2 مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** پپتید احتمالی ODCaTx1 دارای وزن مولکولی بسیار کم (۴۴۴۰/۱ دالتون) و ۴۳ اسید آمینه بود که جزء مولکول‌های پایدار طبقه‌بندی شد. این پپتید، در بررسی‌های متعدد بیوانفورماتیک، شباهت بسیار زیادی به نوعی سم مهار کننده‌ی RyR2 از عقرب Hottentotta judaicus داشت. نیمه عمر تخمینی آن (در رتیکولوسیت‌های پستانداران، In vitro) ۳۰ ساعت محاسبه شد.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه، cDNAی یکی از سموم کلسیمی مؤثر بر ایزوفرم-۲ گیرنده‌های ریانودین و پپتید احتمالی آن (ODCaTx1) از غده‌ی زهری عقرب زرد ایرانی، مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفت. همچنین، بستری مناسب جهت بیان مقادیر کافی از پپتید به وجود آمد. این سم به دلیل اندازه‌ی کوچک و پایداری زیاد، می‌تواند کاندیدای مناسبی در مطالعات دارویی مرتبط با درمان آریتمی قلبی و تشنج باشد.

**واژگان کلیدی:** ایزوفرم-۲ گیرنده‌ی ریانودین، سموم کلسیمی عقرب، درمان آریتمی قلبی، کتابخانه‌ی complementary DNA، Odontobuthus doriae

**ارجاع:** نادری سورکی مریم، جلالی امیر، گله‌داری حمید. **بررسی مولکولی cDNAی کد کننده‌ی سم مؤثر بر ایزوفرم دوم گیرنده‌ی ریانودین حاصل از کتابخانه‌ی cDNAی غده‌ی زهری عقرب زرد ایرانی Odontobuthus doriae.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۹۷): ۱۰۳۷-۱۰۳۲

## مقدمه

زهر هر عقرب متشکل از پپتیدهای سمی گوناگون با دامنه‌ی وزنی ۹۰۰۰-۱۰۰۰ دالتون است (۱). مطالعات نشان می‌دهد که در حدود ۱۵۰ هزار پلی پپتید مختلف در بین ۱۵۰۰ گونه‌ی عقرب در جهان وجود دارد. با این حال، فقط تعداد کمی از آن‌ها یعنی حدود ۴۰۰ پلی‌پپتید از ۳۰ گونه ی مختلف عقرب جداسازی و بررسی شده است. در واقع، پپتیدهای زیادی در زهر عقرب ها به صورت گنجینه هایی بزرگ در انتظار اکتشاف هستند (۳-۲). عقرب Odontobuthus doriae، متعلق به خانواده‌ی بوتیده از خطرناک‌ترین عقرب‌های ایران است که در سال ۲۰۰۵ به عنوان «عقرب زرد ایرانی» معرفی و مورد توجه قرار گرفت و جزء عقرب‌های دارای اهمیت پزشکی است (٤).

توکسین‌ها، مهم‌ترین اجزای زهر عقرب و به طور اساسی، پروتئین‌های بافری، با وزن مولکولی پایین در حدود ۷۰۰۰ دالتون هستند. پایداری بالای این سموم نیز به علت وزن مولکولی پایین آن‌ها

۱- گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲- دانشیار، گروه سم‌شناسی و داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات سم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** حمید گله‌داری
Email: galehdari187@yahoo.com

می‌باشد. این پروتئین‌ها، شامل عوامل سمی نظیر نوروتوکسین، کاردیوتوکسین و هموتوکسین هستند (۵). سموم عقرب بر اساس مکانیسم سمیت در انسان یا اثرات آن‌ها بر روی کانال‌های یونی، تقسیم‌بندی می‌شوند. برخی از این سموم، پپتیدهای مؤثر بر گیرنده‌های کلسیمی حساس به ریانودین (Ryanodine sensitive $Ca^{+2}$-receptors یا RyRs) هستند که ساختمان دقیق آن‌ها به طور دقیق شناسایی نشده است (۷-۶).

کلسیم درون سلولی، یکی از مهم‌ترین پیامبرهای ثانویه در انتقال پیام سلولی است و مهم‌ترین منبع آن، شبکه‌ی آندوپلاسمی می‌باشد. دو نوع کانال کلسیمی شامل گیرنده‌های کلسیمی حساس به ریانودین (RyR) و گیرنده‌های اینوزیتول سه فسفاته (Inositol 1,4,5- phosphate receptors یا $IP_3Rs$) در غشای شبکه‌ی آندوپلاسمی وجود دارد (۸).

تا کنون ۳ ایزوفرم برای RyR شناسایی شده است. RyR1 در سلول‌های ماهیچه‌ی اسکلتی، RyR2 در سلول‌های ماهیچه‌ی قلبی و RyR3 در سلول‌های مغزی بیان می‌شوند (۹-۸). نشت کلسیم از خلال این گیرنده‌ها که در اثر عملکرد مهار نشده‌ی گیرنده رخ می‌دهد، منجر به ضعف عضلانی همانند آن چه در دیستروفی عضلانی است، آریتمی قلبی (۱۰) و همچنین، تشنج می‌شود. به همین دلیل، کشف مهار کننده‌هایی که بتوانند این کانال‌ها را مهار کنند، در سال‌های اخیر به عنوان اهداف درمانی مورد توجه محققین قرار گرفته است. یکی از گزینه‌های انکار ناپذیر در این راستا، سموم کلسیمی حاصل از عقرب‌ها می‌باشند. در این مطالعه تلاش شده است تا complementary DNA (cDNA)ی مرتبط با یکی از این سموم کلسیمی حاصل از کتابخانه‌ی cDNAی غده‌ی زهری عقرب ایرانی Odontobuthus doriae، مورد ارزیابی مولکولی و بیوانفورماتیک قرار گیرد. از طرفی، با توجه به این مورد که پپتیدهای موجود در زهر عقرب به طور کلی تنها ۵ درصد از وزن خشک آن را تشکیل می‌دهند (۱۱) و جداسازی مستقیم هر کدام از سموم از زهر عقرب بازده بسیار پایینی دارد، از این رو، با کلونسازی این cDNA و شناسایی آن، بستری مناسب جهت بیان و دستیابی به مقادیر کافی از این سم جهت مطالعات فیزیولوژیک، پزشکی و داروسازی فراهم آید.

## روش‌ها

۶ عقرب Odontobuthus doriae، از مناطق کویری کاشان صید شدند. با گذشت ۳ روز از زهرگیری آن‌ها، ۱۱۵ نانوگرم RNA از غده‌ی زهری آن‌ها با استفاده از کیت RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagene, Iran) جداسازی شد. به دنبال آن، cDNAی تک رشته‌ای و دو رشته‌ای به کمک برنامه‌ی دمایی دوره‌ای (Thermocycling) که در کیت مورد استفاده جهت ساخت کتابخانه In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Constriction) از شرکت کلون تک) طراحی شده بود (۱۲)، ساخته شد. ضمن ساخت cDNA در این روش، آداپتورهایی به دو انتهای آن‌ها جهت کلونینگ الصاق گردید.

cDNAی دو رشته‌ای ساخته شده در وکتور pSMART2IFD خطی موجود در کیت، طبق دستور شرکت سازنده (۱۲) کلون گردید. وکتور کلون شده، پس از آن به درون باکتری Escherichia coli (E. coli) از سویه‌ی DH5α که به روش شیمیایی جهت پذیرش وکتور مستعد شده بود، انتقال یافت. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری ترانسفورم شده جهت ساخت کتابخانه بر روی پلیت Luria broth agar (LB agar) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ۱ میلی‌مول از ماده‌ی Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) و ۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ماده‌ی X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) به صورت سفره‌ای کشت یافت. پس از گذشت ۱۸-۱۲ ساعت، مجموعه‌ای از کلونی‌های باکتریایی سفید و آبی بر سطح پلیت دیده شد. بر اساس روند اختلال در عملکرد ژن LacZ در وکتورهای کلون یافته، کلونی سفید و مثبت گزارش شد. کلون‌های سفید انتخاب شد و پس از استخراج پلاسمید، تعیین ترادف به کمک پرایمرهای طراحی شده در کیت جهت شناسایی توالی کلون یافته در آن‌ها انجام گرفت.

توالی تعیین ترادف شده، جهت شناسایی مورد بررسی‌های بیوانفورماتیک نظیر تعیین قالب باز خوانش (ORF یا Open reading frame) جهت شناسایی توالی پپتیدی احتمالی (http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)، بررسی تطابق توالی نوکلئوتیدی و پپتیدی با داده‌های موجود در بانک داده‌های نوکلئوتیدی و هم‌ترازی توالی پپتید احتمالی به کمک ابزارهای BlastP و Clustal Omega موجود در سایت‌های NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov) و Uniprot (http://uniprot.org)، بررسی وجود یا عدم وجود پپتید نشانه (Signal peptide) به کمک ابزار signalP4.1 جهت بررسی خاصیت ترشحی بودن پپتید (۱۳)، بررسی تعداد باندهای دی‌سولفیدی موجود در پپتید با استفاده از نرم‌افزار DISULFIND جهت بررسی قرابت عملکردی با سموم عقرب (۱۴) و تعیین ساختار مولکولی پپتید احتمالی در دو سطح ساختار دوم و سوم مولکولی با نرم‌افزار Phyre2 جهت مطالعات داروشناسی (۱۵) قرار گرفت.

سپس، برخی خصوصیات فیزیکو شیمیایی برای پپتید احتمالی با استفاده از ابزار ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) به دست آمد.

جدول ۱. نتایج حاصل از بررسی تطابق پپتیدی **ODCaTx1** با پروتئین مشابه و برخی خصوصیات پپتیدی آن

| نام پپتید | IDبانک ژن | دومین حفاظت شده | اندازه‌ی ORF (تعداد آمینو اسید) | پروتئین مشابه در بانک داده‌های پروتئین/ میزان مشابهت (٪) | باندهای دی‌سولفیدی |
|---|---|---|---|---|---|
| ODCaTx1 | KU365856 | Toxin-6 | ۴۳ | ryanodine-receptor toxin isoform 2 [Hottentotta judaicus]/ 91% | Bond (۱۸ ،۳۴)<br>Bond (۲۱ ،۳۹)<br>Bond (۲۵ ،۴۱) |

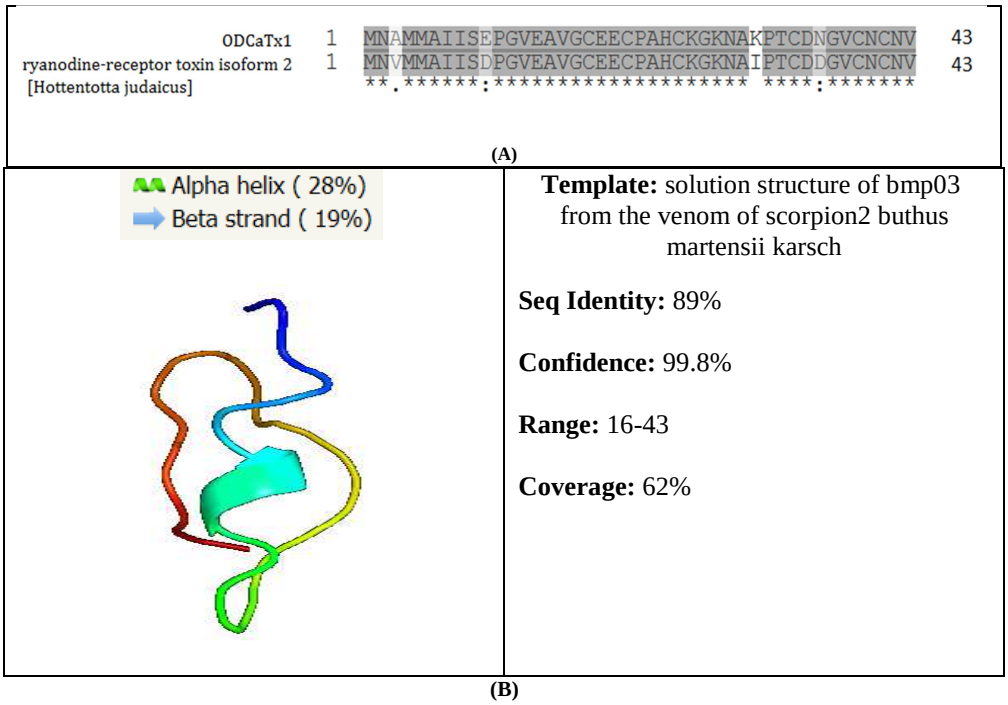
ORF: Open reading frame

## یافته‌ها

تنها cDNAی مرتبط با سموم کانال‌های کلسیمی که در کتابخانه‌ی cDNAی غده‌ی زهری عقرب Odontobuthus doriae یافت شد، ODCaTx1 بود که توالی آن ۲٦٤ نوکلئوتید داشت و در بانک ژنوم با همین عنوان و کد KU365856 ثبت گردید. نتایج حاصل از یافتن ORF، بررسی شباهت پپتید احتمالی (با استفاده ابزار Blast) با پپتیدهای موجود در بانک داده‌های پروتئینی، یافتن دومین حفاظت شده‌ی احتمالی و باندهای دی‌سولفیدی احتمالی و موقعیت آن‌ها در پپتید مورد نظر برای این سم احتمالی در جدول ۱ آمده است.

این سم کلسیمی احتمالی، دارای وزن مولکولی ٤٤٤٠/١ و میزان اسیدیته در نقطه‌ی ایزوالکتریک (IP یا Isoelectric point) ٤/٩٦ بود و بر اساس شاخص ناپایداری جزء مولکول‌های پایدار طبقه‌بندی شد. ناحیه‌ی N– ترمینال پپتید آن به اسید آمینه‌ی آب‌گریز و بزرگ متیونین (M/Met) ختم شده است. نیمه عمر تخمینی آن در رتیکولوسیت‌های پستانداران (In vitro)، ۳۰ ساعت است که نشان از پایداری آن می‌باشد.

نکته‌ی جالب این که این سم به دلیل داشتن دومین حفاظت شده از خانواده‌ی Toxin-6 که همانند توکسین‌های پتاسیمی بود، جزء مهار کننده‌های گیرنده‌های ریانودین که نوعی کانال کلسیمی وابسته به پتاسیم است، شناسایی شد. نتیجه‌ی حاصل از بررسی هم‌ترازی پپتیدی آن با تنها توکسین کلسیمی به نسبت مشابه در عقرب‌ها و ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای آن در شکل ۱ آمده است. بر اساس شکل ۱–A در موقعیت ۳۱ از توالی آمینو اسیدی پپتید ODCaTx1، اسید آمینه‌ی آب‌گریز ایزولوسین با اسید آمینه‌ی باردار و قطبی لایزین جایگزین شده است. تفاوت آمینو اسیدی در موقعیت‌های دیگر، با حفظ خصوصیات مشترک آمینو اسیدی از لحاظ بار بوده است و از این رو، اهمیت کمتری دارد.




**شکل ۱. A)** هم‌ترازی توالی پپتیدی **ODCaTx1** با پپتید مشابه آن در نوعی عقرب. **B)** نتایج حاصل از بررسی ساختاری در سطح ساختار دوم و سوم توالی پپتیدی **ODCaTx1**. مدل پیشنهادی بر اساس الگویی با بیشترین ضریب اطمینان پیشنهاد شده است. مدل ساختاری به صورت رنگین کمانی از انتهای آمینی به انتهای کربوکسیلی رنگ‌آمیزی شده است.

## بحث

گیرنده‌های ریانودین در کنترل تراوش کلسیم سلولی بسیار حایز اهمیت هستند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، پپتید ODCaTx1 شباهت بسیار زیادی در توالی و خصوصیات مختلف شیمیایی و ساختاری با نوعی پپتید سمی مهار کننده‌ی ایزوفرم دوم گیرنده‌های ریانودین (RyR2) دارد. از این رو، به احتمال بسیار زیاد می‌تواند یک مهار کننده‌ی گیرنده‌ی RyR2 می‌باشد. پپتید احتمالی ODCaTx1، به دلیل داشتن دومین حفاظت شده از خانواده‌ی Toxin-5 دارای موتیف Cysteine-stabilized αβ است. سموم پپتیدی دارای این دومین و این موتیف در عقرب‌ها در واقع بلوکه کننده‌ی کانال‌های پتاسیمی کوچک وابسته به کلسیم هستند (۱۶)، اما همان‌طور که در شکل ۱ آمده است، شباهت بسیار زیاد این سم با نوعی سم مؤثر بر کانال کلسیمی، نشان دهنده‌ی عملکرد مشابه آن‌ها در مهار گیرنده‌ی RyR2 می‌باشد.

بنا بر نظر Fill و Copello، سلول‌های ماهیچه‌ای زمانی منقبض می‌شوند که یون کلسیم تحت کنترل شبکه‌ی یونی و توسط گیرنده‌های ریانودین، درون سلول‌ها آزاد شود (۱۷). پژوهش‌های Brillantes و همکاران بر روی رشد سلول‌های بدن نشان داد که خستگی عضلانی با چگونگی آزادسازی این یون‌ها و پردازش آن‌ها در ارتباط است. به نظر می‌رسد که عملکرد گیرنده‌های ریانودین بعد از انجام فعالیت‌های سنگین و یا بیماری به صورت بی‌قاعده می‌شود و این موضوع، باعث آزادسازی نامناسب یون‌های کلسیم و در نهایت بروز خستگی و درد در ماهیچه‌ها خواهد شد (۱۸).

Jones و همکاران، نشان دادند که به طور مشابه با افزایش سن و بروز فرایند پیری، ماهیچه‌های اسکلتی، ضعیف‌تر می‌شوند و پدیده‌ای به نام سارکوپنیا (Sarcopenia) ایجاد می‌شود. سارکوپنیا، که در حدود ۴۰ سالگی پدیدار می‌شود و بعد از ۷۵ سالگی شتاب می‌گیرد، علت اصلی ناتوانی در میان‌سالی است و بر اساس مطالعات بر روی موش، سارکوپنیا زمانی رخ می‌دهد که کلسیم توسط گیرنده‌های ریانودین به صورت کنترل نشده به بیرون تراوش می‌شود. این تراوش‌ها، به زنجیره‌ای از وقایعی منجر می‌شوند که در نهایت، توانایی انقباض ماهیچه را محدود می‌سازند (۱۹).

در مطالعه‌ی Wehrens و همکاران، مشاهده شد که تراوش پذیری گیرنده‌های ریانودین، در بروز نارسایی و آریتمی قلب و همچنین، برخی انواع تشنج‌های مغزی دخیل است (۱۰). ارتباط تراوش پذیری این کانال‌ها با دیستروفی عضلانی دوشن نیز به اثبات رسیده است (۲۰). بر اساس مطالعه‌ی Bellinger و همکاران، روند ضعف عضلانی ناشی از پیری، بسیار شبیه به آن چیزی است که در دیستروفی عضلانی اتفاق می‌افتد. به دنبال این فرایندها، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مولکول‌های پرکار و گرمازا صورت می‌گیرد؛ این امر، منجر به تراوش بیشتر کلسیم به بیرون از سلول و تشدید تظاهرات می‌شود (۲۰). از این رو، یافتن مولکول‌ها یا داروهایی که در این شرایط بتوانند به طور انتخاب پذیر کانال‌های ریانودین و در پی آن تراوش کنترل نشده‌ی کلسیم را مهار کنند، می‌تواند به درمان سارکوپنیا، دیستروفی عضلانی دوشن، آریتمی قلبی، تشنج‌های مغزی مرتبط و حتی ضعف‌های عضلانی ناشی از پیری، کمک به‌سزایی کند. از طرفی، یافتن داروهایی با منشأ طبیعی از دیرباز مورد توجه محققین بوده است. Lewis و Garcia، بیان کردند که زهر عقربها سرشار از پپتیدهایی با خواص درمانی است (۲۱). بسیاری از این خواص، به اثبات رسیده است و بسیاری از داروها با منشأ پپتیدهای عقربی روانه‌ی بازار شده‌اند.

در تحقیق حاضر نیز، سم ODCaTx1 شناسایی شده از زهر عقرب ایرانی Odontobuthus doriae، به دلیل مشابهت بسیار زیاد (۹۱ درصد) در توالی آمینو اسیدی و همچنین مشابهت در داشتن دومین عملکردی حفظ شده، می‌تواند در روندی مشابه با سم مؤثر بر ایزوفرم دوم گیرنده‌ی ریانودین که پیش از این از عقرب Hottentotta judaicus شناسایی شده بود، عمل کند و با مهار اختصاصی این کانال‌ها، از تراوش‌های زیاد و کنترل نشده‌ی کلسیم جلوگیری کند. البته بر اساس تفاوت مشاهده شده در توالی آمینو اسیدی این دو سم در موقعیت اسید آمینه‌ی شماره‌ی ۳۱، احتمال می‌رود که تفاوت‌های مختصری در ساختار و عملکرد این دو سم وجود داشته باشد. میزان تأثیری که این جایگزینی در شکل‌گیری ساختار و عملکرد ODCaTx1 می‌گذارد، مشخص نیست و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. همچنین، از آن جایی که اطلاعات در خصوص مکانیسم عملکرد این سم و سموم مشابه در دست نیست، توصیه می‌شود چگونگی تأثیر پذیری فیزیولوژیک گیرنده‌ی RyR2 از سم ODCaTx1 مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری نهایی این که در مطالعه‌ی حاضر، cDNAی پپتید سمی ODCaTx1 از غده‌ی زهری یک عقرب بومی ایران شناسایی و مورد ارزیابی‌های مولکولی قرار گرفت. کلیه‌ی خصوصیات توالی آمینو اسیدی و ساختاری و مولکولی آن شناسایی شد. پپتید احتمالی ODCaTx1 کد شده توسط cDNAی جدا شده در این مطالعه، به عنوان پپتیدی طبیعی با وزن بسیار کم، پایداری بسیار بالا و عملکرد بسیار اختصاصی بر گیرنده‌های RyR2، می‌تواند کاندیدای مناسبی در جهت سنتز و بررسی‌های داروسازی به خصوص با هدف درمان آریتمی قلبی ناشی از ضعف عضله‌ی قلبی باشد. در این مطالعه، همچنین با جداسازی cDNAی کلون شده‌ی این پپتید، بستری مناسب جهت بیان و دستیابی به مقادیر کافی از این سم برای تحقیقات فیزیولوژیک و پزشکی فراهم شده است.

## تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت‌های عملی- آزمایشگاهی و همچنین، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز به دلیل حمایت مالی از اجرای این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

## References

1. Elgar D, Du Plessis J, Du Plessis L. Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure-function relationship and mode of action. Afr J Biotechnol 2006; 5(25): 2495-505.
2. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie 2000; 82(9-10): 861-8.
3. Froy O, Sagiv T, Poreh M, Urbach D, Zilberberg N, Gurevitz M. Dynamic diversification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium, potassium, and chloride channels. J Mol Evol 1999; 48(2): 187-96.
4. Jalali A, Bosmans F, Amininasab M, Clynen E, Cuypers E, Zaremirakabadi A, et al. OD1, the first toxin isolated from the venom of the scorpion Odonthobuthus doriae active on voltage-gated Na+ channels. FEBS Lett 2005; 579(19): 4181-6.
5. Abdel-Rahman MA, Harrison PL, Strong PN. Snapshots of scorpion venomics. J Arid Environ 2015; 112 (Part B): 170-6.
6. Mackrill JJ. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. Biochem Pharmacol 2010; 79(11): 1535-43.
7. Valdivia HH, Fuentes O, el-Hayek R, Morrissette J, Coronado R. Activation of the ryanodine receptor Ca2+ release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. J Biol Chem 1991; 266(29): 19135-8.
8. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(11): a003996.
9. Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M, Sorrentino V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. J Cell Biol 1995; 128(5): 893-904.
10. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Deng SX, Vest JA, Cervantes D, et al. Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. Science 2004; 304(5668): 292-6.
11. Fan Z, Cao L, He Y, Hu J, Di Z, Wu Y, et al. Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus peptide from the venom of the scorpion Chaerilus tricostatus. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(11): 5220-9.
12. Clontech. In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Construction Kit User Manual (Cat. No. 634933). [Online]; Available from: URL: www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17494
13. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 2011; 8(10): 785-6.
14. Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frasconi P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. Nucleic Acids Res 2006; 34(Web Server issue): W177-W181.
15. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc 2015; 10(6): 845-58.
16. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. Nucleic Acids Res 2011; 39(Database issue): D225-D229.
17. Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. Physiol Rev 2002; 82(4): 893-922.
18. Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell 1994; 77(4): 513-23.
19. Jones TE, Stephenson KW, King JG, Knight KR, Marshall TL, Scott WB. Sarcopenia--mechanisms and treatments. J Geriatr Phys Ther 2009; 32(2): 83-9.
20. Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. Nat Med 2009; 15(3): 325-30.
21. Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. Nat Rev Drug Discov 2003; 2(10): 790-802.

**Journal of Isfahan Medical School**

**Vol. 34, No. 397, 1st Week, November 2016**

Received: 04.06.2016

Accepted: 29.06.2016

# Molecular Characterization of cDNA Encoding Ryanodin Receptor Toxin Isoform-2 Isolated from Venom Glands of Iranian Yellow Scorpion "Odontobuthus Doriae"

Maryam Naderi-Soorki[1], Amir Jalali[2], Hamid Galehdari[3]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Scorpion venom contains bioactive peptides that have potential of medicinal value in drug discovery. Nowadays, many studies indicated the treatment feature of scorpion venom component apart from their normal activities in venom. One type of venom peptides is calcium channel toxins which blocked ryanodine sensitive calcium channels (RyR). Uncontrolled function of RyR2 has been seen in heart arrhythmia. Calcium toxins that inhibit these ion receptors can be a natural drug for treatment of this type of anomalies.

**Methods:** cDNA (complementary DNA) library was constructed from six telsons of Odontobuthus doriae scorpion. ODCaTx1 cDNA was isolated from library and characterized molecularly by some software such as ORFfinding, BlastP, Clustal Omega, SignalP4.1, DISULFIND, ProtParam and Phyre2.

**Findings:** ODCaTx1 putative peptide had low molecular weight (4440.1D) and 43 amino acids in length which classified as a stable molecule. Based on various bioinformatic assessments, this peptide was similar to the RyR2 toxin from Hottentotta judaicus. The estimated half-life was 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

**Conclusion:** In this project, cDNA sequence of the ryanodine receptor toxin isoform-2 and its putative peptide from Iranian yellow scorpion "Odontobuthus doriae" were characterized molecularly. In addition, by preparation of a framework for expression of ODCaTx1 identified in this project, we create a ground to accesses enough peptide for feature used. ODCaTx1 due to its small size and stability can be a good candidate for pharmaceutical research in the field of heart arrhythmia and seizure treatment.

**Keywords:** Ryanodine receptor isoform-2, Scorpion calcium toxins, Heart arrhythmia, Treatment, cDNA library, Odontobuthus doriae

**Citation:** Naderi-Soorki M, Jalali A, Galehdari H. **Molecular Characterization of cDNA Encoding Ryanodin Receptor Toxin Isoform-2 Isolated from Venom Glands of Iranian Yellow Scorpion "Odontobuthus Doriae".** J Isfahan Med Sch 2016; 34(397): 1032-7.

1- Department of Genetics, School of Science, Shahaid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy AND Toxicology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Genetics, School of Science, Shahaid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
**Corresponding Author:** Hamid Galehdari, Email: galehdari187@yahoo.com