



Design, cloning, expression and evaluation of cysteine-substitutes of intact and truncated molecules of streptokinase

Nastaran Monzavi^{1,2}, Mohammad Reza Aghasadeghi², Reza Arabi², Arash Memarnejadian²,
Seyed Mehdi Sadat², Hossein Khanahmad², Melania Ebrahimi^{2,3}, Farzin Roohvand^{2,3*}

1. Khatam University, Tehran, Iran

2. Dept. Hepatitis & AIDS, NRGB-Lab., Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran

3. National Recombinant Gene Bank of Iran, Tehran, Iran

Received: 10 Aug 2009

Accepted: 3 Mar 2010

Abstract

Introduction: Thrombosis and the blockage of blood vessels with clots, can lead to acute myocardial infarction and some times even death. Aside from surgical interventions to remove the blockage, the only available treatment is the administration of thrombolytic agents to dissolve the blood clot. Streptokinase (SK) is the most commonly used fibrinolytic drug for this purpose. However, SK has some disadvantages including immunogenicity, short half-life and hemorrhage induction. PEGylation of pharmaceutical proteins by the incorporation of cysteine amino acid is a novel method to decrease their immunogenicity and also to increase their stability and half-life. The ultimate goal of this study was designing and construction of the cysteine analogues of full-length and truncated forms of SK, which possess less hemorrhagic side effects due to fibrin specificity.

Methods: By application of PCR-based site-directed mutagenesis technique, mutants of SK genes, harboring the transversion of AGC codon (serine) to TGC (cysteine), which encoded full-length (amino acids 1-414) and truncated (amino acids 60-386 and 143-386) proteins were established and cloned in pET41a plasmid. Expression of the recombinant SKs was achieved through the induction of *E. coli* transformants. Produced proteins were confirmed by western blotting, purified by affinity chromatography and finally evaluated for their biological activity.

Results: Mutant SK genes were efficiently expressed and due to the fusion of vector-derived His-tag the recombinant full-length and truncated proteins were easily purified. Also despite the replacement of serine to cysteine in the position of 208, the biological activity of the new recombinant protein was still maintained.

Conclusion: The produced mutants of this study provide the possibility of establishing the cysteine specific PEGylation process and improvement of clinical activity of streptokinase protein.

Key words: Streptokinase, PEGylation, Mutagenesis, Cysteine analogue

* Corresponding author e-mail: rfarzin@pasteur.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

طراحی، کلون، بیان و ارزیابی جایگزین های سیستمی مولکول استرپتوکیناز در اندازه های کامل و کوتاه شده

نسترن منزوی^{۱،۲}، محمدرضا آقاصادقی^۲، رضا عربی^۲، آرش معمارنژادیان^۲، سید مهدی سادات^۲، حسین خان احمد^۲،
ملانیا ابراهیمی^{۲،۳}، فرزین روحوند^{۲،۳*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه خاتم، تهران

۲. بخش هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران

۳. آزمایشگاه بانک ژن نو ترکیب، انستیتو پاستور ایران، تهران

پذیرش: ۱۲ اسفند ۸۸

دریافت: ۱۹ مرداد ۸۸

چکیده

مقدمه: ترومبوز یا انسداد عروق خونی توسط لخته، می تواند منجر به سکتة قلبی و گاهی اوقات مرگ شود. صرف نظر از رفع انسداد به کمک جراحی، تنها درمان موجود تجویز عوامل ترومبولیتیک بمنظور از بین بردن لخته است. استرپتوکیناز رایجترین داروی فیبرینولیتیک برای این منظور است، اما با این وجود تجویز آن با مشکلاتی از جمله تحریک سیستم ایمنی، نیمه عمر کوتاه دارو و خونریزی همراه می باشد. پگیلاسیون پروتئینهای دارویی با واسطه اسید آمینه سیستمی یک روش نوین کاستن از ایمنی زائی دارو و همچنین افزایش پایداری و نیمه عمر آنها است. هدف نهائی این مطالعه طراحی و ساخت جایگزینهای سیستمی استرپتوکیناز کامل و نیز اشکال کوتاه شده آن، که با داشتن اختصاصیت به فیبرین اثرات همورژیک کمتری دارند، می باشد.

روشها: با استفاده از تکنیک موتاسیون زائی در ناحیه دلخواه به کمک PCR موتانتهای ژنهای استرپتوکیناز، دارای جایگزینی کدون AGC (سرین) با TGC (سیستئین)، که پروتئینهای با طول کامل (اسیدهای آمینه ۴۱۴-۱) و کوتاه شده (اسیدهای آمینه ۳۸۶-۶۰-۳۸۶) را کد می کردند ساخته شده و در پلاسمید pET41a کلون شدند. بدنبال القاء باکتری های ترانسفورم شده *E. coli* استرپتوکیناز های نو ترکیب بیان شدند و پروتئینهای حاصل با انجام وسترن بلات تأیید شده، به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص شده و در نهایت از نظر فعالیت بیولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافتهها: بیان ژنهای استرپتوکیناز موتانت بخوبی صورت گرفته و پروتئین های نو ترکیب با اندازه های کامل و کوتاه شده بواسطه اتصال به برچسب هیستیدینی ناشی از ناقل ژنی به راحتی تخلیص شدند. علیرغم جایگزینی سرین با سیستمی در جایگاه اسید آمینه ای ۲۰۸، پروتئینهای نو ترکیب جدید همچنان فعالیت بیولوژیک خود را حفظ کردند. **نتیجه گیری:** پروتئینهای موتانت تولید شده در این مطالعه امکان انجام فرآیند پگیلاسیون اختصاصی بر روی سیستمی و به این ترتیب ارتقاء فعالیت بالینی پروتئین استرپتوکیناز را فراهم می آورند.

واژه های کلیدی: استرپتوکیناز، پگیلاسیون، موتاسیون زائی، جایگزین سیستمی

مقدمه

قلبی و مغزی به خوبی نشان داده شده است [۳]. در میان عوامل ترومبولیتیک، استرپتوکیناز (Streptokinase) دارویی است که به طور متعارف به ویژه در کشورهای در حال توسعه به دلیل قیمت پایین و بهره وری بالا در حال استفاده بوده است [۱۹، ۱۵]. استرپتوکیناز یک پپتید تک زنجیره ای با ۴۱۴ اسید

مزایای درمان ترومبولیتیک در بیماران مبتلا به سکتة های

rfarzin@pasteur.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

برای این منظور ارجح است [۸]. با توجه به فقدان اسید آمینه سیستمی در ساختار پروتئین استرپتوکیناز [۱۵، ۳، ۲] بمنظور نیل به هدف پگیلاسیون این پروتئین می بایست بادرستکاری در توالی اسید آمینه ای مولکول حداقل یک اسید آمینه در جایگاه مناسب به سیستمی تبدیل گردد. اسید آمینه انتخابی برای این منظور می بایست ضمن سطحی و در دسترس بودن دور از جایگاه فعال آزریم قرار داشته و از نظر بیوشیمیائی شبیه به سیستمی باشد بطوریکه موتانت سیستمی حاصل کمترین تغییر را در فعالیت بیولوژیک پروتئین ایجاد کند. با این هدف در تحقیق حاضر بر اساس آنالیزهای کامپیوتری اسید آمینه سرین در جایگاه ۲۰۸ مولکول استرپتوکیناز برای انجام این موتاسیون و تبدیل به سیستمی انتخاب شد. سپس با انجام تکنیک site-directed mutagenesis کدون مربوط به این اسید آمینه در توالی نوکلئوتیدی اشکال کوتاه شده (۳۸۶-۶۰ و ۱۴۳-۳۸۶) و کامل (۴۱۴-۱) مولکول استرپتوکیناز به کدون مربوط به سیستمی تغییر کرده و بدنبال کلون کردن و بیان سه جایگزین سیستمی مذکور در باکتری *E. coli*، پروتئینهای نوترکیب متناظر تخلیص و با توجه به موتاسیون صورت گرفته از نظر فعالیت بیولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

با توجه به اینکه توالی اسید آمینه ای پروتئین استرپتوکیناز در پایگاه اطلاعاتی Protein Databank به نشانی www.pdb.org موجود می باشد از نرم افزار PDB viewer v3.7 (www.expasy.org/spdbv/) جهت مشاهده ساختار سه بعدی پروتئین استفاده شد. در این شکل اسیدهای آمینه سطحی و عمقی و نیز اسیدهای آمینه تشکیل دهنده ناحیه فعال (catalytic site) پروتئین قابل تشخیص می باشند. بر این اساس اسید آمینه سرین در جایگاه ۲۰۸ پروتئین استرپتوکیناز بواسطه شباهت بیوشیمیائی با سیستمی، فاصله از جایگاه فعال استرپتوکیناز (ناحیه ۲۹۰-۲۵۰) و قرار داشتن در ناحیه سطحی پروتئین جهت تبدیل به سیستمی انتخاب شد. موتانت‌های سیستمی ژن استرپتوکیناز بیان کننده اشکال کوتاه شده (توالی اسید آمینه ای ۳۸۶-۶۰ و ۱۴۳-۳۸۶) و کامل

آمینو و وزن مولکولی ۴۷ کیلودالتون است که توسط گونه های مختلف استرپتوکوک های بتاهمولیتیک ترشح شده و خاصیت فیبرینولیتیکی خود را به طور غیر مستقیم با فعال کردن پلاسمینوژن در حال گردش در خون اعمال می کند [۲، ۳، ۶]. با وجود آنکه بروز برخی عوارض جانبی مثل ایمنی زایی و خونریزی استفاده از این پروتئین دارویی را تنها به یک دوز تزریقی محدود کرده است [۲]، مطالعات بالینی مقایسه ای برتری همه جانبه سایر دارو های ترومبولیتیک مثل TPA به استرپتوکیناز را تأیید نکرده اند [۱۱]. بررسیها نشان می دهد که حذف ۵۹ اسید آمینه انتهای آمینی مولکول استرپتوکیناز می تواند با اختصاصی کردن عملکرد این پروتئین موجب فعال شدن پلاسمینوژن تنها در حضور رشته های فیبرین گشته و به این ترتیب با مهار فیبرینولیز عمومی احتمال خونریزی ناشی از مصرف استرپتوکیناز را کاهش دهد [۳۱ و ۲۹، ۶]. همچنین برداشت ۲۸ اسید آمینه انتهای کربوکسیل موجب کاهش ایمنی زایی استرپتوکیناز می شود و در عین حال مشخص شده است که ناحیه حاوی اسید آمینه های ۴۱۴-۳۸۶ نقش مهمی در عملکرد استرپتوکیناز ندارد [۳۶ و ۲، ۲۳]. به این ترتیب دو فرم کوتاه شده پروتئین استرپتوکیناز (دارای اسیدهای آمینه ۳۸۶-۶۰ و ۱۴۳-۳۸۶) با اختصاصیت بالاتر به فیبرین و همچنین اثرات آنتی ژنیسیته کمتر در مطالعات پیشین معرفی شده اند [۲۹ و ۲، ۲۸]. لازم بذکر است که علیرغم حذف این قطعات استرپتوکیناز بخش عمده ای از فعالیت خود را حفظ کرده است.

یکی از روش های مناسب برای افزایش نیمه عمر یک پروتئین دارویی مانند استرپتوکیناز و در نتیجه کاهش نیاز به مصرف مجدد آن، اتصال آن به پلیمر صناعی پلی اتیلن گلیکول (PEG) است که تحت عنوان پگیلاسیون نامیده می شود [۱۴، ۱۱]. علاوه بر مزیت ذکر شده، پگیلاسیون همچنین حلالیت پروتئین را افزایش داده و از ایمنی زایی آن نیز می کاهد. در این روش عموماً یک یا چند مولکول PEG فعال شده از طریق پیوند های کووالانس به پروتئین یا پپتید مورد نظر متصل می شوند، به طوری که این امر باعث ایجاد تغییراتی در شکل فضایی و هیدروفوبیسیته پروتئین مورد نظر گشته و نیمه عمر آن را در بدن افزایش می دهد [۱۸ و ۱]. پگیلاسیون می تواند روی اسید های آمینه خاصی مانند لیزین (Lys) و سیستمی (Cys) صورت بگیرد که استفاده از سیستمی

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت موتاسیون زائی در اسید آمینه جایگاه ۲۰۸ و کلونینگ ژن استرپتوکیناز. محل برش آنزیمهای محدودالتر بر روی توالی بصورت خط زیر و کدون موتانت بر روی پرایمرهای موتانت (R208 و F208) بصورت پر رنگ نشان داده شده اند.

نام پرایمر	توالی	قابل برش با آنزیم
F1	5'-GAAGGATCCATTGCTGGACCTGAGTG-3'	<i>Bam</i> HI
R208	5'-TTTAAAATGCATTGTGCTTGAGCTAGTAATTC-3'	-
F208	5'-CAAGCACAAATGCATTTTAAACAAAACCCA-3'	-
R414	5'-ATCTGCAGTTATTTGTCGTTAGGGTTATCAGG-3'	<i>Pst</i> I
F60	5'-CGAGGATCCAGTCCAAAATCAAAA-3'	<i>Bam</i> HI
F143	5'-AATAGGATCCCATGTGCGCGTTAG-3'	<i>Bam</i> HI
R386	5'-CCGCTGCAGTTACTAGGGTAAATG-3'	<i>Pst</i> I

pET41a (Novagen) منجر به ساخت سه پلاسمید pETSK1، pETSK60 و pETSK143 شد که به ترتیب قادر به بیان نواحی ۱-۴۱۴، ۳۸۶-۶۰ و ۳۸۶-۱۴۳ مولکول استرپتوکیناز بودند (شکل ۱-ب). پلاسمید pET41a نه تنها بیان پروتئین تحت اثر پروموتور قدرتمند T7 را موجب می شود، بلکه با افزودن برچسب 6xHis (متشکل از ۶ اسیدآمینه هیستیدین) به انتهای آمینی پروتئین حاصل امکان شناسائی و تخلیص پروتئین را به ترتیب با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه 6xHis و نیز به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی فراهم می آورد. بدنبال تأیید صحت توالی سازه های موتانت ساخته شده با روشهای آنالیز آنزیمی و نهایتاً واکنشهای تعیین توالی (شکل ۱-ج)، پلاسمیدها به درون سلولهای میزبان بیانی (*E. coli* BL21) ترانسفورم شدند. کلونیهای نوترکیب حاصل در ۵ میلی لیتر محیط مایع LB کشت داده شده و بیان پروتئین پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۶ (OD₆₀₀ = 0.6) با افزودن القاء کننده IPTG (به غلظت نهائی ۰/۲ میلی مولار) برای مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد القاء شد. پس از لیز رسوب سلولهای باکتریائی القاء شده در ۵۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده (شامل ۱۰۰ میلی مولار NaH₂PO₄، ۱۰ میلی مولار Tris.Cl و ۸ مولار اوره) لیزات حاصل با مقدار مناسب بافر SDS-PAGE (شامل ۰/۰۹ مولار Tris.Cl، ۲۰٪ گلیسرول، ۲٪ SDS، ۰/۰۲٪ بروموفنل بلو و ۲٪ 2ME) مخلوط و بمدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد. پس از

(توالی ۱-۴۱۴) مولکول با انجام PCR و تکنیک ایجاد موتاسیون در ناحیه دلخواه (Site-directed mutagenesis) بر روی ژن skc2 که قبلاً از سویه استاندارد *S. equisimilis* (ATCC 9542) جدا شده بود ایجاد شدند. برای این منظور ابتدا دو بخش از ژن به روش PCR به طور جداگانه تکثیر شدند بطوریکه موتاسیون مورد نظر (تبدیل کدون مربوط به اسید آمینه ۲۰۸ در استرپتوکیناز کامل از AGC به TGC) با بکارگیری پرایمرهای ویژه حاوی موتاسیون نقطه ای (پرایمرهای F208 و R208، جدول ۱) در محل اتصال این دو ناحیه ایجاد شدند. سپس در واکنش بعدی، این دو قطعه تکثیر شده که دارای نواحی همپوشان بودند با افزودن یک جفت پرایمر انتهائی (بعنوان مثال در مورد قطعه بیان کننده استرپتوکیناز کامل پرایمرهای F1 و R414) و اعمال یک سیکل دمای تقلیب (۹۴ درجه سانتی گراد جهت جدا شدن رشته های مکمل)، دمای جفت شدن (۵۴ درجه سانتی گراد جهت هیبرید شدن نواحی انتهائی همپوشان از دو قطعه) و دمای پلیمریزاسیون (۷۲ درجه سانتی گراد، جهت فعالیت آنزیم Taq پلیمرز) به هم متصل و تکثیر شدند (شکل ۱-الف). با توجه به اینکه در طراحی پرایمرها توالی اختصاصی برش دو آنزیم محدودالتر *Bam*HI و *Pst*I تعبیه شده و به این ترتیب این نواحی در دو انتهای محصولات PCR حاصل (مربوط به قطعات کوتاه شده و کامل) ایجاد شده بود برش این قطعات با آنزیمهای مذکور و در نهایت کلون کردن آنها در پلاسمید

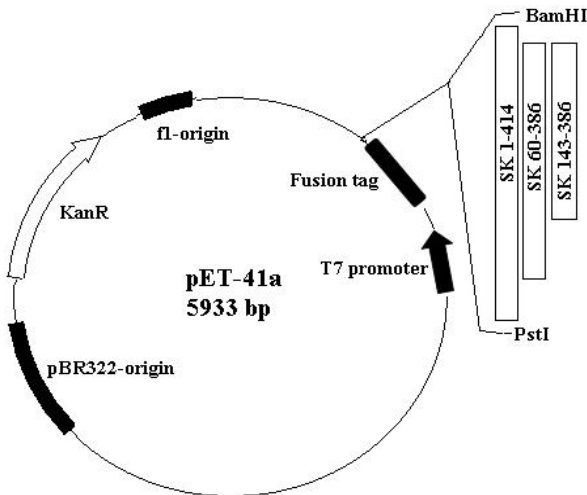
۱٪ آگارز، ۱۰ میلی مولار NaCl و ۵۰ میلی مولار Tris base پر شده و چاهکهای با قطر ۵ میلی متر در درون آن ایجاد شد. نیمی از حجم این چاهکها با غلظتهای مختلف از استرپتوکیناز استاندارد (B. Braun, Germany) و یا مقدار ثابت ۱۰ نانوگرم از پروتئین نوترکیب تخلیص شده در این مطالعه و نیمه دیگر هر چاهک با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر از محلول پلاسمینوژن انسانی (Fluka, Sweden) پر شد بطوریکه میزان مولاریته پلاسمینوژن در چاهکها بیشتر از استرپتوکیناز بود. دو چاهک نیز که فقط حاوی استرپتوکیناز استاندارد بدون پلاسمینوژن و یا پلاسمینوژن بدون استرپتوکیناز بودند نیز بعنوان کنترل تعبیه شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و تشکیل هاله های ناشی از لیز کازئین در اطراف چاهکها ابتدا منحنی استاندارد مربوطه بر اساس قطر هاله و غلظت استرپتوکیناز در چاهکهای استاندارد رسم شده و سپس غلظت تقریبی نمونه های تخلیص شده با توجه به قطر هاله ایجاد شده در اطراف چاهکهای مربوطه بدست آمد.

یافته ها

به منظور ایجاد امکان پگیلاسیون اختصاصی مولکول استرپتوکیناز، سه فرم موتانت ژن استرپتوکیناز با انجام PCR و موتاسیون زائسی ناحیه ای بر روی ژن *skc2* (جداشده از *S. equisimilis*) و دو شکل کوتاه شده آن (شکل ۱-الف) سعی شد که کدون نوکلئوتیدی TCG (مربوط به اسیدآمینه سرین در جایگاه ۲۰۸) به کدون ACG (مربوط به اسیدآمینه سیستئین) تبدیل شود. پرایمرهای بکار گرفته شده برای این منظور و توالی آنها در جدول ۱ نشان داده شده اند. ژنهای استرپتوکیناز موتانت که بیان کننده توالی اسیدآمینه ای ۴۱۴-۱، ۳۸۶-۶۰ و ۳۸۶-۱۴۳ استرپتوکیناز بودند، در قدم بعد در جایگاه *BamHI* / *PstI* ناقل pET41a کلون شده (شکل ۱-ب) و به ترتیب پلاسمیدهای pETSK60، pETSK1 و pETSK143 حاصل شدند. بدنال تأیید موتاسیون القاء شده در ژنهای مذکور (شکل ۱-ج) پلاسمیدهای مذکور به درون سلولهای باکتریایی *E. coli* BL21 ترانسفورم شده و جهت بیان پروتئینهای نوترکیب (بصورت فیوژن با پرچسب His-tag که توالی سازنده آن در بدنه وکتور pET41a موجود است) القاء

سانتریفوژ، محلول روئی در ژل ۱۲٪ SDS-PAGE الکتروفورز شده و باندهای پروتئینی مطابق یک روش استاندارد به غشاء نیتروسولولوز منتقل شدند [۳۳]. بدنال پوشش غشاء نیتروسولولوز با مخلوط ۳٪ آلبومین سرم گاوی (یک شب در ۴ درجه سانتی گراد) و انجام مراحل شستشو، غشاء ابتدا با رقت ۱/۲۰۰۰ آنتی بادی موشی علیه His (Moues anti-His Ab, Qiagen) و سپس با رقت ۱/۵۰۰۰ آنتی بادی ضد IgG (HRP-Goat anti-mouse IgG, HRP) با آنزیم (Sigma) هر یک بمدت ۲ ساعت در دمای اتاق تیمار شد. بعد از هر تیمار شستشو با بافرهای TBS (شامل ۱۰ میلی مولار Tris.Cl، ۱۵۰ میلی مولار NaCl با pH: 7.5) و TBST (شامل ۲۰ میلی مولار Tris.Cl، ۵۰۰ میلی مولار NaCl و Tween 20 % ۰/۰۵) صورت گرفت. سرانجام پس از شستشوی آخر باندهای اختصاصی مربوط به پروتئین استرپتوکیناز در حضور ماده رنگزای DAB (۳.۳' Diaminobenzidine) ظاهر شدند. پروتئینهای نوترکیب حاصل بواسطه داشتن برچسب هیستیدینی (6xHis-tag) در انتهای آمینی با استفاده از ستونهای آگارز Ni-NTA (Nickel-) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده در یک مرحله تخلیص شدند. برای این منظور رسوب ۲۰۰ میلی لیتر از کشت باکتریهای القاء شده در ۵ میلی لیتر از بافر لیز کننده (شامل ۱۰۰ میلی مولار NaH_2PO_4 ، ۱۰ میلی مولار Tris.Cl و ۸ مولار اوره با pH: 8) به مدت ۱۵ دقیقه لیز شده و بعد از سانتریفوژ محلول روئی با ۲ میلی لیتر از رزین Ni-NTA بمدت ۳۰ دقیقه در یک فالكون مخلوط شد. این مخلوط در ستون مخصوص کروماتوگرافی (Qiagen) ریخته شد و بعد از خارج شدن محلول بالایی، پروتئین های متصل به رزین با بافر شستشو (شامل مواد مشابه بافر لیز کننده با pH: 6.3) برای دو بار شسته شدند. سرانجام پروتئین ها با بافر الوشن (دارای مواد مشابه دو بافر قبلی با pH: 4.5) بصورت ۴ فراکسیون ۰/۵ میلی لیتری الوت شده و غلظت آنها با اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر بررسی شد.

فعالیت پروتئینهای تخلیص شده استرپتوکیناز با روش استاندارد و نیمه کمی کازئینولیز [۳۲] اندازه گیری شد. بطور خلاصه، یک ظرف پتری بوسیله ژل حاوی ۵٪ Skim milk،

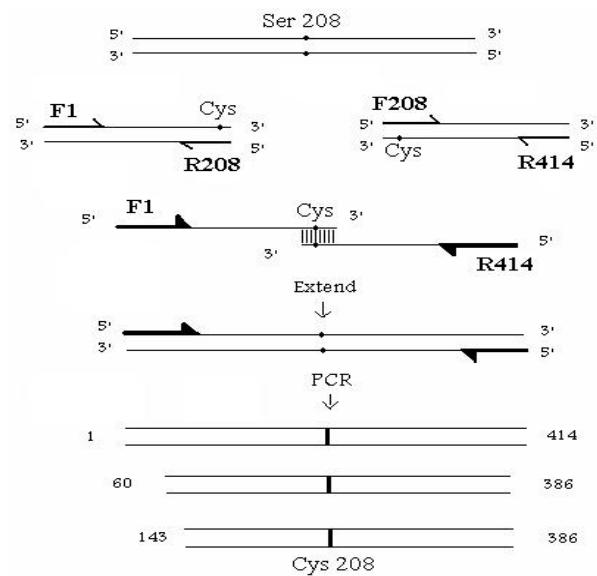


شکل ۱-ب: طرح کلی از نقشه پلاسمیدهای بیان کننده پروتئینهای کامل و کوتاه شده استرپتوکیناز. ژن های بیان کننده قطعات کامل (توالی اسیدآمینه ای ۱-۴۱۴) و کوتاه شده (توالی اسیدآمینه ای ۶۰-۳۸۶ و ۱۴۳-۳۸۶) استرپتوکیناز با دو آنزیم *PstI* و *BamHI* در پلاسمید (Novagen) pET-41a کلون شدند بطوریکه پروتئینهای مربوطه تحت پروموتور قدرتمند T7 بصورت متصل به برجسب (Fusion-tag) بیان شوند. KanR ژن مقاومت به کانامایسین را نشان می دهد.

بیولوژیک خود را حفظ کرده بودند. بر این اساس، در حالیکه هاله کارژینولیز در اطراف چاهکهای حاوی استرپتوکیناز استاندارد و نیز مشتقات سیستمی تخلیص شده ایجاد شده بودند، چاهکهای کنترل منفی که فقط حاوی استرپتوکیناز و یا پلاسمینوزن تنها بودند نشانه ای از کارژینولیز را در اطراف خود نداشتند (شکل ۴-الف). همچنین با اندازه گیری قطر هاله مربوط به چاهکهای حاوی مقادیر مختلف استرپتوکیناز استاندارد (۱/۴ سانتی متر برای ۳۷ واحد، ۱/۸ سانتی متر برای ۷۵ واحد و ۱/۸ سانتی متر برای ۱۵۰ واحد) و رسم منحنی استاندارد مربوطه مشاهده شد که مشتقات کامل و کوتاه شده استرپتوکیناز با توجه به طول توالی اسیدآمینه ای، سطوح مختلفی از فعالیت را نشان می دهند (۱۲۸، ۷۵ و ۴۰ واحد برای توالی های با طول به ترتیب ۱-۴۱۴، ۶۰-۳۸۶ و ۱۴۳-۳۸۶) (شکل ۴-ب).

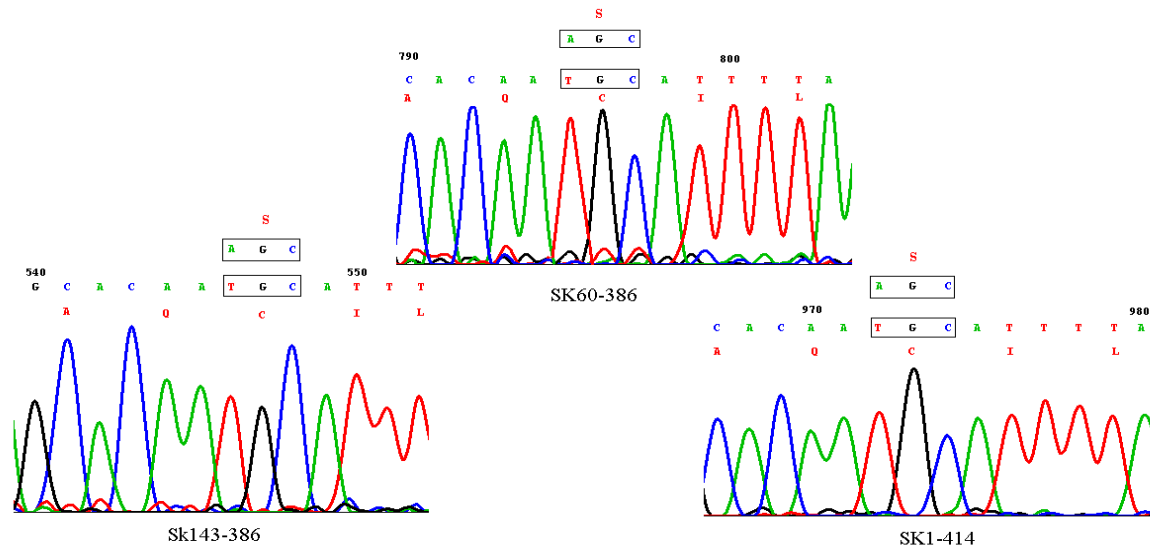
بحث

روشهای متفاوتی بمنظور افزایش نیمه عمر عوامل ترومبولیتیک بکار گرفته شده اند که از آن میان می توان به اسیلایسون کمپلکس پلاسمینوزن-استرپتوکیناز (موسوم به



شکل ۱-الف: ایجاد موتاسیون نقطه ای به روش PCR. دو ناحیه از ژن به طور جداگانه تکثیر شده و در واکنش بعدی این دو ناحیه با هم یکی می شوند. دو پرایمر F208 و R208 در کدون ۲۰۸ شامل موتاسیون از نوع جایگزینی AGC به TGC هستند. از آنجایی که این پرایمرها در ابتدای ۵ مکمل هم هستند، محصولات PCR ایجاد شده با هم همپوشانی داشته و بخش مشترک می تواند در واکنش PCR سوم با پرایمرهای F1 و R414 ضمن بسط یافتن تکثیر شود. انجام PCR انتهائی با سایر پرایمرهای معرفی شده در جدول ۱ منجر به پیدایش محصولات موتانت با اندازه های ۶۰-۳۸۶ و ۱۴۳-۳۸۶ می گردد.

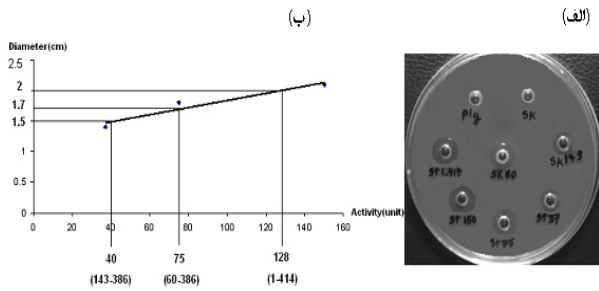
شدند. ارزیابی پروتئینهای بیان شده در ژل ۱۲٪ SDS-PAGE حضور سه پروتئین ۷۸، ۶۶ و ۵۸ کیلودالتونی را که از لحاظ وزنی به ترتیب با توالی های ۱-۴۱۴، ۶۰-۳۸۶ و ۱۴۳-۳۸۶ استرپتوکیناز معادل بودند، نشان داد و بدنبال آن انجام وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه برجسب هیستیدینی و آنتی بادی ثانویه کنژوگه با HRP نیز وجود سه باند اختصاصی مربوط به بیان پروتئینهای متصل به برجسب هیستیدینی را در اندازه های مذکور اثبات نمود (شکل ۲). در نهایت تخلیص این سه پروتئین با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی و بکارگیری ستونهای آگارز Ni-NTA در شرایط تقلیب منجر به حصول مشتقات سیستمی استرپتوکیناز نوترکیب در سه اندازه مذکور شد (شکل ۳). با استفاده از پلیت محتوی آگارز/پلاسمینوزن/کارژین مقادیر مساوی از مشتقات سیستمی استرپتوکینازهای تخلیص شده در این تحقیق از نظر توانائی لیز اختصاصی کارژین با هم مقایسه شدند. بر اساس نتایج بدست آمده علیرغم تبدیل اسیدآمینه سرین ۲۰۸ به سیستمین هم استرپتوکیناز کامل و هم اشکال کوتاه شده آن فعالیت



شکل ۱-ج: توالی نوکلئوتیدی سه ژن موتانت استرپتوکیناز. تعیین توالی ژنهای موتاسیون یافته استرپتوکیناز کامل (SK1-414) و کوتاه شده (SK143-386 و SK60-386) تبدیل کدون AGC (بیان کننده اسید آمینه سرین-S) را به کدون TGC (بیان کننده سیستئین-C) تأیید نمود.

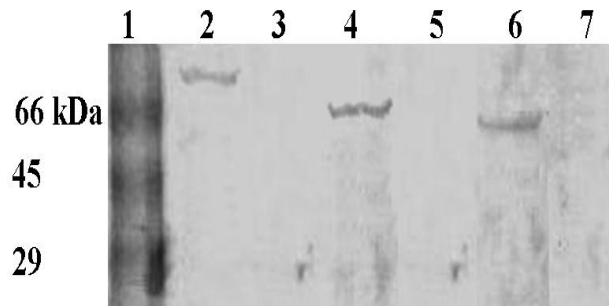
گروههای Thiol پروتئین را دارد اتصال کووالان PEG به اسیدهای آمینه سیستئین موجود در پروتئین صورت گیرد. نمونه هایی از این استراتژی را می توان در موارد پگیلاسیون هورمون رشد انسانی [۱۲] و داروی ضد HIV تریکوزانتین [۲۵]، اتصال PEG به انتهای کربوکسیل فاکتور هفت نوترکیب (FVIIa) [۲۴] و ترومبومودولین کوتاه شده [۵] و نیز اتصال PEG به ناحیه دلخواه (site-directed) اینترلوکین ۲ [۳۰] مشاهده کرد. در تمام این موارد افزایش نیمه عمر و کاهش ایمنی زائی پروتئین پس از پگیلاسیون بخوبی مشاهده شده است. بنابراین با در نظر گرفتن استراتژی اخیر، در تحقیق حاضر تلاش شد که شرایط لازم جهت انجام پگیلاسیون اختصاصی استرپتوکیناز بر مبنای اسید آمینه سیستئین فراهم شده و با انجام موتاسیون در سطح ژن، کدون مربوط به اسید آمینه سیستئین در ناحیه مناسب ژن بیان کننده اشکال کامل و کوتاه شده استرپتوکیناز ایجاد شود. ناحیه در نظر گرفته شده برای ایجاد این موتاسیون نه تنها می بایست دور از منطقه فعال آنزیم باشد بلکه بمنظور تسهیل در انجام پگیلاسیون می بایست در سطح پروتئین قرار داشته و در دسترس باشد [۲۳،۸]. بر این اساس، با توجه به نتایج ارزیابی های کامپیوتری اسید آمینه سرین ۲۰۸ که هم شرایط مذکور را دارا بوده و هم از نظر بیوشیمیایی با سیستئین مشابهت داشت جهت جایگزینی انتخاب شد. با توجه به تجربه قبلی ما در مورد کلونینگ، بیان و تخلیص یک مرحله ای

(APSA) [۶]، اتصال پروتئین وصل شونده به مالتوز (MBP) به انتهای آمینی استرپتوکیناز [۱۶]، ادغام شیمیایی آلبومین سرم انسانی به یوروکیناز [۴]، موتاسیون زائی جهت ایجاد نواحی گلیکوزیلاسیون در فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (TPA) [۳۵] و اتصال پلی اتیلن گلیکول (PEG) به استافیلوکیناز [۲۰] اشاره نمود. برخی از این روشها نتایج امیدوار کننده ای را در پی داشته و برخی موجب کاهش فعالیت پروتئین شده اند. Abuchowski و همکاران نشان داده اند که اتصال کووالان PEG (پگیلاسیون) با ایجاد کنژوگه های فعال ضمن کاهش ایمنی زائی پروتئینها نیمه عمر در گردش آنها را در بدن افزایش می دهد [۱]. اسید آمینه لیزین موجود در توالی پروتئین از جمله نقاط مناسب جهت انجام پگیلاسیون است و این استراتژی در موارد پگیلاسیون آسپارژیناز، آلفا اینترفرون، آدنوزین دامیناز [۱۱] و استرپتوکیناز [۲۶،۱۷] قبلاً بکار گرفته شده است. از جمله مشکلات این روش کاهش چشمگیر فعالیت پروتئین در اثر پگیلاسیون لیزین بوده است، بنابراین با توجه به فراوانی لیزین در توالی پروتئینها معمولاً سعی می شود که پگیلاسیون بصورت نسبی صورت گرفته و تا حد امکان از کاهش فعالیت جلوگیری شود که البته پیامد ناگزیر این تغییرات نسبی هم ایجاد مخلوط هتروژنی از پروتئینهای پگیله و غیر پگیله می باشد [۸]. در روشهای نوین پگیلاسیون سعی می شود که با استفاده از PEG فعال که توان اتصال به



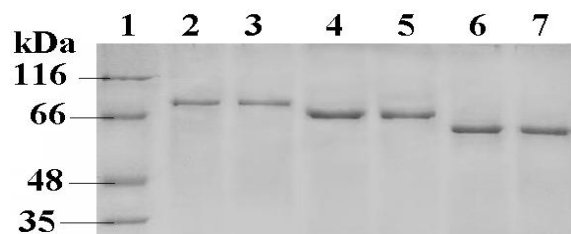
شکل ۴- بررسی فعالیت انواع موتانت استرپتوکیناز به روش لیز شعاعی کارژین. (الف) نمونه های استرپتوکیناز تخلیص شده با طول کامل (SK1-414) و کوتاه شده (SK143 و SK60) با غلظت های برابر ۱۰ نانوگرم و نیز نمونه های استاندارد استرپتوکیناز با فعالیت های مختلف (St150 و St75، St37) در داخل چاهک های تعبیه شده در پلیت حاوی ژل آگارز و Skim milk ریخته شده و پس از پر کردن چاهکها با محلول پلاسمینوژن غلیظ (۱ میلی گرم در میلی لیتر) پلیت برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. چاهکهای حاوی پلاسمینوژن (Pig) و یا استرپتوکیناز (SK) تنها نیز بعنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. (ب) با اندازه گیری قطر هاله پیرامون چاهک های حاوی استرپتوکیناز استاندارد و رسم منحنی استاندارد، فعالیت بیولوژیک نمونه های تخلیص شده بر اساس قطر هاله آنها به میزان ۴۰، ۷۵ و ۱۲۸ واحد (به ترتیب برای قطعات ۳۸۶-۱۴۳، ۳۸۶-۶۰ و ۴۱۴-۱) بدست آمد.

به این ترتیب نه تنها ژن کامل استرپتوکیناز بلکه دو ژن کوتاه شده (بیان کننده توالی ۳۸۶-۶۰ و ۳۸۶-۱۴۳) نیز بخوبی در سویه *E. coli* BL21 (DE3) بیان شدند. در مطالعه مشابه دیگری نیز نشان داده شده بود که وجود توالی های اتصال طولانی در انتهای آمینی استرپتوکیناز نوترکیب کوتاه شده منجر به افزایش پایداری و بیان می گردد [۲۲]. در قدم بعد با بهره گیری از برجسب هیستیدینی (His-tag) موجود در انتهای آمینی، مشتقات سیستئینی استرپتوکیناز نوترکیب به راحتی و با یک مرتبه عبور از ستون Ni-NTA تخلیص شده و از نظر فعالیت بیولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. این تخلیص در شرایط تقلیب (denaturing) صورت گرفته و علیرغم آنکه اوره مورد استفاده در مراحل تخلیص نیز از محیط خارج نشده بود، پروتئینهای خالص شده فعالیت خود را حفظ کرده بودند. نکته قابل ذکر آنکه بعلت فقدان پیوند دی سولفیدی در ساختمان استرپتوکیناز و در نتیجه فقدان ساختار ثانویه، این پروتئین همواره در شرایط تقلیب نیز فعالیت خود را نشان داده است [۳۶،۹]. اما با توجه به اینکه در ساختار پروتئینهای خالص شده این تحقیق یک اسیدآمینه سیستئین وارد شده بود، مشاهده حفظ فعالیت پروتئینهای کامل و کوتاه شده استرپتوکیناز در شرایط تقلیب و در حضور غلظت بالای اوره یافته ای جالب



شکل ۲- وسترن بلات بر روی لیزات باکتری های حاوی پلاسمیدهای بیان کننده استرپتوکیناز کامل و کوتاه شده. ستون ۱: مارکر پروتئینی، ستون های ۲ و ۳: پروتئین کامل به ترتیب بعد و قبل از القاء با IPTG، ستون های ۴ و ۵: استرپتوکیناز کوتاه شده با توالی ۳۸۶-۶۰ به ترتیب بعد و قبل از القاء با IPTG، ستون های ۶ و ۷: استرپتوکیناز کوتاه شده با توالی ۳۸۶-۱۴۳ به ترتیب بعد و قبل از القاء با IPTG.

استرپتوکیناز با استفاده از برجسب هیستیدین [۲۱]، ابتدا پلاسمید (Qiagen) pQE30 جهت بیان جایگزینهای سیستئینی استرپتوکیناز در نظر گرفته شد. اما با وجود آنکه سویه های مختلف *E. coli* بعنوان میزبان بیانی مورد ارزیابی قرار گرفتند (نتایج نشان داده نشده است)، موفقیتی در بیان ژن مربوط به اشکال کوتاه شده استرپتوکیناز (توالیهای ۳۸۶-۶۰ و ۳۸۶-۱۴۳) بدست نیامد و تنها پروتئین کامل استرپتوکیناز (۴۱۴-۱) در این سیستم قابل بیان بود. بمنظور رفع این مشکل ژنهای مذکور در پلاسمید pET41a (Novagen) (که تحت کنترل پرموتور قدرتمند T7 موجب بیان پروتئین بصورت متصل به برجسبهای طویل می گردد) کلون شده و بیان آنها در *E. coli* BL21 بررسی شد که خوشبختانه امکان بیان مناسب مولکولهای کوتاه شده نیز در این سیستم فراهم گردید. علت این امر می تواند تسهیل بیان پروتئینهای کوتاه شده بواسطه توالی های اتصال (فیوژن) موجود در ابتدای ۵' ژن باشد [۲۸].



شکل ۳- ژل SDS-PAGE نمایانگر پروتئین های استرپتوکیناز تخلیص شده با آگارز Ni-NTA. ستون ۱: مارکر پروتئینی ستون های ۲ و ۳: الوشن ۱ و ۲ از استرپتوکیناز کامل (۴۱۴-۱) ستون های ۴ و ۵: الوشن ۱ و ۲ از استرپتوکیناز کوتاه شده (۳۸۶-۶۰) ستون های ۶ و ۷: الوشن ۱ و ۲ از استرپتوکیناز کوتاه شده (۳۸۶-۶۰).

در جایگاه ۲۰۸ مولکول استرپتوکیناز با اسید آمینه سیستمی، نه تنها فعالیت بیولوژیک استرپتوکیناز حفظ می شود بلکه الگوی تغییر فعالیت نیز در مولکولهای کامل و کوتاه شده استرپتوکیناز تغییری نمی کند. به این ترتیب با داشتن جایگزینهای سیستمی امکان انجام پیگلاسیون اختصاصی استرپتوکیناز از طریق سیستمی با هدف کاهش ایمنی زائی و افزایش نیمه عمر آن فراهم می گردد. فرآیند اتصال پلی اتیلن گلایکول به اشکال سیستمی استرپتوکیناز حاصل از این تحقیق متعاقباً در حال انجام است.

سپاسگزاری

هزینه های مربوط به انجام این مطالعه توسط انستیتو پاستور ایران تامین شد.

توجه می باشد. همانطور که انتظار می رفت مقایسه فعالیت مشتقات سیستمی استرپتوکیناز با روش نیمه کمی کازئینولیز نشان داد که در شرایط کلی استرپتوکیناز با طول کامل نسبت به اشکال کوتاه شده آن فعال تر می باشد. اما باید توجه کرد که طبق گزارشات قبلی حذف ناحیه ۵۹-۱ موجب اتصال بیشتر استرپتوکیناز به رشته های فیبرین و در نتیجه فیبرینولیز اختصاصی می گردد [۲۸]، بنابر این با در نظر گرفتن آنکه واکنش کازئینولیز در فقدان فیبرین انجام می شود انتظار می رود که اشکال کوتاه شده استرپتوکیناز موتانت حاصل از این تحقیق در مقایسه با فرم کامل فعالیت بیشتری را در حضور رشته های فیبرین نشان دهند که البته تأیید این ادعا نیازمند مقایسه فعالیت آنها با روشهای کمی در حضور رشته های فیبرین است. بنا به اطلاع نویسندگان برای اولین بار نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پس از جایگزینی اسید آمینه سرین

References

- [1] Abuchowski A, McCoy J. R, Palczuk NC, van Es T and Davis FF, Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem*, 252 (1977) 3582-3586.
- [2] Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC, Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnol. Adv*, 22 (2004) 287-307.
- [3] Baruah DB, Dash RN, Chaundhari MR, Kadam SS, Plasminogen activators: A comparison. *Vascul Pharmacol*, 44 (2004) 1-9.
- [4] Breton J, Pezzi N, Molinari A, Bonomini L, Lansen J, Gonzalez De Buitrago G, Prieto I, Prolonged half-life in the circulation of a chemical conjugate between a pro-urokinase derivative and human serum albumin. *Eur J biochem*, 231(1995) 563-569.
- [5] Chrystelle SC, Carolyn AH, Lisa SC, Elliot L, CC-Terminal Site-specific PEGylation of a truncated thrombomodulin mutant with retention of full bioactivity. *Bioconjug Chem*, 15 (2004) 1005-1009.
- [6] Coffey JA, Jennings KR, Dalton H, New antigenic regions of streptokinase are identified by affinity directed mass spectrometry. *Eur J biochem*, 268 (2001) 5215-5221.
- [7] Crabbe SJ, Grimm AM, Hopkins LE, Acylated plasminogen-streptokinase activator complex: a new approach to thrombolytic therapy. *Pharmacotherapy*, 10 (1990) 115-26.
- [8] Scott M, Cysteine-pegylated proteins, *United States Patent* 5766897 (1995).
- [9] Derenzo EC, Boggiano E, Bargir, WF, Buck FF, Interaction of streptokinase and human plasminogen. *J Biol Chem*, 242 (1967). 2428-2434.
- [10] Dunder Y, Hill R, Dickson R Walley T, Comparative efficacy of thrombolytics in acute myocardial infarction: a systematic review. *QJMed*, 96 (2003) 103-113
- [11] Fee CJ and Van Alstine JM. PEG-Proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chem Eng Sci*, 61 (2006) 924-939.
- [12] George NC, Mary SR, Elizabeth AC, Darin JS, Sharon JC, Daniel HD, A long-acting, mono-PEGylated human growth hormone analog is a potent stimulator of weight gain and bone growth in hypophysectomized Rats. *Endocrinology*, 148 (2007) 1590-1597.
- [13] Harris JM, editor. *Poly (ethylene Glycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications*, New York: American Chemical Society, 1992.
- [14] Harris JM, Zalipsky S, editors. *Poly (ethylene Glycol) Chemistry and Biological Applications*, Washington, DC: American Chemical Society, 1997.
- [15] Hernández L, Marrero M, Streptokinase: about of a

- thrombolytic patented in Cuba. *Biotechnología Aplicada*, 22 (2005) 191-198.
- [16] Irina YS, Aiilyan KH, Shakeel A, Brian RR, Lizbeth H, Guy LR. The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase. *J Biochem Chem*, 16 (2001) 12609-12613.
- [17] Koide A, Suzuki S and Kobayashi S, Preparation of polyethylene glycol-modified streptokinase with disappearance of binding ability towards anti-serum and retention of activity. *Tsukuba Research Laboratory*, 143(1982) 73-76.
- [18] Kubetzko S, Sarkar CA, Pluckthun A, Protein PEGylation decreases observed target association rates via a dual blocking mechanism. *Mol Pharmacol*, 68 (2005) 439-454.
- [19] Kunamneni A, Abed Abdelghani TT, Ellaiah P, Streptokinase—the drug of choice for thrombolytic therapy. *J Thromb Thrombolysis*, 23(2007) 9-23.
- [20] Lieve M, Ingrid V, Ivo R, Randall M, Desire C Hans J. R, toxicology studies with recombinant staphylokinase and with SY 161-P5, a polyethylene glycol-derivatized Cysteine-Substitution Mutant. *Toxicol Pathol*, 29 (2001) 285-291.
- [21] Memarnejadian A, Forouzandeh-Moghadam M, Sadat SM, Roohvand F, Cloning and evaluation of the expression for streptokinase gene with a 6xHis label in *E. coli*. *Daneshvar*, 69 (2007) 62-8.
- [22] Nejadmoghadam MR, Modarresi MH, Babashamsi M, Chamankhah M, Cloning and over expression of active recombinant fusion streptokinase: A New Approach to Facilitate Purification. *Pak J Bio Sci*, 10 (2007) 2146-2151.
- [23] Ofer C, Chanoch K, Arie L, Baruch V, Avigdor Sh. Controlled concealment of exposed clearance and immunogenic domains by site-specific polyethylene glycol attachment to acetylcholine esterase Hypolysine Mutants. *J Biol Chem*, 49 (2007) 35491-35501.
- [24] Ostergaard H, Groth AV, Krogh TN, Petersen JM, Krarup J, Sørensen BB, Stennicke HR, Improving the pharmacokinetics of recombinant factor VIIa Cys407 by cysteine-directed pegylation. *J Thromb Haemost*, 5: (2007) Suppl 2: P-M-020.
- [25] Qunxing An, Yingfeng Lei, Ning Jia, Xianqing Zhang, Yinlan Bai, Jing Yi, Rui Chen, Aijun Xia, Jing Yang, Sanhua Wei, Xiaodong Cheng, Ailing Fan, Shijie Mu and Zhikai Xu, effect of site-directed PEGylation of trichosanthin on its biological activity, immunogenicity, and pharmacokinetics. *Biomol Eng*, 24 (2007) 643-649.
- [26] Rajagopalan S, Gonias S L, and Pizzo S V, A nonantigenic covalent streptokinase-polyethylene glycol complex with plasminogen activator function. *J Clin Invest*, 75 (1984) 413-419.
- [27] Ramos CRR, Abreu PAE, Nascimento ALTO, Ho PL, A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide A T7 *E. coli* plasmid able to express a minimal His-Brazilian. *J Med Biol Res*, 37 (2004) 1103-1109.
- [28] Reed GL, Houg AK, Liu L, Parhami-seren B, Wang S and Hedstrom L, A catalytic switch and the conversion of streptokinase to a fibrin targeted plasminogen activator. *Biochem*, 96 (1999) 8879-8883.
- [29] Reed GL, Lin AF, Parhami-Seren B, Kussie P. Identification of a plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of a functional streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochem*, 34 (1995) 10266-10271.
- [30] Robert JG, Nandini VK, Site-Directed PEGylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site. *Bio/Technol*, 8 (1990) 343 - 346.
- [31] Rodriguez P, Fuetes P, Barro M, Alvarez J, Structural domains of streptokinase involved in the interaction with plasminogen. *Eur J Biochem*, 229 (1995) 83-90.
- [32] Saksela O, caseinolysis in agarose: a simple method for detection of plasminogen activators in the presence of inhibitory substances and serum. *Anal Biochem*, 111 (1981) 276-82.
- [33] Sambrook J, Russell D, *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [34] Welfe K, Pfeil W, Misselwitz H. and Gerlach D, Conformational properties of streptokinase-differential scanning calorimetric investigations. *Int J Biol macromol*, 14 (1992) 19-21.
- [35] William M, Daniel P and David J. L. Tissue-type plasminogen activator variants with domain duplications and rearrangements. *Protein Eng*, 3 (1989) 111-116.
- [36] Wu D, Chuang W, Hsu J, Young K, Chang C, Wu H, Coiled coil region of streptokinase g-Domain is essential for plasminogen activation. *J Biol Chem*, 276 (2001) 15025-15033.