Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(108): 1-10

Site-Directed Mutation, Cloning and Expression of Streptokinase for Producing a New Suitable Molecule for PEGylation

Somayeh Bagheri[1], Hossein Maghsoudi[2], Fatemeh Motevalli[3], Farahnaz Khoshdel Nezamiha[4], Seyed Mehdi Hasanzadeh[5], Reza Arabi Mianroodi[5*]

1- MSc Student, Department of Biology, Payame Noor University, Shahre Rey, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Shahre Rey, Iran.
3- MSc, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
4- MSc, Research and Development Department, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran.
5- Assistant Professor, Research and Ddevelopment Department, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran.

Received: 18 Jan 2016, Accepted: 9 Mqrch 2016

Abstract

Background: Streptokinase is one of the most common and cost effective fibrinolytic drugs for treatment of heart attacks and vein thrombosis. Unlike many advantages over other thrombolytic drugs, administration of streptokinase can produce some complications such as immunologic reactions, hemorrhage and incomplete treatment due to relative short half life. Pegylation is one of the most common methods for improving of these shortcomings.

Materials and Methods: In this study, designing a proper candidate for specific pegylation with cysteine was done by means of SPDBviewer software. After a meaning ful mutation by SOEing PCR method, mutated (*sk45cys*) and intact SK (*ski*) genes were cloned in pET26-b vector and the structures were transformed in E.coli. Clones, Afrer growing, were expressed by IpTG and exptression of proteins was confirmed by SDS-PAGE and western blotting. The proteins were purified by affinity chromatography with NiNTA columns and amidolytic activity of purified proteins was assayed using chromogenic method and different concentrations of S2251 substrate.

Results: Results of activity assays showed that amidolytic activity of SK45cys had about 10% increase in comparison to Ski, after 30 minutes of complex formation with plasminogen.

Conclusion: Generally, it was concluded that, considering cys45 as a superficial aminoacid and also relative increase of activity, SK45cys can be considered a suitable protein for specific pegylation.

Keywords: Activity assay, Mutation, Pegylation, Streptokinase

*Corresponding Author:
Address: Research and Development Department, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran.
Email: arabi552@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۳ (شماره پیاپی ۱۰۸)، خرداد ۱۳۹۵، ۱۰-۱

موتاسیون هدف‌مند، کلونینگ و بیان پروتئین استرپتوکیناز به منظور تولید مولکول جدید مناسب برای پگیلاسیون

سمیه باقری[۱]، حسین مقصودی[۲]، فاطمه متولی[۳]، فرحناز خوشدل نظامیها[۴]، سید مهدی حسن زاده[۵]، رضا عربی میانرودی[۵*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، شهر ری، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، شهر ری، ایران.

۳- کارشناس ارشد، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۴- کارشناس ارشد، بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران،کرج، ایران.

۵- استادیار، بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکیناز رایج‌ترین و در حال حاضر مقرون به صرفه‌ترین داروی فیبرینولیتیک برای درمان سکته‌های قلبی و گرفتگی رگ‌ها می‌باشد. علی‌رغم مزایا و برتری‌هایی که استرپتوکیناز نسبت به داروهای ترومبولیتیک دیگر دارد، تجویز آن می‌تواند با مشکلاتی از جمله تحریک سیستم ایمنی بدن و هموراژی همراه بوده و هم‌چنین نیمه عمر نسبتا پایین آن منجر به درمان ناقص شود. پگیلاسیون یکی از روش‌های رایج برای اصلاح برخی از این معایب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر برای طراحی و تولید پروتئینی مناسب برای پگیلاسیون اختصاصی با سیستئین، نرم افزار SPDBviewer استفاده شد. پس از انجام موتاسیون هدف‌مند به روش SOEing PCR، ژن موتانت *(sk45cys)* و غیرموتانت (*ski*) به درون وکتور pET26-b وارد شده و ساختارهای حاصل به درون اشرشیاکلی ترنسفرم شدند. کلون‌های حاصل پس از رشد توسط IPTG بیان شده و بیان پروتئین‌ها توسط SD-PAGE و وسترن بلاتینگ بررسی گردید. پروتئین‌ها با تکنیک افینیتی کروماتوگرافی با ستون Ni-NTA تخلیص شدند و فعالیت آن‌ها با استفاده از روش کروموژنیک و از طریق سوبسترای S2251 بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از فعالیت سنجی نشان داد که فعالیت آمیدولیتیک *sk45cys* در مقایسه با *ski*، پس از ۳۰ دقیقه از تشکیل کمپلکس با پلاسمینوژن، ۱۰ درصد افزایش فعالیت داشته است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که با توجه به سطحی بودن مکان سیستئین جایگزین شده و هم‌چنین افزایش نسبی فعالیت SK45cys این پروتئین می‌تواند مولکول مناسبی برای انجام فرآیند پگیلاسیون اختصاصی باشد.

واژگان کلیدی: فعالیت سنجی، موتاسیون، پگیلاسیون، استرپتوکیناز

***نویسنده مسئول:** ایران، کرج، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیق و توسعه

Email: arabi552@yahoo.com

مقدمه

استرپتوکیناز، شناخته شده‌ترین داروی فیبرینولیتیک (تجزیه کننده لخته) در درمان سکته‌های قلبی می‌باشد(۳-۱). مبوز یا انسداد عروق خونی توسط لخته می‌تواند منجر به سکته قلبی و گاهی اوقات مرگ شود. صرف نظر از رفع انسداد به کمک جراحی، تنها درمان موجود تجویز عوامل ترومبولیتیک به منظور از بین بردن لخته است. استرپتوکیناز رایج‌ترین و در حال حاضر مقرون به صرفه‌ترین داروی فیبرینولیتیک برای این منظور است(۱، ۲). علی رغم مزایا و برتری‌هایی که استرپتوکیناز نسبت به داروهای ترومبولیتیک دیگر دارد تجویزآن می‌تواند با مشکلاتی از جمله تحریک سیستم ایمنی(۷-۳) و خون‌ریزی در اندام‌های مختلف بدن(۱، ۲) همراه باشد. هم‌چنین برخلاف نیمه عمر نسبتاً بالای این دارو نسبت به داروهای ترومبولیتیک دیگر، به نظر می‌رسد هم‌چنان نیاز به افزایش نیمه عمر آن و افزایش مدت گردش آن در جریان خون برای از میان بردن کامل لخته در رگ‌های گرفته شده بیماران باشد(۶، ۸، ۹).

یک روش مناسب نیز برای افزایش نیمه عمر پروتئین داروئی مانند استرپتوکیناز و در نتیجه کاهش نیاز به مصرف مجدد آن، اتصال آن به پلیمر مصنوعی پلی اتیلن گلایکول (PEG) است که پگیلاسیون (PEGylation) نامیده می‌شود(۶، ۸، ۹). اتصال پلی اتیلن گلایکول باعث پوشیده شدن سطح پروتئین و افزایش وزن مولکولی پپتید می‌شود، بنابراین اولترافیلتراسیون کلیوی را کاهش داده و منجر به افزایش نیمه عمر دارو در بدن می‌شود. هم‌چنین دسترسی سلول‌های ایمنی را نسبت به پروتئین مذکور کاهش داده و در نتیجه از تخریب آن توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک جلوگیری می‌کند. علاوه بر مزیت ذکر شده، حلالیت پروتئین را افزایش داده و باعث افزایش حلالیت داروهای نامحلول می‌شود(۶، ۱۰-۸).

پگیلاسیون می‌تواند روی اسیدهای آمینه خاصی مانند لیزین(Lys) و سیستئین (Cys) صورت بگیرد. در ابتدا پگیلاسیون پروتئین‌ها مبتنی بر استفاده از گروه آمینوی آزاد بود که در انتهای آمینی پروتئین‌ها و یا شاخه جانبی اسید آمینه لیزین قرار دارد(۱۰، ۱۱). استفاده از این روش، محققان را در انتخاب جایگاه پگیلاسیون دچار مشکل می‌نمود. زیرا از طرفی پگیلاسیون در انتهای آمینی پروتئین، محقق را محدود به انجام واکنش در همان ناحیه می‌کرد و از طرف دیگر تعداد زیاد مکان‌های مختلف در ساختار پروتئین‌ها آن‌ها را منجر به تولید پروتئین‌های پگیله‌ای می‌کرد که در نهایت دارای بازده فعالیت و کارایی بسیار کمتری نسبت به پروتئین غیر پگیله بودند و در واقع پروتئین‌هایی حاصل می‌شد که از لحاظ تعداد جایگاه، متعدد و از لحاظ میزان پگیلاسیون جایگاه‌ها ناهمگن بودند(۶).

از طرفی می‌توان از اسید آمینه سیستئین به عنوان جایگاه اتصال با پلی اتیلن گلیکول استفاده نمود. اسید آمینه سیستئین دارای گروه سولفیدرل آزاد می‌باشد که در صورت قرار داشتن این اسید آمینه در سطح پروتئین به راحتی می‌تواند با پلی اتیلن گلیکول فعال شده واکنش دهد. این روش که به پگیلاسیون اختصاصی معروف است تا کنون بر روی مکان‌های مختلفی در ساختار این پروتئین انجام شده است(۱۲). در پروتئین‌هایی مانند استرپتوکیناز به دلیل نبود این اسیدآمینه(۲، ۱۲، ۱۳)، با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک می‌توان کدون اسید آمینه سیتئین را به دلخواه و به صورت هدف‌مند جایگزین اسید آمینه‌هایی کرد که نقش مهمی در فعالیت و یا در تاخوردگی و ساختار پروتئین آن ندارند(۱۲، ۱۴)، به طوری که پس از بیان در جایگاه دلخواه، اسیدآمینه سیستئین ایجاد شود.

هدف از این تحقیق ایجاد موتاسیون روی استرپتوکیناز برای ایجاد جایگاه سیستئین به روش مهندسی ژنتیک می‌باشد، به طوری که پروتئینی که طی ایجاد موتاسیون برای ایجاد جایگاه سیستئین مهندسی تولید می‌شود در آینده برای هدف پگیلاسیون اختصاصی بر روی اسید آمینه سیستئین کاربرد خواهد داشت.

مواد و روش ها

انتخاب جایگاه مناسب برای موتاسیون:

ابتدا ساختار کریستالی استرپتوکیناز در کمپلکس با پلاسمینوژن به صورت فایل pdb از بانک جهانی پروتئین (http://www.rcsb.org/pdb) دانلود شده و برای مشاهده و بررسی این ساختارها از نرم افزار SPDB viewer نسخه ۴/۰۱ استفاده شد. در همین نرم افزار با استفاده از آیکون Accessibility اسید آمینه‌ها بررسی شدند. اساس انتخاب اسید آمینه و دور بودن آن از نقاط اتصال استرپتوکیناز با پلاسمینوژن و هم‌چنین جایگاه کاتالیتیک بر روی پلاسمینوژن بود.

پس از جا به جایی این اسیدآمینه‌ها با اسید آمینه سیستئین در محیط Insilico، مدل سازی پروتئین با استفاده از نرم افزار MODELLER(9v2) انجام شد. بر اساس مدل سازی انجام شده، فایل‌های pdb متعددی از هر کدام به دست آمد که از بین آن‌ها مدلی که دارای پایین‌ترین سطح انرژی بود به عنوان مدل نهایی انتخاب گردید. برای ارزیابی مدل به دست آمده از نرم افزار SPDB viewer برای محاسبه RMSD (محاسبه متوسط فاصله کربن‌های آلفااسیدهای آمینه میان مدل سیستئینی و الگو)استفاده شد.

طراحی پرایمر و موتاسیون هدف‌مند:

با استفاده از برنامه Gene Runner نسخه ۳/۵، پرایمرهای لازم برای تکثیر ژن و هم‌چنین موتاسیون هدف‌مند طراحی شدند(جدول ۱). برای انجام موتاسیون هدف‌مند از روش SOEing PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اتصال از طریق گسترش هم‌پوشانی) استفاده شد. ابتدا با استفاده از ژن استرپتوکیناز (انستیتو پاستور ایران) و جفت پرایمرهای(F1,R45) و (F45, R414)، قطعات همپوشان حاوی موتاسیون با استفاده از روش PCR ساخته شدند. برای تکثیر در این مرحله از آنیلینگ در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه در ۳۰ سیکل استفاده شد. قطعات پس از الکتروفورز در ژل آگارز به وسیله کیت (شرکت یکتا تجهیز) از ژل تخلیص شدند. در مرحله اول SOEing PCR قطعات همپوشان خالص به نسبت مولی مساوی مخلوط شده، بعد از واسرشته شدن رشته‌ها در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۵ سیکل در دمای ۵۰ درجه، اجازه داده شد تا رشته‌های مقابل قطعات همپوشان تکمیل شده و قطعه کامل ایجاد شود. در مرحله دوم با اضافه شدن جفت پرایمرهای F1 و R414، قطعات تکمیل شده تکثیر شدند. برای تکثیر در این مرحله از آنیلینگ در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ سیکل استفاده شد. برای تکثیر ژن دست نخورده نیز از مراحل اشاره شده در مرحله دوم استفاده شد. ژن‌های موتانت ایجاد شده در این مرحله برای تایید ایجاد موتاسیون توسط شرکت MACROGEN کره جنوبی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال T7 پروموتر تعیین توالی شدند.

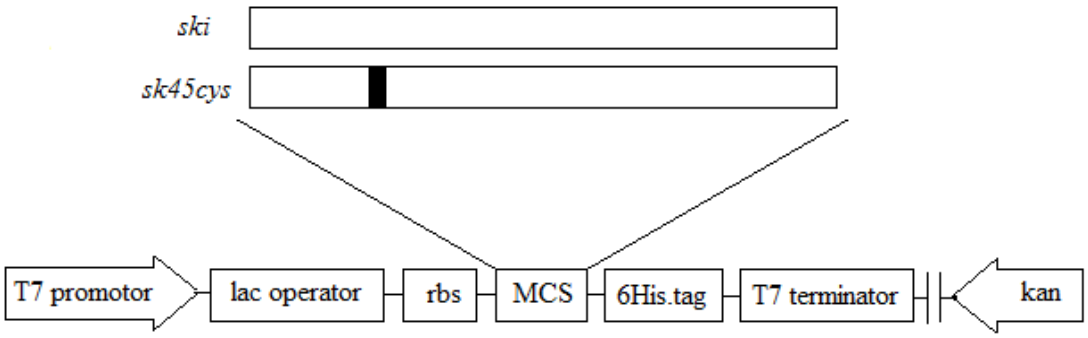
جدول۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن استرپتوکیناز و قطعات همپوشان مورد نیاز برای SOEing PCR

نام پرایمر	توالی
F1	AGACATATGATTGCTGGACCTGAGTG
R45	TCCATGAGCAGGGCATGATGTTAG
F45	TAACATCATGCCCTGCTCATGG
R414	ATCTCGAGTTTGTCGTTAGGGTTATCAG

کلونینگ:

ژن موتانت و ژن دست نخورده استرپتوکیناز به وسیله آنزیم‌های NdeI و XhoI (شرکت فرمنتاس) هضم آنزیمی شده و با کیت تخلیص محصولات PCR (شرکت یکتا تجهیز) تخلیص شدند. وکتور pET26-b (شرکت نوواژن) که از پروموتور قدرت‌مند T7 و دارای ژن مقاومت کانامایسین است (شکل ۱) نیز با همین آنزیم‌ها

هضم شده و پیش از الکتروفورز در ژل آگارز از ژل تخلیص شده و پس از مخلوط شدن ژن‌ها با وکتور، واکنش لیگاسیون توسط آنزیم لیگاز T4 انجام گرفت(۱۵). ساختارهای تشکیل شده که برای ژن موتانت و ژن دست نخورده استرپتوکیناز به ترتیب pETskcys45 و pETski نامیده شدند، به درون اشرشیا کلی سویه DH5α ترنسفرم شدند(۱۵). درستی ورود ژن‌ها به درون وکتور توسط روش هضم آنزیمی تایید گردید و برای تایید نهایی، ژن‌های درون ساختارها از دو طرف با استفاده از پرایمرهای یونیورسال T7 پروموتر و T7 ترمیناتور توسط شرکت MACROGEN تعیین توالی شدند. سپس ساختارهای تایید شده به درون سویه‌های بیانی اشرشیا Rosetta(DE3) ترنسفرم شدند(۱۵).



شکل۱. تصویر شماتیک خطی قسمت‌های مختلف وکتور pET26-b؛این وکتور از پروموتر قدرتمند T7 ، مقاومت به کانامایسین و هم‌چنین برچسب هیستیدینی (6His.tag) در پایین دست جایگاه چندگانه کلونینگ (MCS) بهره می‌برد. ژن‌های *ski* و *sk45cys* در جایگاه‌های اثر آنزیم‌های *Nde*I و *Xho*I وارد شدند. این وکتور از اپرون lac و جایگاه اتصال ریبوزوم (rbs) که درست قبل از کدون شروع قرار دارند نیز بهره می برد.

بیان پروتئین: یک کلونی تک از هر کدام از کلون‌های حاوی ژن‌های موتانت و دست نخورده در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB آگار حاوی کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تلقیح شد. پس از یک شب رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به درون ۵ میلی‌لیتر محیط LB آگار جدید پاساژ داده شد. پس از رسیدن غلظت سوسپانسیون میکروبی به جذب نوری (OD600) به عدد ۰/۶، برای القای تولید پروتئین به سوسپانسیون IPTG (غلظت نهایی نیم میلی‌مولار) اضافه گردید. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سلول‌ها با استفاده از سانتریفوژ رسوب داده شده و برای استفاده در مراحل بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند(۱، ۱۴).

SDS-PAGE: به مقداری از رسوب سلولی (حاصل از یک میلی‌لیترسوسپانسیون میکروبی) ۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (دی سدیم هیدروژن فسفات ۱۰۰میلی‌مولار، Tris.Cl ۱۰ میلی‌مولار و اوره ۸ مولار) اضافه شده و به همان اندازه بافر لودینگ (Tris.Cl ۰/۰۹ مولار، ۲۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد SDS، ۰/۰۲ درصد بروموفنل بلو و ۲ درصد 2ME) اضافه شده و پس از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. سپس ۲۰ مایکرولیتر از این نمونه در ژل پلی اکریل آمید ۱۵ درصد ریخته شده و با ولتاژ ۱۰ ولت به ازای هر سانتی مربع ژل، الکتروفورز انجام شد(۱، ۱۴).

وسترن بلات: پس از انجام SDS-PAGE نمونه‌ها، ابتدا باندهای پروتئین‌های الکتروفورز شده موجود در ژل به غشاء نیتروسلولزی منتقل شده و سپس با استفاده از آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدینی ۶ تایی و نیز آنتی بادی کنژوگه شده با آنزیم HRP، باندهای پروتئینی دارای بر چسب هیستیدنی شناسائی شدند. برای شست و شوی غشا از بافر TBS(۱۰ میلی مولار، Tris.Cl و ۱۵ میلی مولار، NaCl) و از محلول حاوی بافر TBS و BSA ۳ درصد به عنوان محلول بلوکه کننده استفاده شد. بعد از بلوکه سازی غشا در محلول ۱/۲۰۰۰ رقیق شده از استوک آنتی‌بادی

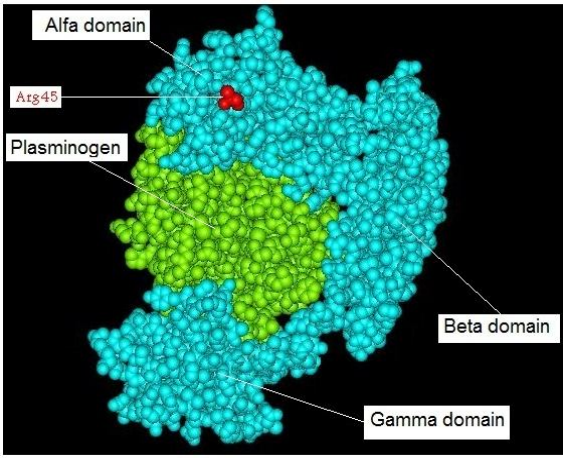
Anti-penta-His Ab (۰/۲ mg/dl) که در TBS حاوی ۳ درصد BSA تهیه شده است، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شست و شو با TBS ، غشا با محلول Ab ثانویه (کنژوگه با HRP) که در TBS حاوی ۳ درصد BSA به اندازه ۱ به ۵۰۰۰ رقیق شده است، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شست و شو، غشا با سوبسترای DAB برای مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه برای قابل رویت شدن باندها انکوباسیون شد(۱، ۱۴).

تخلیص پروتئین‌ها: ابتدا رسوب سلولی با بافر لیز کننده(۱۰ میلی مولار، Tris.Cl و ۱۰۰ میلی مولار، NaH2Po4 8M; PH=8 urea,) مخلوط شده و پس از ورتکس به مدت حدود نیم ساعت در دمای اتاق به آرامی هم زده شد. پس از آن سلول‌های لیز شده از ستون Ni-NTA گذرانده شد. در مرحله بعد بافر شست و شو (اوره، ۱۰ میلی مولار، Tris.Cl ۱۰۰ میلی مولار، NaH2Po4 ۸ مولار PH=6.3) از ستون گذرانده شده و در نهایت پروتئین استرپتوکیناز توسط بافر الوشن (اوره، ۱۰ میلی مولار Tris.Cl، ۱۰۰ میلی مولار NaH2Po4، ۸ مولار PH=4.5) جمع‌آوری شد. در نهایت اوره ۸ مولار موجود در محلول نهایی پروتئین توسط روش ژل فیلتراسیون با ستون سفادکس G-25 حذف شده و با بافر حاوی تریس ۵۰ میلی‌مولار و کلرید سدیم ۲۵ میلی‌مولار، pH=۷/۵ جایگزین شد(۱).

فعالیت سنجی: برای تعیین فعالیت پروتئین‌های Ski و SK45cys از روش کروموژنیک استفاده شد. غلظت‌های مولی مساوی(۴ نانومول) از پروتئین‌های استرپتوکیناز و پلاسمینوژن در چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کمپلکس آنزیمی تشکیل گردد. سپس به این کمپلکس سوبسترای کروموژنیک S2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) یک میلی‌مولار (کروموژنیکس، ایتالیا)اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان جذب نوری رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۰۵ نور ماورای بنفش ثبت شد(۱).

یافته ها

انتخاب جایگاه مناسب برای موتاسیون: با استفاده از نرم افزار SPDB viewer ، جایگاه به دست آمده اسید آمینه آرژینین۴۵ بود که در دمین آلفا قرار داشته و یک اسید آمینه سطحی بر روی این پروتئین به شمار می‌آید(شکل۲). هم‌چنین این جایگاه از دمین گاما که ارتباط نزدیکی با جایگاه کاتالیتیک بر روی پلاسمینوژن (سرین ۷۹۱) پس از تشکیل کمپلکس دارد، کاملا دور می‌باشد(۱۳).

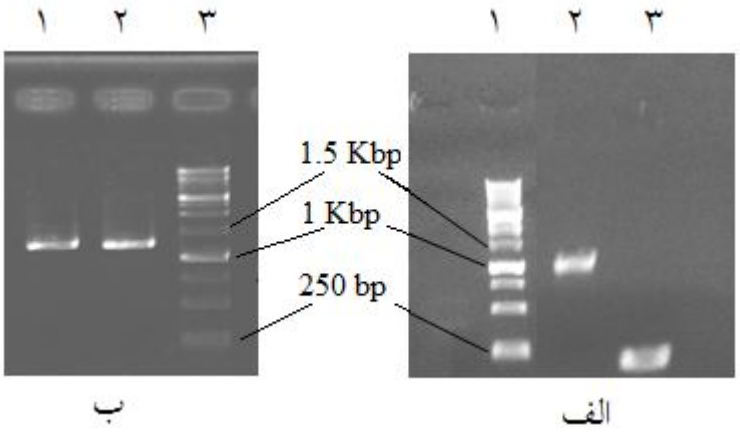


شکل۲. کمپلکس استرپتوکیناز و پلاسمینوژن؛ موقعیت مکانی آرژینین ۴۵ در ساختار استرپتوکیناز مشخص شده است. این اسید آمینه یک اسید آمینه سطحی بوده و تماسی با پروتئین پلاسمینوژن در هنگام تشکیل کمپلکس ندارد. جایگاه فعال پلاسمینوژن بیشترین ارتباط را با دمین گاما دارد.

مدل سازی استرپتوکیناز حاوی سیستئین با استفاده از نرم افزار MODELLER انجام شد. متوسط فاصله کربن‌های آلفای مدل آنالوگ سیستئینی با کربن‌های آلفای الگو تنها۱/۲۲ آنگسترم بود که نشان دهنده شباهت بسیار بالای مدل سیستئینی و الگو بود(کمتر از ۵ آنگسترم).

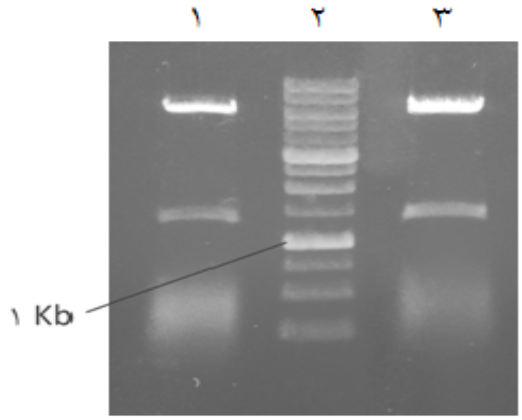
موتاسیون: با استفاده از روش PCR قطعات هم‌پوشان مورد نیاز برای SOEing PCR تکثیر شده و پس از تخلیص در ژل آگارز الکتروفورز شدند(شکل۳، الف). قطعات همپوشان تخلیص شده به نسبت مولی یک به یک مخلوط شده و پس از هیبریداسیون و تکمیل قطعات خالی به

وسیله آنزیم پلیمراز و تکثیر ژن کاملی تشکیل گردید که حاوی موتاسیون در جایگاه کدون مربوط به آرژینین ۴۵ بود(شکل۳، ب). هم‌چنین ژن بدون موتاسیون استرپتوکیناز به وسیله جفت پرایمرهای (F1, R414) به روش PCR تکثیر شد (شکل۳، ب).



شکل۳. الف- الکتروفورز قطعات همپوشان ایجاد شده با روش PCR پس از تخلیص از ژل؛ ستون۱، مارکر تخمین اندازه DNA؛ ستون۲، قطعه حاصل از PCRبا جفت پرایمرهای (F1, R45) به طول ۱۵۶جفت باز؛ ستون۳، قطعه حاصل از PCR با جفت پرایمرهای (F45, R414) به طول ۱۱۲۰ جفت باز ب- تکثیر ژن‌های دست نخورده و موتانت استرپتوکیناز با جفت پرایمرهای (F1, R414؛ ستون ۱، ژن دست نخورده با طول ۱۲۴۲ جفت باز؛ ستون۲، ژن موتانت sk45cys که توسط تکنیک SOEing PCR ایجاد شده است؛ ستون۳ مارکر تخمین اندازه DNA

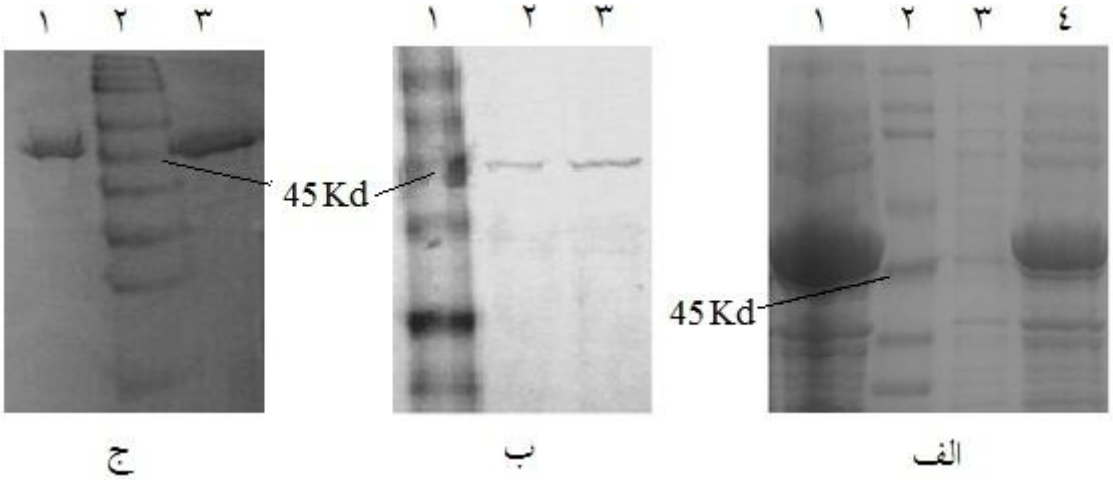
ژن‌های تکثیر شده دست نخورده (*ski* و *sk45cys*) توسط آنزیم‌های *Nde*I و *Xho*I برش خورده و به درون وکتور pET26-b شدند. سازه‌های حاصل (pETSKi و pETSK45cys) به درون میزبان اشرشیا کلی DH5α ترنسفرم شده و درستی ورود ژن توسط روش هضم آنزیمی پس از استخراج ساختارهای پلاسمیدی تایید شد(شکل ۴). سپس ساختارهای تایید شده به درون وکتور بیانی اشرشیا کلی Rosseta(DE3) ترنسفرم شدند.



شکل۴. سازه‌های pETSKi و pETSK45cys برای تایید ورود ژن‌های *ski* و *sk45cys* به وسیله آنزیم‌های *Nde*I و *Xho*I برش خورده و در ژل آگارز الکتروفورز شدند؛ ستون‌های۱و ۳ به ترتیب ژن‌های *ski* و *sk45cys* هستند که پس از هضم آنزیمی با اندازه ۱۲۴۲ جفت باز از وکتور جدا شده‌اند؛ ستون۲، مارکر تخمین اندازه DNA.

بیان و تخلیص: تولید پروتئین توسط کلون‌ها با القا به وسیله IPTG تحریک شده و تولید پروتئین‌ها پس از ۳ ساعت القا با استفاده از روش‌های SDS-PAGE (شکل۵.

الف) و وسترن بلات تایید گردید(شکل۵، ب). توده سلولی به وسیله اوره ۸ مولار شکسته شده و پروتئین‌ها پس از سانتریفوژ با روش کروماتوگرافی جذبی با آگارز Ni-NTA در یک مرحله با درجه خلوص بیش از ۹۰ درصد خالص شدند (شکل۵، ج). اوره موجود در محلول‌های پروتئینی به وسیله ستون سفادکس G-25 حذف گردید.



شکل۵. الف- الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل پلی اکریل آمید ۱۵ درصد پس از القا توسط IPTG؛ ستون ۱ و ۴ به ترتیب پروتئین‌های Ski و SK45cys ، ستون ۲ مارکر وزن مولکولی پروتئینی و ستون ۳ نمونه کلون Ski قبل از القا؛ نمونه‌های القا شده دارای باند پروتئینی کاملا مشخصی در جایگاه ۴۷ کیلودالتون در مقایسه با نمونه القا نشده هستند. ب- تصویر مربوط باندهای پروتئینی پس از انجام آزمون وسترن بلات بر روی کاغذ نیتروسلوز؛ ستون ۱ مارکر وزن مولکولی پروتئینی و ستون ۲و ۳ به ترتیب پروتئین‌های Ski و SK45cys؛ ج- الکتروفورز پروتئین‌های خالص شده به روش افینیتی کروماتوگرافی

بررسی فعالیت بیولوژیک: پروتئین‌های دست نخورده و موتانت استرپتوکیناز به صورت جداگانه با نسبت مولی ۱:۱ با پلاسمینوژن مخلوط شده و فعالیت آمیدازی کمپلکس‌ها با استفاده از غلظت ۸۰۰ میلی‌مولارسوبسترای S2251 اندازه‌گیری شد. در این روش، اساس مقایسه فعالیت میزان رنگ ایجاد شده توسط کمپلکس‌های فعال استرپتوکیناز با پلاسمینوژن می‌باشد؛ به طوری که هر چقدر کمپلکس فعال‌تری تشکیل شود، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر خواهد بود. نتایج میزان جذب نوری حاصل از ایجاد رنگ پس از ۳۰ دقیقه در غلظت ۸۰۰ میلی‌مولار سوبسترا برای SK45cys ۰/۷۷ و برای Ski ۰/۷۱ بود که نشان دهنده این بود که استرپتوکیناز موتانت با این شرایط افزایش فعالیت حدود ۱۰ درصدی فعالیت آمیدولیتیک را نسبت استرپتوکیناز دست نخورده از خود نشان داده است.

بحث

به دلیل فقدان اسید آمینه سیستئین در ساختار استرپتوکیناز، این پروتئین مولکول ایده آلی برای انجام پگیلاسیون اختصاصی می‌باشد. با استفاده از تکنیک DNA نوترکیب، می‌توان سیستئین را به صورت هدف‌مند جایگزین اسید آمینه‌هایی کرد که نقش مهمی در فعالیت و یا تاخوردگی و ساختار استرپتوکیناز ندارند، به طوری که موتانت سیستئینی حاصل کمترین تغییر را در فعالیت بیولوژیک پروتئین ایجاد کند. هم‌چنین، به دلیل این که مولکول پلی اتیلن گلیکول مورد نظر برای انجام واکنش نیاز به دسترسی به اسیدآمینه‌های سطحی دارد، اسید آمینه مورد نظر باید برای تعویض از میان اسید آمینه‌های سطحی انتخاب گردد(۱۲، ۱۴).

در این مطالعه ابتدا به کمک نرم افزار SPDB viewer اسید آمینه گلوتامیک اسید در جایگاه ۴۵، به منظور جایگزینی با اسید آمینه سیستئین انتخاب شد. با استفاده از نرم افزار SPDB viewer ، مشخص گردید که گلوتامیک اسید ۴۵ که در دومین آلفا پروتئین استرپتوکیناز واقع شده است، یک اسید آمینه سطحی می‌باشد. با توجه به این که دمین گاما استرپتوکیناز بیشترین تماس را با دمین

کاتالیتیک پلاسمینوژن(۵۴۱ تا ۷۹۱) دارد، به نظر می‌رسد که پگیلاسیون در ناحیه اسید امینه ۴۵ که در دمین گاما قرار دارد، از لحاظ فضایی در تشکیل کمپلکس با مولکول پلاسمینوژن تداخلی ایجاد نکرده و به اندازه کافی از جایگاه فعال بر روی پلاسمینوژن دور باشد. برای بررسی شباهت ساختار فضایی پروتئین موتانت با پروتئین دست نخورده مدل سازی انجام شد و ارزیابی مدل به دست آمده نشان داد که با توجه به مقدار بسیار ناچیز متوسط فاصله میان کربن‌های آلفای مدل و الگو، احتمالا پس از موتاسیون، حدس زده شد که پروتئین استرپتوکیناز موتانت کمترین تغییر ساختار فضایی را خواهد داشت.

پس از اطمینان نسبی از مناسب بودن انتخاب جایگاه موتاسیون، ژن استرپتوکیناز با استفاده از روش SOEing PCR موتاسیون یافته و با استفاده از وکتور pET26-b در اشرشیاکولی سویه Rosetta بیان شد. از آن‌جا که وکتور مذکور دارای پروموتر قدرت‌مندT7 بوده و سویه استفاده شده غنی از tRNA های نادر بود، انتظار می‌رفت که بیان پروتئین با این سیستم با کارایی بالا صورت گیرد. در تایید این موضوع، الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل پلی کریل آمید نشان داد که باندهای قوی استرپتوکیناز موتانت و دست نخورده در برابر سلول‌های القا نشده ایجاد شده و نتایج وسترن بلات نیز بیان این پروتئین‌ها را قطعی نمود.

نظر به این که هدف از این پروژه تولید استرپتوکیناز سیستئینه‌ای بود که برای پگیلاسیون اختصاصی در آینده استفاده شود باید فعالیت این پروتئین موتانت بررسی می‌شد تا اثبات شود که در اثر موتاسیون دچار کاهش فعالیت نشده باشد. به همین منظور، فعالیت استرپتوکینازهای دست نخورده (Ski) و موتانت (SK45cys) تخلیص شده با هم مقایسه شدند. جذب نوری حاصل از تجزیه سوبسترا به وسیله این پروتئین‌ها پس از تشکیل کمپلکس با پلاسمینوژن نشان داد که نه تنها SKcys45 کاهش فعالیتی در مقایسه با Ski نداشت، بلکه حدود ۱۰ درصد افزایش نیز از خود نشان داد. کومار و همکاران(۱۲) موتاسیون‌های متعددی با هدف جایگزینی سیستئین بر روی استرپتوکیناز انجام داده و فعالیت آن‌ها را با استرپتوکیناز دست نخورده مقایسه کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که موتاسیون در مکان‌های متفاوت می‌تواند اثرات کاملا متفاوتی بگذارد، به طوری که بعضی از آن‌ها مانند SKD102C ۲۶ درصد و SK S105C ۲۴ درصد کاهش فعالیت داشتند، اما موتانت‌هایی مانند SK L258C و SKL260C تفاوت فعالیتی با استرپتوکیناز دست نخورده نشان ندادند. از طرف دیگر، گزارش منزوی و همکاران نشان داد که فعالیت SK105cys بدون تغییر نسبت به استرپتوکیناز دست نخورده بوده است(۱۴). افزایش فعالیت در مطالعه حاضر می‌تواند به این علت باشد که جایگزینی اسید آمینه سیستئین با آرژینین۴۵، احتمالا باعث تغییراتی در ساختار استرپتوکیناز شده که با تشکیل کمپلکس قوی‌تر با پلاسمینوژن، توانایی بیشتری برای تجزیه سوبسترا داشته است. پدیده افزایش فعالیت یا عدم کاهش فعالیت، اهمیت بالایی در فرم پگیله شده این موتانت‌ها دارد، زیرا پس از اتصال مولکول پلی اتیلن گلایکول به این پروتئین‌ها احتمال کاهش فعالیت این پروتئین‌ها وجود خواهد داشت(۶، ۹، ۱۰، ۱۲)؛ بنابراین طراحی پروتئین‌های موتانتی با حداقل کاهش فعالیت، بدون کاهش و حتی با فعالیت افزایش یافته، مطلوب خواهد بود.

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج حاصل از این تحقیق، کلون تولید کننده استرپتوکیناز جدیدی را معرفی می‌کند که قدرت بیان مناسبی داشته و پروتئین موتانت حاصل به خاطر سطحی بودن سیستئین آن و داشتن فعالیت بیولوژیک مناسب می‌تواند مولکول ایده آلی برای پگیلاسیون اختصاصی باشد. مولکول‌های پگیله‌ها که در آینده تولید می‌شوند از لحاظ آنتی ژنیک و پایداری با مولکول غیر پگیله مقایسه خواهند شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک از گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور واحد شهر ری می‌باشد.

هزینه‌های مالی این تحقیق که قسمتی از طرح ۷۰۱ (مصوب در معاونت پژوهشی انستیتو پاستور ایران) می‌باشد، از بودجه پژوهشی انستیتو پاستور ایران تامین گردیده است.

بدین وسیله از حمایت‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر آقاصادقی رییس بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران و کلیه همکاران بخش تحقیق و توسعه مجتمع تولیدی و تحقیقاتی کرج به ویژه آقای دکتر پریان، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Arabi R, Roohvand F, Norouzian D, Sardari S, Aghasadeghi MR, Khanahmad H, et al. A comparative study on the activity and antigenicity of truncated and full-length forms of streptokinase. Pol J Microbiol. 2011; 60(3): 243-51.

2. Banerjee A, Chisti Y, Banerjee U. Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. Biotechnology advances. 2004; 22(4):287-307.

3. Torréns I, Ojalvo AG, Seralena A, Pupo E, Lugo V, Páez R. A mutant streptokinase lacking the C-terminal 42 amino acids is less reactive with preexisting antibodies in patient sera. Biochemical and biophysical research communications. 1999; 266(1):230-6.

4. Coffey JA, Jennings KR, Dalton H. New antigenic regions of streptokinase are identified by affinity-directed mass spectrometry. European Journal of Biochemistry. 2001; 268(19): 5215-21.

5. Parhami-Seren B, Lynch M, White HD, Reed GL. Mapping the antigenic regions of streptokinase in humans before and after streptokinase therapy. Molecular immunology. 1995; 32(10):717-24.

6. Rajagopalan S, Gonias SL, Pizzo SV. A nonantigenic covalent streptokinase-polyethylene glycol complex with plasminogen activator function. Journal of Clinical Investigation. 1985; 75(2):413-9.

7. Reed G, Kussie P, Parhami-Seren B. A functional analysis of the antigenicity of streptokinase using monoclonal antibody mapping and recombinant streptokinase fragments. The Journal of immunology. 1993; 150(10):4407-15.

8. Pizzo SV. Preparation, in vivo properties and proposed clinical use of polyoxyethylene-modified tissue plasminogen activator and streptokinase. Advanced Drug Delivery Reviews. 1991; 6(2):153-66.

9. Pratap J, Rajamohan G, Dikshit K. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from Pichia pastoris: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. Applied microbiology and biotechnology. 2000; 53(4):469-75.

10. Hauhan S, Meena S, Pegylation A. Surprising Technology. Internationale Pharmaceutica Sciencia. 2011. 1 (2):18-24.

11. Maleki A, Madadkar-Sobhani A, Roohvand F, Najafabadi AR, Shafiee A, Khanahmad H, et al. Design, modeling, and expression of erythropoietin cysteine analogs in Pichia pastoris: Improvement of mean residence times and in vivo activities through cysteine-specific PEGylation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2012; 80(3):499-507.

12. Kumar S, Maheshwari N, Sahni G. Mutants of streptokinase and their covalently modified forms. Google Patents; 2012.

13. Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, Zhang XC. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. Science. 1998; 281(5383):1662-5.

14. Monzavi N, Aghasadeghi MR, Arabi R, Memarnejadian A, Sadat M, Khanahmad H, et al. Design, cloning, expression and evaluation of cysteine-substitutes of intact and truncated molecules of streptokinase. Physiology and Pharmacology. 2010; 14(1):56-65.

15. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 2001.