



# Evaluation of the $\alpha$ 2-Antiplasmin-Resistance of a Domain Exchanged-Chimeric Streptokinase from Two Streptococci Groups

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Rafipour M.<sup>1</sup> PhD,  
Keramati M.<sup>2</sup> PhD,  
Aslani M.M.<sup>3</sup> PhD,  
Arashkia A.<sup>4</sup> PhD,  
Roohvand F.<sup>\*4</sup> PhD

### How to cite this article

Roohvand F, Keramati M, Aslani M.M, Arashkia A, Rafipour M. Evaluation of the  $\alpha$ 2-Antiplasmin-Resistance of a Domain Exchanged-Chimeric Streptokinase from Two Streptococci Groups. Pathobiology Research. 2019;22(2):77-84.

<sup>1</sup>Virology & Microbiology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Nano Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Microbiology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Virology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

### \*Correspondence

Address: Virology Department, Pasteur Institute of Iran, No. 69, Pasteur Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1316943551

Phone: +98 (61) 64112250

Fax: +98 (61) 66496682

rforzin@pasteur.ac.ir

### Article History

Received: November 18, 2018

Accepted: February 12, 2019

ePublished: June 20, 2019

## ABSTRACT

**Aims** The chimeric domain-exchanged streptokinase (SKch) between two sk genes from groups G and A streptococci (SK2aG88 and SK2bALAB49, respectively) was constructed to evaluate the role of SK-domains ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) in  $\alpha$ 2-antiplasmin-resistance variations of SK.

**Materials & Methods** In this experimental study, PCR-amplified genes of streptococci (skg, ska) were cloned into pET26b vector to produce pET26-SKG88 and pET26-SKALAB49. For domain exchange, the amplicon containing  $\beta$  and  $\gamma$  domains of SK2bALAB49 was replaced for that of the SK2aG88 within pET-SK2aG88 (pET26-SKch;  $\alpha$ 2aG88 $\beta$ 2bALAB $\gamma$ 2bALAB). All constructs were confirmed by restriction analyses/agarose-gel electrophoresis and DNA sequencing, transformed into E.coli Rosetta, and induced by IPTG for protein expression. Proteins were purified by Ni-NTA chromatography, quantified by Bradford method, and analyzed by SDS-PAGE/Western blotting assays. The  $\alpha$ 2-antiplasmin-resistance was measured by S2251 colorimetric assay for plasminogen activation.

**Findings** SDS-PAGE and western blotting results indicated the expression of proteins with the size of 47kD. At the highest concentration of  $\alpha$ 2-antiplasmin, SK2aG88 remained 80% active, whereas the SK2bALAB49 and SKch retained 55% of their activity.

**Conclusion** SKch shows similar activity reduction, indicating the minor role of the  $\alpha$  domain compared to  $\beta$  and  $\gamma$  domains for  $\alpha$ 2-antiplasmin-resistance.

**Keywords** Streptokinase; Domain exchange; Chimera;  $\alpha$ 2-Antiplasmin

## CITATION LINKS

- [1] Fibrinolytic drug therapy in the management of intravascular thrombosis, especially ... [2] A systematic review on the prevalence of acute myocardial ... [3] Translational initiatives in thrombolytic ... [4] Effectiveness of tenecteplase versus streptokinase in treatment of acute myocardial ... [5] Fibrinolysis and the control of ... [6] The evolution of recombinant thrombolytics: Current status ... [7] Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis ... [8] The forgotten ... [9] Streptokinase for treatment of thrombotic disorders: The end? Or the ... [10] Point mutation in amino acid 263 of streptokinase gene as well as cloning and ... [11] Towards a superior streptokinase for fibrinolytic ... [12] Functional differences between Streptococcus pyogenes cluster 1 and cluster ... [13] Reprogrammed streptokinases develop fibrin-targeting and dissolve blood clots with ... [14] Aslani MM. PCR/RFLP-based allelic variants of streptokinase and their plasminogen [15] Natural selection and evolution of streptococcal virulence genes involved ... [16] Allelic variants of streptokinase from Streptococcus pyogenes display functional ... [17] Streptokinase variants from Streptococcus pyogenes isolates display altered plasminogen activation ... [18] Screening, Cloning and Expression of Active Streptokinase ... [19] Sequence and kinetic analyses of streptokinase from two group G streptococci with high fibrin-dependent plasminogen ... [20] The condensed protocols from molecular cloning ... [21] A comparative study on the activity and antigenicity of truncated and full ... [22] Kinetics of activation of human plasminogen by different activator ... [23] Function of the central domain of streptokinase in substrate plasminogen docking and processing revealed ... [24] collaborative study to establish the 3rd international ... [25] Biological activity analysis of native and recombinant streptokinase using clot ... [26] A standard clot method for the assay of plasminogen activators ... [27] Kinetics of the reactions between streptokinase ... [28] Structure-function analysis of the streptokinase amino ... [29] Structural domains of streptokinase involved ... [30] Chimerism reveals a role for the streptokinase  $\beta$ -domain in nonproteolytic active site ...

## بررسی مقاومت استرپتوکیناز کایمری حاصل از جابه‌جایی دومین‌ها میان دو گروه استرپتوکوک‌ها نسبت به آلفا دو آنتی‌پلاسمین

مریم رفیع پور PhD

بخش ویروس‌شناسی/میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

ملیحه کرامتی PhD

بخش نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

محمد مهدی اصلانی PhD

بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

آرش آرشیکیا PhD

بخش ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

فرزین روحوند\* PhD

بخش ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** استرپتوکیناز کایمر حاصل از تبادل دومین استرپتوکیناز میان دو سویه استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه G و A به منظور بررسی اثر دومین‌های استرپتوکیناز در مقاومت به مهارکننده آلفا دو آنتی‌پلاسمین ساخته شد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر ژن‌های استرپتوکیناز (*skg/ska*) تکثیر شده از ژنوم دو سویه گروه G و A به ترتیب SK2bALAB49 و SK2aG88 در pET26b کلون شدند. به منظور تبادل دومین، محصول PCR حاوی دومین بتا و گامای *skALAB49* در pET26-*skG88* فاقد این دومین‌ها قرار گرفت. پس از تایید هر سه سازه با آنالیز آنزیمی و توالی‌یابی، بیان *E. coli* Rosetta انجام و پروتئین‌ها با کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص شدند. پس از تعیین غلظت، آنالیز با روش الکتروفورز ژل آکریلامید و وسترن بلات انجام شد. مقاومت به آلفا دو آنتی‌پلاسمین به روش رنگ‌سنجی با به کارگیری سوپسترای کروموزئیک S2251 اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج الکتروفورز ژل آکریلامید و وسترن بلات نشان‌دهنده بیان پروتئین‌ها با اندازه ۴۷ کیلودالتون بود. در بالاترین غلظت آلفا دو آنتی‌پلاسمین، SK2aG88، ۸۰٪ فعالیت در حالی که SK2bALAB49 و SKch ( $\alpha_2$ g88 $\beta$ 2bALAB $\gamma$ 2bALAB) ۵۵٪ فعالیت اولیه خود را نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** SKch الگوی کاهش فعالیت مشابه SK2bALAB49 را نشان می‌دهد که بیانگر نقش کمتر دومین آلفا نسبت به سایر دومین‌ها در بروز مقاومت به مهارکننده آلفا دو آنتی‌پلاسمین است.

**کلیدواژه‌ها:** استرپتوکیناز، تبادل دومین، کایمر، آلفا دو آنتی‌پلاسمین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۳

\*نویسنده مسئول: rfazrin@pasteur.ac.ir

### مقدمه

لخته‌های خونی بر اثر از بین رفتن تعادل هموستازی در بدن ایجاد شده و سبب انسداد عروق و به دنبال آن بروز بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شوند که بخش قابل توجهی از مرگ‌ومیر سالیانه را به خود اختصاص می‌دهند<sup>[1, 2]</sup>. در حال حاضر از داروهای ترمبولیتیک مانند استرپتوکیناز (SK) که در حقیقت فعال‌کننده پلاسمینوژن (hPg) موجود در خون هستند برای درمان و حل لخته‌های خون استفاده می‌شود<sup>[3, 4]</sup>. پلاسمینوژن گلیکوپروتئینی با وزن ۹۲ کیلودالتون و دارای ۷۹۱ آمینواسید است که در پلاسما و مایعات خارج سلولی وجود دارد. در صورت تشکیل لخته خون در شرایط نرمال و غیرپاتولوژیک، سیستم فیبرینولیتیک فیزیولوژیک از طریق فعال‌کننده‌های hPg، این پیش‌آنزیم غیرفعال موجود در پلاسما را به پلاسمین (hPn) فعال، عامل تخریب فیبرین (ساختار اصلی لخته‌های خونی)، تبدیل می‌کند. در صورت عدم کنترل hPn توسط مهارکننده‌های موجود در پلاسما، hPn باعث تخریب ماتریکس‌های

خارج سلولی نیز خواهد شد<sup>[5, 6]</sup>. آلفا دو آنتی‌پلاسمین ( $\alpha_2$ -AP) به عنوان مهارکننده و تنظیم‌کننده سیستم فیبرینولیتیک عمل می‌کند. این مهارکننده با hPn طی دو مرحله میان‌کنش نشان می‌دهد. در ابتدا یک میان‌کنش اولیه قابل بازگشت میان انتهای کربوکسیل  $\alpha_2$ -AP و hPn صورت گرفته و در مرحله بعد کمپلکس پایدار و غیرفعال  $\alpha_2$ -AP-hPn تشکیل می‌شود که به صورت رقابتی از اتصال فیبرین به hPg جلوگیری می‌کند و به سرعت hPn را غیرفعال می‌کند<sup>[7]</sup>. ساختار  $\alpha_2$ -AP به دلیل عملکرد مهم آن میان گونه‌های مختلف پستانداران بسیار حفاظت شده است و نقص در عملکرد این مهارکننده سبب بروز بیماری‌های هموراژیک می‌شود<sup>[8]</sup>.

فعال‌کننده‌های hPg متعددی به عنوان داروهای ترمبولیتیک شناسایی و تایید شده‌اند که از میان آنها استرپتوکیناز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با وجود آن که داروهای ترمبولیتیک دیگر مانند فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن (tPA) و مشتقات آن به عنوان نسل دوم و سوم داروهای ترمبولیتیک شناخته و به بازار عرضه شدند، استرپتوکیناز به دلیل صرفه اقتصادی، کارایی و سهولت استفاده، همچنان به عنوان پرکاربردترین داروی ترمبولیتیک در درمان اختلالات انسدادی عروق به خصوص در کشورهای درحال توسعه محسوب می‌شود<sup>[3, 6, 9, 10]</sup>.

استرپتوکیناز آنزیم ترشحی باکتری‌های استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A، C و G است. در سال ۱۹۴۵، کریستنسن *S. equisimilis* H46A متعلق به گروه C (GCS) را به عنوان سویه تجاری تولیدکننده مقادیر بالای استرپتوکیناز معرفی نمود. امروزه از سویه تجاری دیگری با نام *S. equisimilis* (ATCC9542) متعلق به گروه C (GCS) به عنوان سویه استاندارد برای تولید داروی استرپتوکیناز استفاده می‌شود<sup>[11]</sup>.

مولکول استرپتوکیناز دارای ۴۱۴ آمینواسید و سه دمین ساختاری  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  است که به ترتیب شامل آمینواسیدهای ۱-۱۴۶، ۱۴۷-۲۹۰ و ۲۹۱-۴۱۴ است<sup>[11]</sup>. مطالعات فراوانی به منظور شناسایی نقش دقیق دومین‌های استرپتوکیناز در عملکرد آن صورت گرفته است که در مجموع نشان‌دهنده وابسته بودن فعالیت مولکول به مشارکت هر سه دومین و فعالیت همپوشان آنها است<sup>[11]</sup>، اما تاکید بیشتر بر نقش اصلی دومین بتا در تفاوت‌های عملکردی واریانتهای استرپتوکیناز است<sup>[12]</sup>. با این وجود در مورد مقاومت به اثر مهارکننده  $\alpha_2$ -AP، مطالعات مربوط به موتانت‌های فاقد دومین آلفا (SK (Val143-Lys293) و SK (Val143-Lys386) و نیز موتانت‌های فاقد ۵۹ آمینواسید انتهای آمین، نشان می‌دهد که احتمالاً دومین آلفا در ایجاد این مقاومت نقش دارد<sup>[13]</sup>.

ژن‌های *sk* جدا شده از سویه‌های مختلف استرپتوکوک دارای هتروژنیسته متفاوت در دومین‌های سه‌گانه آلفا، بتا و گاما هستند و بخش اعظم این هتروژنیسته در دو ناحیه متغیر V1 (اسیدهای آمینه ۲۱۸-۱۴۷) و V2 (اسیدهای آمینه ۲۶۴-۲۴۴) در دومین بتا واقع شده است<sup>[14]</sup>. مطالعات فیلوژنی انجام شده روی ۸۰ سویه استرپتوکوک، براساس تفاوت‌های نوکلئوتیدی ناحیه بسیار متغیر V1، دو کلاستر اصلی ۱ و ۲ (SK1، SK2) و دو ساب کلاستر (SK2a، SK2b) معرفی شدند<sup>[15, 16]</sup>. تحقیقات نشان دادند در حالی که ساختار ثانوی واریانتهای SK1 و SK2 مشابه است اما خصوصیات عملکردی متفاوتی دارند بدین معنی که واریانتهای SK1 قادر هستند تا هر دو نوع hPg موجود در محیط (به صورت محلول یا متصل به فیبرینوژن) را فعال کنند و دارای قدرت اتصال

کره جنوبی) استفاده شد.

به‌منظور ساخت سازه pET26b-SKG88 ابتدا ژنوم سویه G88 استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با به‌کارگیری پرایمر رفت 5'-

GACGAGACATATGATTGCTGGACCTGAGTG-3' و برگشت-5' پرایمر

GACACTCGAGTTTGTCTAGGGTTATCAG-3'

XhoI-skr: صورت گرفت. در مرحله آغازین، واسرشت‌سازی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C صورت گرفت. به‌دنبال آن مرحله تکثیر در ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل یک دقیقه واسرشت‌سازی در دمای ۹۵°C، یک دقیقه جفت‌شدن در دمای ۵۶°C و ۳ دقیقه تکثیر در دمای ۷۲°C بود. تکثیر نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C صورت گرفت. برای ساخت سازه pET26b-SKALAB49 از ژن skALAB49 کلون‌شده در وکتور pHSg (pHSg-SKALAB49) دریافت‌شده به‌عنوان هدیه از طرف دکتر مک‌آرتور (موسسه تحقیقات پزشکی و سلامت Illawarra، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه ولونگونگ، ولونگونگ، استرالیا) به‌عنوان الگو برای PCR و از همان پرایمرها و برنامه ذکرشده استفاده شد. محصول PCR تخلیص و پس از تعیین غلظت، با آنزیم‌های محدودگر NdeI و XhoI هضم و در جایگاه‌های آنزیمی وکتور pET26b کلون شد. عمل اتصال ژن‌ها در این پلاسمید با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4، و در دمای محیط به‌مدت یک شبانه‌روز صورت گرفت. کلیه مراحل کلونینگ به‌طور خلاصه در شکل ۱ ذکر شده است.

برای تبادل دومین آلفا و ساخت مولکول کایمر SKch حاوی دومین آلفا متعلق به SKG88 و دومین بتا و گامای متعلق به SKALAB49، از آنزیم‌های محدودگر BstEII و XhoI که به‌ترتیب نوکلئوتیدهای ۳۷۵ تا ۱۲۵۱ (۳۷۵-۱۲۵۱) را هضم می‌کنند، استفاده شد (شکل ۲). سپس برای ساخت دومین بتا و گامای SKALAB49، PCR از الگوی pET26b-SKALAB49 با به‌کارگیری پرایمر رفت 5'-BstEII-skβf:5'-3'-AAAGATGATTCGGTAACCTTGC-3' و پرایمر برگشت XhoI-skr انجام شد. در مرحله آغازین، واسرشت‌سازی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C صورت گرفت. به‌دنبال آن مرحله تکثیر در ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل ۹۵°C به‌مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، ۶۵°C به‌مدت ۳۰ ثانیه برای جفت‌شدن و ۷۲°C به‌مدت ۱/۴۵ دقیقه برای تکثیر بود. نهایتاً تکثیر نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C صورت گرفت. محصول PCR که حاوی دومین بتا و گامای SKALAB49 است پس از تخلیص و هضم با آنزیم‌های محدودگر BstEII و XhoI در سازه pET26b-G88 برش‌خورده با همان آنزیم‌ها، جای گرفت. به‌منظور اطمینان از صحت جابه‌جایی دومین، از آنزیم PsiI که دارای محل برش در skG88 اما فاقد این جایگاه در SKALAB49 است، استفاده شد (شکل ۲).

باکتری‌های مستعد *E. coli* DH5α توسط پلاسمیدهای نوترکیب pET26b-SK با روش شوک حرارتی ترانسفورم شدند. پس از تایید کلون‌ها با روش کلونی PCR، پلاسمیدها استخراج و با روش هضم آنزیمی و سپس توالی‌یابی ارزیابی شدند. کلیه مراحل تخلیص و کلونینگ با روش‌های استاندارد انجام شدند [20] و در استفاده از کیت‌های تجاری دستورالعمل شرکت سازنده اعمال شد.

بیان سازه‌های نوترکیب استرپتوکیناز در سلول‌های *E. coli* Rosetta و بهینه‌سازی بیان به‌منظور بیان، پلاسمید نوترکیب

و قابلیت فعال‌سازی hPg به‌مراتب قوی‌تر در مقایسه با واریانت‌های SK2b هستند، در حالی که واریانت‌های SK2b تنها قادر به فعال‌کردن hPg باندشده به فیبرینوژن هستند به بیان دیگر به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند [16]. همچنین گزارش شده است که فعالیت آنزیمی استرپتوکینازهای کلاستر SK2a احتمالاً مقاومت بیشتری به مهار توسط α2-AP نسبت به استرپتوکینازهای دسته‌بندی‌شده در گروه‌های SK1 و SK2b نشان می‌دهند [17]. غیرفعال‌شدن در برابر مهارکننده α2-AP از محدودیت‌های داروهای ترومبولیتیک محسوب می‌شود که سبب نیمه‌عمر کوتاه اثربخشی دارو می‌شود [6]. بنابراین بررسی نقش احتمالی دومین آلفا در مقاومت به مهار توسط α2-AP در استرپتوکیناز مربوط به گروه‌های مختلف استرپتوکوک می‌تواند اطلاعات مفیدی برای ایجاد یک داروی موثرتر فیبرینولیتیک را فراهم نماید.

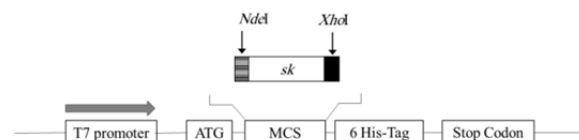
در مطالعه حاضر با هدف بررسی و تایید نقش احتمالی دومین آلفا در مقاومت به مهار توسط α2-AP در استرپتوکیناز مربوط به گروه‌های مختلف استرپتوکوک، در میان ۷۵ سویه استرپتوکوک بتاهمولیتیک جمع‌آوری‌شده از نقاط مختلف ایران [18]، دو سویه G88 و ALAB49 به‌ترتیب متعلق به گروه G و A، و هر دو سویه متعلق به کلاستر SK2 اما دو ساب‌کلاستر متفاوت به‌ترتیب 2a و 2b، برای تبادل دومین آلفا انتخاب شدند [19]. به‌منظور شناسایی دومین تعیین‌کننده مقاومت به مهارکننده، تبادل دومین آلفا بین دو ژن استرپتوکیناز SK2aG88 و SK2bALAB49 صورت گرفت و استرپتوکیناز کایمری با دومین آلفای SK2aG88 و دومین بتا و گامای SK2bALAB49 (α2aG88β2bALABγ2bALAB) SKch ساخته شد. در صورتی که کایمر حاصل ویژگی مقاومت به مهارکننده را از کلاستر 2a به ارث ببرد می‌توان دومین آلفا را مسئول این ویژگی دانست. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر دومین آلفا در مقاومت به مهارکننده α2-AP بود که برای اولین بار بنا به اطلاع ما با تبادل دومین آلفا در دو سویه متعلق به دو گروه متفاوت استرپتوکوک صورت می‌گیرد و می‌تواند گامی در جهت بهینه‌سازی خصوصیات استرپتوکیناز به‌عنوان یک داروی ترومبولیتیک باشد.

## مواد و روش‌ها

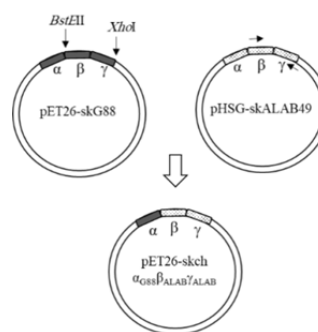
در مطالعه تجربی حاضر انتخاب سویه‌های مناسب برای تبادل دومین سویه‌های SK2aG88 و SK2bALAB49 (شماره‌های دسترسی: AY234134، HM390000.1) که به‌ترتیب متعلق به کلاستر SK2a و SK2b هستند، برای تبادل دومین انتخاب شدند. توالی نوکلئوتیدی ژن sk سویه‌های مذکور و اطلاعات مربوط به کلاسترها توسط کرمتی [18، 19] و کالی [15] شناسایی شده‌اند.

**کلونینگ و ساخت سازه‌های اولیه و کایمر:** برای کلونینگ و بیان به‌ترتیب از سویه‌های *E. coli* DH5α (نواژن، ایالات متحده آمریکا) و *E. coli* Rosetta (نواژن؛ ایالات متحده آمریکا) و وکتور pET26b (نواژن؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. کلیه آنزیم‌های مورد استفاده در کلونینگ، محصول کمپانی فرمنتاز (کانادا) و مواد شیمیایی به‌کاررفته از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. به‌منظور استخراج DNA ژنومیک، تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تخلیص DNA از ژل آگاروز از کیت‌های شرکت روچ و برای تخلیص پلاسمید از باکتری، از کیت استخراج AccuPrep® Plasmid Mini (بیونیر؛

SK-pET26b به سلول‌های *E. coli* Rosetta ژن مقاومت کلرامفنیکل ترانسفورم شد. بهینه‌سازی شرایط بیان به طرق متفاوت از جمله محیط کشت TY2X، غلظت‌های متفاوت (۰/۵ تا یک میلی‌مولار) IPTG و همچنین انکوباسیون در بازه‌های زمانی مختلف پس از القا با IPTG (۳ تا ۲۰ ساعت) انجام شد. بیان پروتئین‌های استرپتوکیناز ابتدا در مقیاس اندک و در حجم ۵ میلی‌لیتری انجام و تایید شد و در مرحله بعدی بیان پروتئین‌ها در حجم ۵۰ میلی‌لیتری صورت گرفت.



**شکل ۱)** مراحل کلونینگ دو ژن استرپتوکیناز اولیه (*g88* و *alab49*) درون وکتور pET26b: ژن استرپتوکیناز پس از تکثیر، با آنزیم‌های محدودگر NdeI و XhoI هضم و درون وکتور pET26b هضم شده با آنزیم‌های مذکور، جای می‌گیرد. ATG: کدون آغازین متعلق به وکتور، MCS: محل اثر آنزیم‌های محدودگر، 6His-tag: دنباله هیستیدینی



**شکل ۲)** ساخت استرپتوکیناز کایمر (pET26b-SKch) از دو ژن استرپتوکیناز اولیه (*g88* و *alab49*): آنزیم‌های محدودگر BstEII و XhoI به ترتیب نوکلئوتیدهای ۳۷۵ تا ۱۲۵۱ (دومین بتا و گاما) *skβ* G88 را برش داده و خارج می‌سازند. سپس محصول PCR (حاصل از تکثیر دومین بتا و گاما) *skβ* *ALAB49* درون سازه pET26b-SK88 برش‌خورده جای می‌گیرد. برای تایید تبادل صحیح دومین از آنزیم PsiI استفاده شد که جایگاه برش در دومین بتای *skG88* دارد اما فاقد این جایگاه در دومین بتا *skALAB49* است (مراجعه به شکل ۴).

**ارزیابی پروتئین به روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ:** بیان پروتئین‌های نوترکیب با روش SDS-PAGE ۱۲٪ و رنگ آمیزی کوماسی بلو ارزیابی و سپس با وسترن بلات با روش‌های استاندارد تایید شد [20]. به منظور انجام وسترن بلاتینگ، باندها به کاغذ نیتروسلولز (بیورد؛ ایالات متحده آمریکا) منتقل و با ۵٪ BSA بلاک شدند. از آنتی‌بادی مونوکلونال آنتی-هیستیدین موش (کیاژن؛ ایالات متحده آمریکا) به عنوان آنتی‌بادی اولیه و از آنتی‌بادی بز صدموشی کونجوگه به هورس‌ریش (کیاژن؛ ایالات متحده آمریکا) به عنوان آنتی‌بادی ثانویه و به منظور آشکارسازی باندهای پروتئینی نیز از ۳-دی‌آمینوبنزیلیدین (DAB؛ سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد.

**تخلیص پروتئین مورد نظر با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی:** به منظور تخلیص پروتئین‌ها از روش کروماتوگرافی تمایلی و کیت Ni-NTA (کیاژن؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد [21]. پروتئین‌های تخلیص شده دارای دنباله شش آمینواسیدی هیستیدین در انتهای کربوکسیل هستند که به نیتریلوتری‌استیک اسید متصل به  $Ni^{2+}$  تمایل داشته و با آن

واکنش می‌دهند. برای تخلیص پروتئین از دو روش دنا توره با حضور اوره ۶ مولار و نیز روش طبیعی استفاده شد. به دنبال روش دنا توره پروتئین‌ها از طریق دیالیز رفولد شدند. هر دو روش کارایی بالایی داشتند اما به منظور حفظ ساختار آنزیمی پروتئین‌های نوترکیب روش طبیعی برای تخلیص استفاده شد. در انتها پس از اطمینان از خلوص نمونه‌های تخلیص شده با استفاده از SDS-PAGE، پروتئین‌ها به روش برادفورد تعیین غلظت شدند [20].

**ارزیابی فعالیت آنزیمی پروتئین‌های استرپتوکیناز تخلیص شده به روش کروموتیک:** به منظور ارزیابی فعالیت آنزیمی از روش کروموتیک استفاده شد که روش تایید شده بررسی فعالیت آنزیمی داروهای فیبرینولیتیک است. در این روش پپتید سنتتیک (H-D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroaniline) S2251 به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. میزان جذب ناشی از تجزیه سوبسترا ناشی از فعالیت پروتئولیتیک استرپتوکیناز متناسب با توانایی تشکیل کمپلکس فعال SK-hPg یا ایجاد hPn است [22]. پروتئین‌های تخلیص شده (۱۰۰ نانومولار) SK به پلیت‌های حاوی (یک میلی‌مولار؛ سیگما) S2251 و (یک میکرومولار؛ سیگما) پلاسمینوژن در ۱۰۰ میکرولیتر بافر واکنش (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، با pH برابر ۷/۴) منتقل شد. سپس جذب نمونه‌ها در بازه‌های زمانی ۵ دقیقه، به مدت ۶۰ دقیقه، در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر مدل Biohit UV-160 (BioHIT؛ انگلستان) خوانده شد. واکنش‌ها به صورت سه‌بار تکرار انجام شدند. فعالیت بیولوژیک (واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) و سپس فعالیت اختصاصی واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم پروتئین‌های تخلیص شده با رسم منحنی استاندارد به دست آمده از رقت‌های متوالی استاندارد Streptase® (Behring:CSL)؛ آلمان) و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad 6 محاسبه شد [23].

**بررسی اثر مهار آ $\alpha$ 2-AP بر فعالیت آنزیمی استرپتوکیناز:** کمپلکس (۴۰۰ نانومولار SK، ۲۰۰ نانومولار hPn) SK-hPn به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس کمپلکس تشکیل شده تا رقت ۲۰ نانومولار به بافر واکنش حاوی (۴۰۰-۱۰۰ نانومولار)  $\alpha$ 2-AP افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس S2251 (۵۰۰ میکرومولار) به مخلوط واکنش اضافه و فعالیت آنزیمی با خوانش جذب در ۴۰۵ نانومتر در دمای ۳۷°C هر ۵ دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه سنجش شد [17].

**آنالیزهای آماری:** برای ارزیابی و مقایسه فعالیت استرپتوکینازهای نوترکیب در حضور و عدم حضور مهارکننده از آزمون t-استیودنت به صورت غیرجفت و نرم‌افزار GraphPad 6 استفاده شد.

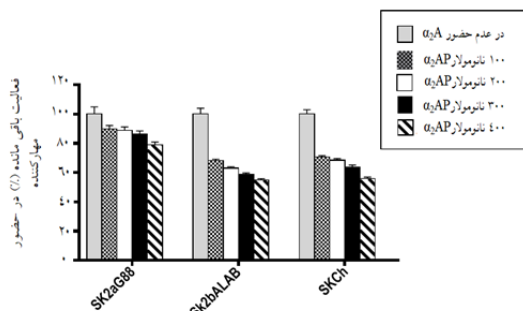
## یافته‌ها

**ساخت سازه‌های اولیه و کایمر:** PCR روی الگوی DNA ژنومیک G88 و سازه pHSG-ALAB49 انجام شد (شکل ۳- الف). محصول PCR با آنزیم‌های NdeI و XhoI هضم و در وکتور pET26b در جایگاه‌های آنزیمی مربوطه کلون شد. برای ساخت pET26b-SKch، PCR دومین بتا و گاما pET26b-SKch صورت گرفت و محصول PCR پس از هضم با آنزیم‌های محدودگر BstEII و XhoI در وکتور متناظر pET26b-SK88 برش‌خورده جای گرفت (شکل ۳- ب). پس از ترانسفورم محصول لیگاسیون به باکتری مستعد *E. coli* DH5 $\alpha$ ، کلون‌های رشد یافته روی محیط کشت آگار LB حاوی کانامایسین که با آزمایش کلونی PCR (شکل ۴- الف) با به کارگیری پرایمرهای *skβ*



**بیان پروتئین‌های استرپتوکیناز:** پلاسمیدهای نوترکیب-pET26b SK درون سلول‌های *E. coli* BL21 که میزبان معمول برای سیستم pET26b است، ترانسفورم شدند. از آنجایی که میزان بیان به‌دست‌آمده در باکتری *E. coli* BL21 پس از القا با IPTG بالا نبود، از میزبان *E. coli* Rosetta (DE3) استفاده شد و بیان پروتئین‌های نوترکیب در این میزبان مورد بررسی قرار گرفت. بیان پروتئین‌های اولیه و کایمر با روش SDS-PAGE و سپس وسترن‌بلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست‌آمده هر سه پروتئین نوترکیب اولیه و کایمر در وکتور pET26b مربوطه با وزن مولکولی ۷۴ کیلودالتون را نشان دادند که بیانگر صحت بیان پروتئین‌ها بود (شکل ۵- الف و د). علاوه بر آن، بررسی‌های انجام‌شده نشان داد، بهترین بیان در جذب نوری ۰/۷ و غلظت بهینه IPTG برای القای بیان یک‌میلی‌مولار است. پس از تایید بیان، پروتئین‌ها در مقیاس بالا (۵۰ میلی‌لیتر) با به‌کارگیری Ni-NTA تخلیص (شکل ۵- ج) و با روش برادفورد تعیین غلظت شدند. کارایی بیان سازه‌های SKALAB49، SKG88 و SKch به‌ترتیب ۱/۸، ۰/۴۵ و ۰/۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۵).

**ارزیابی فعالیت آنزیمی:** منحنی استاندارد براساس غلظت‌های مختلف استاندارد و با محاسبه میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر در مقابل زمان رسم شد (نمودار ۱) و براساس آن فعالیت اختصاصی پروتئین‌های نوترکیب محاسبه شد. در حالی که فعالیت فیبرینولیتیک استرپتوکینازهای اولیه SKG88 و SKALAB49، به ترتیب ۷۶/۸۲ و ۲۶/۵۹ واحد در میکروگرم است، فعالیت کایمر SKch ۱۷۷/۰۱ واحد در میکروگرم به دست آمد که نسبت به SKALAB49 تا حدود ۷ برابر افزایش و نسبت به SKG88 تا ۷۷% کاهش یافته است. نمودار ۲ بیانگر کاهش نسبی فعالیت فیبرینولیتیک استرپتوکینازهای بیان شده از سه سازه ساخته شده در حضور غلظت‌های متفاوت مهارکننده  $\alpha_2$ -AP، است. براساس این نتایج، در حضور غلظت کم مهارکننده (۱۰۰ نانومولار) فعالیت SK2aG88 ناچیز و حدود ۱۰% کاهش یافت، در حالی که کاهش فعالیت دو مولکول دیگر بیشتر و تا ۳۰% گزارش شد. در حضور بالاترین غلظت (۴۰۰ نانومولار)  $\alpha_2$ -AP نیز کاهش فعالیت SKch و SK2bALAB49 تقریباً مشابه و تا حدود ۵۵% فعالیت در عدم حضور مهارکننده گزارش شد در حالی که این کاهش فعالیت در مورد SK2aG88 کمتر و تا ۸۰% فعالیت در عدم حضور



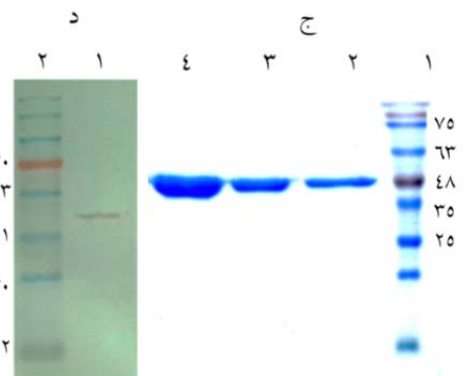
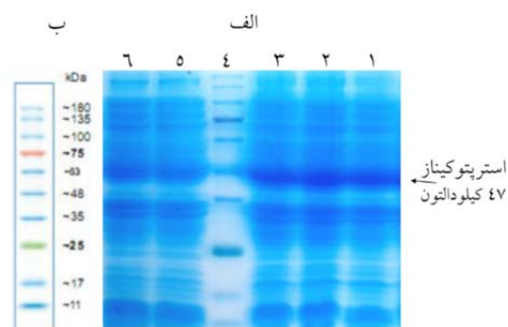
**نمودار ۲)** کاهش فعالیت فیبرینولیتیک مولکول‌های استرپتوکیناز در حضور مهارکننده α2-AP: هیستوگرام درصد باقی‌مانده فعالیت هر یک از مولکول‌های استرپتوکیناز را در حضور غلظت‌های ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومولار α2-AP نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ).

### بحث

در مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش احتمالی دومین آلفا در مقاومت به مهار توسط α2-AP در استرپتوکیناز مربوط به گروه‌های مختلف استرپتوکوک، دو سویه G88 متعلق به گروه G و ساب‌کلاستر 2b و ساب‌کلاستر 2a و ALAB49 متعلق به گروه A و ساب‌کلاستر 2b برای تبادل دومین آلفا انتخاب شدند. نتایج چگونگی فعالیت استرپتوکیناز در حضور غلظت‌های متفاوت مهارکننده نشان داد که هر دو مولکول اولیه و نیز کایمر حاصل متعلق به کلاستر 2b که دارای دومین آلفای 2a و بتا و گامای 2b بود، نسبت به مهارکننده مقاومت نسبی نشان دادند. الگوی کاهش فعالیت مولکول کایمر در حضور غلظت‌های متفاوت مهارکننده مشابه با مولکول اولیه SK2bALAB49 گزارش شد که دال بر بی‌اثربودن جابه‌جایی دومین آلفا است. همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، به‌منظور تبادل دومین آلفا، از دو سویه متعلق به کلاستر 2a و کلاستر 2b استفاده شد. سویه ALAB49 تنها سویه متعلق به کلاستر 2b بود که ژن *sk* آن به‌صورت کلون‌شده در وکتور pHSG در دسترس بود. پروتئین نوترکیب SKALAB49 دارای فعالیت بسیار اندک (۷۶/۵۹ واحد در میکروگرم) است و برخلاف آن SKG88 متعلق به کلاستر 2a، از سویه‌های بومی ایران است که فعالیت فیبرینولیتیک بسیار بالایی دارد. فعالیت فیبرینولیتیک SKG88، ۷۶۰/۸۲ واحد در میکروگرم و حدود ۳۰ برابر فعالیت فیبرینولیتیک SKALAB49 است. این فعالیت بالا به جهش‌هایی نسبت داده می‌شود که در سراسر ژن *sk* پراکنده شده‌اند [19].

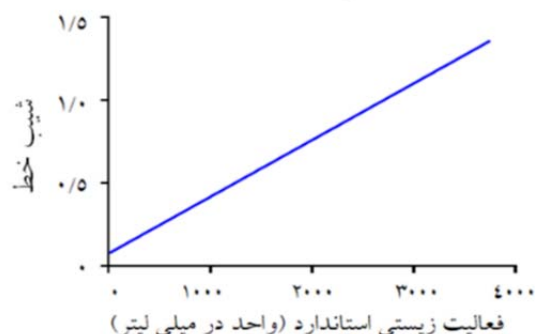
همان‌طور که تصویر ۵ (الف، ج و د) نشان می‌دهد پروتئین‌های استخراج‌شده باند ۴۷ کیلودالتون مربوط استرپتوکیناز با طول کامل را نشان دادند [19] و باند ناخالصی قابل مشاهده با چشم میان پروتئین‌های تخلیص‌شده، دیده نشد (نمودار ۱-ج).

برای ارزیابی فعالیت فیبرینولیتیک استرپتوکیناز از روش کمی کروموزنیک استفاده شد [24, 25]. روش کروموزنیک روش تاییدشده و استاندارد برای سنجش فعالیت فیبرینولیتیک است. طبق فارماکوپه اروپا روش کروموزنیک در عدم حضور فیبرین انجام می‌شود در حالی که موسسه ملی کنترل و استاندارد زیستی (NIBSC) پیشنهاد کرده است که ارزیابی فعالیت در هر دو شرایط حضور و عدم حضور فیبرین لازم است صورت گیرد [24]. در این مطالعه روش کروموزنیک در عدم حضور فیبرینونژن صورت گرفت. علاوه بر روش کروموزنیک از سایر روش‌ها مانند روش کازینولیتیک و حل لخته که عمدتاً بیانگر نتایج به‌صورت کیفی هستند، برای بررسی فعالیت فیبرینولیتیک استفاده می‌شود [25, 26].



**شکل ۵)** آنالیز بیان و استخراج پروتئین‌های استرپتوکیناز به روش SDS-PAGE و وسترن‌بلاتینگ. (الف) SDS-PAGE ۱۲٪، آنالیز عصاره پروتئینی استخراج‌شده از سلول‌های *E. coli* Rosetta حاوی پلاسمیدهای نوترکیب قبل و بعد از القا با IPTG، ستون ۱ تا ۳: عصاره سلولی پروتئین استخراج‌شده به‌ترتیب از سلول‌های حاوی pET26b-SKG88، pET26b-ALAB49 و pET26b-SKCh القاشده با یک میلی‌مولار IPTG. فلش باند پروتئینی استرپتوکیناز را که ۴۷ کیلودالتون وزن دارد نشان می‌دهند. ستون ۴: پروتئین مارکر، ستون‌های ۵ و ۶: عصاره پروتئینی استخراج‌شده از سلول‌های حاوی pET26b-SKG88 و pET26b-ALAB49 قبل از القا. (ب) پروتئین مارکر ۱۰ تا ۱۷۰ کیلوپازی SM7012 (سیناژن: ایران) به‌کاررفته در ژل شکل الف. (ج) SDS-PAGE ۱۲٪، ستون ۱: پروتئین مارکر ۱۰ تا ۱۷۰ کیلوپازی SM7012 (سیناژن: ایران)، ستون ۲ تا ۴: پروتئین تخلیص‌شده SKG88، SKALAB49 و SKCh به روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون‌های حاوی بیدهای نیکل (NTA-NI). (د) آنالیز وسترن‌بلات پروتئین SKG88، ستون ۱: عصاره لیز سلولی حاوی SKG88 پس از القا با IPTG، ستون ۲: پروتئین مارکر، (نتایج وسترن‌بلات برای دو سازه دیگر دقیقاً مشابه بودند که به‌دلیل محدودیت فضا نشان داده نشده‌اند).

### منحنی استاندارد



**نمودار ۱)** منحنی استاندارد فعالیت استرپتوکیناز: شیب نمودارهای حاصل از جذب رقت‌های متوالی استاندارد Streptase® (Behring:CSL؛ آلمان) با فعالیت زیستی مشخص در ۴۰۰ نانومتر به دست آمده و سپس منحنی استاندارد براساس میزان شیب خط هر یک از استانداردها با فعالیت زیستی مشخص با استفاده از نرم‌افزار GraphPad6 رسم شد. براساس این منحنی استاندارد میزان فعالیت سایر استرپتوکینازهای نوترکیب محاسبه شدند [23].

مهارکننده هستند که این مناطق در هر سه مولکول مورد مطالعه در این تحقیق بدون تغییر مانده است. بررسی این آمینواسیدها می‌تواند گام دیگری در جهت تکمیل مطالعه قلمداد شود. از طرفی مطالعات فراوان نشان داده‌اند دومین‌های استرپتوکوکاز نقش‌های همپوشان دارند. در یکی از مطالعات اخیر اشاره شد کایمر SKβswap، دارای دومین بتای استرپتوکوکوس /وبریس (*Streptococcus uberis*) که فاقد توانایی فعال‌سازی hPg است، نسبت به مهارکننده مقاومت کمتری نشان داده است و نقش دومین بتا را در میان‌کنش با مهارکنندگان مطرح می‌سازد [30]. شاید بتوان این‌طور تصور کرد که میان‌کنش با مهارکننده، حاصل فعالیت همپوشان هر دو دومین آلفا و بتا است که به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر با توجه به یافته‌های پیشین مبتنی بر اهمیت دومین آلفا در بروز مقاومت نسبت به مهارکننده  $\alpha_2$ -AP، تنها دومین آلفا میان سویه‌های والدی جابه‌جا شد. پیشنهاد می‌شود با توجه به اهمیت کمتر دومین آلفا نسبت به سایر دومین‌های استرپتوکوکاز (بتا و گاما) در بروز مقاومت به مهارکننده  $\alpha_2$ -AP، جابه‌جایی دومین بتا نیز میان سویه‌های والدی انجام شود. بدین‌منظور می‌توان از تعداد بیشتری از سویه‌های والدی متعلق به گروه‌های متفاوت استرپتوکوک استفاده کرد.

### نتیجه‌گیری

به‌منظور بهینه‌سازی داروی استرپتوکوکاز، شناخت نقش دومین‌های آن در بروز ویژگی‌های کلیدی از جمله مقاومت به مهارکننده که سبب افزایش پایداری آن می‌شود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به مشابه بودن الگوی کاهش فعالیت مولکول کایمر در مقایسه با مولکول اولیه دهنده دومین بتا و گاما، به نظر می‌رسد که دومین آلفا تأثیر چندانی در بروز مقاومت به مهارکننده نداشته باشد و دومین یا آمینواسیدهای دیگری در بروز این ویژگی موثر باشند که نیاز به مطالعه بیشتر و به‌کارگیری تعداد بیشتر و متنوع‌تری از مولکول‌های اولیه در این مورد است.

**تشکر و قدردانی:** مقاله پژوهشی حاضر حاصل از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع دکتری است. از مسئولین آزمایشگاه میکروپزشناسی و ویروس‌شناسی انستیتو پاستور ایران که در فراهم کردن شرایط لازم برای انجام این کار ما را حمایت کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** مریم رفیع‌پور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ ملیحه کرامتی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ محمدمهدی اصلانی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۰٪)؛ آرش آرش‌کیا (نویسنده چهارم)، روش‌شناس (۱۰٪)؛ فرزین روحوند (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪) **منابع مالی:** این تحقیق با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران در قالب پایان‌نامه دکتری انجام گرفته است.

### منابع

1- Lal V. Fibrinolytic drug therapy in the management of

همان‌طور که نمودار ۲ نشان می‌دهد برای بررسی اثر مهار  $\alpha_2$ -AP از چهار رقت متفاوت از ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومولار مهارکننده استفاده شد تا هرگونه اثر بازدارندگی آشکار شود. از طرفی به‌منظور مقایسه، کاهش فعالیت در حضور مهارکننده  $\alpha_2$ -AP به‌صورت درصدی از فعالیت در حالت کنترل، عدم حضور مهارکننده نشان داده شده است. در حضور بالاترین غلظت (۴۰۰ نانومولار)  $\alpha_2$ -AP، SK2bALAB49 و SKch، ۵۵٪ فعالیت خود را حفظ کردند، در حالی که SK2aG88 تا ۸۰٪ فعالیت نشان داد ( $p < 0.05$ ). بنابراین نتایج دال بر مقاومت نسبی بیشتر کلاستر 2a نسبت به کلاستر 2b در برابر غلظت‌های بالاتر مهارکننده است. از این‌رو، موافق با مطالعات گذشته هر سه مولکول استرپتوکوکاز بدون توجه به نوع کلاستر، نسبت به مهارکننده مقاومت نسبی نشان داده و بیش از نیمی از فعالیت فیبرینولیتیک خود را حتی در حضور غلظت بالای مهارکننده حفظ کردند. براساس گزارشات پیشین، در حالی که داروهای ترمبولیتیک از جمله tPA که بزرگ‌ترین رقیب استرپتوکوکاز است، نسبت به این مهارکننده حساس است، استرپتوکوکاز همواره نسبت به آن بیشتر مقاوم بوده و میان‌کنش میان hPn و مهارکننده را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد. نکته جالب توجه آن که گزارشات پیشین مبتنی بر مقاومت استرپتوکوکاز، براساس مطالعاتی است که در مورد سویه استاندارد ۹۵۴۲ متعلق به کلاستر 2a و گروه C، صورت گرفته است و با وجود هتروژنیته بالای ژن استرپتوکوکاز این ویژگی بدون در نظر گرفتن گروه یا کلاستر خاص، به‌طور عمومی به استرپتوکوکاز تعمیم داده شده است [27, 28]. در مطالعه‌ای که اخیراً به‌دنبال کلاستربندی و مطالعه خصوصیات کلاسترهای استرپتوکوکاز انجام شد این‌طور ادعا شده است که مغایر با مطالعات پیشین، کلاستر 2a نسبت به این مهارکننده مقاوم‌تر است و کلاستر 1 و 2b نسبت به آن حساس هستند [17]. شایان ذکر است مطالعات گذشته تنها روی استرپتوکوکاز کلاسترهای مختلف گروه A انجام شد و هیچ‌گاه از گروه‌های C یا G به این منظور استفاده نشده است. نتایج ما نشان داد که هر دو مولکول اولیه متعلق به دو ساب‌کلاستر متفاوت 2a و 2b و نیز کایمر حاصل متعلق به کلاستر 2b که دارای دومین آلفای 2a و بتا و گامای 2b بود، نسبت به مهارکننده مقاومت نسبی نشان دادند. گرچه همسو با مطالعه فوق، این مقاومت نسبی در مورد SK2aG88 نسبت به SK2bALAB49 بیشتر مشاهده شد. از طرف دیگر همان‌طور که نمودار ۲ نشان می‌دهد، الگوی کاهش فعالیت مولکول کایمر در حضور غلظت‌های متفاوت مهارکننده مشابه با الگوی مولکول اولیه SK2bALAB49 است که دال بر بی‌اثر بودن جابه‌جایی دومین آلفا است. مطالعات پیشین مبتنی بر حساسیت موتانت‌های SK (Val143-Lys293) و SK (Val143-Lys386) که کاملاً فاقد دومین آلفا بودند و نیز موتانت‌های SK(60-414) که بخشی از دومین آلفا را از دست داده بودند نسبت به مهارکننده، حاکی از ضروری بودن وجود دومین آلفا در بروز این ویژگی است [29]. این‌طور به نظر می‌رسد که حضور این دومین در میان‌کنش با مهارکننده تعیین‌کننده است و حذف کامل و جزئی آن سبب حساسیت نسبت به آن می‌شود. از طرف دیگر به نظر می‌رسد که توالی آمینواسیدی نیز در این میان تأثیرگذار باشد. مشاهده شده است که جهش‌یافته‌های آمینواسیدهای انتهای آمین مولکول V20K، L18D، V19D، S16K، V20D، V22D و G24D نسبت به مهارکننده حساس هستند [28]. احتمالاً آمینواسیدهای خاصی در دومین آلفا مسئول میان‌کنش با

- characteristics- implications for pathogenesis. *Mol Microbiol*. 2012;86(5):1052-62.
- 18- Keramati M, Roohvand F, Aslani MM, Khatami S, Aghasadeghi M, Sadat M, et al. Screening, Cloning and Expression of Active Streptokinase from an Iranian Isolate of *S. equisimilis* Group C in *E. coli*. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(4):620-7.
  - 19- Keramati M, Aslani MM, Khatami S, Roohvand F. Sequence and kinetic analyses of streptokinase from two group G streptococci with high fibrin-dependent plasminogen activities and the identification of novel altered amino acids as potential hot spots. *Biotechnol Lett*. 2017;39(6):889-95.
  - 20- Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. New York: CSHL Press; 2006.
  - 21- 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.
  - 22- Wohl RC, Summaria L, Robbins K. Kinetics of activation of human plasminogen by different activator species at pH 7.4 and 37 degrees C. *J Biol Chem*. 1980;255(5):2005-13.
  - 23- Chaudhary A, Vasudha S, Rajagopal K, Komath SS, Garg N, Yadav M, et al. Function of the central domain of streptokinase in substrate plasminogen docking and processing revealed by site-directed mutagenesis. *Protein Sci*. 1999;8(12):2791-2805.
  - 24- Sands D, Whitton CM, Longstaff C. International collaborative study to establish the 3rd international standard for streptokinase. *J Thromb Haemost*. 2004;2(8):1411-5.
  - 25- Mahboubi A, Sadjady SK, Mirzaei Saleh Abadi M, Azadi S, Solaimanian R. Biological activity analysis of native and recombinant streptokinase using clot lysis and chromogenic substrate assay. *Iran J Pharm Res*. 2012;11(4):1087-93.
  - 26- Hawkey CM, Stafford JL. A standard clot method for the assay of plasminogen activators, anti-activators, and plasmin. *J Clin Pathol*. 1964;17(2):175-81.
  - 27- Cederholm-Williams SA, De Cock F, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin and  $\alpha$ 2-antiplasmin. *Eur J Biochem*. 1979;100(1):125-32.
  - 28- Mundada LV, Prorok M, DeFord ME, Figuera M, Castellino FJ, Fay WP. Structure-function analysis of the streptokinase amino terminus (residues 1-59). *J Biol Chem*. 2003;278(27):24421-7.
  - 29- Rodríguez P, Fuentes P, Barro M, Alvarez JG, Muñoz E, Collen D, Lijnen HR. Structural domains of streptokinase involved in the interaction with plasminogen. *Eur J Biochem*. 1995;229(1):83-90.
  - 30- Gladysheva IP, Sazonova IY, Chowdhry SA, Liu L, Turner RB, Reed GL. Chimerism reveals a role for the streptokinase  $\beta$ -domain in nonproteolytic active site formation, substrate, and inhibitor interactions. *J Biol Chem*. 2002;277(30):26846-51.
- intravascular thrombosis, especially acute myocardial infarction-A review. *J Pharmacol Clin Res*. 2017;2(4):555593.
- 2- Mohseni J, Kazemi T, Maleki MH, Beydokhti H. A systematic review on the prevalence of acute myocardial infarction in Iran. *Heart Views*. 2017;18(4):125-32.
  - 3- Klegerman ME. Translational initiatives in thrombolytic therapy. *Front Med*. 2017;11(1):1-19
  - 4- Tourani S, Bashzar S, Nikfar Sh, Ravaghi H, Sadeghi M. Effectiveness of tenecteplase versus streptokinase in treatment of acute myocardial infarction: A meta-analysis. *Tehran Univ Med J*. 2018;76(6):380-7. [Persian]
  - 5- Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. 2015;29(1):17-24
  - 6- Adivitiya, Khasa YP. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions. *Bioengineered*. 2017;8(4):331-58
  - 7- Carpenter SL, Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia*. 2008;14(6):1250-4.
  - 8- Coughlin PB. Antiplasmin: The forgotten serpin?. *FEBS J*. 2005;272(19):4852-7.
  - 9- Roohvand F. Streptokinase for treatment of thrombotic disorders: The end? Or the end of the beginning? *Iran Biomed J*. 2018;22(3):140-1.
  - 10- Rezaei M, Baghbani-Arani F, Arabi Mianroodi R. Point mutation in amino acid 263 of streptokinase gene as well as cloning and expression of the cysteine containing mutated protein. *Nova Biologica Reperta*. 2016;3(3):249-57. [Persian]
  - 11- Keramati M, Arabi Mianroodi R, Memarnejadian A, Mirzaie A, Sazvari S, Mehdi Aslani M, Roohvand F. Towards a superior streptokinase for fibrinolytic therapy of vascular thrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2013; 11(3):218-29
  - 12- Zhang Y, Liang Z, Ginton K, Ploplis VA, Castellino FJ. Functional differences between *Streptococcus pyogenes* cluster 1 and cluster 2b streptokinases are determined by their  $\beta$ -domains. *FEBS Lett*. 2013;587(9):1304-9.
  - 13- Sazonova IY, McNamee RA, Houg A, King S, Hedstrom L, Reed GL. Reprogrammed streptokinases develop fibrin-targeting and dissolve blood clots with more potency than tissue plasminogen activator. *J Thromb Haemost*. 2009;7(8):1321-8
  - 14- Keramati M, Roohvand F, Eslaminejad Z, Mirzaie A, Nikbin VS, Aslani MM. PCR/RFLP-based allelic variants of streptokinase and their plasminogen activation potencies. *J FEMS Microbiol Lett*. 2012;335(2):79-85.
  - 15- Kalia A, Bessen DE. Natural selection and evolution of streptococcal virulence genes involved in tissue-specific adaptations. *J Bacterial*. 2004;186(1):110-21.
  - 16- McArthur JD, McKay FC, Ramachandran V, Shyam P, Cork AJ, Sanderson-Smith ML, et al. Allelic variants of streptokinase from *Streptococcus pyogenes* display functional differences in plasminogen activation. *FASEB J*. 2008;22(9):3146-53.
  - 17- Cook SM, Skora A, Gillen CM, Walker MJ, McArthur JD. Streptokinase variants from *Streptococcus pyogenes* isolates display altered plasminogen activation