

ارزیابی بیان نو ترکیب زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A متصل به یک پپتید نفوذ کننده به سلول

پروانه صفاریان (Msc)¹، شهین نجار پیرایه (PhD)¹، جعفر امانی (PhD)²، عباسعلی ایمانی فولادی (PhD)^{2*}

1- گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
2- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران

دریافت: 94/2/1، اصلاح: 94/5/7، پذیرش: 94/7/6

خلاصه

سابقه و هدف: توکسین بوتولینوم تیپ A امروزه به طور گسترده ای به صورت تزریقی در درمان برخی اختلالات انقباضی ماهیچه ها به کار می رود. این مطالعه به منظور تولید پروتئین نو ترکیب حاصل از اتصال کوالان زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A (BoNT/A) به پپتید TAT₍₄₇₋₅₇₎ و همچنین شرایط مناسب برای افزایش بیان و تخلیص این پروتئین انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه بنیادی توالی نوکلئوتیدی زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A و پپتید TAT از بانک ژنی به دست آمد و سازه ژنی حاوی این توالی ها طراحی و ساخته شد. پس از کلون سازی در وکتور بیانی BL21 (DE3)E. coli القای بیان با استفاده از IPTG انجام گرفت. سپس شرایط بهینه دمای و غلظت مناسب IPTG برای بیشترین میزان بیان بر اساس تفاوت در شدت رنگ میان باندهای پروتئینی ژل در SDS PAGE تعیین شد. پروتئین نو ترکیب با کمک ستون کروماتوگرافی حاوی نیکل (Ni-NTA) تخلیص شد.

یافته ها: پروتئین کایمریک حاصل در شرایط معمول بیان (1 mM IPTG و دمای 37°C) به صورت نامحلول تولید می شود. با بهینه سازی شرایط بیان (0/5 IPTG و دمای 18°C) میزان 60% از پروتئین کایمریک به صورت محلول تولید شد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه با بیان پروتئین نو ترکیب به صورت محلول پروتئین پیچش صحیح و در نتیجه فعالیت خود را به میزان زیادی حفظ کرده و نیازی به استفاده از ترکیبات دنا توره کننده برای باز کردن پیچش پروتئین و محلول سازی آن نخواهد بود.

واژه های کلیدی: زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A، پپتید نفوذ کننده به سلول، پروتئین نو ترکیب.

مقدمه

میان روش های مختلف انتقال مستقیم مولکول ها به سلول، استفاده از پپتید های انتقال دهنده به سلول، CPP (cell penetrating peptide)، از محبوبیت ویژه ای برخوردار است (12، 13). طول این پپتید ها معمولاً کمتر از 30 آمینو اسید بوده و قادر هستند ترکیبات مختلف زیستی (DNA، RNA، پپتید ها و پروتئین ها) را که با اتصال کوالان یا غیر کوالان با آنها همراه می شوند به داخل سلول های زنده هدایت کنند (14). در سال 1991، روشن شد که هموئودمین سلول های *Drosophila antennapedia* به وسیله سلول های نورونی به درون کشیده می شود. این پدیده منشأ کشف اولین CPP در سال 1994 به نام پنتراتین بود (15). در سال های اخیر یک کانجوه از سیکلوسپورین-پلی آرژینین به نام PsorBanR به عنوان یک داروی سطحی برای درمان پسوریازیس و یک کانجوه از مهار کننده پروتئین کیناز TAT-C به نام KAI-9803 برای درمان انفارکتوس قلبی حاد طراحی شده اند (16). پپتید TAT (اسید آمینه های 47-57) یکی از انواع CPP است (15). این مطالعه به منظور تولید پروتئین

پروتئین کامل توکسین بوتولینوم تیپ A (150kDa) از 2 زیر واحد شامل زنجیره سبک و زنجیره سنگین تشکیل شده است (3-1). زنجیره سبک (دومین کاتالیتیک) به وزن 50kDa، یک متالوپروتئاز وابسته به یون روی (Zn²⁺) است. سوبسترای طبیعی این آنزیم پروتئین SNAP-25 (Synaptosomal Associated Protein, 25 kDa) است که مسئول انتقال وزیکول حاوی نوروترانسمیترهای تحریکی می باشد (4 و 5). توکسین سبب مهار رهاسازی استیل کولین شده و سرانجام به طور موقت مانع از انقباض ماهیچه می شود. در سال های اخیر سرو تایپ های A و B این توکسین را به طور موفقیت آمیز به عنوان داروی بیولوژیک در درمان بعضی از بیماری های ناشی از نقص انقباض ماهیچه از جمله بلفارواسپاسم، میگرن و کاهش چین و چروک صورت به کار می رود (6-11). در کنار درمان نقایص ماهیچه ای، تزریق دارو سبب ایجاد اثرات جانبی مانند قرمزی، التهاب، سوزش، درد و گاهی خونریزی در ناحیه تزریق می شود از این رو، یافتن راهی غیر تهاجمی برای تجویز بدون خطر این دارو ضروری به نظر می رسد. از

این مقاله حاصل پایان نامه پروانه صفاریان دانشجوی دکتری باکتری شناسی پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره 3-1393 مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر عباسعلی ایمانی فولادی

E-mail: imanifouladi.a@gmail.com

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، تلفن: 021-88068924

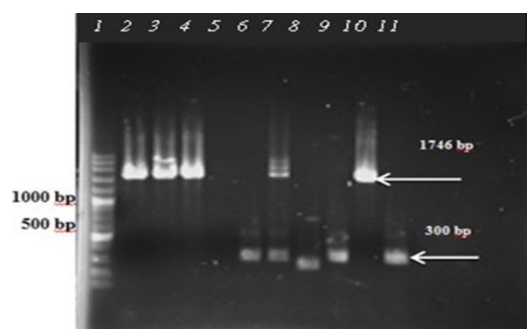
PAGE جداسازی شدند. ضخامت باندهای پروتئینی با کمک نرم افزار Quantity One, Version 4.6.5 (Bio-Rad, USA) سنجش شد. سرانجام کلون های باکتریایی که قادر به بیان پروتئین به میزان بالا بودند انتخاب شده و برای استفاده بعدی در 80°C ذخیره شدند.

بهینه سازی بیان: به منظور بهینه سازی بیان پروتئین، محیط کشت باکتری حاوی قطعه الحاقی با غلظت های مختلف IPTG (0/3mM, 0/5mM, 0/8mM و 1 mM) القا شد. بعد از آن کشت القا شده باکتری در دماهای متفاوت (37°C و 30°C) گرماگذاری شد. محیط کشت های القا شده روی ژل 12% SDS-PAGE از نظر میزان تولید پروتئین بررسی شدند. در این مطالعه سعی شد تا با تغییر و بهینه سازی شرایط بیان حلالیت پروتئین افزایش یابد. بدین منظور القای بیان پروتئین با غلظت های کم IPTG (0/5 mM) صورت گرفته و کشت در دمای کمتر از دمای معمول (18°C) گرماگذاری شد (17). هم چنین میزان ZnCl_2 0/25 μM به عنوان ماده معدنی به کشت باکتری ها اضافه گشت تا سبب حفظ هر چه بهتر ساختار سه بعدی پروتئین شود (18).

تخلیص پروتئین: رسوب حاصل از لیت کشت القا شده باکتری (mM 0/5 IPTG در 18°C) بعد از 22 ساعت گرماگذاری شد. رسوب سلولی حاصل بعد از سونیکاسیون سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ که حاوی پروتئین های محلول بود جمع آوری شده و جهت تخلیص پروتئین به ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی ذرات نیکل (Ni-NTA, Qiagen) منتقل شد (17). ستون به ترتیب با محلول شستشوی حاوی 20 mM Tris-HCl و 500 mM NaCl و 100 mM ایمیدازول شستشو داده شد. جهت جداسازی پروتئین نوترکیب از ستون محلول شستشوی حاوی 250 mM ایمیدازول مورد استفاده قرار گرفت. خروجی ستون بعد از هر بار شستشو به طور جداگانه جمع آوری شده و روی ژل 12% SDS-PAGE الکتروفورز شدند.

یافته ها

کلون سازی سازه ژنی: بعد از جداسازی محصول PCR مربوط به هر کلون روی ژل آگارز، کلون های ۲،۳،۴ و ۱۰ یک قطعه 1746bp را نشان دادند (شکل 1).



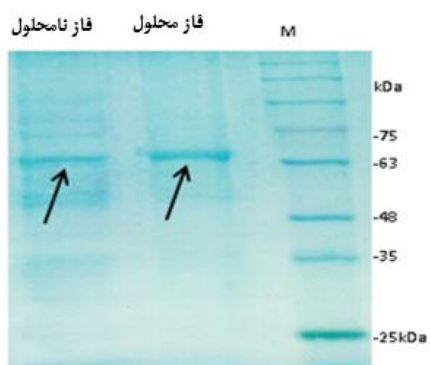
شکل 1. الکتروفورز محصول PCR. coli BL2 (DE3). از میان 10 کلون ترانسفرم که به طور تصادفی انتخاب شدند ستون های 2، ۳، ۴ و 10 حاوی قطعه ترانسفرم شده بودند. واکنش PCR با کمک پرایمرهای مربوط به ناحیه عمومی T7 پروموتور و T7 ترمیناتور پلاسمید pET28a انجام شد. ستون 1: نشانگر اندازه DNA.

نوترکیب حاصل از اتصال کوالان زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A (BoNT/A) به پپتید (47-57) TAT و همچنین شرایط مناسب برای افزایش بیان و تخلیص این پروتئین انجام شد.

مواد و روش ها

آماده سازی سازه ژنی: توالی اسید نوکلئیکی زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A (نوکلئوتیدهای 1344-1) از سویه استاندارد ATCC 3502 پپتید TAT (نوکلئوتیدهای 169-139) مربوط به ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک از بانک ژنی استخراج شدند. سازه ژنی پروتئین نوترکیب طراحی و ساخته شد. به انتهای 3' این توالی یک دنباله پلی هیستیدین (6xHis) جهت کمک به شناسایی و تخلیص پروتئین اضافه گشت. همچنین، جایگاه دو آنزیم محدود کننده *HindIII* و *BamHI* به ترتیب در انتهای 3' توالی نوترکیب پیش بینی شد تا در صورت نیاز به استخراج توالی نوترکیب از درون پلاسمید از آنها استفاده شود. **کلون سازی سازه ژنی:** سازه ژنیتحت هضم آنزیمی با دو آنزیم *HindIII* و *BamHI* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) قرار گرفت. قطعه ژنی حاوی توالی پروتئین نوترکیب مورد نظر با کمک آنزیم T4DNA لیگاز در پلاسمید خطی شده pET28a الحاق شد و سپس با روش شوک حرارتی (30 دقیقه در یخ، 90 ثانیه در دمای 42°C و مجدداً 1 دقیقه در یخ) به باکتری *E. coli* BL21(DE3) به عنوان میزبان بیانی منتقل گردید. باکتری ها در محیط LB آگار حاوی $20 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین کشت داده شده و به مدت 24 ساعت در دمای 37°C گرماگذاری شدند. از میان کلنی های رشد کرده بر روی آگار به صورت تصادفی با استفاده از پرایمرهای مربوط به ناحیه عمومی T7 پروموتور و T7 ترمیناتور پلاسمید pET28a (CinnaGen Co.) کلنی PCR انجام شد تا از حضور قطعه الحاقی درون پلاسمید اطمینان حاصل شود. فاصله کد شونده میان دو پرایمر در حالت عادی 300bp است. در صورت وارد شدن قطعه الحاقی مورد نظر در حد فاصل این ناحیه کد شونده 1446bp به اندازه محصول PCR اضافه می گردد (در مجموع 1746bp). پلاسمید مربوط به کلنی هایی که قطعه الحاقی در آنها وارد شده بود با کمک کیت تخلیص پلاسمید (iNtRON, Korea) استخراج شده و تحت هضم آنزیمی دوگانه با دو آنزیم *HindIII* و *BamHI* قرار گرفتند. تا ورود قطعه الحاقی به درون پلاسمید مورد تأیید قرار بگیرد. کلنی های انتخاب شده برای استفاده های بعدی در دمای 80°C نگهداری شدند.

بیان پروتئین نوترکیب: کلنی های حاوی قطعه الحاقی به مدت 24 ساعت در دمای 37°C در 50ml محیط LB مایع حاوی $20 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین کشت داده شدند. بعد از اینکه $\text{OD}_{600\text{nm}}$ محیط به 0/6-0/9 رسید تولید پروتئین با اضافه کردن IPTG 1 mM (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) القا گردید و در دمای 37°C به مدت 24 ساعت با دور ثابت 150 rpm در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. سپس سلولها با استفاده از سانتریفیوژ (5000rpm) به مدت 5 دقیقه از محیط کشت جدا شدند. رسوب سلولی حاصل با کمک بافر لیز کننده حاوی اوره 8M لیز شده و بعد از سونیکاسیون (30 سیکل با فواصل استراحت 45 ثانیه در یخ) سانتریفیوژ شد (14000rpm) به مدت 20 دقیقه. مایع رویی حاوی پروتئین های محلول و مایع حاصل از لیز سلولی حاوی پروتئینهای نامحلول مربوط به هر کلون به طور جداگانه روی ژل SDS-

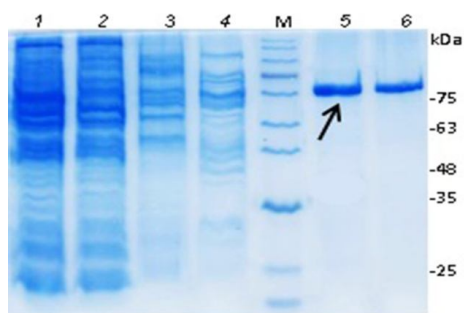


شکل 4. بیان پروتئین نوترکیب زنجیره سبک توکسین بوتولینوم در

فاز محلول

بیان پروتئین با IPTG 0/5mM القا شد. بعد از گرماگذاری کشت در دمای 18°C حدود 60% از پروتئین نوترکیب به صورت محلول تولید شد. فاز محلول: پروتئینهای محلول، فاز نامحلول: پروتئینهای نامحلول، M: نشانگر اندازه پروتئین. باند مربوط به محصول پروتئینی با پیکان نشان داده شده است. ژل SDS-PAGE 12% رنگ آمیزی با کوماسی بلو G250

تخلیص پروتئین: هر یک از فراکشن های حاصل از تخلیص پروتئین در ستون حاوی رزین متصل به نیکل به طور جداگانه در روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. میزان تخلیص پروتئین در محلول شستشوی حاوی 250 mM ایمیدازول حدود 95% بود (شکل 5).



شکل 5. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون

کروماتوگرافی Ni-NTA

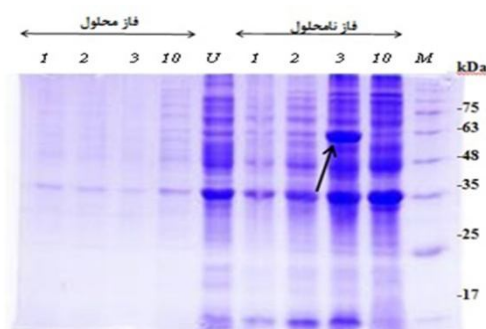
ستون 1: قبل از تخلیص، ستون 2: جریان اولیه ستون، ستون 3 و 4: شستشو با محلول حاوی 20mM و 100 mM ایمیدازول. ستون 5 و 6: پروتئین تخلیص شده در محلول حاوی 250 mM ایمیدازول. باند مربوط به پروتئین تخلیص شده با پیکان نشان داده شده است. ژل SDS-PAGE 12% رنگ آمیزی با کوماسی بلو G250.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A به صورت کوالانته توالی ژنتیکی پپتید نفوذکننده به سلول TAT (47-57) متصل شده و در میزان پروکاریوت کلون شد. با بهینه سازی شرایط بیان، حدود 60% از حجم تولیدی پروتئین نوترکیب به فاز محلول منتقل شد. سپس پروتئین با روش ستون کروماتوگرافی حاوی نیکل (Ni-NTA) به حد مطلوبی تخلیص شد. بخش

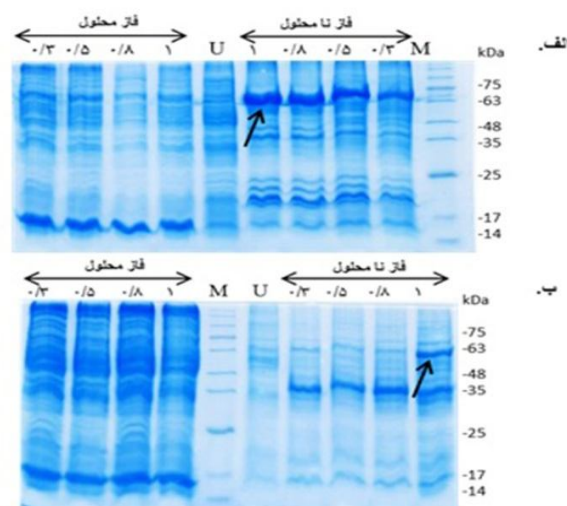
بیان پروتئین نوترکیب: از میان چهار کلون باکتریایی حامل پلاسمید نوترکیب کلون شماره 4 بیان مناسبی از پروتئین را بعد از القا نشان داد. با توجه به تصویر ژل SDS-PAGE حاصل از الکتروفورز نمونه ها (شکل 2) مشخص شد که پروتئین نوترکیب به صورت نامحلول (اینکلوژن) تولید شده و میزان بسیار ناچیزی از پروتئین در فاز محلول وجود دارد.

بهینه سازی بیان: با بهینه سازی بیان مشخص شد پروتئین نوترکیب در غلظت IPTG 1mM و در دمای 37°C دارای بالاترین میزان بیان بود (شکل 3 الف و ب). به منظور بهینه سازی شرایط برای تولید پروتئین نوترکیب در فاز محلول، القای بیان پروتئین با غلظت IPTG 0/5 mM صورت گرفته و کشت باکتری ها در دمای 18°C گرماگذاری شد. میزان زیادی از پروتئین (حدود 60%) به فاز محلول منتقل شد (شکل 4).



شکل 2. بررسی بیان پروتئین در *E. coli* BL21 (DE3)

تنها کلون 3 (با پیکان نشان داده شده است) قادر به بیان موثر پروتئین نوترکیب بود (باند 54kDa). فاز محلول: پروتئینهای محلول، فاز نامحلول: حاوی پروتئین های نامحلول، U: لیزات سلولها قبل از القای بیان، M: نشانگر اندازه پروتئین، ژل SDS-PAGE 12% رنگ آمیزی با کوماسی بلو G250



شکل 3. بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب زنجیره سبک

توکسین بوتولینوم

بیان پروتئین با غلظتهای مختلف IPTG یک بار در دمای الف) 37°C و ب) 30°C بررسی شد. پروتئین نوترکیب (باند 54kDa) در غلظت IPTG 1mM و دمای 37°C دارای بیشترین میزان بیان بود. فاز محلول: پروتئینهای محلول، فاز نامحلول: پروتئینهای نامحلول، U: قبل از القای بیان، M: نشانگر اندازه پروتئین. باند مربوط به بیشترین بیان پروتئین با پیکان نشان داده شده است. ژل SDS-PAGE 12% رنگ آمیزی با کوماسی بلو G250.

واکنش سیستم ایمنی علیه زنجیره سبک توکسین بوتولینوم به تنهایی بسیار کمتر از هنگامی است که این دومین به همراه دومین‌های متصل کننده و اتصال است (21و18). بنابراین احتمال ایجاد واکنش های آلرژیک و التهابی نسبت به پروتئین نوترکیب تولید شده در این مطالعه کمتر خواهد شد. به علاوه از پپتید های نفوذ کننده به سلول (CPP) نیز یکی از کم تهاجم‌ترین روش‌های انتقال زیست مولکول‌ها به انواع رده های سلولی است. مطالعات نشان داده‌اند که این پپتیدها دارای کمترین خاصیت سمی و کمترین میزان آسیب برای سلول‌های هدف خود به صورت *invivo* و *invitro* هستند (17). با تولید پروتئین نوترکیب به صورت محلول دیگر نیازی به تخلیص در شرایط دنا توره و افزودن ترکیبات محلول کننده پروتئین مانند اوره نبود. این امر از یک سو سبب کاهش مراحل تخلیص و صرفه جویی در وقت شده و از سوی دیگر نیاز به بازگرداندن پپچس پروتئین به حالت طبیعی را برطرف می سازد.

با این روش حجم تولیدی پروتئین دست نخورده باقی مانده و پروتئینهای نوترکیب به میزان زیادی کارایی خود را حفظ خواهند کرد. نتایج حاصل حاکی از بیان بالای پروتئین نوترکیب زنجیره سبک توکسین بوتولینوم تیپ A تحت شرایط بهینه شده در این مطالعه بود. به علاوه، باتوجه به نتایج این تحقیق تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با ستون حاوی رزین متصل به نیکل، روشی بسیار مناسب و مؤثر جهت تخلیص پروتئین نوترکیب دارای دنباله هیسیتیدین است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری آقای حمید صدیقیان راد در انجام آزمایشات کلون و بیان پروتئین تشکر و قدردانی می‌گردد.

عمده‌های از پروتئین‌های نوترکیب بیگانه در میزبان باکتریایی به صورت اجسام اینکلوژن با پیچش غیر طبیعی تجمع می یابند. چنانچه پروتئین نوترکیب تولید شده دارای عملکرد باشد (مانند آنزیم ها) در این صورت باید به نحوی پیچش پروتئین به حالت طبیعی بازگردتا پروتئین عملکرد خود را باز یابد. یک روش معمول آن است که به طریقی سرعت تولید پروتئین نوترکیب در سلول میزبان کاهش یابد تا باکتری فرصت بیشتری برای پیچش صحیح و طبیعی پروتئین بیگانه به دست آورد. در بعضی مطالعات دمای گرماگذاری کشت القا شده کاهش یافت (30°C) و در عوض زمان گرماگذاری کوتاه شد. این روش سبب شد نسبتی از پروتئین به صورت محلول تولید گردد (17و18). در مطالعه حاضر نیز مشاهده گردید که کاهش دمای گرماگذاری (18°C) سبب می شود نسبت بیشتری از پروتئین به صورت محلول تولید گردد. به علاوه به محیط کشت القا شده باکتری $\text{ZnCl}_2/25\mu\text{M}$ به عنوان ماده معدنی اضافه شد. با توجه به مطالعات انجام شده این عنصر به پیچش طبیعی پروتئین و حفظ ساختار سوم آن کمک می کند (20و19). در مطالعه Jensen و همکاران توالی دومین انتقال دهنده توکسین بوتولینوم (آمینواسیدهای 449 - 552) به توالی زنجیره سبک اضافه شد تا ساختار پروتئین نوترکیب به حالت آن نزدیک گردد. با این حال افزایشی در میزان تولید پروتئین نوترکیب با پیچش طبیعی دیده نشد. آنها نشان دادند کاهش دمای انکوباسیون تأثیر بیشتری در افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب دارد. بنابراین لزوماً کامل بودن ساختار یک پروتئین منجر به تولید پروتئین با پیچش طبیعی نمی گردد بلکه ممکن است به خاطر بزرگتر شدن توالی پروتئین نوترکیب توانایی باکتری میزبان برای پیچش طبیعی پروتئین کمتر گردد (18). در این مطالعه تنها بخش کاتالیتیک توکسین بوتولینوم تیپ A به صورت نوترکیب بیان شد. همراه بودن دومین های متصل کننده و اتصال توکسین به استحکام و ماندگاری بیشتر پروتئین در سیستم های طبیعی کمک می کند. اما بر طبق مطالعات انجام شده

Evaluation of the Expression of Recombinant Type A Botulinum Neurotoxin Light Chain Loaded onto a Cell-Penetrating Peptide

P. Saffarian (MSc)¹, Sh. Najar Peeraye (PhD)¹, J. Amani (PhD)², A.A. Imani Fooladi (PhD)^{*2}

1.Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran

2.Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(1);Jan 2016; PP:25-30

Received: Apr 21th 2015, Revised: Jul 29th 2015, Accepted: Sep 28th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Botulinum toxin type A (BoNT/A) is widely used in the treatment of some muscle contraction disorders through injection. This study aimed to produce recombinant protein through covalent bonding of the light chain of BoNT/A to the peptide TAT (47-57), and to create an optimized condition for expression and purification of the protein.

METHODS: In this preliminary study, the nucleotide sequences of the light chain of BoNT/A and TAT peptide were obtained from Gen Bank, and genetic structures containing these sequences were designed and engineered. After cloning into the BL21 (DE3) E. coli vector, expression was induced by IPTG. Thereafter, optimum thermal condition and IPTG concentration for maximum expression were determined based on the difference in the intensity of staining between the bands on SDS-PAGE protein gel. The recombinant protein was purified through nickel column chromatography (Ni-NTA).

FINDINGS: The produced chimeric protein is insoluble in normal conditions (1 mM IPTG and at 37° C). Through optimization of expression conditions (0.5 mM IPTG and at 18° C) 60% of the chimeric protein was produced as solution.

CONCLUSION: Based on our results, through expressing the recombinant protein as a solution, the protein maintained its proper folding and function. Hence, the use of denaturation compounds for solution making and destabilization of folded protein structures is not required.

KEY WORDS: *Light chain of botulinum toxin type A, Cell-penetrating peptide, Recombinant protein.*

Please cite this article as follows:

Saffarian P, Najar Peeraye Sh, Amani J, Imani Fooladi AA. Evaluation of the Expression of Recombinant Type A Botulinum Neurotoxin Light Chain Loaded onto a Cell-Penetrating Peptide. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(1):25-30.

*Corresponding Author: AA. Imani Fooladi (PhD)

Address: Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 88068924

E-mail: imanifooladi.a@gmail.com

References

1. Johnson EA, Bradshaw M. Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon*. 2001; 39(11): 1703-22.
2. Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol*. 1998;5(10):898-902.
3. Swaminathan S, Eswaremoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B. *Nat Struct Biol*. 2000;7(8):693-9.
4. Schiavo G, Rossetto O, Santucci A, DasGupta BR, Montecucco C. Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J Biol Chem*. 1992;267(33):23479-83.
5. Gul N, Smith LA, Ahmed SA. Light chain separated from the rest of the type a botulinum neurotoxin molecule is the most catalytically active form. *PLoS One*. 2010;5(9):e12872.
6. Mauskop A. The use of botulinum toxin in the treatment of headaches. *Curr Pain Headache Rep*. 2002;6(4):320-3.
7. Mauskop A. Botulinum toxin in headache treatment: the end of the road? *Cephalalgia*. 2007;27(5):468.
8. Verheyden J, Blitzer A. Other noncosmetic uses of BOTOX. *Dis Mon*. 2002;48(5):357-66.
9. Dhaked RK, Singh MK, Singh P, Gupta P. Botulinum toxin: bioweapon & magic drug. *Indian J Med Res*. 2010; 132: 489-503.
10. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27(11): 552-8.
11. Masuyer G, Chaddock JA, Foster KA, Acharya KR. Engineered botulinum neurotoxins as new therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:27-51.
12. Wadia J S, Dowdy S F. Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13(1): 52-6.
13. Henriques ST, Melo MN, Castanho MA. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem J*. 2006;399(1):1-7.
14. Mueller J, Kretschmar I, Volkmer R, Boisguerin P. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug Chem*. 2008;19(12):2363-74.
15. Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol*. 2009;157(2):195-206.
16. Mino T, Mori T, Aoyama Y, Sera T. Cell-permeable artificial zinc-finger proteins as potent antiviral drugs for human papillomaviruses. *Arch Virol*. 2008;153(7):1291-8.
17. Kim DW, Kim SY, An JJ, Lee SH, Jang SH, Won MH, et al. Expression, purification and transduction of PEP-1-botulinum neurotoxin type A (PEP-1-BoNT/A) into skin. *J Biochem Mol Biol*. 2006;39(5):642-7.
18. Jensen MJ, Smith TJ, Ahmed SA, Smith LA. Expression, purification, and efficacy of the type A botulinum neurotoxin catalytic domain fused to two translocation domain variants. *Toxicon*. 2003;41(6): 691-701.
19. Lacy DB, Stevens RC. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol*. 1999; 291(5):1091-104.
20. Farasat A, Ebrahimi F, Mousavy J, Salehi MB, Rostamian M. Characterization of antibody titer and immunogenic feature of light chain of botulinum neurotoxin type A. *Ann Biol Res*. 2013;4(3):143-8.
21. Chaddock JA, Herbert MH, Ling RJ, Alexander FC, Fooks SJ, Revell DF, et al. Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxin type A. *Protein Expr Purif*. 2002;25(2):219-28.