مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۲/ ۸-۱

مقاله پژوهشی

مطالعه توده ای شدن حرارتی کاندیدای واکسن بوتولینوم در انتهای کربوکسیل نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E

مصیب رستمیان، دکتر سید جعفر موسوی*

گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۶ اصلاح نهایی: ۹۱/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۲

چکیده:

زمینه و هدف: **مطالعه توده ای شدن حرارتی پروتئین یک روش ساده و مفید برای مطالعه مقاومت پروتئین به واسرشتگی حرارتی است و اطلاعات ارزشمندی در مورد ساختار پروتئین ارائه می دهد. از آنجایی که تا به حال هیچگونه اطلاعاتی در مورد ساختار زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E (rBoNT/E-HCC) گزارش نشده است، لذا این مطالعه با هدف بررسی ساختاری پروتئین مذکور، یافتن شرایط pH بهینه برای آن و توده ای شدن حرارتی پروتئین طراحی شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، توده ای شدن حرارتی پروتئین با روش طیف سنجی مرئی- فرابنفش در pH های ۲، ۵، ۷/٤ و ۹ مورد مطالعه قرار گرفت. نهایتاً به منظور ارزیابی نتایج توده ای شدن حرارتی، مطالعات طیف سنجی فلورسانس نیز صورت گرفت.**

یافته ها: **نتایج نشان داد که زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH های اسیدی فشرده تر و در pH های بالاتر بازتر است.**

نتیجه گیری: **هر چند بر اساس نتایج زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH های اسیدی فشرده تر است، با این حال فشرده تر بودن پروتئین، لزوماً به معنای پایداری بیشتر پروتئین نیست، چرا که ممکن است مکانیسم های دخیل در فشردگی و پایداری پروتئین بسیار متفاوت باشند.**

واژه های کلیدی: توده ای شدن حرارتی، فلورسانس، نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E.

مقدمه:

نام بوتولیسم از کلمه لاتین Botulus به معنای سوسیس در قرن نوزدهم گرفته شد. این اصطلاح، بیماری بوتولیسم را که از خوردن سوسیس آلوده به وجود می آمد، توصیف می‌نمود (۲،۱). انواع متفاوتی از بوتولیسم شناسایی شده‌اند که بر مبنای منشاء مسمومیت و شکل ورود سم به بدن از یکدیگر متمایز می‌گردند. مهمترین و رایج ترین شکل بیماری، بوتولیسم ناشی از غذا است. این شکل از بوتولیسم بدنبال مصرف غذاهای آلوده به سم باکتری کلستریدیوم بوتولینوم ایجاد می‌گردد. از علائم مشخص آن در مراحل اولیه بیماری، دوبینی و تاری دید و در مراحل بعدی، فلج پیشرونده عضلانی و گسترش آن به عضلات تنفسی و نهایتاً مرگ می باشد (۴،۳). امروزه هفت تیپ A، B، C، D، E، F وG از سم کلستریدیوم بوتولینوم شناخته شده است. این نوروتوکسین ها دارای سه ناحیه عملکردی هستند که عبارتند از ناحیه کاتالیتیک، ناحیه انتقال دهنده و ناحیه اتصال دهنده. این نوروتوکسین پس از عبور از خون در مجاورت پایانه های عصبی قرار گرفته و از طریق ناحیه اتصال دهنده به گیرنده خود متصل می‌شود. این نوروتوکسین با اثر بر سلول های عصبی باعث عدم ترشح استیل کولین، متعاقب آن عدم انتقال پیام عصبی و در نهایت فلج عضلانی می شود (۵).

نویسنده مسئول: تهران،دانشگاه جامع امام حسین (ع)، مرکز تحقیقات زیست شناسی، تلفن:۰۲۱-۷۷۱۰٤۹۳٤، *E-mail:jmosavi@ihu.ac.ir*

www.SID.ir

در حال حاضر برای ایجاد مصونیت اختصاصی در افراد در معرض خطر، از یک توکسوئید پنج ظرفیتی بوتولینوم علیه سروتیپ‌های A-E استفاده می‌شود (۶). با این حال سالانه بررسی های فراوانی روی انواع مختلف واکسن های بوتولیسم و امکان استفاده از آنها به صورت خوراکی انجام می‌شود (۶). امروزه محققین به سوی استفاده از پروتئین های نوترکیب به عنوان واکسن رو آورده‌اند. با توجه به اهمیت ناحیه اتصال دهنده در اتصال سم به نورون ها، بررسی روی این ناحیه به عنوان کاندیدای واکسن مورد توجه محققین می باشد. یکی از این نوع واکسن ها پروتئین نوترکیبی متشکل از ۹۳ اسید آمینه انتهای کربوکسیلی زیرواحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E می باشد (۷).

از آنجا که هرگونه تجمع، ناپایداری و دناتوراسیون پروتئینی در تولید داروها و واکسن ها غیر قابل قبول و مشکل ساز است، بررسی توده ای شدن پروتئین ها همواره یکی از جنبه های مورد مطالعه در بررسی های ساختاری پروتئین ها بوده است (۸). به علت تغییر ساختمان پروتئین و به سطح آمدن نواحی آبگریز، پروتئین ها ممکن است باهم تجمع یابند، به این فرآیند توده ای شدن (Aggregation) می گویند (۸). محققین بر این عقیده اند که واسرشتگی پروتئین پیش شرط توده ای شدن می‌باشد. کوچکترین آشفتگی در ساختار پروتئین می‌تواند موجب به سطح آمدن سطوح آبگریز شده و در نتیجه باعث توده ای شدن پروتئین گردد (۸). فاکتورهای محیطی متعددی هم وجود دارند که موجب توده ای شدن پروتئین می‌شوند. شرایط مختلف، نظیر: دما، غلظت پروتئینی، PH و قدرت یونی می توانند علت پدید آمدن توده ای شدن های مشاهده شده باشد (۹،۸).

با توجه به اهمیت فراوان واکسن های نوترکیب در پیشگیری از بیماری بوتولیسم که بتوان از آنها به صورت خوراکی استفاده کرد (۱۰،۶) و نظر به عدم وجود هر گونه گزارش قبلی در مورد ویژگی های ساختاری پروتئین مذکور، در این تحقیق به عنوان اولین قدم در مطالعات ساختاری و یافتن شرایط بهینه تخلیص، مصرف و نگهداری این کاندیدای واکسن نوترکیب به بررسی توده ای شدن حرارتی پروتئین در چهار pH مختلف (pH=۲ معیاری از pH معده، pH=۵ یک pH نزدیک به خنثی، pH=۷/۴ نماینده pH خون و pH=۹ به عنوان یک pH بازی) پرداخته شده است.

روش بررسی:

به منظور بیان پروتئین های نوترکیب، از باکتری *E. coli* BL21 (DE3) استفاده گردید (۱۲،۱۱،۷) و پروتئین های بیان شده با روش ستون کروماتوگرافی نیکل تخلیص شدند (۱۳،۱۱،۷). همچنین برای دوباره طبیعی کردن (Renaturation) پروتئین ها و حذف اوره از محلول حاوی پروتئین، از روش دیالیز استفاده گردید (۱۵،۱۴) و از کیسه دیالیزی با نمره (Cut Off Number) برابر ۱۲ کیلو دالتون در این تحقیق استفاده شد.

از دستگاه طیف سنجی نوری Varian (مدل Carry-100 Bio) با کووت کوارتز با قطر ۱۰ mm به منظور مطالعه توده ای شدن پروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E استفاده شد و محدوده روبش طیف ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر در نظر گرفته شد. دستگاه در ابتدا با pH=۷ در محیط بافر حاوی (NaH_2PO_4 (۱۰۰mM و Tris-base (۱۰mM) تنظیم شد. یعنی دو سل دستگاه از بافر پر شده و خط پایه بدست آمد. سپس در سل نمونه، پروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در شرایط pH مختلف قرار گرفت. طیف نمونه ها در چهار pH مختلف (۲، ۵، ۷/۴ و ۹) به طور همزمان در طول موج ۳۶۰ نانومتر به عنوان پروبی به منظور سنجش توده ای شدن (۹) در نظر گرفته شدند (۱۶). دما برای همه ی نمونه‌ها برابر ۵۰ درجه سانتیگراد بود. در آزمایشی دیگر به منظور احیا باندهای دی سولفیدی، دی تیوتریتول (Dithiothreitol=DTT) در غلظت های بالا (۱۰۰–۱۰ mM) به میزان مشابه به همه ی نمونه ها اضافه گردید و آزمایش در همان طول موج و دمای ذکر شده تکرار گردید (۱۷).

به منظور ارزیابی نتایج توده ای شدن حرارتـی،

Archive of SID

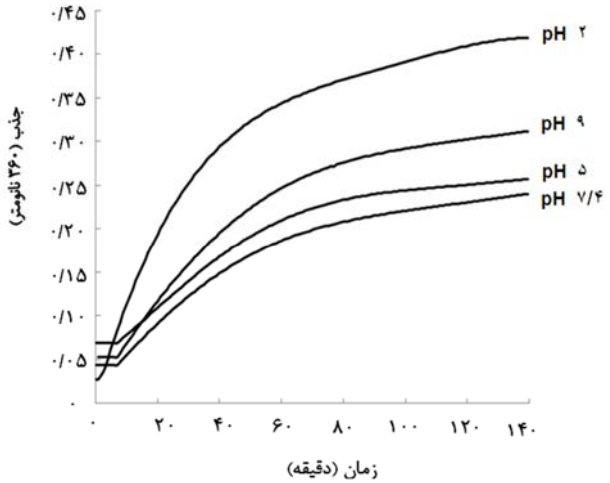
www.SID.ir

مطالعات اثر pH بر روی ساختار سوم پروتئین با روش فلورسانس هم صورت گرفت. طیف نشری پروتئین ها با استفاده از دستگاه طیف سنج فلورسانس Varian (مدل Carry Eclipse)، با طول موج ثابت تهییج ۲۸۰ nm و نشر ما بین طول موج های ۴۵۰-۳۰۰ nm و با فواصل طول موجی ۰/۹ nm ثبت شد و اندازه گیری شدت فلورسانس در دمای ۲۵ °C صورت گرفت. محفظه‌های کوارتزی استفاده شده حجمی معادل ۴۰۰µl و طول مسیری معادل ۰/۵ cm را در جهت عبور نور داشتند. سرعت روبش طول موج توسط تکفام ساز نشری بکار رفته ۱۲۰ nm/min و نیز قطر دریچه های نشری تهییجی ۱۰ nm بود. جهت به حداقل رساندن اثر نورهای پراکنده شده از فیلترهای خاص بر سر راه فوتون های نشری استفاده گردید تا فوتون های با طول موج کمتر از ۳۰۰ nm را جذب نمایند. غلظت پروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در تمام نمونه ها حدود ۱۰۰ µg/ml با pH های ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ در محیط بافر حاوی(NaH_2PO_4 ۱۰۰mM) و (۱۰ mM) Tris-base بود (۱۸).

یافته ها:

مطالعه توده ای شدن حرارتی طبق آزمایشی که به منظور حصول الگوی دناتوراسیون حرارتی زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E انجام گرفت، دمای مناسب برای مطالعات توده ای شدن حرارتی در مورد زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E را برابر ۵۰ درجه سانتیگراد برآورد نمود.

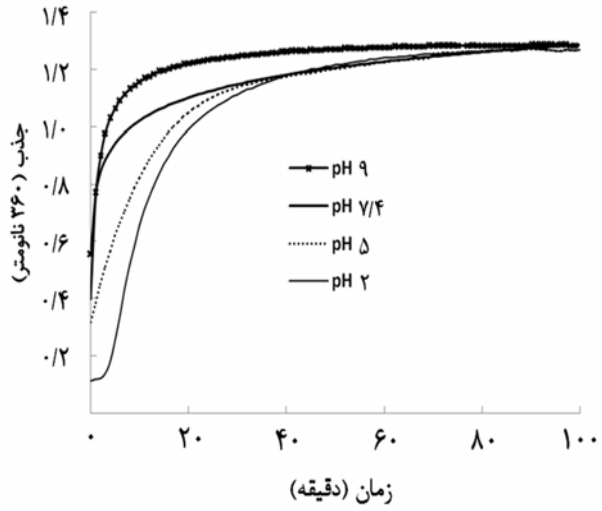
ماکزیمم میزان توده ای شدن در pH=۲ دیده شد (نمودار شماره ۱). به استثنای pH=۹، نمودارهای توده ای شدن pH=۵ و pH=۷/۴ از الگوی مذکور تبعیت می کرد. به عبارت دیگر افزایش pH از دو به ۵ و ۷/۴ باعث کاهش توده‌ای شدن پروتئین زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E می‌گردد. اکسیداسیون خود به خودی گروه تیول و تشکیل بانـــد



نمودار شماره ۱: مقایسه تغییرات زمانی توده ای شدن زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH های مختلف.

دی سولفیدی در داخل و خارج مولکول ها در pH≥ ۸ تسریع می یابد (۱۹). بنابراین احتمالاً به همین دلیل است که توده‌ای شدن زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH=۹ از الگوی مذکور تبعیت نکرده و نسبت به pH= ۷/۴ و pH=۵ بیشتر است.

به منظور اثبات فرضیه مذکور و تحلیلی که از نمودارهای توده ای شدن و نقش واسطه گری باند



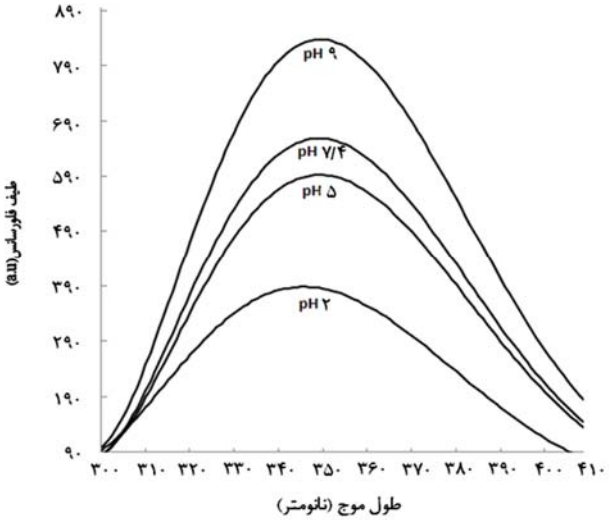
نمودار شماره ۲: توده‌ای شدن حرارتی پروتئین زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در حضور غلظت‌های یکسان دی‌تیوتریتول در pH های مختلف.

Archive of SID

www.SID.ir

دی سولفیـــدی صورت گرفت، آزمـــایش فـوق در حضور دی تیوتریتول تکرار گردید. از آنجایی که دی تیوتریتول به عنوان عامل احیا کننده عمل می کند، بنابراین باند دی سولفیدی را می‌شکند و همچنین از تشکیل باند دی سولفیدی جلوگیری می‌کند. در این شرایط تنها پارامتر تعیین کننده باقیمانده در واسرشتگی و توده ای شدن پروتئین، پایداری ساختاری است. احتمالاً زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH=۲ فشرده تر و پایدارتر است و بنابراین در مقابل توده ای شدن حرارتی هم مقاوم تر است. نتایج همچنین نشان داد که توده ای شدن زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH های ۵، ۷/۴ و ۹ بر اساس پایداری آنها کاهش می یابد (نمودار شماره ۲).

در این مطالعه طیف نشری زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E را در pH های ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ در محدوده ۳۰۰–۵۰۰nm با تهییج در ۲۸۰nm نشان داد که افزایش pH از ۲ به ۹ با افزایش شدت نشر همراه بود (نمودار شماره۳).



نمودار شماره ۳: مقایسه طیف فلورسـانس پـروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینـوم تیپ E در pH های مختلف.

طیف فلورسانس پروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH=۲ میزان جابه جایی آبی حدود ۴ nm را نسبت به طیف نشری سایر pH ها نشان می دهد. این جابه جایی نشان می دهد که اسید آمینه های تریپتوفان پروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH=۲ به یک محیط آبگریزتر انتقال یافته اند.

بحث:

مطالعه توده ای شدن حرارتی پروتئین در ۳۶۰ نانومتر، یک روش مفید و ساده برای مطالعه مقاومت پروتئین به واسرشتگی حرارتی است. نمودارهای توده ای شدن معمول دارای سه فاز تأخیری، لگاریتمی و ثابت می باشند. هر چه نمودار توده ای شدن پروتئین دارای فاز تاخیری کوتاه تری باشد یا فاز لگاریتمی شیب بیشتری داشته باشد، نشان دهنده ی این است که سرعت توده ای شدن این پروتئین بالا می باشد و بر عکس هر چه فاز تاخیری بزرگتر و یا فاز لگاریتمی دارای شیب کمتری باشد پروتئین پایدارتر است و سرعت توده ای شدن که ناشی از ناپایداری پروتئین است کاهش می یابد (۲۰،۹). آزمایشات توده ای شدن نشان می دهد که زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در ۵۰ درجه سانتیگراد با نرخ های مختلف توده ای می شوند. توده ای شدن فرآیندی است که با چند مکانیسم مختلف از جمله تشکیل واریته‌های محلول/غیر محلول، کووالانت/غیر کووالانت، برگشت پذیر/برگشت ناپذیر و طبیعی/دناتوره پروتئین، ممکن است رخ دهد (۸). نتایج ما نشان داد که توده‌ای شدن از راه تشکیل باندهای دی سولفیدی بین مولکولی پیش می رود. تشکیل باند دی سولفیدی در pH=۲ و pH=۹ در مقایسه با pH=۵ و pH=۷/۴ بیشتر تسریع می گردد. به منظور اثبات این ادعا باندهای دی سولفیدی پروتئین احیا و تشکیل مجدد آن با استفاده از عامل احیا کننده DTT ممانعت گردید و نتایج نشان داد زیر واحد اتصال

Archive of SID

www.SID.ir

دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH=۲ به توده‌ای شدن حرارتی مقاوم‌تر است. در مقایسه، توده ای شدن پروتئین در pH=۹ با مکانیسمی دیگر (تسریع اکسیداسیون خود به خودی گروه تیول و تشکیل باند دی سولفیدی در داخل و خارج مولکول ها در pH≥ ۸ (۱۹) نسبت به pH=۵ و pH=۷/۴ کاهش می یابد.

مطالعه بر روی طیف فلورسانس ماکرومولکول ها می تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد بنای فضایی ماکرومولکول بدست بدهد (۲۱). در پروتئین ها تنها سه فلوروفر ذاتی یا درونی وجود دارد که به ترتیب کاهش بازده کوانتایی، تریپتوفان، تایروزین و فنیل آلانین می باشند. در عمل فلورسانس تریپتوفان بیشتر مورد مطالعه قرار می‌گیرد، زیرا فنیل آلانین بازده کوانتایی کمی دارد و فلورسانس تایروزین نیز غالباً به واسطه خاموش شدن بسیار ضعیف است (۲۱). دلیل اصلی مطالعه فلورسانس ذاتی پروتئین‌ها بدست آوردن اطلاعاتی در مورد بنای فضایی آنان است، زیرا فلورسانس تریپتوفان و تایروزین شدیداً بستگی به محیط اطراف آنان (نوع و ترکیب حلال، PH، حضور یک خاموشگر، وجود یک مولکول کوچک و یا یک گروه همسایه در ساختمان پروتئین) دارد. پروتئین زیر واحد اتصال نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E دارای پنج اسید آمینه تریپتوفان می باشد و طیف فلورسانس زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E ناشی از این چند اسید آمینه است که درPH های ۲، ۵، ۷/۴ و ۹ بدست آمده است. هیچ گونه جابه جایی آبی یا سرخ در طیف فلورسانس پروتئین در pH های ۵، ۷/۴ و ۹ دیده نشد. حال آنکه طیف فلورسانس پروتئین زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH=۲ میزان جابه جایی آبی حدود ۴nm را نسبت به طیف نشری سایر pH ها نشان می دهد این جابه جایی احتمالاً بدلیل انتقال تریپتوفان ها به یک محیط آبگریزتر است. همچنین نتایج نشان داد که شدت فلورسانس پروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH=۲ نسبت به سایر pH ها کمتر است، با افزایش pH از pH های اسیدی (pH=۲) به pH های بازی (pH=۹) شدت فلورسانس افزایش یافته است. بنابراین کرموفورها (اسید آمینه های آروماتیک پروتئین) در pH های پائین‌تر کمتر به سطح ماکرومولکول متمایل شده اند. این امر احتمالاً بدلیل فشرده تر شدن پروتئین در pH=۲ نسبت به سایر pH ها می باشد و تایید کننده نتایج حاصل از مطالعات توده ای شدن حرارتی است.

مطالعات بیوفیزیکی- بیوشیمیایی فراوانی روی تیپ های مختلف نوروتوکسین بوتولینوم صورت گرفته است (۲۶-۲۲). در مرتبط ترین تحقیق با مقاله حاضر، محققین به بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ساختاری پروتئین نوترکیب زنجیره سنگین نوروتوکسین بوتولینوم تیپ B (rBoNT/B-Hc) تحت شرایط گوناگون و با استفاده از اطلاعات حاصل، به ارزیابی شرایط فرآیند تخلیص مناسب پرداختند. آنها در مطالعه خود حلالیت پروتئین نوترکیب در pH های ۴، ۵، ۶، ۷/۵، ۸ و ۹ را ارزیابی کردند و چندین روش بیوفیزیکی مختلف برای بدست آوردن پایداری پروتئین نوترکیب تحت شرایط گوناگون استفاده نمودند. یافته ها، نشان داد که پایداری شیمیایی و فضایی rBoNT/B-Hc زیر pH های ۷/۵ بیشتر می شود. این مطالعه پیشنهاد می کند که برای فرآیند تخلیص باید عرضه rBoNT/B(Hc به pH های بالا و شرایط نمکی را به حداقل رساند(۲۶). این تحقیق، ما را به سمت یافتن شرایط pH بهینه برای پروتئین نوترکیب زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E تشویق کرد.

نتیجه گیری:

در مجموع نتایج ما نشان می دهد که زیر واحد اتصال دهنده‌ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در pH های اسیدی فشرده تر و در pH های بالاتر بازتر است. بنابراین بافرهای با pH پائین می‌توانند برای تخلیص، مصرف و نگهداری پروتئین زیر واحد اتصال دهنده ی نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E مناسب تر باشند. همچنین می توان این احتمال را داد که این واکسن

Archive of SID

www.SID.ir

نوترکیب توانایی تحمل pH اسیدی معده را داشته باشد و بتوان از آن به عنوان یک واکسن خوراکی استفاده نمود، هر چند این فرض نیاز به بررسی جامع‌تر و دقیق تری دارد. نهایتاً لازم به ذکر است که فشرده-تر بودن پروتئین لزوماً به معنای پایداری بیشتر پروتئین نیست چرا که ممکن است مکانیسم های دخیل در این دو حالت (فشردگی و پایداری) بسیار متفاوت باشند. بنابراین توصیه می گردد که مطالعات بیوفیزیکی بیشتری در این راستا صورت گیرد.

تشکر و قدردانی:

این کار تحقیقاتی (طرح تحقیقاتی شماره ۱۱۹۷) با حمایت های مالی دانشگاه جامع امام حسین (ع) انجام گرفته است. نویسندگان از کمک های علمی و عملی اعضای مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران خصوصاً استاد گرانقدر پروفسور علی اکبر موسوی موحدی صمیمانه قدردانی می نمایند.

منابع:

1.Van Ermengem E. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. Reviews of Infectious Diseases. 1979: 701-19.

2.Pickett A. On the discovery of *Bacillus botulinus*. Botulinum J. 2008; 1(1): 5–6.

3.Sobel J, Tucker N, Sulka A, McLaughlin J, Maslanka S. Foodborne botulism in the United States, 1990-2000. Emerg Infect Dis. 2004 Sep; 10(9): 1606-11.

4..Novak J, Peck M, Juneja V, Johnson E. *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens*. In: Pina M, Arun K, James L, editors. Foodborne Pathogens. Microbiology and Molecular Biology. Caister Academic Press. 2005; 38: 383-407.

5.Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004; 44: 167-93.

6.Byrne MP, Smith LA. Development of vaccines for prevention of botulism. Biochimie. 2000 Sep-Oct; 82(9-10): 955-66.

7.Mansour AA, Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J, Farhadi N. Cloning, high level expression and immunogenicity of 1163-1256 residues of C-terminal heavy chain of *C. botulinum* neurotoxin type E. Biologicals. 2010 Mar; 38(2): 260-4.

8.Cromwell ME, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing. AAPS J. 2006; 8(3): E572-9.

9.Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. Int J Pharm. 2005 Jan; 289(1-2): 1-30.

10. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune response in external secretions. J Clin Immunol. 1987; 7(4): 265-76.

11. Wingfield PT, Palmer I, Liang SM. Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from *Escherichia coli*. Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]. 2001 May; 6: 6.

12. Olad G, Tavalaee M, Mohamad hasan Z, Ebrahimi F, Salimian J, Nazarean S, et al . *Shigella dysentery* stxA mutant (R170L-A231D-G234E) gene design and optimization of recombinant protein expression and purification. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011; 13(5): 93-102.

13. Gholipour A, Moosavian S, Galehdari H, Makvandi M, Mard S, RajabiMemari H, et al. Optimization of gene expression and purification of *Legionella pneumophila* peptidoglycan associated lipoprotein recombinant protein. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012; 14(3): 1-11.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Wingfield PT, Palmer I, Liang SM. Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from *Escherichia coli*. Current protocols in protein science. 1995; 6: 1-6.

15. Hesaraki M, Saadati M, Honari H, Olad G, Heiat M, Zare M. Optimization of expression, extraction & purification of the N-terminal region of ipaD gene in *Shigella dysenteriae* by proteomics analysis. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012; 14(2): 64-73

16. Rezaei-Ghaleh N, Ramshini H, Ebrahim-Habibi A, Moosavi-Movahedi AA, Nemat-Gorgani M. Thermal aggregation of alpha-chymotrypsin: role of hydrophobic and electrostatic interactions. Biophys Chem. 2008 Jan; 132(1): 23-32.

17. Rudolph R, Böhm G, Lilie H, Jaenicke R. A practical approach. In: Creighton TE, editor. Protein function. Oxford: IRL Press; 1997; 57.

18. Dehghan GR, Housaindokht MR, Fazly Bazzaz BS. Spectroscopic studies on the interaction of human serum albumin (HSA) with surfactin. Iran J Basic Med Sci. 2005; 8(4): 287-98.

19. Ruddock LW, Hirst TR, Freedman RB. PH-dependence of the dithiol-oxidizing activity of DsbA (a periplasmic protein thiol: disulphide oxidoreductase) and protein disulphide-isomerase: studies with a novel simple peptide substrate. Biochem J. 1996 May; 315(Pt 3): 1001-5.

20. Won CM, Molnar TE, McKean RE, Spenlehauer GA. Stabilizers against heat induced aggregation of RPR 114849, an acidic fibroblast growth factor (aFGF). Int J Pharm. 1998; 167(1-2): 25-36.

21. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Berlin: Springer. 2009.

22. Singh BR, DasGupta BR. Structure of heavy and light chain suhunits of type a botulinum neurotoxin analyzed by circular dichroism and fluorescence measurements. Mol Cell Biochem.1989; 85: 67-73.

23. Chen F, Kuziemko GM, Stevens RC. Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. Infect Immun. 1998 Jun; 66(6): 2420-5.

24. Singh BR, Wasacz FM, Strand S, Jakobsen RJ, DasGupta BR. Structural analysis of botulinum neurotoxin types A and E in aqueous and nonpolar solvents by Fourier transform infrared, second derivative UV absorption, and circular dichroic spectroscopies. J Protein Chem. 1990 Dec; 9(6): 705-13.

25. Encinar JA, Fernandez A, Ferragut JA, Gonzalez-Ros JM, DasGupta BR, Montal M, et al. Structural stabilization of botulinum neurotoxins by tyrosine phosphorylation. FEBS Letters. 1998 Jun 5; 429 (1): 78-82.

26. Bedu-Addo F, Johnson C, Jeyarajah S, Henderson I, Advant S. Use of biophysical characterization in preformulation development of a heavy-chain fragment of botulinum serotype B: evaluation of suitable purification process conditions. Pharm Res. 2004; 2(8): 1353-61.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2013 June, July; 15(2): 1-8.

Original article

Thermal aggregation study of C-terminal botulinum neurotoxin type E as a vaccine candidate

Rostamian M (MSc), Mousavy SJ (PhD)*
[1]Biology Dept., Imam Hussein University, Tehran, I.R. Iran.
Received: 6/June/2012 Revised: 11/Aug/2012 Accepted: 4/Oct/2012

Background and aims: Thermal aggregation study of proteins is a useful and simple method to evaluate protein resistance to thermal denaturation and presents valuable information about protein conformation. There is no reported information about botulinum neurotoxin type E (rBoNT/E-HCC) structure. The aim of this study was to examine the structure of rBoNT/E-HCC, to find the best pH for it, and to study thermal aggregation of protein.
Methods: In this descriptive laboratory study, thermal aggregation was studied using UV-visible spectrometry in different pH (2, 5, 7.4, and 9). Finally, fluorescence spectrometry was also carried out to evaluate the thermal aggregation results.
Results: The results showed that rBoNT/E-HCC is more compact in acidic pH and more open in alkaline pH.
Conclusion: According to the results, although rBoNT/E-HCC is more compact in acidic pH, it is notable that being more compact is not necessarily equal to being more stable. The mechanisms involving in compactness and stability may be completely different.

Keywords: **Botulinum neurotoxin type E, Fluorescence, Thermal aggregation.**

Archive

Cite this article as: Rostamian M, Mousavy SJ. Thermal aggregation study of C-terminal botulinum neurotoxin type E as a vaccine candidate. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 June, July; 15(2):1-8.

*Corresponding author:
Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, Iran. Tel: 00982177104934, E-mail: jmosavi@ihu.ac.ir

www.SID.ir