

Sylwia Parasion, Michał Bartoszcze, Romuald Gryko

STRUKTURA I MECHANIZM DZIAŁANIA NEUROTOKSYN BAKTERII RODZAJU *CLOSTRIDIUM*

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczenia Zagrożeń Biologicznych
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
Szef Ośrodka: Michał Bartoszcze

Przedstawiono toksynę botulinową i tężcową – neurotoksyny wytwarzane przez bakterie z rodzaju Clostridium – ich strukturę, mechanizm działania i zastosowanie.

Słowa kluczowe: Clostridium botulinum, Clostridium tetani, neurotoksyny, mechanizm działania

Key words: Clostridium botulinum, Clostridium tetani, neurotoxins, mechanism of action

1. *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* I *CLOSTRIDIUM TETANI* – CZYNNIKI ETIOLOGICZNE TĘŻCA I BOTULIZMU

Szczepki dwóch gatunków bakterii z rodzaju *Clostridium*: *Clostridium botulinum* i *Clostridium tetani*, należących do beztlenowych laseczek zarodnikujących produkują najsilniejsze ze znanych toksyn biologicznych. W skład neurotoksyn wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Clostridium* (CNTs – clostridial neurotoxins) wchodzi toksyna tężcowa i siedem antygenowo różnych neurotoksyn botulinowych (1,2,3).

Objawy kliniczne wskazujące na tężec opisał już w czasach starożytnych *Hipokrates* (4), a *Carlo i Rattone* (5) wywołali doświadczalnie to schorzenie u królików wszczepiając im ropę pobraną z rany chorego człowieka. Komórki laseczki tężca, tak jak innych gatunków z rodzaju *Clostridium*, mogą przechodzić w postać przetrwalną tzw. endospory (6). W warunkach naturalnych są one obecne w glebie, stąd też zakażenie tężcem ma najczęściej charakter przyranny (6,7). Endospory dostają się do organizmu przez uszkodzoną skórę, gdzie kiełkują przechodząc w formę wegetatywną produkującą toksynę tężcową uwalnianą do środowiska w procesie autolizy komórek bakteryjnych (4). *Clostridium tetani* jest gatunkiem wytwarzającym tylko jeden rodzaj toksyny odpowiedzialnej za objawy tężca (1).

Charakterystycznymi objawami tężca jest porażenie spastyczne spowodowane inhibicją wytwarzania mediatorów hamowania tj. kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) i glicyny w neuronach w centralnym systemie nerwowym (2). W konsekwencji tych zaburzeń dochodzi

do niekontrolowanego przepływu impulsów powodujących drgawki i skurcze mięśniowe. Toksyna tężcowa (TeNT- Tetanus neurotoxin) może także powodować porażenie wiotkie w przypadkach tężca czaszkowego lub po iniekcji dużych dawek toksyny, jako rezultat blokowania uwalniania acetylocholino w zakończeniach nerwów ruchowych (6,7).

W 1895 roku *Emil van Ermengen* wyizolował, a w 1897 opisał beztlenową laseczkę przetrwalnikującą – *Clostridium botulinum*, będącą producentem toksyny botulinowej (5). Dotychczas opisano 7 typów toksyn (BoNT – Botulinal neurotoxin), różniących się pod względem serologicznym tj. BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F i BoNT/G (8). Bakterie produkujące toksyny również podzielono na typy. Szczepy produkujące jeden typ toksyny wykazują często dość znaczne różnice biochemiczne i genetyczne, co wskazuje, że *Clostridium botulinum* jest gatunkiem wysoce heterogennym. Cechą determinującą przynależność szczepu do gatunku *C. botulinum* jest zdolność produkowania jednej z toksyn botulinowych (8,9).

Niektóre toksyczne szczepy rodzaju *Clostridium*, inne niż *C. botulinum*, są także zdolne do produkcji neurotoksyn botulinowych i tak np: szczepy *Clostridium butyricum* mogą produkować toksynę typu E (9), a *Clostridium baratii* wytwarzają toksynę typu F (9). W 1998 roku opisano w Indiach 34 przypadki botulizmu, wywołanego przez toksynę typu E, wytwarzaną przez *C. butyricum* (5,9). Neurotoksyczne szczepy *Clostridium butyricum* izolowano także w Chinach, a przypadki botulizmu niemowląt wywołane przez szczepy tego gatunku bakterii odnotowano we Włoszech (5).

Człowiek najczęściej ulega zatruciu przez spożycie zakażonej żywności (botulizm pokarmowy) zawierającej toksynę botulinową powstałą podczas namnażania się bakterii (10). Botulizm pokarmowy pochodzący z żywności produkowanej komercyjnie jest wprawdzie rzadko spotykany, to jednak w przypadku wystąpienia zatruc konsekwencje – zarówno medyczne, jak i ekonomiczne – mogą być wysokie. Szacuje się, że w USA koszt jednego przypadku botulizmu w przybliżeniu wyniósłby 30 milionów dolarów, 3000 razy więcej niż w przypadku listeriozy lub salmonellozy (10). Obecnie większość zachorowań ma związek z przetworami przygotowywanymi w warunkach domowych (10). Najczęściej komórki szczepów *C. botulinum* nie kolonizują przewodu pokarmowego osób dorosłych. Wyjątkiem jest botulizm niemowląt, będący następstwem wytwarzania BoNT wewnątrz światła jelita, ze względu na nierozwiniętą w pełni florę układu pokarmowego (9,10). Botulizm przyrany jest następstwem zakażenia ran przez *Clostridium botulinum* i produkowania przez nie toksyny, uwalnianej *in vivo*. Ten typ botulizmu coraz częściej spotykany jest u narkomanów – przy wstrzykiwaniu heroiny (11). Toksyna może przenikać przez błony śluzowe zarówno układu pokarmowego, jak i oddechowego, powodując w tym drugim przypadku botulizm inhalacyjny (8,9). We wszystkich rodzajach botulizmu wchłonięta do krwi toksyna przenika do obwodowych synaps cholinergicznyc, z którymi wiąże się nieodwracalnie. Blokada przepływu sygnałów cholinergicznyc w synapsach nerwowo-mięśniowych i zahamowanie uwalniania się acetylocholino, prowadzi do paraliżu wiotkiego (7).

2. NEUROTOKSYNY BAKTERII RODZAJU *CLOSTRIDIUM* I ICH STRUKTURA

Opisano 8 różnych typów neurotoksyn: jeden wytwarzany przez szczepy *Clostridium tetani* – toksyna tężcowa (TeNT) i siedem typów wytwarzanych przez *Clostridium botulinum*

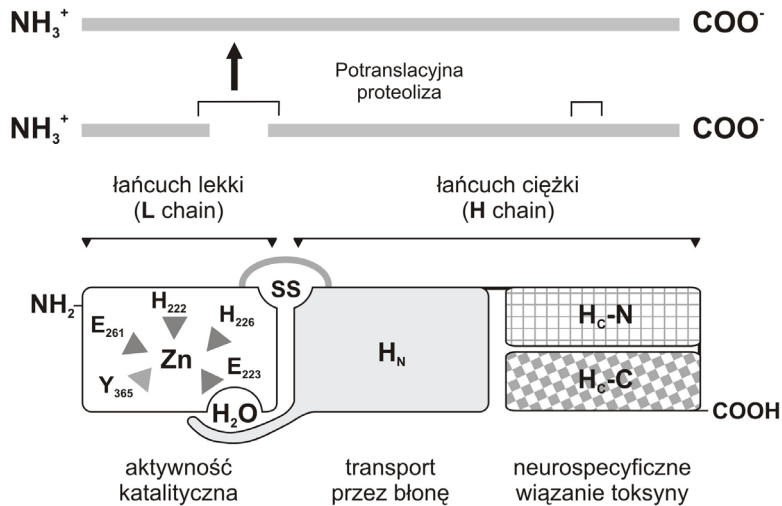
– toksyny botulinowe (BoNT) tj. A, B, C, D, E, F, i G wykazujących niemal identyczne działanie farmakologiczne, lecz różniących się budową antygenową (6,7,12). Najczęstszą przyczyną botulizmu u ludzi są neurotoksyny BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E (rzadziej BoNT/F), które są przyczyną 99% wszystkich zachorowań. Toksyny BoNT/C i BoNT/D wywołują botulizm u zwierząt domowych i wolno-żyjących (7). Neurotoksyna typu G jest wytwarzana przez bakterie izolowane z gleby (12). Chociaż wiele toksycznych szczepów *Clostridium* izolowanych z próbek klinicznych, żywności i środowiska wytwarza jeden typ toksyny, to jednak opisano szczepy zdolne do syntetyzowania dwóch typów BoNT. Są one określane jako typy Af, Ab, Bf i Ba, gdzie duża litera wskazuje na dominujący typ toksyny; szczepy typu Ba i Bf produkują 10-krotnie większą ilość toksyny B niż toksyny typu A lub F (8,13).

Neurotoksyny bakterii z rodzaju *Clostridium* są syntetyzowane jako pojedynczy łańcuch biologicznie nieaktywnego białka o masie około 150 kDa, który ulega potranslacyjnej proteolizie do formy dwułańcuchowej, aktywnej molekule, gdzie dwa łańcuchy (50 i 100 kDa) łączy dwusiarczkowy mostek. Toksyny składają się z trzech funkcjonalnych domen, każda o masie 50 kDa, odpowiedzialnych za jej wiązanie do receptorów, translokację oraz aktywność katalityczną (1,14,15).

Podobny mechanizm działania wspomnianych neurotoksyn na zakończenia nerwowe wynika z podobieństwa ich struktury białkowej. Syntetyzowane toksyny gromadzone są w cytozolu komórki bakteryjnej skąd uwalniane są w wyniku autolizy (4). Z toksyną tężcową nie są związane żadne dodatkowe białka, podczas gdy toksyny botulinowe są uwalniane w formie multimerycznych kompleksów, zwanych protoksynami, w skład których wchodzi nietoksyczne białko, tzw. białko NAPs (*neurotoxin-associated proteins*) (16,17,18). W supernatantach hodowli *C. botulinum* zidentyfikowano 3 formy protoksyn: LL-toksyna (*extra large toxin*) o ciężarze cząsteczkowym dochodzącym do 900 kDa (stała sedymentacji 19S), L-toksyna (*large toxin*) o ciężarze 500 kDa (stała sedymentacji 16S) i M-toksyna (*medium toxin*) o wielkości 300 kDa (stała sedymentacji 12S) (4,18). Kompleks protoksyny w formie M tworzy pojedynczą cząsteczkę toksyny BoNT (150 kDa) i jedno nietoksyczne białko niehemaglutyniny (NTNH *nontoxic nonhemagglutinin protein*) (18). Natomiast formę L tworzy cząsteczkę toksyny BoNT, białko NTNH oraz mniejsze białko typu hemaglutyniny (HA *hemagglutinin*), o masie molekularnej: 54, 33, 20 i 14 kDa (16,17,18). W skład największej protoksyny, formy LL wchodzi dwie podjednostki L toksyny (16). BoNT/A występuje w trzech formach (M, L i LL), a BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D i BoNT/F w dwóch: M i L, natomiast BoNT/F istnieje jedynie w formie M. Liczba NAPs jest różna u wszystkich siedmiu serotypów, i tak np. w serotypach A i B występuje ich 7, a tylko jedno w serotypie E (17). Prawdopodobnie nietoksyczne komponenty protoksyn odgrywają znaczącą rolę w ochronie samych toksyn przed inaktywacją w warunkach niskiego pH soku żołądkowego i przed działaniem proteaz przewodu pokarmowego (18).

Długość łańcuchów polipeptydowych CNTs (*Clostridial neurotoxins*) waha się od 1251 reszt aminokwasowych u *Clostridium butyricum* BoNT/E do 1297 reszt u BoNT/G i 1315 u TeNT (4). Dokładna długość łańcucha L i H toksyny zależy od miejsca cięcia proteolizy w obrębie „odsłoniętej” pętli (*exposed loop*). Wielkość łańcucha lekkiego wynosi od 419 reszt aminokwasowych u BoNT/E do 449 reszt u TeNT, a łańcucha ciężkiego od 829 reszt aminokwasowych u BoNT/E do 857 u TeNT (4).

Krystaliczna struktura BoNT/A, BoNT/B i COOH-końcowej domeny TeNT (H_C) (1,4,14) uwidacznia trzy funkcjonalnie różne domeny: 1) N-końcową domenę obdarzoną aktywnością zależną od cynku endopeptydazy (łańcuch lekki – L), 2) domenę odpowiedzialną za transport toksyny przez błonę (H_N), charakteryzującą się obecnością dwóch długich heliks przypominających elementy obecne w kolicynach i w hemaglutynie wirusa grypy, 3) domenę odpowiedzialną za wiązanie toksyny na powierzchni receptora – złożoną z dwóch poddomen (H_C -N i H_C -C) charakterystycznych dla lektyn i inhibitora Kunitz'a (1,4,14) (ryc. 1).



Ryc. 1. Budowa neurotoksyn bakterii rodzaju *Clostridium* (4)
Fig. 1. Structure of clostridial neurotoxins (4)

Łańcuch lekki jest metaloproteazą, której katalityczne miejsce jest zlokalizowane w głębokiej szczelinie obecnej na powierzchni białka. Atom cynku jest wiązany przez dwie cząsteczki histydyny i reszty glutaminowe obszaru „zinc binding motif” – HEXXH występującego we wszystkich cynkowo-zależnych proteazach oraz przez Glu 262 w BoNT/A (14,19). Reszty te charakterystyczne dla wszystkich neurotoksyn *Clostridium* sp. dostarczają ujemnie naładowanych reszt karboksylowych. Reszta kwasu glutaminowego w tym motywie jest szczególnie ważna z uwagi na wiązanie cząsteczki wody, niezbędnej do hydrolytycznej reakcji proteolizy. Dowiedziono, że mutacja tej reszty prowadzi do całkowitej inaktywacji toksyny (4). Jak wspomniano aktywne miejsce jest położone w głębokiej szczelinie na powierzchni białka, dostępnej przez anionowy kanał. Translokacyjny pas domeny H_N otacza aktywne miejsce w BoNT/A, zapobiegając dojściu do atomu cynku, co decyduje o braku aktywności enzymatycznej w dwułańcuchowej strukturze toksyn (1). Kanał ten staje się dostępny dla substratu przy redukcji dwusiarczkowego wewnątrzłańcuchowego mostka (4).

Domeny H_C toksyny TeNT i BoNT/A wykazują znaczne podobieństwo z uwagi na swój wydłużony kształt. Są one odpowiedzialne za wiązanie białka (toksyny) na powierzchni receptora, zawierają one dwie różne poddomeny: NH_2 -terminalną (H_C -N) i C-terminalną

połowę (H_C -C), które w nieznacznym stopniu stykają się ze sobą (4). Sekwencje aminokwasowe tych poddomen są słabo konserwatywne wśród toksyn, a usunięcie poddomeny H_C -C nie redukuje zdolności wiązania H_C do błony nerwowej, podczas gdy delecja tylko 10 reszt końców COOH znosi jej wiązanie do neuronów rdzenia kręgowego (4). Istotną rolę w wiązaniu części oligosacharydowej polisialogangliozydów odgrywa 34 ostatnich reszt H_C -C, a w szczególności His-1293 toksyny tężcowej. Główna różnica w strukturze pomiędzy H_C -C toksyny tężcowej i botulinowej typu A dotyczy struktury pętli, co może sugerować, że wspomniane zewnętrzne segmenty mogą być odpowiedzialne za wiązanie różnych receptorów białkowych (4).

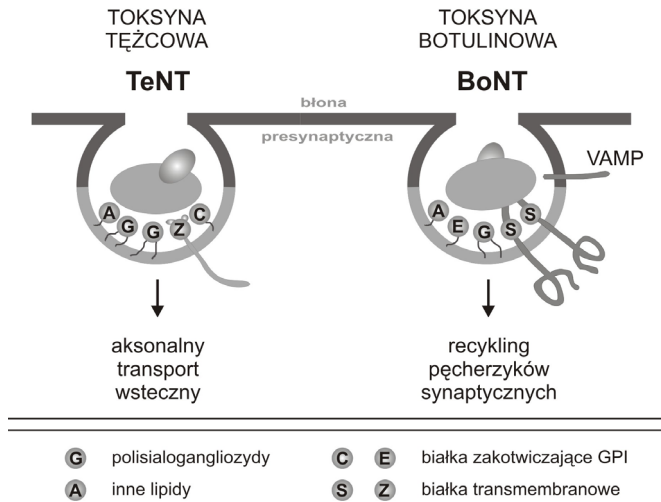
Części H_N łańcucha ciężkiego są wysoce homologiczne wśród neurotoksyn, wykazując duże podobieństwo ich struktury drugorzędowej. Domena H_N , odpowiedzialna za translokację toksyny (BoNT/A), ma walcowaty kształt zdeterminowany obecnością niezwykle długich i skręconych α -heliks oraz posiada długą pętlę tzw. translokacyjny pas (*translocation belt*), który owija się dookoła łańcucha lekkiego toksyny (1,4). Funkcja domeny H_N polega na kształtowaniu porów i translokacji katalitycznej domeny do cytozolu neuronu. Szczegóły tego procesu nie są do końca poznane (1).

3. MECHANIZM DZIAŁANIA NEUROTOKSYN

3.1. WIĄZANIE TOKSYNY NA POWIERZCHNI RECEPTORA

Od miejsca produkcji lub adsorpcji (jelito lub rany) toksyny botulinowe lub toksyna tężcowa rozprzestrzeniają się przez płyny ustrojowe do błony presynaptycznej zakończeń cholinergicznyc (4) W pierwszym etapie działanie toksyny jest uzależnione od wiązania cząsteczki do błon komórek nerwowych, co jest uwarunkowane obecnością na ich powierzchni specyficznych receptorów. Różne typy toksyn wiążą się ze swoistymi receptorami białkowymi, przy czym dużą rolę w tym procesie odgrywają gangliozydy (20).

Dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik badawczych zidentyfikowano dwa miejsca wiązania polisialogangliozydów wewnątrz N-końcowej części (H_C) domeny odpowiedzialnej za wiązanie receptora u TeNT - w przeciwieństwie do jednej cząsteczki polisialogangliozydu wiążącej się z wysokim powinowactwem do BoNT/A i BoNT/B₂. Toksyna tężcowa wiąże się do białka zakotwiczonego GPI (*GPI-anchored protein*) – Thy-1, podczas gdy toksyny botulinowe typu A, B, E i G oddziałują z synaptogaminą I i II. W świetle danych eksperymentalnych wiążąca się toksyna tężcowa zajmuje miejsca wewnątrz regionów błony plazmatycznej, które są bogate w cholesterol, gangliozydy i białka zakotwiczone GPI (20). Ostatnio odchodzi się od modelu podwójnych receptorów (gangliozydy-białko), na korzyść zaangażowania szeregu zgrupowanych w mikrodomeny receptorów na presynaptycznej membranie w wiązanie TeNT i BoNTs do obwodowych zakończeń nerwowych (ryc. 2) (20). Zarówno toksyna tężcowa jak i toksyny botulinowe wiążą się do błony presynaptycznej w α -motoneuronach, w następstwie różnych wewnątrzkomórkowych dróg przemieszczania. BoNTs blokują neuroegzocytozę w zakońzeniach obwodowych, natomiast TeNT działa w ten sam sposób w synapsach centralnego układu nerwowego. Końcowe miejsca działania toksyn określane są przez specyficzne receptory, prowadząc do odmiennych wewnątrzkomórkowych szlaków (14).



Ryc. 2. Wiązanie neurotoksyn przez szereg presynaptycznych receptorów (20)

Fig. 2. Binding of neurotoxins via array presynaptic receptors (20)

3.2. INTERNALIZACJA

Łańcuch lekki (L chain) neurotoksyn bakterii rodzaju *Clostridium* blokuje neuroegzocytozę przez działanie w cytozolu (przynajmniej ta domena neurotoksyny musi wnikać do cytozolu komórki). W świetle najnowszych badań toksyny nie docierają do komórki bezpośrednio przez błonę komórkową, lecz ulegają one endocytozie. Badania z użyciem mikroskopu elektronowego wykazały, że neurotoksyny wchodzi w strukturę pęcherzyka w procesie temperaturo- i energozależnym. Białkowy receptor toksyny teżcowej jest odpowiedzialny za włączenie jej do pęcherzyka endocytarnego, który przemieszcza się we wstecznym kierunku wzdłuż i wewnątrz aksonu, natomiast receptory białkowe toksyn botulinowych prowadzą je do wnętrza pęcherzyków zakwaszających obszar połączeń neuro-mięśniowych (14).

3.3. TRANSLOKACJA TOKSYNY PRZEZ BŁONĘ

Łańcuch lekki toksyny, aby dostać się do cytozolu musi przejść przez hydrofobową barierę błony pęcherzyka i kwaśne komponenty obecne w komórce. Redukcja pH warunkuje zmiany strukturalne w toksynach i prowadzi do zwiększonej hydrofobowości molekuly oraz umożliwia penetrację podwójnej warstwy lipidowej (4,14). Wykazano, że BoNT i TeNT formowały transmembranowe jonowe kanały w dwuwarstwie fosfolipidowej i membranach PC12, w warunkach podobnych do istniejących *in vivo* (4).

3.4. AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA NEUROTOKSYN

W łańcuchu lekkim neurotoksyn występuje wysoce konserwatywny, złożony z około 20 reszt aminokwasowych segment, który zawiera „zinc binding motif” – HEXXH, występu-

jący we wszystkich cynkowo-zależnych proteazach (4,19). Toksyny botulinowe i toksyna tężcowa są szczególnymi, specyficznymi proteazami, które rozpoznają i tną jedynie trzy białka, zwane SNARE (*soluble N – ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) odpowiedzialne za fuzję pęcherzyka synaptycznego wypełnionego neuromedia-torem z błoną neuronu (6,19,20). TeNT, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F i BoNT/G tną VAMP (*vesicle associated membrane protein*) – białko błony pęcherzyków synaptycznych w różnych pojedynczych wiązaniach peptydowych. Toksyna botulinowa typu C rozszczepia zarówno syntaksynę, jak i SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*) – dwa białka błony presynaptycznej, natomiast toksyna botulinowa typu A i E nie tną białko SNAP-25 w różnych miejscach wewnątrz jego COOH-końca (6,17). Warto zaznaczyć, że TeNT i BoNT tną te same wiązanie peptydowe w białku VAMP (Gln76 – Phe77), jednakże wstrzyknięcie tych toksyn zwierzętom powoduje wystąpienie botulizmu lub tężca, zależnie od rodzaju toksyny. Jest to dowód o decydującym znaczeniu docelowego miejsca działania toksyny, a nie jej molekularnego mechanizmu (7,14).

Proteoliza jednego z białek SNARE prowadzi do powstania niefunkcjonalnego kompleksu, dzięki czemu dochodzi do przerwania sprzężenia pomiędzy dopływem wapnia i fuzją (14,21). Poszczególne toksyny różnią się pod względem interakcji z motywami białek SNARE, które są związane ze specyficznością działania neurotoksyn botulinowych (6,7,14).

4. WYKORZYSTANIE TOKSYN BOTULINOWYCH I TOKSYNY TĘŻCOWEJ

Toksyny wytwarzane przez bakterie *Clostridium botulinum* są najsilniejszymi ze znanych toksyn biologicznych na świecie (12). Toksyna botulinowa może być użyta jako broń biologiczna w atakach drogą powietrzną lub za pośrednictwem celowo skażonej żywności. W latach 90-tych japońska sekta Aum Shinrikyo kilkakrotnie próbowała rozpylić toksynę w centrum Tokio, ale ataki te na szczęście nie przyniosły oczekiwanego rezultatu. Bakterie *C. botulinum* użyte przez terrorystów zostały wyizolowane z gleby. Najbardziej skuteczną drogą ataku toksyną botulinową jest droga aerzolowa: LD50 wynosi około 0,001 µg/kg. Dzięki stymulacji komputerowej wykazano, że przy dawce inhalacyjnej toksyny 1,5 µg śmiertelność wyniesie 50%, a przy dawce większej niż 2,4 µg aż 99%. W celu podwyższenia jej stabilności w formie aerzolowej zastosowano metodę mikrokapsułkowania (31) Badania nad wykorzystaniem toksyny botulinowej do celów militarnych prowadzone były m.in. w Japonii, Związku Radzieckim i USA (12).

Kliniczne zastosowanie BoNTs jest możliwe z powodu pełnej odwracalności skutków ich działania na poziomie komórki nerwowej. Wysoka specyficzność w stosunku do obwodowych cholinergicznych zakończeń nerwowych i fakt, że przy stosowaniu odpowiednich środków ostrożności wstrzyknięte małe dawki BoNTs, nie rozprzestrzeniają się znacząco poza miejsce iniekcji, spowodowały powszechne jej stosowanie jako leku. Toksyna botulinowa jest pierwszą biologiczną trucizną dopuszczoną przez FDA (Food and Drug Administration) do stosowania w terapii różnego rodzaju zaburzeń neurologicznych (4,14). Neurotoksynę stosuje się w leczeniu dystonii kraniowej, kurczu powiek, dystonii karku, zeza, dystonii kończyn, kurczach prostaty, nadmiernej potliwości dłoni, nadmiernym ślinieniu się, migrenowych bólach głowy i innych schorzeniach, w których korzystna jest blokada połączeń nerwowych (20,21).

Zastosowanie BoNT/A w przypadkach kurczu powiek skutkuje wygładzeniem zmarszczek wokół oczu i ta obserwacja zapoczątkowała stosowaniu preparatów toksyny botulinowej w kosmetyce. W handlu dostępne są dwa preparaty farmakologiczne toksyny botulinowej typu A: Botox (firmy Allegran) i Dysport (firmy Ipsep). BoNT/B jest także dostępna komercyjnie (Neuroblock, firmy Elan Pharmaceuticals) (21). BoNT/A jest najczęściej stosowana klinicznie za względu na długi okres działania po iniekcji (2 razy dłużej niż BoNT/B), chociaż rozpatrywana jest możliwość stosowania także BoNT/C (21). Terapii tego typu, przy podawaniu dużych dawek toksyny, może towarzyszyć jednak występowanie efektów ubocznych oraz powstanie przeciwciał, wpływając także na uodpornienie się pacjenta na toksynę (4). Ostatnio toksyna botulinowa typu B została wprowadzona do leczenia dystonii szyjnej (22). Badania nad zastosowaniem innych typów toksyn są w trakcie testów klinicznych, a zachęcające wyniki otrzymano z BoNT/C (1). Toksyna tężcowa jest stosowana do wywoływania eksperymentalnej padaczki i degradacji komórek nerwowych na modelach zwierzęcych. Przeprowadzono doświadczenia, w których fragment łańcucha ciężkiego toksyny tężcowej (H_C) został użyty jako nośnik hydrolazy lizosomowej i dysmutazy ponadtlenkowej do wnętrza komórek w hodowlach lub β -galaktozydazy w embrionach mysich. Badania te wskazują na możliwość zastosowania TeNT jako nośnika różnorodnych substancji biologicznych do selektywnych obszarów centralnego systemu nerwowego (4).

S Parasion, M Bartoszcze, R Gryko

THE STRUCTURE AND MECHANISM OF ACTION OF CLOSTRIDIAL NEUROTOXINS

SUMMARY

Clostridium botulinum and *Clostridium tetani* produce highly potent neurotoxins, called botulinum toxins and tetanus toxin, respectively. The clostridial neurotoxins specifically bind to neuronal cells and disrupt neurotransmitter release by cleaving proteins involved in specific vesicle membrane fusion. Each toxin is synthesized as an inactive ~150 kDa single-chain protein. The protein is post-translationally proteolyzed to form the active dichain molecule in which the chains ~50 and ~100 kDa, remain linked by a disulfide bond. The structural organization is functionally related to the fact that CNTs intoxicate neurons via four-step mechanism consisting of 1. binding, 2. internalization, 3. membrane translocation, and 4. enzymatic target modification. The L chain is responsible for the intracellular catalytic activity. The NH_2 -terminal 50-kDa domain of the H chain (H_N) is implicated in membrane translocation, whereas the $COOH$ -terminal part (H_C) is mainly responsible for neurospecific binding.

PIŚMIENNICTWO

1. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci* 2002;27(11):552-8.
2. Rao KN, Kumaran D, Binz T, i in. Structural analysis of the catalytic domain of tetanus neurotoxin. *Toxicon* 2005;45(7):929-39.
3. Lacy DB, Stevens RC. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* 1999;291(5):1091-104.
4. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 2000;80(2):717-66.

5. Johnson EA, Bradshaw M. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon* 2001;39(11):1703-22.
6. Boquet P, Munro P, Fiorentini C, i in. Toxin from aerobic bacteria: specificity and molecular mechanisms of action. *Curr Opin Microbiol* 1998;1(1):66-74.
7. Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, i in. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* 2000;82(5):427-46.
8. Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J Appl Microbiol* 1998;84(1):5-17.
9. Caya JG, Agni R, Miller JE. *Clostridium botulinum* and the clinical laboratorian: a detailed review of botulism, including biological warfare ramifications of botulinum toxin. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128(6):653-62.
10. Peck MW. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J Appl Microbiol* 2006;101(3):556-70.
11. Brett MM, Hallas G, Mpmamgo O. Wound botulism in the UK and Ireland. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt 6):555-61.
12. Reiss J., Mierzejewski J. Toksyna botulinowa – aspekty zagrożenia biologicznego. *Mikrobiologia Medycyna* 2004; 2(39):24-35.
13. Raffestin S, Marvaud JCh, Cerrato R, i in. Organization and regulation of the neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Anaerobe* 2004; 10: 93-100.
14. Rossetto O, Rigoni M, Montecucco C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. *Toxicol Lett* 2004;149:91-101.
15. Lacy DB, Stevens RC. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* 1999;291(5):1091-104.
16. Franciosa G, Floridi F, Maugliani A, i in. Differentiation of the gene clusters encoding botulinum neurotoxin type A complexes in *Clostridium botulinum* type A, Ab, and A(B) strains. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(12):7192-9.
17. Sharma SK, Whiting RC. Methods for detection of *Clostridium botulinum* toxin in foods. *J Food Prot* 2005;68(6):1256-63.
18. Arndt JW., Gu J, Jaroszewski L, i in. The structure of the neurotoxin-associated protein HA33/A from *Clostridium botulinum* suggests a reoccurring beta-trefoil fold in the progenitor toxin complex. *J Mol Biol* 2005;346(4):1083-93.
19. Breidenbach MA, Brunger AT. New insights into clostridial neurotoxin–SNARE interactions. *Trends Mol Med* 2005;11(8):377-81.
20. Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G. Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol* 2004;12(10):442-6.
21. Montecucco C, Molgo J. Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5(3):274-9.
22. Munchau A, Bhatia KP. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ* 2000;320(7228):161-5.

Otrzymano: 12.02.2007 r.

Adres autora:

Sylwia Parasion,

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych, WIHiE

Ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy,

e-mail: sparasion@gmail.com