

# LES NEUROTOXINES CLOSTRIDIALS COM A EINES MOLECULARS I TERAPÈUTIQUES

Joan Blasi, Mireia Martín-Satué, Ashraf Muhaisen,  
Adriana Raptis, Àlex Soler i Benjamín Torrejón-Escribano  
*Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica  
Universitat de Barcelona. Campus de Bellvitge*

## SUMMARY

Clostridial neurotoxins (tetanus toxin and botulinum neurotoxins) are the most lethal proteins known to human. They bind selectively to the nerve terminals where selectively inhibit the exocytosis of the synaptic vesicles and so block the neurotransmission. In addition to their lethal effect, clostridial neurotoxins have been used in therapeutical treatments. In particular, the botulinum neurotoxins (specially of type A) have been widely used in the treatment of neuromuscular alterations because of its ability to relax the muscles by blocking the secretion of the acetylcholine from the motor nerve terminals. The tetanus toxin, from the other side, principally blocks the secretion of the inhibitory neurotransmitters of the interneurons of the spinal cord. Consequently, it causes a spastic paralysis. Because of its ability to be transported retrogradely, tetanus toxin can be used as a vehicle to direct molecules with a potential therapeutical effect to the central nervous system.

From the other side, these toxins have become fundamental tools to understand the neurosecretion machinery and the regulated secretion in other cellular models as well as other fenomens in which exists the membrane fusion between the cellular compartments.

In this communication, we focus on properties of the clostridial neurotoxins to recognize and act specifically at the nerve terminations where they cleave particular synaptic proteins. Specially, the report is concentrated on the botulinum neurotoxins, which have been used as therapeutical agents.

## RESUM

Les neurotoxines clostridials (toxina tetànica i neurotoxines botulíniques) són les proteïnes més letals que es coneixen. S'uneixen selectivament als terminals nerviosos, on inhibeixen l'exocitosi de vesícules sinàptiques i, per tant, bloquegen la neurotransmissió. No obstant això, malgrat el seu efecte letal, les neurotoxines clostridials s'han utilitzat per a tractaments terapèutics. En particular, les neurotoxines botulíniques (sobretot la de tipus A) han estat àmpliament emprades per al tractament d'alteracions neuromusculars, per la seva habilitat de relaxar la musculatura en bloquejar la secreció d'acetilcolina dels terminals nerviosos motors. La toxina tetànica, per la seva banda, bloqueja principalment la secreció de neurotransmissors inhibidors de les interneurons de la medulla espinal. Conseqüentment, provoca una paràlisi espàstica. Gràcies a la seva propietat de ser transportada retrògradament, la toxina tetànica pot ser utilitzada com a vehicle per dirigir molècules amb un efecte potencialment terapèutic al sistema nerviós central.

D'altra banda, aquestes toxines han estat unes eines fonamentals per entendre la maquinària neurosecretora i, per extensió, la secreció regulada en altres models cel·lulars, així com altres fenòmens en els quals intervé la fusió de membranes entre compartiments cel·lulars.

En aquesta comunicació, ens centrarem en les propietats de les neurotoxines clostridials per reconèixer les terminacions nervioses i actuar-hi específicament, ja que és on proteolitzen determinades proteïnes sinàptiques. Farem esment especialment de les toxines botulíniques, ja que són les utilitzades com a agents terapèutics.

## INTRODUCCIÓ

La toxina tetànica i les neurotoxines botulíniques són les responsables del tètanus i el botulisme, que es manifesten en forma de paràlisi espàstica i flàccida respectivament. Malgrat la potència letal d'aquestes toxines, la seva incidència clínico-social és relativament baixa, ja que, d'una banda, existeix una vacuna altament efectiva (com en el cas de la toxina tetànica, el tètanus), i, de l'altra, les creixents mesures d'higiene i control en la conservació d'aliments afavoreixen la baixa freqüència de casos. No obstant això, per exemple, entre 1988 i 1998 s'ha enregistrat més d'un brot de botulisme a l'any a França, Alemanya, Espanya i Itàlia (amb un total de cent setanta-set casos a Alemanya, quatre-cents dotze a Itàlia i noranta-dos a Espanya en aquest període, vegeu: <http://www.eurosurveillance.org/em/v04n01/0401-322.asp?langue=03&>). Malgrat la baixa incidència d'aquesta afecció, el problema està en l'elevada mortalitat que provoca si no es detecta a temps.

A part d'aquestes consideracions, les neurotoxines clostridials, i en especial la toxina botulínica, han anat guanyant interès en els darrers anys per dos motius principals. Un és que han estat unes eines moleculars clau per esbrinar el mecanisme molecular de la neurosecreció. L'altre, de caire més aplicat, és la seva utilització com a molècules terapèutiques per a un nombre creixent d'afeccions, sobretot d'origen muscular (encara que no exclusivament, com és el cas d'aplicacions per hiperhidrosi i hipersalivació) o el seu ús en tractaments d'estètica.

## LES NEUROTOXINES CLOSTRIDIALS

Les neurotoxines clostridials (NTC) són proteïnes sintetitzades per bacteris anaeròbics productors d'espores del gènere *Clostridium*. Comprenen la toxina tetànica (TeTx), produïda per *Clostridium tetani*, i set tipus serològicament diferents de neurotoxines botulíniques (anomenades de la A a la G, BoNT/A a BoNT/G) produïdes bàsicament per soques de *Clostridium botulinum* (Hatheway, 1989). Representen el grup de neurotoxines de natura proteica més potents que hi ha. Es calcula que la dosi letal de la BoNT/A, la més potent, és al voltant de 0,4 i 1 ng per Kg en ratolins i humans, respectivament (Gill, 1982; Middlebrook, 1989; Schechter i Arnon, 2000).

Aquesta gran potència letal s'atribueix bàsicament a dos factors: l'elevada afinitat i especificitat de les neurotoxines per al teixit nerviós i la seva activitat proteolítica intracel·lular, que és la causant, en definitiva, de la seva activitat inhibidora de la neurosecreció.

La TeTx i les BoNT són responsables de les manifestacions clíniques del tètanus i el botulisme, respectivament. El tètanus es caracteritza per una paràlisi muscular espàstica, amb contracció de la musculatura voluntària, que pot provocar la mort per aturada respiratòria. La manifestació final del botulisme, en canvi, és la d'una paràlisi flàccida, amb impossibilitat de contracció muscular esquelètica, de manera que la causa de la mort és també l'aturada respiratòria. Malgrat que les manifestacions clíniques són diverses, el mecanisme cel·lular d'acció és, bàsicament, el mateix: la inhibició de la secreció del neurotransmissor als terminals nerviosos (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco i Schiavo, 1995). Els dos tipus de neurotoxines s'uneixen específicament a receptors presents a la membrana presinàptica de les unions neuromusculars, però mentre que les BoNT bloquegen la secreció d'acetilcolina (ACh) de la mateixa unió neuromuscular i provoquen la paràlisi flàccida (Mellanby, 1984; Wellhoner, 1982), la TeTx és transportada retrògradament cap al cos de la motoneurona a la medul·la espinal (Schwab *et al.*, 1979), des d'on migra transsinàpticament cap a les interneurons inhibidores. És en aquestes on bloqueja la secreció de neurotransmissors inhibidors (GABA, glicina), que provoca la paràlisi espàstica (Bizzini, 1989; Montecucco i Schiavo, 1995).

Una altra de les diferències entre la TeTx i les BoNT és la via d'entrada a l'organisme. El tètanus s'esdevé habitualment per ferides en què el bacteri pot progressar en unes mínimes condicions anaeròbiques i produir la toxina.

La via habitual, encara que no totalment exclusiva, de les neurotoxines botulíniques és a través del consum d'aliments en mal estat de conservació on ha pogut créixer el bacteri en condicions anaeròbiques i produir la toxina. Les BoNT resisteixen el pas per l'estómac i són absorbides pels budells, des d'on es distribueixen pel cos. Les BoNT poden resistir el suc gàstric de l'estómac, ja que són produïdes juntament amb altres proteïnes no neurotòxiques que les envolten tot formant un complex proteic d'elevat pes molecular (Sugiyama, 1980) de fins a 900 kDa en el cas de la BoNT/A. Aquests complexos es coneixen com a *toxines botulíniques*. Algunes de les proteïnes que acompanyen la neurotoxina i formen el complex tenen activitat hemaglutinant i d'altres no. Cap d'aquestes proteïnes, però, intervé en el procés neurotòxic en si. Fora de l'ambient àcid de l'estómac, un cop als budells, el complex es disgrega i la neurotoxina és absorbida. Encara no es coneix amb detall el mecanisme pel qual la neurotoxina travessa l'epiteli intestinal; un dels més acceptats és el de l'endocitosi seguida del pas a través de la cèl·lula epitelial absorbiva (l'enteròcit) des del pol apical fins al basolateral (transcitosi) (Maksymowych i Simpson, 1998; Maksymowych *et al.*, 1999).

A més de la intoxicació per consum d'aliments en mal estat de conservació, s'han descrit altres casos de botulisme amb diferents vies d'entrada del bacteri o la seva toxina a l'organisme. El botulisme infantil s'esdevé per l'entrada d'espores i el subseqüent creixement del clostridi al budell d'infants molt petits (Midura i Arnon, 1976; Pickett *et al.*, 1976; Midura, 1996) quan encara no el tenen colonitzat per altres bacteris. És el tipus de botulisme més corrent actualment als Estats Units, on es fa un seguiment més exhaustiu (possiblement per això se'n descriuen més casos, especialment a Califòrnia, on s'ha estudiat més). S'ha assenyalat que la mel que a vegades es dona als nadons en pot ser una de les causes, ja que pot contenir espores del clostridi (Arnon *et al.*, 1979). No obstant això, en els últims anys, menys del 5 % del botulisme infantil referenciat a Califòrnia s'ha pogut atribuir al consum de mel (Midura, 1996). Encara que el clostridi no creix als budells de persones adultes ja que ha de competir amb la flora bacteriana natural, s'ha descrit algun cas de botulisme per invasió d'espores als budells de persones adultes amb afeccions intestinals (McCroskey i Hatheway, 1988; Cherington, 1988).

Un tipus més rar de botulisme és el degut a ferides. Es pot considerar en aquells casos aïllats en què es presenten els símptomes de botulisme en una persona que ha patit alguna ferida d'on es pot aïllar el bacteri, i sense evidència d'intoxicació per menjar (Weber *et al.*, 1993). En aquest tipus de botulisme s'inclouen els associats al consum de drogues. Un d'aquests casos ha estat el botulisme que va aparèixer en persones que consumien una heroïna importada de Mèxic (*Mexican black*

*tar*) que contenia espores del clostridi (Merson i Dowell, 1973). Altres casos relacionats són els descrits en persones amb símptomes de botulisme i que eren consumidores de cocaïna. Aquestes persones presentaven inflamació de la mucosa nasal, on es va detectar el bacteri (Kudrow *et al.*, 1988).

Hi ha un darrer tipus de possible entrada a l'organisme de la toxina botulínica, però que no es considera natural, i és per inhalació de toxina en forma d'aerosol. Aquesta via s'ha demostrat experimentalment en primats (Franz *et al.*, 1993), i s'ha intentat utilitzar en atemptats de bioterrorisme, encara que sense conseqüències (Arnon *et al.*, 2001). S'ha provat la possibilitat d'utilitzar la propietat de la toxina botulínica de tipus A de ser absorbida per inhalació per fabricar vacunes amb aplicació intranasal fetes a base de toxina botulínica detoxificada (Park i Simpson, 2003; vegeu també <http://news.cnet.com/investor/news/newsitem/0-9900-1028-20927919-0.html>).

En el cas del botulisme, el grau de gravetat pot ser variable i dependrà de la quantitat de toxina absorbida per l'organisme. Els símptomes més lleus inclouen debilitat muscular, dificultat en la parla o en empassar, i visió doble i borrosa, que pot continuar amb debilitat progressiva i acabar en paràlisi. La recuperació s'esdevé per la nova formació de terminals nerviosos que reinnervaran els músculs paralitzats, en un procés que pot durar setmanes o mesos. En els casos greus i si s'agafa a temps, es manté la persona intoxicada amb ventilació assistida fins a la seva recuperació.

També s'ha observat que la sensibilitat a les toxines botulíniques depèn del tipus de toxina (A-G) i que una mateixa toxina presenta diferències entre espècies animals. En l'espècie humana s'han detectat casos de botulisme deguts a la toxina botulínica de tipus A (la més potent de totes), B, E i algun cas a la de tipus F. Pel que fa a les toxines botulíniques de tipus C i D, no se n'ha detectat cap cas clar en humans, però sí, en canvi, en animals. La de tipus C és la principal responsable de brots de botulisme en aus. No obstant això, s'ha vist que la toxina botulínica de tipus C és activa en humans (Eleopra *et al.*, 1997) i fins i tot s'ha detectat un cas aïllat de botulisme infantil provocat per aquesta toxina (Oguma *et al.*, 1990). La soca que produeix la BoNT/G es va aïllar del terra de Sud-amèrica sense que fins al moment s'hagi detectat cap cas de botulisme per causa natural (Hatheway, 1989; Arnon *et al.*, 2001).

A part de les diferències mencionades més amunt, totes les neurotoxines clostridials (NTC) presenten una estructura molecular semblant i bloquegen la secreció del neurotransmissor mitjançant una activitat proteolítica específica dependent de zinc sobre proteïnes SNARE presents a les terminacions nervioses. S'ha demostrat que aquestes proteïnes són essencials per a l'exocitosi de vesícules sinàptiques, tal com veurem més endavant.

## ESTRUCTURA MOLECULAR

El model d'acció de les NTC està molt relacionat amb la seva estructura molecular. Les NTC se sintetitzen en forma inactiva com una proteïna de cadena única d'uns 150 kDa. La forma activa es genera després d'una proteòlisi específica, aproximadament a un terç de la seva longitud des de l'extrem amínic, de manera que s'obtenen dues cadenes, una d'aproximadament 100 kDa, anomenada *cadena pesada* (*heavy chain* o HC) i l'altra d'aproximadament 50 kDa, que es coneix com a *cadena lleugera* (*light chain* o LC).

La proteasa responsable de l'activació de la neurotoxina la pot produir el mateix bacteri (com en el cas de la TeTx, la BoNT/A o la BoNT/B), que ja sintetitza la neurotoxina activa, o pot no ser així, com en el cas de la BoNT/E, en què l'activació es realitza durant el pas pel tub digestiu (DasGupta, 1989). Les dues cadenes es mantenen unides per un únic pont disulfur (figura 1), que si es redueix provoca la separació de les dues cadenes i la consegüent inactivació de les neurotoxines.

Alhora, la cadena pesada està formada per dos dominis ben diferenciats i de pes molecular semblant, que es poden separar amb papaïna, i que tenen un significat funcional diferent en el mecanisme d'acció de les neurotoxines.

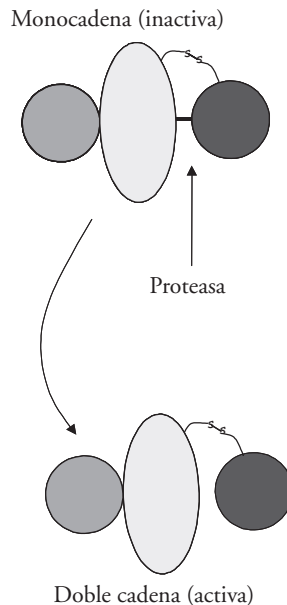


FIGURA 1. Esquema de l'estructura general de les neurotoxines clostridials.

Així doncs, l'estructura terciària de les NTC està formada per tres dominis diferents, cada un d'aproximadament 50 kDa: l'extrem carboxílic de la cadena pesada (Hc), l'extrem amínic de la mateixa cadena (Hn) i la cadena lleugera. Cada domini és responsable d'un pas en el camí que segueixen les neurotoxines per a la intoxicació dels terminals nerviosos.

En la seva seqüència d'acció, les neurotoxines segueixen inicialment un patró que comparteixen amb les toxines anomenades *de tipus AB*. La toxina colèrica, diftèrica i *Ricinus*, a més de les clostridials, en són una mostra (Rappuoli i Montecucco, 1997). Aquest tipus de toxines estan formades per dos dominis diferenciats, un domini (el B) s'encarrega de la unió selectiva i l'entrada a l'interior de la cèl·lula, i l'altre domini (l'A) és responsable de l'acció tòxica, habitualment a través d'una activitat enzimàtica.

En el cas de les NTC es diferencien, com s'ha dit anteriorment, fins a tres dominis, de manera que el pas d'unió i entrada a l'interior de la cèl·lula es considera per separat del d'entrada al citosol o translocació.

Així, en el primer pas de la intoxicació, les neurotoxines s'uneixen a la membrana presinàptica del terminal nerviós de la motoneurona; en el segon, són internalitzades pel mecanisme d'endocitosi per mitjà de receptor; en el tercer, l'acidificació de l'endosoma promou la formació d'un porus i la translocació del domini catalític (cadena lleugera) al citosol, on tindrà accés a la proteïna SNARE per procedir al quart i definitiu pas, la seva proteòlisi i la inhibició de la secreció (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco i Schiavo, 1995; Pellizzari *et al.*, 1999; Singh, 2000) (figura 2).

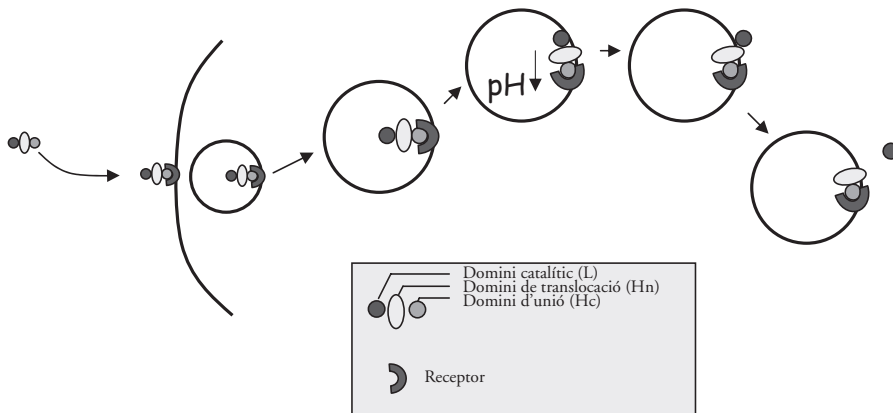


FIGURA 2. Esquema dels passos que segueixen les neurotoxines clostridials en la intoxicació de les terminacions nervioses: unió a la membrana presinàptica, internalització per endocitosi i translocació al citosol de la cadena lleugera.

L'estructura tridimensional de la BoNT/A va ser la primera a ser descrita a una elevada resolució (Lacy *et al.*, 1998). Altres neurotoxines o part d'aquestes han estat també resoltes (Umland *et al.*, 1998; Swaminathan i Eswaramoorthy, 2000; Hanson i Stevens, 2000; Emsley *et al.*, 2000; Fotinou *et al.*, 2001), de manera que s'observa una elevada semblança entre les unes i les altres. Es pot considerar, doncs, la BoNT/A com a model de l'estructura general per a la resta de les NTC.

#### DOMINI D'UNIÓ (Hc)

El fragment Hc de les NTC és el responsable del reconeixement i unió de les neurotoxines a les terminacions nervioses (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco i Schiavo, 1995; Pellizzari *et al.*, 1999; Lalli *et al.*, 1999). El domini d'unió consisteix en dos subdominis, formats predominantment per làmines- $\beta$  i connectats per una hèlix- $\alpha$  prominent. El domini d'unió s'allunya del llarg eix helicoidal del domini de translocació, sense que es produeixi contacte directe entre els dominis carboxílic i de translocació. Aquesta és l'estructura comuna a totes les NTC, amb algunes diferències en les nanses exteriors (Lacy *et al.*, 1998; Lacy i Stevens, 1999). Comparant els dominis d'unió de la TeTx i la BoNT/A, es pot trobar més homologia entre les seqüències dels subdominis N-terminal que entre les dels C-terminal (Lacy *et al.*, 1998; Lacy i Stevens, 1999). Aquestes diferències en les seqüències d'aminoàcids entre les neurotoxines podrien ser les responsables de les diferències observades en la unió i el transport que s'han trobat, principalment entre les BoNT i la TeTx (Lacy i Stevens, 1999; Ginalska *et al.*, 2000).

Es pensa que la unió de les neurotoxines clostridials a la membrana presinàptica es pot realitzar per un model de «doble receptor», en què intervenen polisialogangliòsids i un receptor proteic que encara no s'ha identificat. En aquest model, les NTC reconeixrien un polisialogangliòsid present a la membrana presinàptica i s'hi unirien inicialment amb baixa afinitat. Després, es mourien lateralment per la membrana fins a trobar un receptor proteic de més alta afinitat, que seria responsable de la seva internalització per endocitosi (Montecucco, 1986).

La regió responsable de la unió a gangliòsids ha estat localitzada en els trenta residus de l'extrem carboxílic a la BoNT/A (Shone *et al.*, 1985), a la TeTx (Shapiro *et al.*, 1997) i a la BoNT/E (Kubota *et al.*, 1997). També l'extrem més carboxílic és el responsable de la unió de la TeTx a una proteïna de baix pes molecular (15kDa, identificada com a proteïna Thy-1, que es troba a *lipid rafts*) present a línies cel·lulars neuronals i motoneurons (Herrerros *et al.*, 2000, 2001).

Fins ara no s'ha pogut aïllar el receptor proteic funcional per a les diferents neurotoxines, encara que han sorgit alguns candidats (vegeu la taula 1). En canvi, ha quedat ben establerta la unió selectiva de les neurotoxines a diferents tipus de



gangliòsids (Ahnert-Hilger i Bigalke, 1995; Bullens *et al.*, 2002). La identificació dels receptors proteics de les neurotoxines ha estat i és un tema molt estudiat, ja que es consideren molècules específiques presents a la membrana presinàptica que representen vies d'entrada als terminals nerviosos i fins i tot al sistema nerviós central en el cas de la TeTx (Lalli i Schiaro, 2002).

A continuació es presenta una taula on s'indiquen algunes de les troballes més significatives sobre la caracterització dels receptors de les NTC.

TAULA 1. *Caracterització bioquímica dels llocs d'unió de les neurotoxines clostridials*

<i>Toxina</i>	<i>Molècula on s'uneix</i>	<i>Referències</i>
TeTx	Gangliòsids i proteïna	Yavin <i>et al.</i> , 1981 Yavin <i>et al.</i> , 1983 Parton <i>et al.</i> , 1988 Lazarovi i Yavin, 1986
TeTx	Gangliòsids (GD1b i GT1b)	Critchley <i>et al.</i> , 1986 Rogers i Snyder, 1981
TeTx	Proteïna de 20 kDa	Schiavo <i>et al.</i> , 1991
Fragment Hc, TeTx	Thy-1 (proteïna) i gangliòsids	Herreros <i>et al.</i> , 2000 Herreros <i>et al.</i> , 2001
TeTx, BoNT/A, B i E	Gangliòsids (GT1b)	Schengrund <i>et al.</i> , 1991
BoN/TA	Gangliòsids (GT1b)	Kitamura <i>et al.</i> , 1980
BoNT/A	Proteïna de 140 kDa	Blasi <i>et al.</i> , 1992
BoNT/A i E	Sinaptotagmina I	Li i Singh, 1998
BoNT/B	Gangliòsids (GD1a o GT1b) Sinaptotagmina	Nishiki <i>et al.</i> , 1994 Nishiki <i>et al.</i> , 1996 Kozaki <i>et al.</i> , 1998
BoNT/B	Gangliòsids (estructura tridimensional)	Hanson i Stevens, 2000
BoNT/B, C1 i F	Gangliòsids (GD1a, GD1b i GT1b)	Ochanda <i>et al.</i> , 1986
BoNT/C1	Gangliòsid (GT1b) i possible proteïna	Agui <i>et al.</i> , 1985

## DOMINI DE TRANSLOCACIÓ (FRAGMENT HN)

Després de l'endocitosi, s'ha suggerit que el pH àcid de l'endosoma provoca un canvi conformacional del domini de translocació, el qual formaria un porus o canal a la membrana. Amb aquest canvi es provocaria la translocació de la cadena lleugera o domini catalític al citosol a través del canal format pel domini N-terminal de la cadena pesada (Hn).

El domini de translocació té dues hèlixs  $\alpha$  i un cinturó o banda de cinquanta-quatre residus que envolta el domini catalític. En aquest cas, manté ocult i inaccessible el lloc catalític de la cadena lleugera per al substrat (la proteïna SNARE diana) i per tant es fa necessària la separació del domini de translocació del catalític perquè aquest sigui funcional (Lacy *et al.*, 1998; Lacy i Stevens, 1999). Aquest és el cas de la BoNT/A, però en altres neurotoxines botulíniques en què aquesta banda no emmascara el domini catalític, la separació dels fragments no seria necessària per a l'activitat proteolítica de la cadena lleugera (Swaminathan i Eswaramoorthy, 2000).

Hi ha evidència experimental que el domini de translocació forma canals en membranes artificials (Blaustein *et al.*, 1987; Donovan i Middlebrook, 1986; Hoch *et al.*, 1985) i en membranes cel·lulars (Sheridan, 1998) sempre que es trobi en un ambient àcid separat d'un de neutre per la membrana. Recentment s'ha comparat el mecanisme de translocació de la cadena lleugera amb el dels canals conductors/translocadors del reticle endoplasmàtic, mitocondris i cloroplasts (Koriazova i Montal, 2003).

## DOMINI CATALÍTIC (CADENA L)

Durant molt de temps es va intentar esbrinar el mecanisme que utilitzaven les neurotoxines clostridials per inhibir, de manera tan potent i selectiva, la secreció del neurotransmissor. Durant molts anys es van realitzar una sèrie d'estudis que, encara que en general no van donar resultats positius, van deixar clar que les neurotoxines actuaven directament en el mecanisme molecular de la secreció, és a dir, sobre l'exocitosi en si de les vesícules sinàptiques. Així, es va demostrar que les neurotoxines no intervingien en la captació de neurotransmissors o els seus precursors, ni en la seva síntesi ni emmagatzemament a les vesícules, i que tampoc no interferien en el potencial d'acció o en el de membrana, ni en cap canal iònic dels que es van estudiar. Tampoc no afectaven la integritat del terminal nerviós, ni la seva activitat semblava que provoqués la mort neuronal, ni presentaven una activitat enzimàtica semblant a les descrites per altres toxines, com la ribosilació d'ADP (Simpson, 1989; Dreyer, 1989). No es va tenir una pista concreta sobre el mecanisme molecular d'acció de les cadenes lleugeres fins que es va descobrir que contenien una se-

qüència comuna a les metal·loproteases dependents de zinc (Jongeneel *et al.*, 1989; Kurazono *et al.*, 1992). A partir de llavors es va demostrar que la cadena lleugera unia ions de zinc i que aquests eren essencials per a la seva funció inhibidora de la neurotransmissió (Schiavo *et al.*, 1992a; Rossetto *et al.*, 1995). Poc després es va demostrar la seva activitat proteolítica i es van identificar els seus substrats.

TAULA 2. *Relació de les neurotoxines clostridials i els seus substrats moleculars*

<i>Neurotoxina</i>	<i>Substrat</i>	<i>Posició del tall</i>	<i>Referències</i>
TeTx	Sinaptobrevina/VAMP 2 Cel·lubrevina	Q <sup>76</sup> F <sup>77</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1992b McMahon <i>et al.</i> , 1993
BoNT/A	SNAP-25	Q <sup>197</sup> R <sup>198</sup>	Blasi <i>et al.</i> , 1993a
BoNT/B	Sinaptobrevina/VAMP 2	Q <sup>76</sup> F <sup>77</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1992b
BoNT/C1	Sintaxina-1A Sintaxina-1B SNAP-25	L <sup>253</sup> A <sup>254</sup> L <sup>252</sup> A <sup>253</sup> R <sup>198</sup> A <sup>199</sup>	Blasi <i>et al.</i> , 1993b Schiavo <i>et al.</i> , 1995 Williamson <i>et al.</i> , 1996
BoNT/D	Sinaptobrevina/VAMP 2 Cel·lubrevina	K <sup>59</sup> L <sup>60</sup>	Yamasaki <i>et al.</i> , 1994a
BoNT/E	SNAP-25	R <sup>180</sup> I <sup>181</sup>	Binz <i>et al.</i> , 1994
BoNT/F	Sinaptobrevina/VAMP 1 i 2 Cel·lubrevina	Q <sup>58</sup> K <sup>59</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1993 Yamasaki <i>et al.</i> , 1994a
BoNT/G	Sinaptobrevina/VAMP 1 i 2 Cel·lubrevina	A <sup>81</sup> A <sup>82</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1994 Yamasaki <i>et al.</i> , 1994b

L'activitat proteàsica de les neurotoxines és molt específica. Cadascuna efectua un únic tall proteolític sobre una única proteïna (exceptuant la BoNT/C1, que actua sobre dues). Tal com mostra la taula 2, els substrats de les neurotoxines tan sols són tres proteïnes (la Sinaptobrevina/VAMP, la SNAP-25 i la Sintaxina), de manera que una mateixa proteïna és el substrat de més d'una neurotoxina encara que, exceptuant la TeTx i la BoNT/B, el lloc de tall sigui diferent.

Tal com s'ha esmentat, l'acció inhibidora de les neurotoxines clostridials sobre la secreció del neurotransmissor és molt específica, sensible i potent, i es realitza directament sobre la maquinària neurosecretora, responsable de la fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana plasmàtica. Així doncs, els substrats de les neurotoxines clostridials es van definir com a components de la maquinària neurosecretora que eren essencials per a la neurosecreció.

El mateix any en què es va descobrir el primer substrat de les neurotoxines (la

Sinaptobrevina/VAMP per a la TeTx i la BoNT/B) es van descriure una sèrie de proteïnes que formen el nucli del mecanisme de fusió de membranes. Aquestes proteïnes es van anomenar *SNARE* («receptors de SNAP») i curiosament es va veure que eren les mateixes que els substrats de les neurotoxines.

#### ELS SUBSTRATS DE LES NEUROTOXINES CLOSTRIDIALS I LA MAQUINÀRIA NEUROSECRETORA

La fusió de la vesícula sinàptica amb la membrana presinàptica representa el punt culminant en la neurosecreció: la sortida del neurotransmissor cap a l'element postsinàptic, on es troba el seu receptor.

En els darrers anys s'han anat definint els elements que formen la maquinària neurosecretora, aquella que intervé en la fusió regulada per calci de les vesícules sinàptiques amb la membrana presinàptica. Els substrats de les neurotoxines clostridials, les proteïnes SNARE, han esdevingut el centre al voltant del qual s'han anat perfilant la resta d'elements d'aquesta maquinària, ja que estan directament involucrades en la fusió de les membranes vesicular i plasmàtica. Són considerades com a catalitzadores del fenomen de fusió de membranes ja que, de manera seqüencial, recluten un seguit de proteïnes, en gran part citosòliques, que regulen el procés de fusió (Jahn *et al.*, 2003).

Rothman i els seus col·laboradors van descriure una sèrie de factors citosòlics que eren essencials per al trànsit i la fusió de compartiments intracel·lulars (Wilson *et al.*, 1992; Rothman, 1994, 1996). Aquests elements eren l'NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*, una proteïna amb activitat ATPàsica) i les proteïnes SNAP ( $\alpha$ - i  $\gamma$ -, *soluble NSF attachment proteins*), que s'unien al primer. Segons la seva hipòtesi, dos compartiments de membrana cel·lulars, el donador i l'acceptor, es reconeixen per unió específica de proteïnes que tenen a la seva superfície. Després de la seva unió, el complex que es forma recluta els factors citosòlics SNAP i NSF, situació que provoca l'hidròlisi d'ATP per l'NSF, i causa la fusió dels dos compartiments (figura 3). Mitjançant una columna d'afinitat que contenia NSF i SNAP, van poder aïllar les proteïnes dels compartiments de membrana a partir d'un extracte de cervell de bou (Söllner *et al.*, 1993). Les proteïnes eren la Sinaptobrevina/VAMP, la SNAP-25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*) i la Sintaxina-1 (A i B), a les quals van anomenar *SNARE*, perquè es comportaven com a proteïnes receptores del factor citosòlic SNAP (*SNAP-receptors*). Com que la Sinaptobrevina és una proteïna de la membrana de la vesícula sinàptica, considerada com a compartiment donador, es va definir com a v-SNARE.

La SNAP-25 i la Sintaxina-1, en estar en el compartiment acceptor (*target*), es van definir com a t-SNARE. A partir d'aquests descobriments es va perfilar la hipòtesi inicial SNARE per explicar el mecanisme de fusió (figura 3). Des de la primera

descripció, s'han anat trobant proteïnes SNARE en pràcticament tots els fenòmens de trànsit intracel·lular de membranes, de manera que les proteïnes SNARE formen una superfamília de més de trenta-cinc membres en cèl·lules de mamífer (Chen i Scheller, 2001; Bock *et al.*, 2001). Per tant, les proteïnes SNARE no estan només involucrades en la secreció regulada del neurotransmissor, sinó també en la majoria dels processos de fusió de compartiments intracel·lulars. Dintre de la superfamília, hi ha la tendència, basant-se en homologies entre els diferents membres, a catalogar-les en la família de la Sinaptobrevina/VAMP, de la SNAP-25 i de la Syntaxina, ja que les proteïnes SNARE que es van descriure originalment són les més ben caracteritzades i les que s'han anat utilitzant com a model.

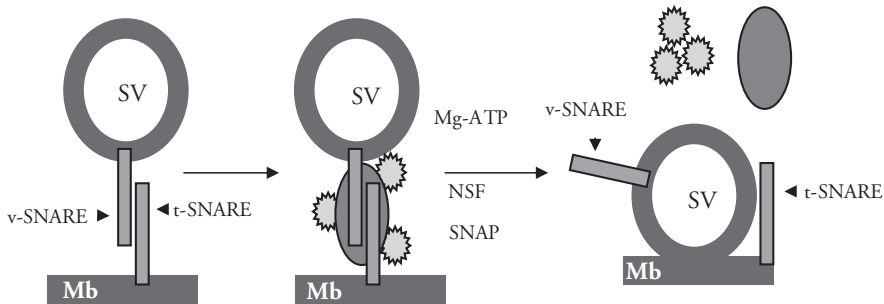


FIGURA 3. Esquema que mostra la hipòtesi SNARE que es va proposar inicialment.

En l'esquema inicial les proteïnes SNARE eren responsables del reconeixement i la unió dels dos compartiments, i formaven un complex per associació antiparal·lela. La seva dissociació per acció de l'NSF promouria la fusió de membranes. No obstant això, aquest esquema ha variat molt des de la resolució de l'estructura tridimensional del nucli del complex SNARE (Jahn *et al.*, 2003).

L'estructura tridimensional la van resoldre l'any 1998 els grups de Reinhard Jahn i Axel Brunger (Sutton *et al.*, 1998). De l'estructura es van extreure una sèrie de conclusions:

- El complex està format per quatre segments: un de Sinaptobrevina/VAMP, un altre de Syntaxina-1, i els altres dos de SNAP-25.
- Els segments es disposen en sentit paral·lel, és a dir, amb els extrems N-terminal en un mateix costat i els C-terminals a l'altre, en una estructura helicoidal. Quan cada SNARE es troba en el seu compartiment es forma un complex de tipus *trans*-. Després de la fusió, totes les proteïnes SNARE estan en la mateixa membrana fent un complex de tipus *cis*-.

- El nucli del complex és molt estable i resistent a detergents denaturants com l'SDS.
- El complex es forma pels extrems amínics, amb un moviment cremallera cap a l'extrem carboxílic. D'aquesta manera, les membranes dels dos compartiments es van apropant fins al punt de poder-se fusionar en el cas que no existeixi cap mecanisme de control (Weber *et al.*, 1998).

Poc després es va proposar que l'acció disgregadora de l'NSF (amb SNAP) es realitzés sobre el complex *cis-*, després de la fusió de membranes, per tal d'alliberar els respectius components del complex SNARE i que poguessin tornar a ser utilitzats en un altre cicle de fusió (Jahn *et al.*, 2003).

## EL CICLE VESICULAR I LA FORMACIÓ DEL COMPLEX SNARE

Les vesícules sinàptiques són produïdes en el cos neuronal i posteriorment transportades al terminal nerviós on, després d'una primera fusió amb la membrana presinàptica, entren en un cicle de reutilització, de manera que una vesícula sinàptica pot intervenir en la secreció del neurotransmissor diverses vegades (Sudhof, 1995). La fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana plasmàtica, base de la neurosecreció, és un pas més d'aquest cicle. L'any 1995, Thomas Südhof va esquematitzar els diferents passos que segueixen les vesícules sinàptiques en el seu cicle, agafant com a punt de partida la nova formació de la vesícula a partir d'un compartiment endosomal (Sudhof, 1995). Malgrat algunes modificacions, aquest esquema encara és vigent i ha servit de model per estudiar cada un dels passos que formen el cicle vesicular.

L'esquema adjunt (figura 4) representa una modificació de l'original on es resalten els passos previs a la fusió de la vesícula sinàptica. De l'esquema inicial es desprèn que hi ha una població de vesícules adherida físicament a la membrana plasmàtica i una altra d'allunyada o, si més no, en un segon pla, parcialment o totalment associada al citoesquelet del terminal nerviós.

De les vesícules que estan físicament en contacte amb la membrana plasmàtica, no totes estan preparades per a l'exocitosi immediata, de manera que es pot parlar d'una diversitat funcional de vesícules adherides a la membrana plasmàtica. Aquelles que estan llestes per a la secreció formen el grup preparat per a la secreció (RRP, de l'anglès *release-ready pool*). S'entén que aquestes vesícules tenen el complex SNARE totalment format i preparat per al pas final de la fusió, però que hi ha algun mecanisme que probablement actua com a sensor del calci intern i que el manté aturat (Xu *et al.*, 1998; Martin, 2002; Chapman, 2002). Per tant, ja que la formació del complex SNARE és necessària i suficient per a la fusió de membranes, els passos previs a l'exocitosi estan destinats a la regulació i correcta formació d'aquest complex.

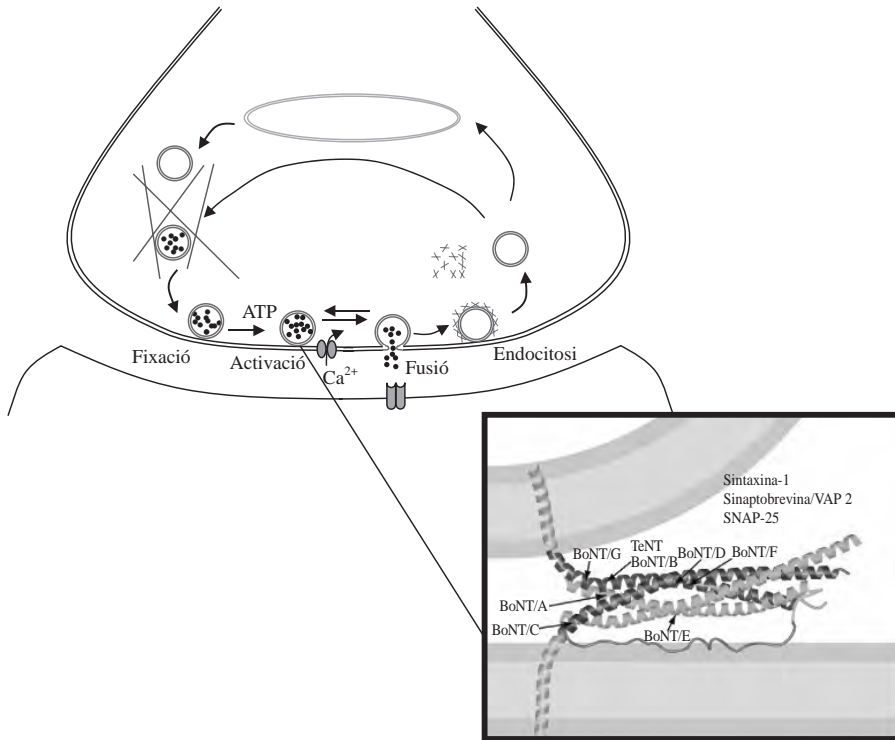


FIGURA 4. Representació esquemàtica del cicle vesicular en la terminació nerviosa i detall del complex SNARE.

Font: Sutton *et al.* (1998), *Nature*, núm. 395, p. 347-353.

Aquests passos previs són la fixació de la vesícula carregada amb el neurotransmissor a la membrana presinàptica (*docking*) i la seva preactivació (*priming*), que fa que la vesícula es torni competent per a la seva fusió, i formi part del grup de vesícules llestes per a la secreció. El temps que passa des de l'entrada de calci a l'interior del terminal, per l'obertura dels canals dependents de voltatge, fins a la fusió de les vesícules sinàptiques, es considera que és massa curt per realitzar tots els passos previs a la fusió, de manera que la vesícula sinàptica ja ha d'estar preparada en el moment precís de l'estímul (Almers i Tse 1990; Bruns i Jahn, 1995; Neher, 1998).

Des de fa anys s'han invertit grans esforços a assignar les proteïnes presents als terminals nerviosos a cada un dels passos del cicle vesicular. Existeixen excel·lents revisions sobre el tema on el lector interessat pot adreçar-se (Augustine *et al.*, 1999; Jahn i Südhof, 1999; Brunger, 2001; Martin, 2002; Jahn *et al.*, 2003).

Darrerament, s'ha centrat especial atenció en els dos passos previs a la fusió, aquells que regulen el volum de vesícules llestes per a la secreció.

El plantejament general és que les proteïnes SNARE estan involucrades en un cicle de formació i segregació del complex que segueix el de fusió vesicular (Jahn *et al.*, 2002). En aquest cicle intervenen, a més de les proteïnes SNARE, proteïnes moduladores del procés, algunes de les quals s'han anat identificant com a segrestadores de les proteïnes SNARE, que eviten la formació del complex. Entre aquestes s'ha descrit la Sinaptofisina per a la Sinaptobrevina (Calakos i Scheller, 1994; Edelman *et al.*, 1995) i la Sec1/Munc18 per a la Sintaxina (Pevsner *et al.*, 1994; Dulubova *et al.*, 1999).

La Sintaxina sembla que té un paper clau en la modulació de la formació del complex SNARE. Es pot replegar sobre si mateixa, en la forma que s'anomena *tancada* i que no pot formar complexos, o bé es pot trobar en la forma *oberta*, desplegada, capaç de formar complexos SNARE. La Sec1/Munc18 s'uneix a la Sintaxina i la manté en la seva forma tancada, de manera que impedeix la seva interacció amb la SNAP-25 i la Sinaptobrevina/VAMP. La unió de la Sec1/Munc18 amb la Sintaxina ha estat especialment estudiada i (en resum) s'ha descrit que:

- la Sec1/Munc18 interacciona amb la Sintaxina-1 i forma un complex heterodimèric del qual s'ha determinat l'estructura tridimensional (Misura *et al.*, 2000),
- la unió de la Munc18 amb la Sintaxina inhibeix la interacció d'aquesta amb la Sinaptobrevina i la SNAP-25, de manera que es bloqueja la formació de complexos SNARE (Perez-Branguli *et al.*, 2002),
- els ratolins mutants deficients per a aquesta proteïna tenen abolida la secreció de neurotransmissor, tant l'evocada com l'espontània, de manera que aquesta proteïna és essencial per al procés de secreció (Verhage *et al.*, 2000),
- La Munc18 està implicada en el pas de fixació de les vesícules secretores a la membrana plasmàtica (Voets *et al.*, 2001).

Hi ha altres proteïnes que intervenen en l'activació de les vesícules sinàptiques (*priming*, o pas previ a la fusió de membranes), que són capaces de desplaçar la Sec1/Munc18 de la seva unió amb la Sintaxina-1 i així permetre (i fomentar) la formació del complex SNARE. Entre aquestes s'han descrit la Tomosina, la Munc13, i la RIM (Fujita *et al.*, 1998; Brose *et al.*, 2000; Martin, 2002; Rizo i Sudhof, 2002).



## LA UTILITZACIÓ DE LA TOXINA BOTULÍNICA COM A EINA TERAPÈUTICA

Abans de prosseguir, cal tenir en compte que encara que es mencionin i s'agafin com a referència les aprovacions o no per part de la FDA (Food and Drug Administration dels Estats Units) sobre l'ús terapèutic de la toxina botulínica, cada país té la seva legislació, que pot variar, i que s'ha de consultar abans de qualsevol aplicació de les toxines.

Durant les guerres napoleòniques, al ducat de Württemberg a Stuttgart, es va observar l'augment de morts per intoxicacions atribuïdes al consum de menjar en mal estat, concretament, de salsitxes fumades. Justinus Kerner (metge i poeta, 1786-1862) va realitzar la primera descripció clínica detallada del botulisme, així com del seu possible potencial per al tractament d'algunes alteracions d'origen nerviós o muscular. Va demostrar la relació entre la malaltia i el menjar en mal estat i inicialment va pensar que era una toxina present en el greix (l'anomenava *veri de les salsitxes* o *del greix*). Va deduir, a partir dels símptomes clínics i de les seves observacions experimentals, que la toxina actuava suspenent la transmissió al sistema nerviós perifèric motor i al sistema simpàtic i parasimpàtic, però deixant la transmissió sensorial intacta. També va proposar l'ús de la toxina com a teràpia en aquells casos en què en el sistema nerviós, sobretot el simpàtic, es trobava hiperactivat i hiperexcitat, i en els casos d'hipersecreció de fluids corporals, entre altres aplicacions. Arran dels seus estudis, al botulisme (en aquella època, la intoxicació per salsitxes) se'l coneixia com a *malaltia de Kerner*. No va ser fins a l'any 1870 que un altre metge alemany, Müller, li va donar el nom de *botulisme* a la intoxicació per salsitxes (del llatí *botulus*, salsitxa). El 1895, a partir d'un episodi de botulisme causat pel consum de pernil en conserva a Ellezelles (Bèlgica), Emile-Pierre van Ermengem, professor de bacteriologia a la Universitat de Ghent que havia estat al laboratori de Robert Koch, va relacionar, aïllar i identificar un bacteri gram positiu, anaeròbic i productor d'espores com a causant del botulisme, i l'anomenà inicialment *Bacillus botulinus* (Erbguth i Naumann, 1999). Aquest nom al cap d'uns anys va ser canviat pel de *Clostridium botulinum*, que s'ha mantingut fins al moment. L'any 1949 es va descriure que la toxina botulínica (de tipus A) actuava sobre la unió neuromuscular inhibint la secreció d'acetilcolina (Burgen *et al.*, 1949).

La toxina botulínica de tipus A va ser purificada al començament de la dècada dels anys vint del segle passat pel doctor Herman Sommer de la Universitat de Califòrnia, i cristal·litzada en forma de complex el 1946 pel doctor Edward J. Schantz de la Universitat de Wisconsin a Madison. Això va permetre un estudi més detallat de la toxina botulínica de tipus A, tant del seu mecanisme d'acció com de la seva possible aplicació terapèutica. L'any 1979, el doctor Schantz va purificar una remesa de toxina botulínica cristal·lina, que ha estat l'única que ha rebut l'aprovació de

la FDA per al seu ús (comercialitzada ara com a Botox) fins a la nova remesa aprovada el 1997 (Klein, 2002). Encara que Justinus Kerner ja va suggerir els possibles usos terapèutics de la toxina botulínica al primer quart del segle XIX, no va ser fins al 1973 que el doctor Alan Scott de la Smitt-Kettlewell Eye Research Foundation a San Francisco, utilitzant la toxina purificada pel doctor Schantz, va realitzar els primers experiments per al tractament de l'estrabisme en micos, i el 1978, en voluntaris humans. El 1989 la FDA va aprovar la utilització de la toxina botulínica de tipus A amb el nom d'Oculinum (Oculinum, inc., fundada pel doctor Alan Scott) per al tractament de l'estrabisme i el blefarospasme. Oculinum va ser adquirit per la companyia Allergan per a la seva distribució i futures aplicacions i poc després va canviar al nom actual de Botox. La utilització amb èxit de la toxina botulínica de tipus A per al tractament d'aquestes alteracions neuromusculars va ser el començament per a l'ús més ampli d'aquesta toxina en les afeccions musculars caracteritzades per la contracció muscular involuntària. A finals de l'any 2000, la FDA va aprovar la utilització de la toxina botulínica de tipus A (Botox) per al tractament de la distonia cervical en adults, per corregir la posició anormal del cap i el dolor de coll associat. Els anys vuitanta, la doctora Jean Carruthers, oftalmòloga canadenca, es va adonar de l'aspecte més relaxat que tenien els pacients tractats amb toxina botulínica per al blefarospasme, i juntament amb el seu marit, van iniciar els estudis per al tractament d'arrugues facials (Carruthers, 2002). Recentment, la FDA ha aprovat la utilització de la toxina botulínica de tipus A (Botox Cosmetics) en el camp de la cosmètica, per a l'eliminació d'arrugues en adults provocades per la contracció prolongada de músculs facials, possiblement una de les aplicacions més sorprenents de la toxina més potent que existeix.

La utilització de la toxina botulínica de tipus A s'ha anat estenent a altres alteracions en què la relaxació muscular o la inhibició de la secreció d'acetilcolina dels terminals nerviosos perifèrics pot suposar una millora dels símptomes. Algunes de les aplicacions que s'han descrit inclouen l'espasticitat de la laringe (disfonia espasmòdica), tremolors a les mans i espasmes als músculs de l'esquena i les extremitats, fissura anal, músculs distònics o espàstics a la paràlisi cerebral (aquest ús ha estat aprovat a Europa però no encara als Estats Units) o acalàsia esofàgica, entre d'altres.

A començaments dels anys noranta, es va observar que els pacients tractats amb la toxina patien menys dolors de cap i per tant s'està considerant i provant el seu ús per al tractament de la migranya i altres dolors associats a trastorns musculars, com el dolor miofacial, la fibromiàlgia, el mal d'esquena, d'extremitats...

També s'ha provat amb èxit la utilització de la toxina botulínica de tipus A en el camp de la hipersecreció glandular, com la hiperhidrosi (excessiva sudoració) o el ptilisme (hipersalivació).

Finalment, la utilització de la toxina botulínica en casos d'obesitat està en fase experimental inicial, però se n'ha referenciat alguna experiència i s'intenta empen-

dre estudis pilot per avaluar-ne l'eficàcia (Rollnik *et al.*, 2003). Els resultats obtinguts en animals fan pensar que la injecció de toxina botulínica a la paret gàstrica pot inhibir la seva musculatura, i provocar un alentiment en el buidat gàstric i una acceleració de la sensació de sacietat. D'aquesta manera es pot reduir el pes corporal en reduir la quantitat de menjar ingerit.

Actualment, la toxina botulínica de tipus A es comercialitza amb el nom de Botox (de la casa Allergan, amb seu als Estats Units) i Dysport (de la casa Ipsen, Ltd., amb seu a Anglaterra). Aquestes toxines s'apliquen per injeccions molt localitzades. L'efecte és temporal, que pot ser de setmanes a uns mesos, depenent del temps que es triga a regenerar els terminals, de manera que per mantenir-ne els efectes s'han de realitzar noves injeccions. Un dels problemes associats a aquest tipus de tractament, i que en limita l'ús, és la generació d'anticossos contra la toxina, de manera que en aquests casos se n'ha d'injectar més dosi per obtenir el mateix efecte, fins al punt que pot arribar a ser inefectiva. Per resoldre aquest problema s'utilitzen bàsicament dues estratègies. Una és la de produir i experimentar toxines botulíniques d'altres tipus (Ludlow *et al.*, 1992; Eleopra *et al.*, 1997, 1998). D'entre la resta de toxines botulíniques, fins al moment tan sols s'ha arribat a comercialitzar a partir de l'any 2000 la de tipus B, per al tractament de la distonia cervical o torticolí espàstica (nom comercial, Myobloc, de la casa Elan). La resta de toxines botulíniques s'han anat estudiant per a la seva aplicació terapèutica sense que fins al moment presentin una bona alternativa a la de tipus A, ja que tenen poca eficàcia o especificitat per al múscul humà i/o menys temps d'activitat després de la injecció (Pellizzari *et al.*, 1999). L'altra estratègia consisteix a modificar les toxines per obtenir preparacions més pures, menys antigèniques, amb més activitat i/o amb efecte més durador.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUI, T.; SYUTO, B.; OGUMA, K.; IIDA, H.; KUBO, S. (1985). «The structural relation between the antigenic determinants to monoclonal antibodies and binding sites to rat brain synaptosomes and GT1b ganglioside in *Clostridium botulinum* type C neurotoxin». *J. Biochem.* [Tokyo], núm. 97, p. 213-218.
- AHNERT-HILGER, G.; BIGALKE, H. (1995). «Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning». *Prog. Neurobiol.*, núm. 46, p. 83-96.
- ALMERS, W.; TSE, F. W. (1990). «Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis?». *Neuron*, núm. 4, p. 813-818.
- ARNON, S. S.; MIDURA, T. F.; DAMUS, K.; THOMPSON, B.; WOOD, R. M.; CHIN, J. (1979). «Honey and other environmental risk factors for infant botulism». *J. Pediatr.*, núm. 94, p. 331-336.
- ARNON, S. S.; SCHECHTER, R.; INGLESBY, T. V.; HENDERSON, D. A.; BARTLETT, J. G.; ASCHER, M. S.; EITZEN, E.; FINE, A. D.; HAUER, J.; LAYTON, M.; LILLIBRIDGE, S.;

- OSTERHOLM, M. T.; O'TOOLE, T.; PARKER, G.; PERL, T. M.; RUSSELL, P. K.; SWERDLOW, D. L.; TONAT, K. (2001). «Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management». *JAMA*, núm. 285, p. 1059-1070.
- AUGUSTINE, G. J.; BURNS, M. E.; DEBELLO, W. M.; HILFIKER, S.; MORGAN, J. R.; SCHWEIZER, F. E.; TOKUMARU, H.; UYAHARA, K. (1999). «Proteins involved in synaptic vesicle trafficking». *J. Physiol.*, núm. 520 (1), p. 33-41.
- BIZZINI, B. (1989). «Axoplasmic transport and transsynaptic movement of tetanus toxin». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 203-229.
- BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; LINK, E.; BINZ, T.; YAMASAKI, S.; DE CAMILLI, P.; SUDHOF, T. C.; NIEMANN, H.; JAHN, R. (1993a). «Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25». *Nature*, núm. 365, p. 160-163.
- BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; YAMASAKI, S.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; JAHN, R. (1993b). «Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin». *EMBO J.*, núm. 12, p. 4821-4828.
- BLASI, J.; EGEA, G.; CASTIELLA, M. J.; ARRIBAS, M.; SOLSONA, C.; RICHARDSON, P. J.; MARSAL, J. (1992). «Binding of botulinum neurotoxin to pure cholinergic nerve terminals isolated from the electric organ of Torpedo». *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, núm. 90, p. 87-102.
- BLAUSTEIN, R. O.; GERMANN, W. J.; FINKELSTEIN, A.; DASGUPTA, B. R. (1987). «The N-terminal half of the heavy chain of botulinum type A neurotoxin forms channels in planar phospholipid bilayers». *FEBS Lett.*, núm. 226, p. 115-120.
- BOCK, J. B.; MATERN, H. T.; PEDEN, A. A.; SCHELLER, R. H. (2001). «A genomic perspective on membrane compartment organization». *Nature*, núm. 409, p. 839-841.
- BROSE, N.; ROSENEMUND, C.; RETTIG, J. (2000). «Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues». *Curr. Opin. Neurobiol.*, núm. 10, p. 303-311.
- BRUNGER, A. T. (2001). «Structural insights into the molecular mechanism of calcium-dependent vesicle-membrane fusion». *Curr. Opin. Struct. Biol.*, núm. 11, p. 163-173.
- BRUNS, D.; JAHN, R. (1995). «Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles». *Nature*, núm. 377, p. 62-65.
- BULLENS, R. W.; O'HANLON, G. M.; WAGNER, E.; MOLENAAR, P. C.; FURUKAWA, K.; PLOMP, J. J.; WILLISON, H. J. (2002). «Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function». *J. Neurosci.*, núm. 22, p. 6876-6884.
- BURGEN, A. S. V.; DICKENS, F.; ZATMAN, L. J. (1949). «The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction». *J. Physiol.*, núm. 109, p. 10-24.
- CALAKOS, N.; SCHELLER, R. H. (1994). «Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 24534-24537.
- CARRUTHERS, A. (2002). «Botulinum toxin type A: history and current cosmetic use in the upper face». *Dis. Mon.*, núm. 48, p. 299-322.
- CHAPMAN, E. R. (2002). «Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis?». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, núm. 3, p. 498-508.
- CHEN, Y. A.; SCHELLER, R. H. (2001). «SNARE-mediated membrane fusion». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, núm. 2, p. 98-106.

- CHERINGTON, M. (1998). «Clinical spectrum of botulism». *Muscle Nerve*, núm. 21, p. 701-710.
- CRITCHLEY, D. R.; HABIG, W. H.; FISHMAN, P. H. (1986). «Reevaluation of the role of gangliosides as receptors for tetanus toxin». *J. Neurochem.*, núm. 47, p. 213-222.
- DASGUPTA, B. R. (1989). «The Structure of botulinum neurotoxin». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 53-67.
- DONOVAN, J. J.; MIDDLEBROOK, J. L. (1986). «Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes». *Biochemistry*, núm. 25, p. 2872-2876.
- DREYER, F. (1989). «Peripheral actions of tetanus toxin». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 179-202.
- DULUBOVA, I.; SUGITA, S.; HILL, S.; HOSAKA, M.; FERNANDEZ, I.; SUDHOF, T. C.; RIZO, J. (1999). «A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18». *EMBO J.*, núm. 18, p. 4372-4382.
- EDELMANN, L.; HANSON, P. I.; CHAPMAN, E. R.; JAHN, R. (1995). «Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine». *EMBO J.*, núm. 14, p. 224-231.
- ELEOPRA, R.; TUGNOLI, V.; ROSSETTO, O.; MONTECUCCO, C.; DE GRANDIS, D. (1997). «Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human». *Neurosci. Lett.*, núm. 224, p. 91-94.
- (1998). «Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans». *Neurosci. Lett.*, núm. 256, p. 135-138.
- EMSLEY, P.; FOTINO, C.; BLACK, I.; FAIRWEATHER, N. F.; CHARLES, I. G.; WATTS, C.; HEWITT, E.; ISAACS, N. W. (2000). «The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding». *J. Biol. Chem.*, núm. 275, p. 8889-8894.
- ERBGUTH, F. J.; NAUMANN, M. (1999). «Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the «sausage poison»». *Neurology*, núm. 53, p. 1850-1853.
- FOTINO, C.; EMSLEY, P.; BLACK, I.; ANDO, H.; ISHIDA, H.; KISO, M.; SINHA, K. A.; FAIRWEATHER, N. F.; ISAACS, N. W. (2001). «The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin». *J. Biol. Chem.*, núm. 276, p. 32274-32281.
- FRANZ, D. R.; PITT, L. M.; CLAYTON, M. A.; HANES, M. A.; ROSE, K. J. (1993). «Efficacy of prophylactic and therapeutic administration of antitoxin for inhalation botulism». A: DASGUPTA, B. R. [ed.]. *Botulinum and tetanus neurotoxins. Neurotransmission and biomedical aspects*. Nova York: Plenum Press, p. 473-476.
- FUJITA, Y.; SHIRATAKI, H.; SAKISAKA, T.; ASAKURA, T.; OHYA, T.; KOTANI, H.; YOKOYAMA, S.; NISHIOKA, H.; MATSUURA, Y.; MIZOGUCHI, A.; SCHELLER, R. H.; TAKAI, Y. (1998). «Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process». *Neuron*, núm. 20, p. 905-915.
- GILL, D. M. (1982). «Bacterial toxins: a table of lethal amounts». *Microbiol. Rev.*, núm. 46, p. 86-94.
- GINALSKI, K.; VENCLOVAS, C.; LESYNG, B.; FIDELIS, K. (2000). «Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides

- residue level information about the putative ganglioside binding site». *FEBS Lett.*, núm. 482, p. 119-124.
- HANSON, M. A.; STEVENS, R. C. (2000). «Cocrystal structure of synaptobrevin-II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 Å resolution». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 7, p. 687-692.
- HATHEWAY, C. L. (1989). «Bacterial sources of clostridial neurotoxins». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 3-24.
- HERREROS, J.; LALLI, G.; MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. (2000). «Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons». *J. Neurochem.*, núm. 74, p. 1941-1950.
- HERREROS, J.; NG, T.; SCHIAVO, G. (2001). «Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons». *Mol. Biol. Cell*, núm. 12, p. 2947-2960.
- HOCH, D. H.; ROMERO-MIRA, M.; EHRLICH, B. E.; FINKELSTEIN, A.; DASGUPTA, B. R.; SIMPSON, L. L. (1985). «Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 82, p. 1692-1696.
- JAHN, R.; LANG, T.; SUDHOF, T. C. (2003). «Membrane fusion». *Cell*, núm. 112, p. 519-533.
- JAHN, R.; SUDHOF, T. C. (1999). «Membrane fusion and exocytosis». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 68, p. 863-911.
- JONGENEEL, C. V.; BOUVIER, J.; BAIROCH, A. (1989). «A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases». *FEBS Lett.*, núm. 242, p. 211-214.
- KITAMURA, M. (1976). «Binding of botulinum neurotoxin to the synaptosome fraction of rat brain». *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, núm. 295, p. 171-175.
- KLEIN, A. W. (2002). «Introduction. Botox». *Dis. Mon.*, núm. 48, p. 296-298.
- KORIAZOVA, L. K.; MONTAL, M. (2003). «Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 10, p. 13-18.
- KOZAKI, S.; KAMATA, Y.; WATARAI, S.; NISHIKI, T.; MOCHIDA, S. (1998). «Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins». *Microb. Pathog.*, núm. 25, p. 91-99.
- KUBOTA, T.; WATANABE, T.; YOKOSAWA, N.; TSUZUKI, K.; INDOH, T.; MORIISHI, K.; SANDA, K.; MAKI, Y.; INOUE, K.; FUJII, N. (1997). «Epitope regions in the heavy chain of Clostridium botulinum type E neurotoxin recognized by monoclonal antibodies». *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 63, p. 1214-1218.
- KUDROW, D. B.; HENRY, D. A.; HAAKE, D. A.; MARSHALL, G.; MATHISEN, G. E. (1988). «Botulism associated with Clostridium botulinum sinusitis after intranasal cocaine abuse». *Ann. Intern. Med.*, núm. 109, p. 984-985.
- KURAZONO, H.; MOCHIDA, S.; BINZ, T.; EISEL, U.; QUANZ, M.; GREBENSTEIN, O.; WERNARS, K.; POULAIN, B.; TAUC, L.; NIEMANN, H. (1992). «Minimal essential domains specifying toxicity of the light chains of tetanus toxin and botulinum neurotoxin type A». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, p. 14721-14729.
- LACY, D. B.; STEVENS, R. C. (1999). «Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins». *J. Mol. Biol.*, núm. 291, p. 1091-1104.

- LACY, D. B.; TEPP, W.; COHEN, A. C.; DASGUPTA, B. R.; STEVENS, R. C. (1998). «Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 5, p. 898-902.
- LALLI, G.; HERREROS, J.; OSBORNE, S. L.; MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G. (1999). «Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains». *J. Cell. Sci.*, núm. 112 (16), p. 2715-2724.
- LALLI, G.; SCHIAVO, G. (2002). «Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR». *J. Cell Biol.*, núm. 156, p. 233-239.
- LAZAROVICI, P.; YAVIN, E. (1986). «Affinity-purified tetanus neurotoxin interaction with synaptic membranes: properties of a protease-sensitive receptor component». *Biochemistry*, núm. 25, p. 7047-7054.
- LI, L.; SINGH, B. R. (1998). «Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay». *J. Nat. Toxins*, núm. 7, p. 215-226.
- LUDLOW, C. L.; HALLETT, M.; RHEW, K.; COLE, R.; SHIMIZU, T.; SAKAGUCHI, G.; BAGLEY, J. A.; SCHULZ, G. M.; YIN, S. G.; KODA, J. (1992). «Therapeutic use of type F botulinum toxin». *N. Engl. J. Med.*, núm. 326, p. 349-350.
- MAKSYMOWYCH, A. B.; REINHARD, M.; MALIZIO, C. J.; GOODNOUGH, M. C.; JOHNSON, E. A.; SIMPSON, L. L. (1999). «Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade». *Infect. Immun.*, núm. 67, p. 4708-4712.
- MAKSYMOWYCH, A. B.; SIMPSON, L. L. (1998). «Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, p. 21950-21957.
- MARTIN, T. F. (2002). «Prime movers of synaptic vesicle exocytosis». *Neuron*, núm. 34, p. 9-12.
- MCCROSKEY, L. M.; HATHEWAY, C. L. (1988). «Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract». *J. Clin. Microbiol.*, núm. 26, p. 1052-1054.
- MCMAHON, H. T.; USHKARYOV, Y. A.; EDELMANN, L.; LINK, E.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; JAHN, R.; SUDHOF, T. C. (1993). «Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein». *Nature*, núm. 364, p. 346-349.
- MELLANBY, J. (1984). «Comparative activities of tetanus and botulinum toxins». *Neuroscience*, núm. 11, p. 29-34.
- MERSON, M. H.; DOWELL, V. R. J. (1973). «Epidemiologic, clinical and laboratory aspects of wound botulism». *N. Engl. J. Med.*, núm. 289, p. 1105-1110.
- MIDDLEBROOK, J. L. (1989). «Cell surface receptors for protein toxins». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 95-119.
- MIDURA, T. F. (1996). «Update: infant botulism». *Clin. Microbiol. Rev.*, núm. 9, p. 119-125.
- MIDURA, T. F.; ARNON, S. S. (1976). «Infant botulism. Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces». *Lancet*, núm. 2, p. 934-936.

- MIDURA, T. F.; SNOWDEN, S.; WOOD, R. M.; ARNON, S. S. (1979). «Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey». *J. Clin. Microbiol.*, núm. 9, p. 282-283.
- MISURA, K. M.; SCHELLER, R. H.; WEIS, W. I. (2000). «Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex». *Nature*, núm. 404, p. 355-362.
- MONTECUCCO, C. (1986). «How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes?». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 11, p. 314-317.
- MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. (1995). «Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins». *Q. Rev. Biophys.*, núm. 28, p. 423-472.
- NEHER, E. (1998). «Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release». *Neuron*, núm. 20, p. 389-399.
- NIEMANN, H.; BLASI, J.; JAHN, R. (1994). «Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis». *Trends Cell Biol.*, núm. 4, p. 179-185.
- NISHIKI, T.; KAMATA, Y.; NEMOTO, Y.; OMORI, A.; ITO, T.; TAKAHASHI, M.; KOZAKI, S. (1994). «Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 10498-10503.
- NISHIKI, T.; TOKUYAMA, Y.; KAMATA, Y.; NEMOTO, Y.; YOSHIDA, A.; SATO, K.; SEKIGUCHI, M.; TAKAHASHI, M.; KOZAKI, S. (1996). «The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a». *FEBS Lett.*, núm. 378, p. 253-257.
- OCHANDA, J. O.; SYUTO, B.; OHISHI, I.; NAIKI, M.; KUBO, S. (1986). «Binding of *Clostridium botulinum* neurotoxin to gangliosides». *J. Biochem. [Tokyo]*, núm. 100, p. 27-33.
- OGUMA, K.; YOKOTA, K.; HAYASHI, S.; TAKESHI, K.; KUMAGAI, M.; ITOH, N.; TACHI, N.; CHIBA, S. (1990). «Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin». *Lancet*, núm. 336, p. 1449-1450.
- PARK, J. B.; SIMPSON, L. L. (2003). «Inhalational poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component». *Infect. Immun.*, núm. 71, p. 1147-1154.
- PARTON, R. G.; OCKLEFORD, C. D.; CRITCHLEY, D. R. (1988). «Tetanus toxin binding to mouse spinal cord cells: an evaluation of the role of gangliosides in toxin internalization». *Brain Res.*, núm. 475, p. 118-127.
- PELLIZZARI, R.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. (1999). «Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses». *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, núm. 354, p. 259-268.
- PEREZ-BRANGULI, F.; MUHAISEN, A.; BLASI, J. (2002). «Munc 18a binding to syntaxin 1A and 1B isoforms defines its localization at the plasma membrane and blocks SNARE assembly in a three-hybrid system assay». *Mol. Cell. Neurosci.*, núm. 20, p. 169-180.
- PEVSNER, J.; HSU, S. C.; SCHELLER, R. H. (1994). «n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, p. 1445-1449.
- PICKETT, J.; BERG, B.; CHAPLIN, E.; BRUNSTETTER-SHAFFER, M. A. (1976). «Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study». *N. Engl. J. Med.*, núm. 295, p. 770-772.
- RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C. [ed.] (1997). *Guidebook to protein toxins and their use in cell biology*. Oxford University Press. (Sambrook & Tooze)



- RIZO, J.; SUDHOF, T. C. (2002). «Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion». *Nat. Rev. Neurosci.*, núm. 3, p. 641-653.
- ROGERS, T. B.; SNYDER, S. H. (1981). «High affinity binding of tetanus toxin to mammalian brain membranes». *J. Biol. Chem.*, núm. 256, p. 2402-2407.
- ROLLNIK, J. D.; MEIER, P. N.; MANNS, M. P.; GOKE, M. (2003). «Antral injections of botulinum a toxin for the treatment of obesity». *Ann. Intern. Med.*, núm. 138, p. 359-360.
- ROSSETTO, O.; DELOYE, F.; POULAIN, B.; PELLIZZARI, R.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. (1995). «The metallo-proteinase activity of tetanus and botulinum neurotoxins». *J. Physiol. [París]*, núm. 89, p. 43-50.
- ROTHMAN, J. E. (1994). «Intracellular membrane fusion». *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, núm. 29, p. 81-96.
- (1996). «Felix Hoppe-Seyler Lecture 1996. Mechanisms of intracellular protein transport». *Biol. Chem.*, núm. 377, p. 407-410.
- SCHECHTER, R.; ARNON, S. S. (2000). «Extreme potency of botulinum toxin». *Lancet*, núm. 355, p. 237-238.
- SCHENGRUND, C. L.; DASGUPTA, B. R.; RINGLER, N. J. (1991). «Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof». *J. Neurochem.*, núm. 57, p. 1024-1032.
- SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B.; ROSSETTO, O.; POLVERINO DE LAURETO, P.; DASGUPTA, B. R.; MONTECUCCO, C. (1992b). «Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin». *Nature*, núm. 359, p. 832-835.
- SCHIAVO, G.; FERRARI, G.; ROSSETTO, O.; MONTECUCCO, C. (1991). «Tetanus toxin receptor. Specific cross-linking of tetanus toxin to a protein of NGF-differentiated PC 12 cells». *FEBS Lett.*, núm. 290, p. 227-230.
- SCHIAVO, G.; MALIZIO, C.; TRIMBLE, W. S.; POLVERINO DE LAURETO, P.; MILAN, G.; SUGIYAMA, H.; JOHNSON, E. A.; MONTECUCCO, C. (1994). «Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 20213-20216.
- SCHIAVO, G.; ROSSETTO, O.; SANTUCCI, A.; DASGUPTA, B. R.; MONTECUCCO, C. (1992a). «Botulinum neurotoxins are zinc proteins». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, p. 23479-23483.
- SCHIAVO, G.; SHONE, C. C.; BENNETT, M. K.; SCHELLER, R. H.; MONTECUCCO, C. (1995). «Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins». *J. Biol. Chem.*, núm. 270, p. 10566-10570.
- SCHIAVO, G.; SHONE, C. C.; ROSSETTO, O.; ALEXANDER, F. C.; MONTECUCCO, C. (1993). «Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, p. 11516-11519.
- SCHWAB, M. E.; SUDA, K.; THOENEN, H. (1979). «Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport». *J. Cell Biol.*, núm. 82, p. 798-810.
- SHAPIRO, R. E.; SPECHT, C. D.; COLLINS, B. E.; WOODS, A. S.; COTTER, R. J.; SCHNAAR, R. L. (1997). «Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand». *J. Biol. Chem.*, núm. 272, p. 30380-30386.

- SHERIDAN, R. E. (1998). «Gating and permeability of ion channels produced by botulinum toxin types A and E in PC12 cell membranes». *Toxicon*, núm. 36, p. 703-717.
- SHONE, C. C.; HAMBLETON, P.; MELLING, J. (1985). «Inactivation of Clostridium botulinum type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity». *Eur. J. Biochem.*, núm. 151, p. 75-82.
- SIMPSON, L. L. (1989). «Peripheral actions of the botulinum toxins». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 153-178.
- SINGH, B. R. (2000). «Intimate details of the most poisonous poison». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 7, p. 617-619.
- SOLLNER, T.; WHITEHEART, S. W.; BRUNNER, M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; GEROMANOS, S.; TEMPST, P.; ROTHMAN, J. E. (1993). «SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion». *Nature*, núm. 362, p. 318-324.
- SUDHOF, T. C. (1995). «The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions». *Nature*, núm. 375, p. 645-653.
- SUGIYAMA, H. (1980). «Clostridium botulinum neurotoxin». *Microbiol. Rev.*, núm. 44, p. 419-448.
- SUTTON, R. B.; FASSHAUER, D.; JAHN, R.; BRUNGER, A. T. (1998). «Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution». *Nature*, núm. 395, p. 347-353.
- SWAMINATHAN, S.; ESWARAMOORTHY, S. (2000). «Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 7, p. 693-699.
- UMLAND, T. C.; WINGERT, L.; SWAMINATHAN, S.; SCHMIDT, J. J.; SAX, M. (1998). «Crystallization and preliminary X-ray analysis of tetanus neurotoxin C fragment». *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, núm. 54 (2), p. 273-275.
- VERHAGE, M.; MAIA, A. S.; PLOMP, J. J.; BRUSSAARD, A. B.; HEEROMA, J. H.; VERMEER, H.; TOONEN, R. F.; HAMMER, R. E.; BERG, T. K. van den; MISSLER, M.; GEUZE, H. J.; SUDHOF, T. C. (2000). «Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion». *Science*, núm. 287, p. 864-869.
- VOETS, T.; TOONEN, R. F.; BRIAN, E. C.; DE WIT, H.; MOSER, T.; RETTIG, J.; SUDHOF, T. C.; NEHER, E.; VERHAGE, M. (2001). «Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking». *Neuron*, núm. 31, p. 581-591.
- WEBER, J. T.; GOODPASTURE, H. C.; ALEXANDER, H.; WERNER, S. B.; HATHEWAY, C. L.; TAUXE, R. V. (1993). «Wound botulism in a patient with a tooth abscess: case report and review». *Clin. Infect. Dis.*, núm. 16, p. 635-639.
- WEBER, T.; ZEMELMAN, B. V.; MCNEW, J. A.; WESTERMANN, B.; GMACHL, M.; PARLATI, F.; SOLLNER, T. H.; ROTHMAN, J. E. (1998). «SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion». *Cell*, núm. 92, p. 759-772.
- WELLHONER, N. H. (1982). «Tetanus neurotoxin». *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, núm. 93, p. 1-68.
- WILLIAMSON, L. C.; HALPERN, J. L.; MONTECUCCO, C.; BROWN, J. E.; NEALE, E. A. (1996). «Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neuro-

- toxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, p. 7694-7699.
- WILSON, D. W.; WHITEHEART, S. W.; WIEDMANN, M.; BRUNNER, M.; ROTHMAN, J. E. (1992). «A multisubunit particle implicated in membrane fusion». *J. Cell Biol.*, núm. 117, p. 531-538.
- XU, T.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; NEHER, E. (1998). «Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity». *Nat. Neurosci.*, núm. 1, p. 192-200.
- YAMASAKI, S.; BAUMEISTER, A.; BINZ, T.; BLASI, J.; LINK, E.; CORNILLE, F.; ROQUES, B.; FYKSE, E. M.; SUDHOF, T. C.; JAHN, R. (1994a). «Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulin neurotoxins and tetanus toxin». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 12764-12772.
- YAMASAKI, S.; BINZ, T.; HAYASHI, T.; SZABO, E.; YAMASAKI, N.; EKLUND, M.; JAHN, R.; NIEMANN, H. (1994b). «Botulinum neurotoxin type G proteolyzes the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 200, p. 829-835.
- YAVIN, E.; YAVIN, Z.; HABIG, W. H.; HARDEGREE, M. C.; KOHN, L. D. (1981). «Tetanus toxin association with developing neuronal cell cultures. Kinetic parameters and evidence for ganglioside-mediated internalization». *J. Biol. Chem.*, núm. 256, p. 7014-7022.
- YAVIN, E.; YAVIN, Z.; KOHN, L. D. (1983). «Temperature-mediated interaction of tetanus toxin with cerebral neuron cultures: characterization of a neuraminidase-insensitive toxin-receptor complex». *J. Neurochem.*, núm. 40, p. 1212-1219.

## ALGUNES ADRECES D'INTERNET

Hi ha un gran nombre d'adreces d'Internet on la persona interessada es pot adreçar per obtenir més informació sobre el tema. Les que es relacionen a continuació en són una mostra.

## INFORMACIÓ GENERAL

- <http://www.bt.cdc.gov/agent/botulism/index.asp>
- <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap2.html>
- <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/nother/bot.htm#infant>
- <http://iaith.tapetrade.net/botulism/>
- <http://www.emedicine.com/plastic/byname/botox-injections.htm>
- <http://www.emedicine.com/ped/topic273.htm>
- <http://us.expasy.org/spotlight/articles/sptlt019.html>