

Die Rolle der H_C-Fragmente der
Botulinum Neurotoxine A, B, C und D:
Charakterisierung der Bindung an die
nicht-toxische nicht-hämagglutinierende
Komponente und neuronale Rezeptoren

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

M. Sc. Jasmin Strotmeier

geboren am 14. März 1984 in Warendorf

2012

Referent: Prof. Dr. Hans Bigalke
Institut für Toxikologie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Alves
Institut für Biophysikalische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 21.März 2012

Erklärung

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und nicht zuvor als eine andere Prüfungsarbeit eingesetzt habe.

Minden, den 30.01.2012

Zusammenfassung

Die sieben Serotypen des Botulinum Neurotoxins (BoNT/A-G) und das Tetanus Neurotoxin (TeNT) gehören zur Familie der clostridiellen Neurotoxine (CNT). Diese AB-Toxine werden von Bakterien der Gattung *Clostridium* als 150 kDa große, einkettige Proteine produziert und bestehen aus einer leichten Kette (LC, 50 kDa, A-Untereinheit) und einer schweren Kette (HC, 100 kDa, B-Untereinheit). Die HC lässt sich in drei funktionell unabhängige Domänen unterteilen, die 50 kDa große Translokationsdomäne (H_N), die C-terminal benachbarte H_{CN} -Domäne, dessen genaue Funktion bisher noch unklar ist, und die endständige H_{CC} -Domäne, welche für die neurospezifische Bindung an Motoneurone und die Rezeptorvermittelte Endozytose der CNT verantwortlich ist. Die H_{CN} - und H_{CC} -Domäne sind je 25 kDa groß und bilden zusammen das H_C -Fragment. Die LCs sind Zinkmetalloproteasen, die im Cytosol der Zielzelle spezifisch verschiedene SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*) Proteine hydrolysieren, welche Bestandteil des Vesikel-Exozytose-Apparats sind. Dadurch wird die Neurotransmitterfreisetzung blockiert. Dies resultiert in einer spastischen bzw. einer schlaffen Lähmung, dem Tetanus bzw. Botulismus. Der vorwiegend auftretende Lebensmittelbotulismus entsteht durch orale Aufnahme eines Progenitortoxinkomplexes (PTC), in dem vier verschiedene nicht-toxische Neurotoxin-assoziierte Proteine (NAPs) das BoNT vor dem Abbau im Magen-Darm-Trakt schützen.

Als erstes Ziel wird in dieser Arbeit die erste Kristallstruktur eines PTC, dem M-PTC bestehend aus BoNT/A und der nicht-toxischen nicht hämagglutinierenden Komponente (NTNHA), beschrieben. Mittels Mutations- und Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass das H_C -Fragment von BoNT/A eine wichtige Rolle bei der Komplexbildung spielt und dass der PTC aufgrund eines komplexen Netzwerks aus sauren und basischen Aminosäuren im H_C -Fragment pH-abhängig gebildet wird.

Für die Aufnahme der CNT in neuronale Zellen gilt das Zwei-Rezeptor-Modell, wonach BoNT zunächst mittels Bindung an Polysialoganglioside an der Zelloberfläche angereichert werden. Anschließend führt die spezifische Bindung an seinen Proteinrezeptor zur Rezeptorvermittelten Aufnahme. Die Proteinrezeptoren von BoNT/A, B, E und G sind identifiziert. Für BoNT/A, B, E, F, G und TeNT sind die Gangliosidbindungstaschen und teilweise die Proteinrezeptorbindungstaschen bekannt. Für BoNT/C und BoNT/D fehlen diese Informationen.

Aufgrund der schwachen Potenz von BoNT/B in Menschen soll in dieser Arbeit die Bindung von BoNT/B an humanes Synaptotagmin-II (hSyt-II) analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des H_C -Fragments von BoNT/B an hSyt-II durch den Aminosäureaustausch des L51 in hSyt-II statt des korrespondierenden F54 in Ratten Syt-II stark geschwächt wird.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Bindungsmodi sowie die Bindungstaschen der Rezeptoren in BoNT/C und BoNT/D zu identifizieren und genauer zu charakterisieren.

In dieser Dissertation konnten mittels der Kristallstrukturen der H_C -Fragmente und zielgerichteter Mutationsstudien in BoNT/C und BoNT/D zwei Gangliosid- bzw. Kohlenhydratbindungstaschen identifiziert und näher charakterisiert werden. Beide Serotypen binden wie die anderen fünf BoNT mittels Ganglioside an die neuronale Zelle, besitzen aber wie TeNT zwei Gangliosidbindungstaschen. Den Bindungstaschen in BoNT/C und D fehlt aber das klassische Gangliosid-Bindungsmotiv.

Schlagerwörter: Botulinum Neurotoxin, Progenitortoxinkomplex, neuronale Rezeptoren, humanes Synaptotagmin, Gangliosidbindung, Kristallstruktur

Abstract

The seven serotypes of botulinum neurotoxin (BoNT/A-G) and the tetanus neurotoxin (TeNT) belong to the family of clostridial neurotoxins (CNT). These AB toxins are produced by bacteria of the genus *Clostridium* as 150 kDa, single chain proteins and consist of a light chain (LC, 50 kDa, A unit) and a heavy chain (HC, 100 kDa, B unit). The HC can be divided into three functional independent domains, the 50 kDa translocation domain (H_N), the neighbouring H_{CN} domain whose function is unknown so far, and the final H_{CC} domain that is responsible for the neurospecific binding to motoneurons and the receptor mediated endocytosis of the CNT. The latter two are each 25 kDa in size and constitute the H_C fragment. The LCs are zinc metalloproteases that specifically hydrolyse specific SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*) proteins in the cytosol of the target cell that are part of the vesicle exocytosis machinery. That results in the blockage of neurotransmitter release, which leads to a spastic or flaccid paralysis: tetanus or botulism, respectively. The predominantly occurring food-borne botulism results from oral ingestion of the progenitor toxin complex (PTC), in which four different non-toxic-neurotoxin-associated proteins (NAPs) protect the BoNT from gastrointestinal degradation.

In this work, the first crystal structure of the smallest PTC of BoNT/A (M-PTC) composed of BoNT/A and the non-toxic-non-hemagglutinating protein (NTNHA) is reported and the central role of the BoNT/A H_C fragment is described. The pH dependent complex formation can be allocated to a complex network of acidic and basic residues in the H_C -fragment.

The uptake of CNT into neuronal cells follows a double receptor mechanism. First, the BoNT is enriched on the cell surface via binding to polysialogangliosides. Subsequently, the specific binding to its protein receptor is followed by receptor mediated uptake. The protein receptors of BoNT/A, B, E und G are identified. For BoNT/A, B, E, F, G und TeNT the ganglioside binding pockets and for some of them the protein receptor binding pocket are characterised. Information about BoNT/C und BoNT/D is lacking.

Because of the low potency of BoNT/B in humans the binding of BoNT/B to human synaptotagmin-II (hSyt-II) should be analysed. The low potency of BoNT/B is due to the mutation F51L in hSyt-II in comparison to rat Syt-II, which drastically impairs the binding of the H_C -fragment of BoNT/B to hSyt-II.

Another aim of this work was to identify and further characterise the receptor binding pockets of BoNT/C and BoNT/D.

Employing crystallization of the H_C fragments and biochemical mutagenesis studies two carbohydrate binding pockets were identified in BoNT/C and D and further characterised. Both serotypes bind to neuronal cells via gangliosides similar to the other five serotypes but possess each novel types of ganglioside binding pockets. The binding pockets of BoNT/C and D lack the canonical ganglioside binding motif.

Key words: botulinum neurotoxin, progenitor toxin complex, neuronal receptors, human synaptotagmin, ganglioside binding, crystal structure

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	III
Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungen.....	VIII
Einleitung.....	1
1 <i>Clostridium botulinum</i>	1
2 Botulismus und Tetanus.....	3
2.1 Tetanus.....	3
2.2 Botulismus im Menschen.....	4
2.3 Botulinum Neurotoxin im Komplex.....	8
2.4 Botulismus in Tieren.....	10
3 BoNT in der Kosmetikindustrie und in der Medizin.....	10
4 BoNT als Biowaffe.....	11
5 Aufbau der clostridiellen Neurotoxine.....	12
5.1 Die leichte Kette.....	14
5.2 Die schwere Kette.....	15
5.3 Kristalle und Co-Kristalle der CNT.....	17
6 Zwei-Rezeptor-Modell für die Bindung und Aufnahme der BoNT.....	20
6.1 Interaktion der CNT mit Gangliosiden.....	20
6.2 Proteinrezeptoren der CNT.....	25
7 Aufgabenstellung.....	28
Ergebnisse.....	29
Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex.....	29
Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: Increased therapeutic dosage and immunogenicity.....	58

Inhaltsverzeichnis

Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner.....	63
The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites.....	75
Zusammenfassung und Diskussion	100
Das Botulinum Neurotoxin und das NTNHA schützen sich gegenseitig durch Bildung eines miteinander verschlungenen Komplexes	100
Rolle des H _C -Fragments bei der Bindung an neuronale Rezeptoren	103
Analyse der Bindung von Botulinum Neurotoxin Serotyp B (BoNT/B) an humanes Synaptotagmin-II.....	103
Identifizierung und Charakterisierung der Rezeptorbindungstaschen von Botulinum Neurotoxin Serotyp D (BoNT/D)	104
Identifizierung und Charakterisierung der Rezeptorbindungstaschen von Botulinum Neurotoxin Serotyp C (BoNT/C)	110
Literaturverzeichnis	X
Anhang	XXIX
Abbildungs - und Tabellenverzeichnis	XXIX
Liste der Publikationen	XXX
Originalpublikationen in „peer reviewed“ Zeitschriften:	XXX
Poster	XXX
Vorträge	XXXI
Lebenslauf	XXXII
Danksagung.....	XXXIII

Abkürzungen

Å	Angström $1\text{Å}=10^{-10}\text{m}$
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B4galnt1</i>	<i>Beta-1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase 1</i>
BoNT	Botulinum Neurotoxin
BoNT/A-G	Botulinum Neurotoxin Serotyp A bis G
BoNT/Ai	inaktive Form des BoNT/A
C.	<i>Clostridium</i>
CD	zervikale Dystonie
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cer	Ceramide
CGN	Kleinhirngranullarneurone (<i>cerebellar granular neurons</i>)
CNT	Clostridielle Neurotoxine
cSyt	Schimpansen Synaptotagmin
Da	Dalton
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ee	frühes Endosom
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
FDA	<i>USA federal drug administration</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gal	Galactose
GD1a	NAcNeu α 3Gal β 3NAcGal β 4(NAcNeu α 3)Gal β 4Glc β Cer
GD1b	Gal β 3NAcGal β 4(NAcNeu α 8NAcNeu α 3)Gal β 4Glc β Cer
GD2	NAcGal β 4(NAcNeu α 8NAcNeu α 3)Gal β 4Glc β Cer
GD3	NAcNeu α 8NAcNeu α 3Gal β 4Glc β Cer
GD3S	GD3 Synthetase
GI	Gastrointestinal
Glc	Glucose
GM1	Gal β 3NAcGal β 4(NAcNeu α 3)Gal β 4Glc β Cer;
GM2	NAcGal β 4(NAcNeu α 3)Gal β 4Glc β Cer;
GM3	NAcNeu α 3Gal β 4Glc β Cer;
GQ1b	NAcNeu α 8NAcNeu α 3Gal β 3NAcGal β 4(NAcNeu α 8NAcNeu α 3)Gal β 4Glc β Cer;
GT1b	NAcNeu α 3Gal β 3NAcGal β 4(NAcNeu α 8NAcNeu α 3)Gal β 4Glc β Cer;
HA	Hämagglutinin
H _C	C-terminale Hälfte der HC, Bindungsdomäne, 50 kDa
HC	Schwere Kette, 100 kDa
H _{CC}	C-terminaler Teil der H _C , 25 kDa
H _{CN}	N-terminaler Teil der H _C , 25 kDa
H _{CX}	H _C -Fragment von BoNT/X oder TeNT
H _N	N-terminale Hälfte der HC, Translokationsdomäne, 50 kDa
hSyt	humanes Synaptotagmin
i.p.	intraperitoneal
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
KO	<i>Knock out</i>
KWKG	Kriegswaffenkontrollgesetz
Lac-Cer	Lactose-Ceramid
LC	Leichte Kette, 50 kDa
LD4	luminale Domäne 4 von SV2
LD ₅₀	mediane letale Dosis
le	spätes Endosom

Abkürzungen

MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MMWR	Morbidity and Mortality Weekly Report
MPN	<i>mouse phrenic nerve</i>
MS	Massenspektrometrie
mSyt	Maus Synaptotagmin
NAcGal	N-Acetylgalactosamin
NAcNeu	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
NAP	nicht-toxische Neurotoxin-assoziierte Proteine
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
nH _C	C-terminale Hälfte des NTNHA
nH _N	N-terminale Hälfte des NTNHA
nLC	Leichte Kette des NTNHA
NMJ	motorische Endplatte (<i>neuromuscular junction</i>)
NSF	N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor
NTNHA	nicht toxisch, nicht hämagglutinierend
NTNHA-A	NTNHA von BoNT/A
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein data bank, www.rcsb.org
PE	Phosphatidylethanolamin
PIP	Phosphatidylinositolmonophosphat
PTC	Progenitortoxinkomplex
RMSD	root mean square deviation
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rSyt	Ratten Synaptotagmin
SA	Sialinsäure
sc	single-chain
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP-25	Synaptosomen assoziiertes Protein von 25 kDa
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
<i>St8sia1</i>	<i>ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase</i>
sv	synaptisches Vesikel
SV2	Synaptisches Vesikel Glykoprotein 2
SV2/A, /B, /C	Isoform A, B und C von SV2
Syt	Synaptotagmin
Syt-I, -II	Isoform I und II von Syt
TeNT	Tetanus Neurotoxin
ToF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
v. Chr.	vor Christus
VAMP 2	Vesikel assoziiertes Membranprotein 2

Einleitung

Die Botulinum Neurotoxine (BoNT) gehören zu den potentesten Toxinen für den Menschen (Lamanna 1959). Seine mediane letale Dosis (LD₅₀) liegt bei ca. 1 ng pro kg Körpergewicht i.p. (Gill 1982). In Folge dessen wird es vom *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) auch als eines von sechs *category A select agents* gelistet, zu denen auch Anthrax, die Pest, Pocken, Tularämie und Hämorrhagische Fieber gehören (He et al. 2007). Aufgrund ihrer hohen Toxizität gelten die Botulinum Neurotoxine auch als Biowaffe (Bigalke und Rummel 2005; Dhaked et al. 2010). Andererseits finden sie aber auch breite kosmetische und medizinische Anwendungen.

1 *Clostridium botulinum*

Serologisch lassen sich sieben Serotypen des Botulinum Neurotoxins, benannt BoNT/A bis BoNT/G, unterscheiden (Hatheway 1990; Lindström und Korkeala 2006). Die Neurotoxine werden zum größten Teil von dem gram-positiven, obligat anaeroben, stäbchenförmigen und sporenbildenden Bakterium *Clostridium botulinum* produziert (van Ermengem 1897). Die Serotypen BoNT/E und BoNT/F werden auch von *C. butyricum* bzw. *C. baratii* synthetisiert (Hall et al. 1985; Aureli et al. 1986).

Die Clostridienstämme werden genotypisch und phänotypisch in vier Gruppen eingeteilt (Hatheway 1990; Collins und East 1998; Lindström und Korkeala 2006; Hill et al. 2007, s. Abbildung 1): Zu Gruppe I zählen die proteolytischen Clostridienstämme, welche BoNT/A, B und F exprimieren, sowie die bivalenten Stämme, deren Plasmid-DNA BoNT/AB, AF und BF kodiert. Diese Stämme sind nah verwandt mit *C. sporogenes*. Die Gruppe II beinhaltet die nicht-proteolytischen Stämme, welche einkettige BoNT/B, E und F produzieren. Die BoNT der Gruppen I und II verursachen Botulismus beim Menschen. Die Stämme, die BoNT/C und D sowie die Nichtneurotoxine C2 und C3 produzieren, gehören zur Gruppe III, sind sehr nah verwandt mit *C. novyi* und *C. haemolyticum* und sind hauptsächlich für Botulismus bei Tieren verantwortlich (Collins und East 1998; Lindström et al. 2004). Obwohl BoNT/C bisher noch kein Fall von Lebensmittelbotulismus aber ein Fall von Säuglingsbotulismus (Oguma et al. 1990) zugeschrieben worden ist, haben Coffield et al. 1997 gezeigt, dass BoNT/C auch sehr effektiv bei der Paralyse der menschlichen neuromuskulären Endplatte (NMJ) ist, wenn es direkt in den Muskel injiziert wird. Parallel wurde BoNT/C auch als therapeutische Alternative für BoNT/A vorgeschlagen (Eleopra et al. 1997; Eleopra et al. 2004). Im Gegensatz dazu soll BoNT/D nicht die neuromuskuläre Übertragung in menschlichem Gewebe blockieren (Coffield et al. 1997). Unter den sieben BoNT Serotypen hat BoNT/C mit 52,2 % identischen Aminosäuren die höchste Ähnlichkeit zu BoNT/D (Watanabe et al. 1999). Einige BoNT vom

Einleitung

Serotyp C und D besitzen eine besondere Genstruktur, in welcher die ersten zwei Drittel des *bont* Gens sich von BoNT/C und das letzte Drittel sich von BoNT/D ableiten lässt oder umgekehrt. Diese Stämme werden als C/D bzw. D/C Mosaikstämmen bezeichnet (Moriishi et al. 1996; Nakamura et al. 2009). BoNT/G bildet die Gruppe IV. Für diesen Serotyp sind bisher keine neuroparalytischen Erkrankungen im Menschen bekannt, es wurde aber von Krankheitsfällen mit plötzlichem Tod berichtet (Sonnabend et al. 1981; Zhang et al. 2010a).

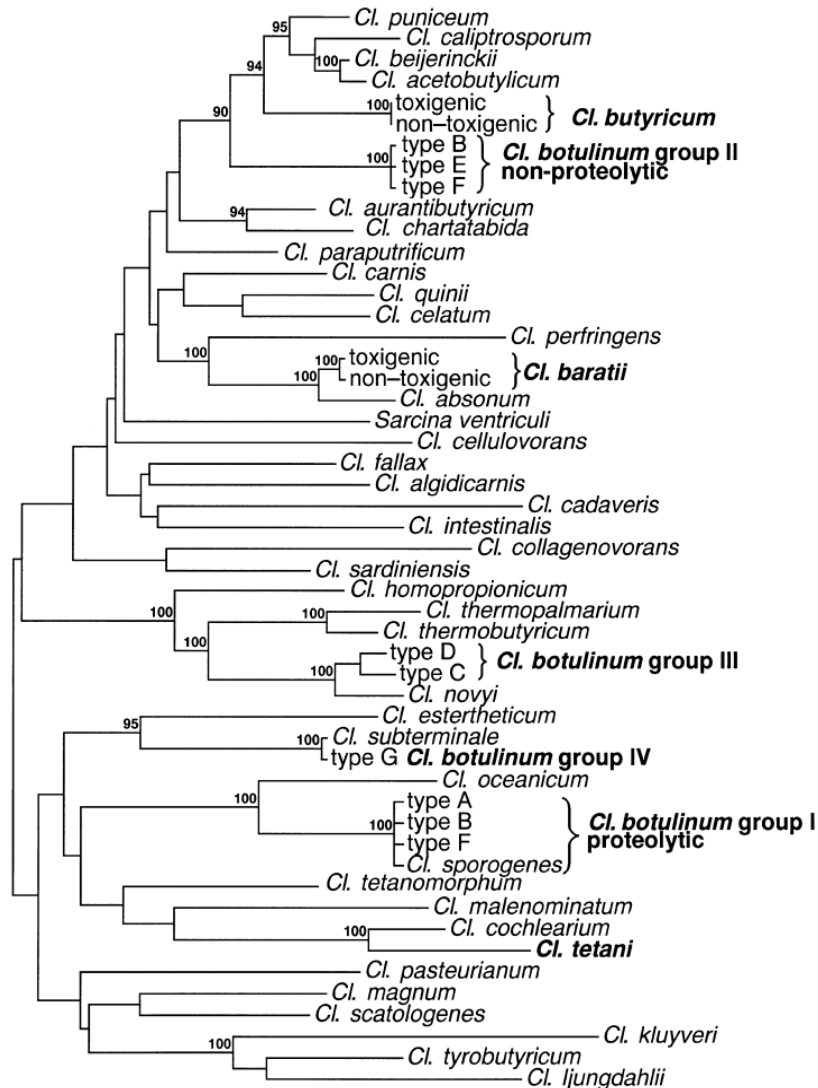


Abbildung 1: Dendrogramm mit den phylogenetischen Positionen von *Clostridium botulinum* der Gruppen I bis IV. Das Cluster I *Clostridium* basiert auf 16S rRNA Gensequenzen. Der Baum wurde mittels der *neighbour-joining method* generiert. (Collins und East 1998).

Systematische Genomsequenzierungen ergaben Varianten von *bont*-Genen, deren Sequenzunterschiede auf Aminosäureebene zwischen 2,6 % bis 31,6 % liegen. Diese BoNT zählen trotzdem zum gleichen Serotyp, aber bilden einen neuen Subtyp dieses BoNT-Serotyps, der fortlaufend nummeriert wird (Smith et al. 2005; Hill et al. 2007). Diese

Einleitung

Unterschiede können die Bindung und Neutralisation durch Antikörper beeinflussen. Deshalb ist es wichtig, diese Sequenzvariabilitäten bei der Herstellung von diagnostischen und therapeutischen Antikörpern zu beachten (Smith et al. 2005).

Zusammen mit dem Tetanus Neurotoxin (TeNT) bilden die sieben BoNT die Familie der clostridiellen Neurotoxine (CNT). TeNT (Kitasato 1891) wird durch das Bakterium *C. tetani* (Brüggemann et al. 2003) produziert und hat mit den BoNT Serotypen eine Sequenzhomologie von 65 % und eine Identität von 35 % (Lacy und Stevens 1999, s. Abbildung 1). Die CNT gehören zu den AB-Toxinen.

2 Botulismus und Tetanus

2.1 Tetanus

Von der Infektionskrankheit Tetanus wurde schon 400 v. Chr. durch Hippocrates berichtet (Pappas et al. 2008). Er nannte die beobachtete spastische Paralyse „Tetanus“ (griechisch: *tetanos*, Kontraktion; (Schiavo et al. 2000)). Die Erkrankung wird durch das Bakterium *C. tetani*, dessen Sporen im Erdreich weit verbreitet sind, verursacht. Eine Wunde bietet aufgrund der hier vorherrschenden Sauerstoffarmut eine hervorragende Umgebung für das Bakterium (Hatheway 1990). Nach Wundverschluss keimen die Sporen, die Bakterien vermehren sich und produzieren das Neurotoxin. Das TeNT gelangt somit direkt in die Blutbahn und erreicht die NMJ, wo es in Motoneurone aufgenommen wird.

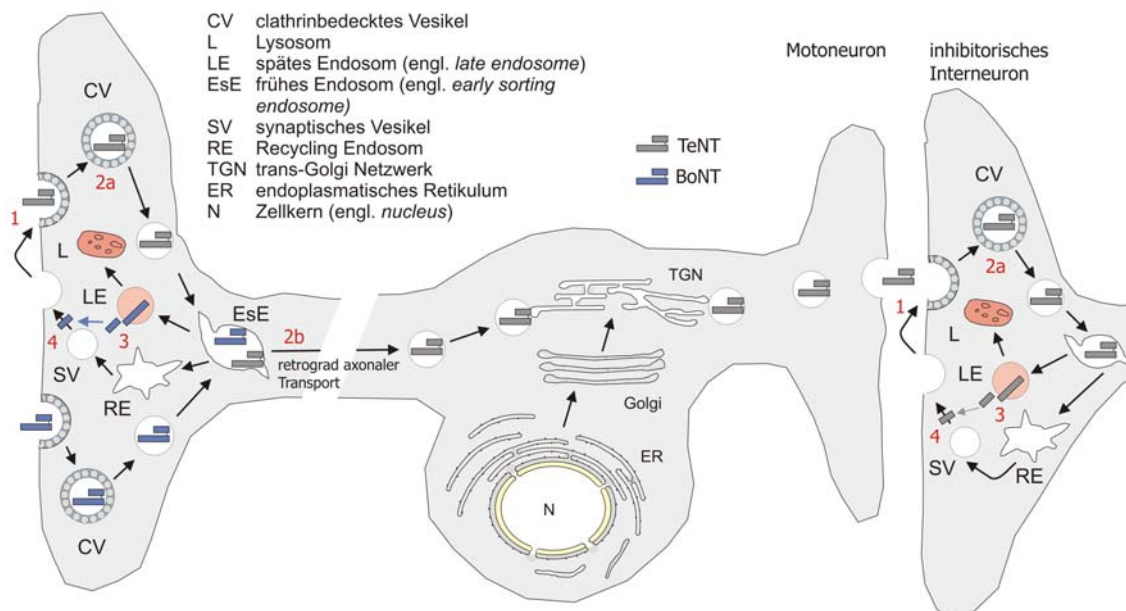


Abbildung 2: Wirkmechanismus der clostridiellen Neurotoxine TeNT und BoNT. Nach neurospezifischer Bindung (1) und Rezeptor-vermittelter Endozytose (2a) verbleibt BoNT (blau) im Motoneuron und TeNT (grau) wird retrograd-axonal zu den inhibitorischen Interneuronen transportiert (2b). Es folgt bei beiden die Translokation der leichten Kette (LC) in das Cytosol (3) und die enzymatische Proteolyse individueller SNAREs (4).

Einleitung

Das TeNT und die BoNT unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Wirkort (s. Abbildung 2): Die BoNT wirken an der NMJ (s. Abbildung 2, Montecucco und Schiavo 1994), wo sie die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin in den synaptischen Spalt blockieren (Burgen et al. 1949; Dolly et al. 1984). Dies führt zur schlaffen Paralyse, dem Botulismus. Im Gegensatz dazu wird TeNT retrograd-axonal ins Rückenmark zu den inhibitorischen Neuronen transportiert (s. Abbildung 2), wo es die Freisetzung der Neurotransmitter Glycin und γ -Aminobuttersäure (GABA) blockiert (Mellanby und Green 1981). Dies resultiert in einer spastischen Lähmung, dem Tetanus, auch als Wundstarrkrampf bekannt (s. Abbildung 3).



**Abbildung 3: Ein an Tetanus erkrankter Soldat.
Gemälde von Charles Bell mit dem Titel
Opisthotonus (Tetanus) aus dem Jahre 1809.**

TeNT kann ebenso cholinerge Nervenenden blockieren, ist aber im Vergleich zu BoNT fünffach weniger potent an den postganglionären, cholinergen Enden und ca. 500-fach weniger toxisch an den Motoneuronen (Bigalke und Habermann 1980). Die Art und Weise, wie das Botulinum und das Tetanus Neurotoxin die Neuronen vergiften, ist aber in beiden Fällen die gleiche (Simpson 1986; Simpson 1989). Durch den unterschiedlichen Wirkort verursachen sie die Krankheitsbilder des Botulismus bzw. Tetanus (Schiavo et al. 2000; Herreros et al. 2000a). Seit 1927 gibt es einen Impfstoff gegen Tetanus. Dies hat dazu geführt, dass die Erkrankung des Tetanus zumindest in den Industrieländern nahezu ausgerottet ist. In den Entwicklungsländern stellt insbesondere der neonatale Tetanus mit mehr als 100.000 Todesfällen jährlich (2002: 180.000) aber noch eine große Gefahr dar (WHO), da es unbehandelt zum Tod führen kann. Ebenso tritt diese Infektionskrankheit auch sehr häufig bei Pferden und anderen Einhufern auf, so dass diese ebenfalls grundimmunisiert werden. Außerdem sind Wiederkäuer und Schweine anfällig, wohingegen Vögel nahezu resistent sind (Patel und Rao 1966).

2.2 Botulismus im Menschen

Die Krankheit Botulismus wird durch das stärkste bekannte Toxin Botulinum Neurotoxin ausgelöst und äußert sich in einer schlaffen Lähmung der Muskeln. Im frühen

Einleitung

19. Jahrhundert wurde diese Erkrankung zum ersten Mal durch den Mediziner Justinus Kerner (1786-1862) beschrieben (Kerner 1817). Sie war nach dem Verzehr von roher oder schlecht verarbeiteter Wurst aufgetreten. Kerner versuchte die giftige Substanz aus der Wurst zu isolieren. Dies gelang ihm aber nicht. Die Erkrankung wurde als „*Botulus Vergiftung*“ bezeichnet (lateinisch: *botulus*, Wurst). Kerner mutmaßte damals schon, dass sich das Toxin aufgrund der vorherrschenden anaeroben Bedingungen in der Wurst entwickelt hatte. Zudem stellte er fest, dass es am motorischen und autonomen Nervensystem agiert und es selbst in kleinen Dosen letal war (Erbguth und Naumann, 1999). Er hat es schon zu seiner Zeit für den therapeutischen Gebrauch in Betracht gezogen (Kerner 1822).

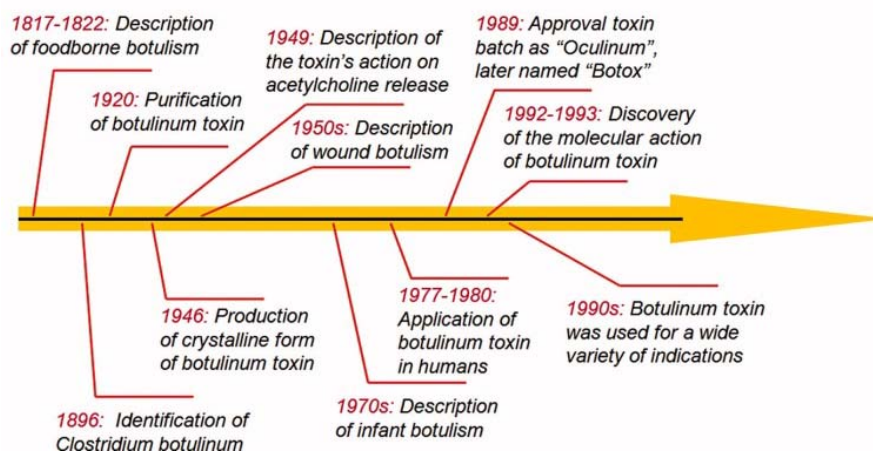


Abbildung 4: Meilensteine in der Botulismus Forschung (Zhang et al. 2010a).

Trotzdem gab es lange Zeit keine neuen Erkenntnisse zum Toxin oder seiner genauen Herkunft. Erst 1897 beschrieb der belgische Bakteriologe Emile van Ermengem (1851-1922) wieder eine Epidemie, bei der 30 Menschen durch den Verzehr von rohen Schinken vergiftet wurden (s. Abbildung 4). Es gelang van Ermengem als Erstem, das Bakterium *Clostridium botulinum* aus dem Schinken zu isolieren. Er nannte den Organismus damals zunächst *Bacillus botulinus* (van Ermengem 1897), später wurde dieser in *Clostridium botulinum* umbenannt. Snipe und Sommer gelang es 1928 zum ersten Mal das Botulinum Neurotoxin zu isolieren (Snipe und Sommer 1928). 1949 wurde zum ersten Mal entdeckt, dass das BoNT die Freisetzung der Neurotransmitter blockiert (Burgen et al. 1949).

Mittlerweile sind fünf verschiedene Formen des Botulismus im Menschen bekannt (Zhang et al. 2010a):

1. Lebensmittelbotulismus (*food-borne botulism*)
2. Wundbotulismus (*wound botulism*)

Einleitung

3. Säuglingsbotulismus (*infant botulism*) / darmgebundener Botulismus (*adult botulism*)
4. Iatrogen Botulismus (*iatrogenic botulism*).
5. Inhalativer Botulismus (*inhalativ botulism*)

Beim Lebensmittelbotulismus handelt es sich um die klassische Botulismusform. Hierbei erfolgt die Erkrankung nach Aufnahme des Toxins aus der Nahrung. Die Ursache ist mit Bakteriensporen kontaminierte Nahrung in Konservendosen, wie z.B. selbst eingemachte Bohnen, die anschließend nicht ausreichend abgekocht wurden. Bakteriensporen sind bis 120°C hitzeresistent und präferieren einen pH-Wert über 5 (Cherington 2004). Lebensmittelbotulismus wird überwiegend durch BoNT/A, B und E hervorgerufen, wobei schon kleine Mengen des Toxins ausreichen. BoNT/E wird dabei meistens mit Fällen durch kontaminierten Fisch in Verbindung gebracht (Cherington 2004).

Wenn sich Sporen von *Clostridium botulinum* in einer wiederverschlossenen Wunde vermehren und dort das Toxin sezernieren, führt dies ebenfalls zur neuroparalytischen Erkrankung. In diesem Fall handelt es sich um Wundbotulismus. Dieser tritt seit 1994 vermehrt im Zusammenhang mit Heroinmissbrauch und kontaminiertem Spritzenmaterial auf (Passaro et al. 1998; Thomas und Haji-Michael 2003; Kuhn et al. 2006; Wenham 2008; Abavare und Abavare 2011).

Im dritten Fall, dem Säuglingsbotulismus, kommt es zur Vermehrung des Bakteriums im Darmtrakt, wo das Neurotoxin ausgeschieden wird. Der Darmtrakt von Säuglingen ist dem Bakterium noch nicht gewachsen, da ihm im Gegensatz zum Darmtrakt eines Erwachsenen sowohl die schützende bakterielle Darmflora als auch die Clostridien verhindernde saure Gallenflüssigkeit fehlen (Cherington 2004). So sollten Säuglinge bis zum Erreichen des ersten Lebensjahres z.B. keinen Honig essen, da dieser häufig *C. botulinum* Sporen enthält (Midura et al. 1979; Arnon 1980). Seit 1976 wird von dieser Form des Botulismus berichtet. Die meisten Fälle solcher Erkrankungen wurden durch die Serotypen A oder B ausgelöst, nur wenige durch Typ E und F (Hall et al. 1985; Aureli et al. 1986). 1990 haben Oguma et al. den ersten Fall von Säuglingsbotulismus ausgelöst durch BoNT/C, der eigentlich als tierpathogen galt, beschrieben (Oguma et al. 1990; Collins und East 1998; Lindström et al. 2004). Die gleiche Form des Botulismus kann auch bei Erwachsenen auftreten, wenn diese eine Abnormalität im Darmtrakt, z. B. durch orale Breitspektrumantibiotikatherapie, aufweisen, so dass sich *C. botulinum*-Sporen ansiedeln können (Zhang et al. 2010a). In diesem Fall spricht man vom darmgebundenen Erwachsenenbotulismus. Diese Form ist aber sehr selten und wird auch als viszeraler Botulismus bezeichnet.

Der iatrogene Botulismus ist ebenfalls sehr selten und kann bei der falschen Applikation des Toxins für medizinische und kosmetische Zwecke auftreten (Bakheit et al. 1997; Chertow et

Einleitung

al. 2006). Eine weitere Form des Botulismus tritt nach Inhalation des BoNT durch die Aerosolbildung auf, welches für den Einsatz als Biowaffe missbraucht wird. Sanford et al. konnten 2010 zeigen, dass BoNT/A und B Botulismus durch Inhalation in Primaten ausgelöst haben (Sanford et al. 2010).

Folglich bestehen mehrere Resorptionswege für das BoNT im menschlichen Körper: über den Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt; Lebensmittel- und Säuglingsbotulismus), über infizierte Wunden (Wundbotulismus) und über die Atemwege (Botulismus durch Inhalation). Anschließend wird es über die Blutbahn zu den peripheren cholinergen Synapsen transportiert und gelangt zu der NMJ (Simpson 2004).

Die ersten Symptome eines Botulismus werden meist nicht unmittelbar mit einer BoNT-Vergiftung in Zusammenhang gebracht. Sie treten bereits wenige Stunden nach der Toxinaufnahme auf und äußern sich u.a. durch Mundtrockenheit einhergehend mit Schluckbeschwerden. Spätere Symptome sind Brechreiz, Krämpfe, Muskelschwäche, Doppelt-Sehen, Ataxie und final die Atemlähmung (Bigalke und Rummel 2005; Zhang et al. 2010a).

Aufgrund der geringen Menge an Toxin, die für eine schwere Erkrankung ausreichend ist, ist der Nachweis des Toxins im Blut und im Stuhl mittels ELISA oder PCR meistens schwierig und somit die Labordiagnose häufig unmöglich oder erfolgt erst in einem späten Stadium.

Die jeweilige Therapie richtet sich folglich zunächst gegen die auftretenden Symptome. Zur Therapie ist aber auch ein trivalentes Pferdeantiserum gegen BoNT/A, B und E (Behring) in Deutschland zugelassen. Im März 2010 hat die FDA das bivalente Botulinum Antitoxin AB und das monovalente Botulinum Antitoxin E (BAT-AB and BAT-E, Sanofi Pasteur) durch ein heptavalentes (ABCDEFG) Botulinum Antitoxin (HBAT, Cangene Corporation) aus Pferd ersetzt (Arnon et al. 2001; Zhang et al. 2010a) (MMWR / March 19, 2010 / Vol. 59 / No. 10). Für die Behandlung von Säuglingsbotulismus steht das pentavalente BabyBIG[®], welches humanes Antiserum gegen BoNT/A, B, C, D und E enthält, zur Verfügung (Arnon et al. 2001; Long 2007). Neben dieser passiven Immunisierung liegt der Fokus auch auf der aktiven Immunisierung mit Toxoiden. Allerdings ist seit November 2011 die Abgabe des pentavalenten BoNT/A, B, C, D und E-Toxoid als „*investigational drug*“ durch die CDC eingestellt worden (MMWR / October 28, 2011 / Vol. 60 / No. 42). Baldwin et al. haben 2008 den ersten aus *Escherichia coli* erhaltenen Impfstoff basierend auf den sieben H_C-Fragmenten der BoNT (H_CX) hergestellt, der alle sieben BoNT Serotypen effektiv neutralisiert (Baldwin et al. 2008). Ethisch bedenklich wäre aber die Immunisierung der Zivilbevölkerung mit dem Antigen, weil eine therapeutische und kosmetische Anwendung der Botulinum Neurotoxine (s. Kap. 3) in späteren Jahren nicht mehr möglich sein würde.

Einleitung

Im Jahr 2009 gab es sieben Botulismusfälle in Deutschland (RKI 2009). In der EU wurden 2009 185 Fälle gemeldet, von denen 132 labordiagnostisch bestätigt werden konnten. Bei weniger als 10 % dieser Fälle handelte es sich um Säuglingsbotulismus (ECDC 2011). In den USA wurden dem CDC 2009 121 Botulismusfälle gemeldet: elf Lebensmittel-, 84 Säuglings-, 23 Wund- und drei Botulismusfälle mit unbekannter Ursache (CDC 2011). Bei den Fällen, bei denen der Toxintyp bekannt war, handelte es sich hauptsächlich um Typ A und B, selten auch um Typ E oder F (CDC 2011).

2.3 *Botulinum Neurotoxin im Komplex*

Das Bakterium *Clostridium botulinum* setzt sogenannte Progenitortoxinkomplexe (PTC) frei, die durch die nicht-kovalente Assoziation des Neurotoxins mit weiteren Proteinen, den nicht-toxischen Neurotoxin-assoziierten Proteinen (NAP), gebildet werden (Oguma et al. 1995; Inoue et al. 1996; Hines et al. 2005). Zu den NAPs zählen eine nicht-toxische, nicht-hämagglutinierende (NTNHA) Komponente (~ 140 kDa) und drei verschiedene Proteine mit Hämagglutinin Aktivität (HA), die nach ihrer Größe benannt sind: HA-17, HA-33, HA-70.

Tabelle 1: Proteine des Progenitortoxinkomplexes nach Serotyp sortiert (modifiziert nach Hines et al. 2005).

Proteine im Serotyp:							
A1	A2	B	C	D	E	F	G
BoNT	BoNT	BoNT	BoNT	BoNT	BoNT	BoNT	BoNT
NTNHA	NTNHA	NTNHA	NTNHA	NTNHA	NTNHA	NTNHA	NTNHA
HA-33		HA-33	HA-33	HA-33			
HA-17		HA-17	HA-17	HA-17			HA-17
HA-70		HA-70	HA-70	HA-70			HA-70

Das *ntnha* bildet mit den drei *ha* Genen ein stromaufwärts des *bont* Gens positioniertes Cluster (s. Abbildung 5), der aber in seiner Zusammensetzung und Organisation zwischen den einzelnen Serotypen variiert (s. Tabelle 1, Johnson und Bradshaw 2001; Dineen et al. 2003). Das NTNHA kommt in allen BoNT produzierenden Stämmen vor und ist mit einer Aminosäuresequenzidentität von 70 % hoch konserviert (East und Collins 1994; Bhandari et al. 1997). Die HAs agieren als Adhäsine, die es dem PTC ermöglichen, an Darmepithelzellen und Erythrozyten zu binden sowie über die Darmepithelzellmonolayerschicht transportiert zu werden (Fujinaga et al. 2004; Ito et al. 2011).

Es existieren drei verschiedene Formen des PTC (Sugii und Sakaguchi 1975). Der kleinste Komplex (M-PTC, 12S) besteht aus dem BoNT und dem NTNHA und hat eine Größe von ca. 300 kDa. In den Serotypen BoNT/A2-4, E und F kommt ausschließlich diese Komplexform vor, da die *ha* Gene gänzlich fehlen (East und Collins 1994; Bhandari et al. 1997). In den Stämmen von *C. botulinum* Typ A1, B, C und D werden zusätzlich noch größere Komplexe

Einleitung

produziert (Hauser et al. 1994). Diese bestehen neben dem BoNT und NTNHA aus HA Proteinen und werden je nach Anzahl der HAs als L- (16S, ~500 kDa) oder LL-Komplex (19S, ~900 kDa) bezeichnet. Der LL-Komplex kommt nur mit BoNT/A1 vor und wird u.a. als Dimer bestehend aus zwei L-Komplexen, die über acht HA-33 verbunden sind, beschrieben (Inoue et al. 1996). Im Typ G tritt der L-Komplex auf (Terilli et al. 2011), aber ohne das HA-33, da das Gen *ha-33* fehlt (Bhandari et al. 1997).

Der molekulare Aufbau des PTC ist größtenteils unbekannt. Es existieren bisher lediglich zwei schwach aufgelöste EM-Strukturen (Burkard et al. 1997; Hasegawa et al. 2007) sowie eine Antikörper-Kartierungs-Studie (Chen et al. 1997).

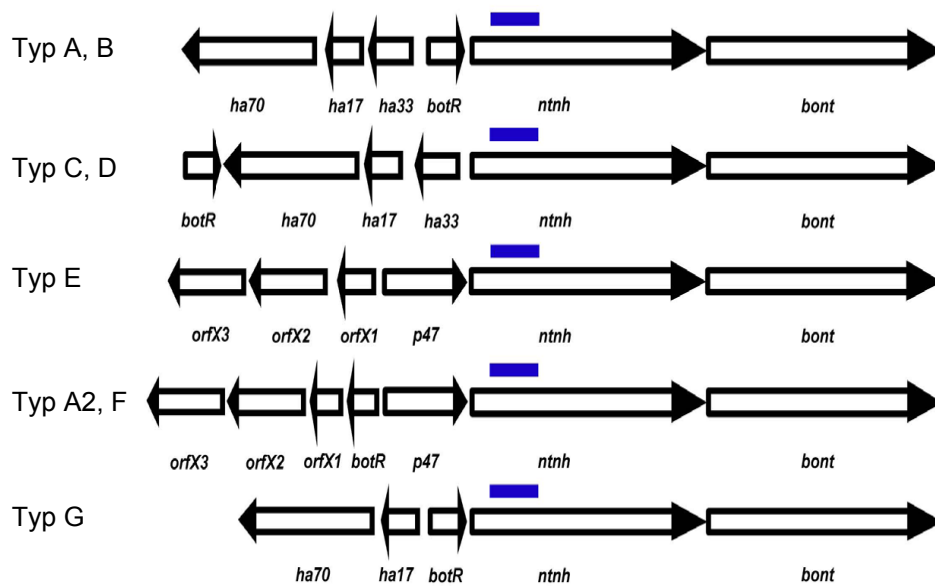


Abbildung 5: Genorganisation des *boNT* Clusters (Hill et al. 2010).

Die Komplexproteine schützen das Neurotoxin im Magen-Darm-Trakt vor dem Abbau durch sauren pH oder Pankreaseenzyme (Kubota et al. 1998; Mutoh et al. 2003; Simpson 2004). Folglich ist die orale Toxizität des BoNT-Komplexes um das 1000-fache höher als die des aufgereinigten Neurotoxins (Ohishi et al. 1977; Ohishi et al. 1981). Bei physiologischem pH-Wert während der Absorption vom Darm in die Blutbahn dissoziiert der Komplex sofort in das Neurotoxin und die nicht toxischen Komponenten (Fujii 1995; Simpson 2004; Eisele et al. 2011), so dass nur das Neurotoxin in die Blutbahn gelangt (Maksymowych und Simpson 1998). Im Gegensatz zum BoNT ist das TeNT weder mit NTNHA noch HAs assoziiert, da die entsprechenden Gene fehlen. Somit wird es nach oraler Aufnahme nicht resorbiert und ist nicht wirksam.

2.4 Botulismus in Tieren

BoNT/A, B, E und selten auch F lösen Botulismus im Menschen aus. Die beiden Serotypen C und D sind hingegen für Botulismusfälle in Tieren verantwortlich. So sind zahlreiche Fälle bei Pferden, Rindern, Löwen, Hetzhunden und Pavianen beschrieben worden (Critchley 1991). Für die Botulismusfälle in Pferden werden sowohl BoNT/A (Johnson et al. 2010) als auch BoNT/C (Heath et al. 1990) verantwortlich gemacht.

Ebenso wird von Fällen in Schafen und Schweinen sowie in Vögeln, Hühnern und Truthähnen berichtet (Critchley 1991). Auch in Hunden sind Botulismusfälle bekannt (Uriarte et al. 2010). Außerdem sind Botulismusfälle durch Typ C in Füchsen beschrieben, obwohl Füchse eigentlich als resistent gegen BoNT gelten (Lindström et al. 2004). In Nerzen sind ebenfalls Botulismusausbrüche durch Typ C bekannt (Lindström et al. 2004). BoNT/D vergiftet effizient Ratten und Mäuse sowie verschiedene Wiederkäuer (Woodward et al. 2003).

Auch in Tieren wird zwischen klassischem und viszeralem Botulismus unterschieden. Im ersten Fall wird das Neurotoxin über das Futter aufgenommen, während im zweiten Fall das Bakterium *C. botulinum* aufgenommen und das Toxin erst im Darm des Tieres produziert wird. Beim viszeralem Botulismus handelt es sich meistens um eine schleichende Darminfektion, die sich nach der Aufnahme des Bakteriums über mehrere Monate hinziehen kann. In beiden Fällen zeigen sich bei den betroffenen Tieren ähnliche Symptome wie im Menschen (s. Kap. 2.2, (Böhnel et al. 2001)).

Hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass *C. botulinum* vom Tier auf den Menschen übertragen wird. Daher handelt es sich beim Botulismus um eine Zoonose (Conraths et al. 2004; European Parliament L 325/31).

3 BoNT in der Kosmetikindustrie und in der Medizin

Trotz ihrer neurotoxischen Wirkung finden die Botulinum Neurotoxine auch Anwendung in der Kosmetik und in der Medizin, wo sie unter den Markennamen wie *BOTOX®*, *Dysport®* und *Xeomin®* (BoNT/A) sowie *MYOBLOC®/NeuroBloc®* (BoNT/B) bekannt sind. Kosmetische Anwendung finden sie bei der Faltenglättung. Die erste Behandlung erfolgte bereits 1992, die offizielle Zulassung zur kosmetischen Anwendung folgte aber erst 2002 (Lewis 2002). Da die Paralyse der NMJ reversibel ist, erfordert die Aufrechterhaltung der Relaxation der Muskeln wiederholte Injektionen je nach Serotyp alle drei bis vier Monate (Davletov et al. 2005).

Seit Anfang der 1980er Jahre kommt das BoNT auch in der Medizin zum Einsatz (Johnson

1999; Jankovic 2004). So war der amerikanische Augenarzt Alan Scott vermutlich der erste, der das Gift gegen das Schielen einsetzte (Scott 1981). Da BoNT/A die höchste Potenz und somit den längsten paralyisierenden Effekt der sieben BoNT Serotypen hat (Dolly 2003; Foran et al. 2003a), wird hauptsächlich BoNT/A für die Behandlung von neurologisch bedingten Fehlstellungen verwendet, wie z.B. für Dystonien (Bewegungsstörungen) vom Typ Blepharospasmus (Lidkrampf) oder Torticollis spasmodicus (Schiefhals). Bei diesen zervikalen Dystonien wird neben BoNT/A auch BoNT/B eingesetzt. Allerdings wird vom BoNT/B im Menschen eine ~ 40-fach höhere Dosis zur Behandlung benötigt als von BoNT/A, obwohl in der Maus der Potenzunterschied lediglich Faktor 3-5 beträgt (Callaway 2004; Comella et al. 2005; Hunt 2007; Allergan_Inc. 2011). Es wird vermutet, dass die 10-fach schwächere Potenz von BoNT/B im Menschen gegenüber Maus auf speziesspezifische Unterschiede auf molekularer Ebene zurückzuführen ist.

Außerdem findet das BoNT Anwendung gegen Strabismus (Schielen; (Crouch 2006)) und Spasmen, sowie gegen übermäßige Schweißproduktion (Hyperhidrose) und eine hyperaktive Blase. Seit kurzem ist es in den USA auch für eine Behandlung der chronischen Migräne zugelassen (Bekkelund und Alstadhaug 2011; Chankrachang et al. 2011). Jedoch zeigten frühere Studien, dass die prophylaktische Behandlung von Migräne mit BoNT/A sich nicht signifikant von der mit Placebos abhebt (Shuhendler et al. 2009).

Da einige Patienten durch Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern mit der Zeit gegen BoNT/A resistent wurden, versuchte man 1997 die Behandlung von Blepharospasmen mit BoNT/C. Es wurden bemerkenswert lang anhaltende Effekte ähnlich zu BoNT/A erzielt (Eleopra et al. 1997).

4 BoNT als Biowaffe

Aufgrund ihrer extremen Toxizität besitzen die BoNTs das Potenzial zur Biowaffe (Bigalke und Rummel 2005; Dhaked et al. 2010). Demzufolge wurden sie vom CDC auch als *category A select agent* und von der Bundesregierung im Kriegswaffenkontrollgesetz (KWKG) als biologisches Kampfmittel eingeordnet. Das Neurotoxin könnte als Aerosol oder durch die Kontamination von Wasser oder Essenszusätzen verbreitet werden und so viele Todesopfer fordern (Dhaked et al. 2010). So haben Wein und Liu 2005 ein Bioterrorismusszenario theoretisch durchgespielt, in dem unverarbeitete Milch mit Neurotoxin versetzt wurde, bevor diese aufbereitet, pasteurisiert, homogenisiert und mit Vitaminen angereichert wurde. Sie stellten heraus, dass das Potenzial des Neurotoxins abhängig von dessen eingesetzter Menge und von der schnellen Entdeckung der Quelle ist (Wein und Liu 2005). In einer Experimentalstudie wurde allerdings kürzlich gezeigt, dass mindestens 99,9 % des

Einleitung

eingesetzten reinen BoNT/A und B und 99,5 % der jeweiligen Komplexe nach dem standardisierten Pasteurisieren von 72 °C für 15 s inaktiviert werden und nicht nur 70 % wie in der theoretischen Studie angenommen (Wein und Liu 2005; Weingart et al. 2010). Somit wird die Aktivität durch das Pasteurisieren viel stärker reduziert als zuvor angenommen und vermindert deutlich die Bedrohung durch die Zugabe von BoNT in der Milch als mögliche Biowaffe (Weingart et al. 2010).

Zwischen 1990 und 1995 sollte das BoNT mehrmals als biologische Waffe durch Terroristen der japanischen Aum-Sekte in Tokio zum Einsatz kommen. Doch die Anschläge scheiterten, da bei der Kultivierung kein oder nur geringe Toxinmengen entstanden waren. Es war geplant, dass BoNT als Aerosol freizusetzen (Olson 1999; Arnon et al. 2001).

Im zweiten Weltkrieg stellten die USA und auch Japan das Neurotoxin her, um es als Waffen einzusetzen. Nach Inkrafttreten der Biowaffenkonvention produzierten nachweislich noch Russland und der Irak größere Mengen waffenfähiges BoNT (Zilinskas 1997; Bozheyeva et al. 1999; Arnon et al. 2001). Ähnliches werden auch Nordkorea und dem Iran unterstellt (Arnon et al. 2001).

Trotz der extremen Toxizität ist das Botulinum Neurotoxin als biologische Waffe wenig geeignet, da seine Attraktivität durch mehrere Faktoren verringert wird: 1) Es degradiert sehr schnell in der Umwelt und verliert in Folge dessen innerhalb weniger Minuten seine Letalität (Zhang et al. 2010a), und 2) es kann sehr schnell durch standardisierte Wasserhygiene oder durch Pasteurisierung inaktiviert werden (Weingart et al. 2010). Eine thermische Denaturierung erfolgt bereits ab 60 °C (Gu et al. 2012). Ebenso schädigen Detergentien wie SDS und Ethanol BoNT. Dies macht es schwierig ausreichende Konzentrationen zu erhalten, um größeren Schaden anzurichten. 3) Außerdem penetriert das Neurotoxin aufgrund seines hohen Molekulargewichts nicht die intakte Haut. 4) Ein weiterer Nachteil des Einsatzes von BoNT als Biowaffe ist, dass Botulismus nicht von Person zu Person übertragen wird und dass 5) die Behandlung mit einem Impfstoff möglich ist (Zhang et al. 2010a). So erfolgt zurzeit noch eine Behandlung mit Pferde-Antiserum. Doch zukünftig werden humane molekulare Antikörper als Therapie zur Verfügung stehen (Garcia-Rodriguez et al. 2011).

5 Aufbau der clostridiellen Neurotoxine

Die clostridiellen Neurotoxine (CNT) werden als 150 kDa große, einkettige (engl.: *single-chain*, *sc*) Proteine hergestellt. Ihre Aminosäuresequenz ist zu ca. 35 % identisch (Lacy und Stevens 1999) und sie unterscheiden sich kaum in ihrem Aufbau. Die CNT lassen sich in eine leichte Kette (LC, 50 kDa) und eine 100 kDa große schwere Kette (HC)

Einleitung

unterteilen (s. Abbildung 6) und gehören zu den AB-Toxinen. Das Neurotoxin wird posttranslational zwischen LC und HC durch bakterielle oder Wirtsproteasen proteolysiert und bleibt zunächst kovalent über eine Disulfidbrücke (Fischer und Montal 2007) und nicht-kovalent über einen sogenannten Gürtel (engl. *belt*), der sich um die LC legt, verbunden (s. Abbildung 6). Dieser Gürtel besteht aus 54 Aminosäuren am N-Terminus der Translokationsdomäne (H_N) und könnte als Chaperon dienen, das die Entfaltung, den Porendurchgang und die Rückfaltung der LC unterstützt (Brunger et al. 2007). In dieser Form liegt das BoNT als zweikettiges (engl.: *dichain*) Protein vor. Eine Ausnahme bilden BoNT/E und die nicht proteolytischen BoNT/B und F, die als einkettiges Polypeptid den Darm des Wirts erreichen. U.a. im Dünndarm werden sie durch Proteasen, wie z. B. Trypsin, aktiviert (Aoki und Guyer 2001).

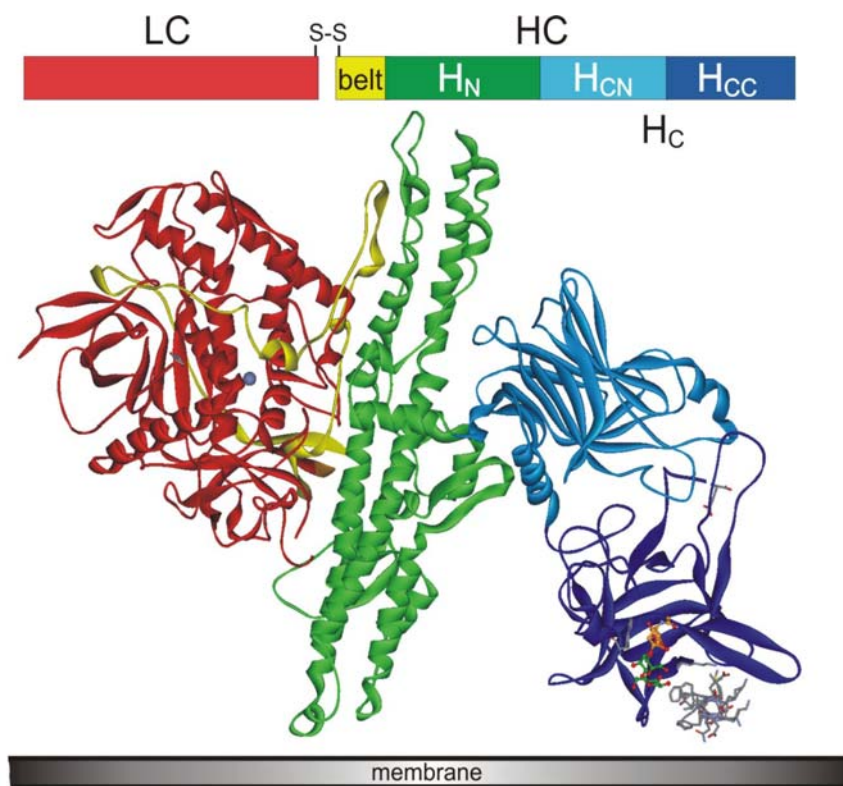


Abbildung 6: Schematische Darstellung der vier Domänenstruktur der CNT (oben) und die Kristallstruktur von BoNT/B mit gebundener Sialyllactose und Synaptotagmin (Syt)-II 7-61 (unten, aus PDB: 1F31 und 2NM1).

Die clostridiellen Neurotoxine werden posttranslational zwischen leichter Kette (LC, rot) und schwerer Kette (HC, grün, hell- und dunkelblau) proteolysiert und bleiben zunächst kovalent über eine Disulfidbrücke und nicht-kovalent über einen Gürtel (gelb) verbunden. Die N-terminale Domäne (H_N , grün) der schweren Kette (HC) vermittelt die Translokation der LC ins Cytosol, wo diese ihre spezifischen SNARE (engl.: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor (NSF) attachment protein receptor*) Proteine hydrolysieren. Der C-terminale Teil (H_{CC}) der in blau dargestellten Bindungsdomäne (H_C) ist für die neurospezifische Bindung des CNTs an die Zelle durch komplexe Ganglioside (grün-orange) und einen spezifischen Proteinrezeptor, hier Syt-II (grau), und für die anschließende Aufnahme in die Zelle verantwortlich (Binz und Rummel 2009).

Einleitung

Die BoNT Intoxikation erfolgt mittels eines mehrstufigen Prozesses (Montecucco und Schiavo 1994), in den jede der vier funktionell unabhängigen Domänen involviert ist (Schiavo et al. 2000; Montal 2010): 1. neurospezifische Bindung an NMJ, 2. Internalisierung durch Rezeptor-vermittelte Endozytose, 3. Translokation und Freisetzung der LC ins Cytosol der Zelle und 4. Spaltung der SNARE (engl.: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor (NSF) attachment protein receptor*) Proteine durch die LC, wodurch die Bildung des SNARE-Komplexes verhindert und somit die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin in den synaptischen Spalt blockiert wird (s. Abbildung 9).

5.1 Die leichte Kette

Die leichte Kette (LC) ist eine Zinkmetalloprotease mit dem Zinkbindungsmotiv HEXXH...E (Binz et al. 1990; Vallee und Auld 1990; Schiavo et al. 1992b; Bode et al. 1993; Binz et al. 2002) und stellt die katalytische Domäne des Toxins dar (A-Untereinheit). Etwa in der Mitte der LC in einem tiefem Spalt befindet sich das Zn^{2+} -Ion, das essenziell für die katalytische Aktivität der LC ist (Schiavo et al. 1992a).

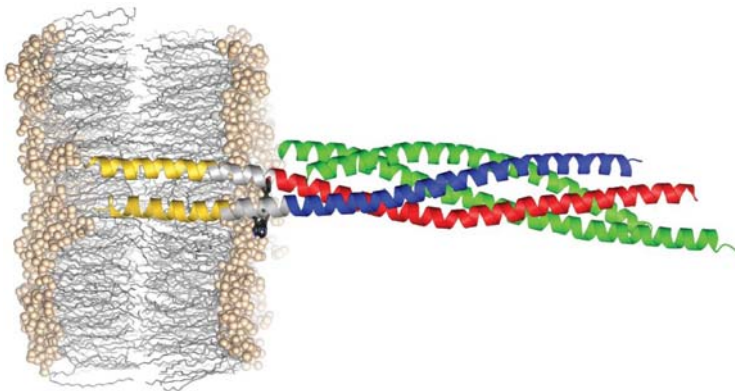


Abbildung 7: Kristallstruktur des membranverankerten synaptischen cis-SNARE Komplexes, wie er nach Vollzug der Membranfusion vorliegt.

Transmembrandomäne (gelb) von Syntaxin 1A (rot) und Synaptobrevin 2 (blau); SNAP-25 (grün) (Stein et al. 2009).

Abhängig vom Serotyp spaltet die LC im Cytosol spezifisch verschiedene SNARE Proteine, welche Bestandteil des Vesikel-Exozytose-Apparats sind (s. Tabelle 2). Dieser Komplex vermittelt die Membranfusion und ist essenziell für die Freisetzung der Neurotransmitter in den Präsynapsen (Sutton et al. 1998; Jahn und Scheller 2006). Zu den Komponenten des Komplexes zählen SNAP-25 (Synaptosomen-assoziiertes Protein von 25 kDa), ein membranassoziiertes Protein der präsynaptischen Membran (Oyler et al. 1989), Syntaxin 1A, ein Transmembranprotein der präsynaptischen Membran (Bennett et al. 1992) und Synaptobrevin 2, ein Transmembranprotein in synaptischen Vesikeln (Baumert et al. 1989; Söllner et al. 1993a; Pevsner et al. 1994). Die drei SNARE Proteine bilden in vitro einen stabilen hetero-trimeren Komplex (Hayashi et al. 1994, s. Abbildung 7).

Die BoNT spalten nur die freien SNARE Proteine. Sobald sich der Komplex gebildet hat, sind

Einleitung

die Spaltungsstellen bzw. die Erkennungssequenzen für die BoNT unzugänglich bzw. die Umfaltung in den Substratgraben der LC ist unmöglich, so dass der Komplex proteolyse-resistent ist (Hayashi et al. 1994).

**Tabelle 2: Die Substrate und die spezifischen Spaltstellen der LC.
(modifiziert nach Zhang et al. 2010a).**

Toxin	Substrat	Spaltstelle
BoNT/A	SNAP-25	Gln197–Arg198
BoNT/B	Synaptobrevin 2	Gln76–Phe77
BoNT/C	SNAP-25, Syntaxin 1A	Arg198–Ala199, Lys253–Ala254
BoNT/D	Synaptobrevin 2	Lys59–Leu60
BoNT/E	SNAP-25	Arg180–Ile181
BoNT/F	Synaptobrevin 2	Gln58–Lys59
BoNT/G	Synaptobrevin 2	Ala81–Ala82
TeNT	Synaptobrevin 2	Gln76–Phe77

Das Substrat von BoNT/A und E ist SNAP-25 (Blasi et al. 1993a; Binz et al. 1994). BoNT/B, D, F und G sowie TeNT spalten Synaptobrevin 2, das zur Familie der Vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMP) gehört (Schiavo et al. 1992c; Schiavo et al. 1993a; Schiavo et al. 1993c; Schiavo et al. 1994; Yamasaki et al. 1994a; Yamasaki et al. 1994b). In dieser Eigenschaft ist BoNT/C einzigartig, da es nicht nur ein SNARE Protein spaltet, sondern sowohl SNAP-25 als auch Syntaxin 1A hydrolysiert (Blasi et al. 1993b; Schiavo et al. 1995; Foran et al. 1996; Vaidyanathan et al. 1999). Die Spaltstellen befinden sich außer bei BoNT/B und TeNT jeweils an unterschiedlichen Positionen (s. Tabelle 2). Die Spaltung der SNARE Proteine verhindert die Fusion des synaptischen Vesikels mit der präsynaptischen Membran, so dass die Freisetzung der Neurotransmitter blockiert wird (Schiavo et al. 2000).

5.2 Die schwere Kette

Die schwere Kette (*heavy chain*, HC, B-Untereinheit) ist über eine Disulfidbrücke mit der LC verbunden und besteht aus drei funktionell unabhängigen Domänen. Die N-terminale 50 kDa große Translokationsdomäne (H_N) besteht zum größten Teil aus α -Helices und der sogenannten Gürtelregion, die LC und HC verbindet. Sie ist für die Internalisierung und Translokation der LC durch die endosomale Membran ins Cytosol der Zelle verantwortlich (Koriazova und Montal 2003; Fischer und Montal 2007). Dieser Teil des Intoxikations-

Einleitung

prozesses der CNT ist bis jetzt am wenigsten verstanden. Das saure Lumen der Endosomen bewirkt die Insertion der HC in die endosomale Membran (Simpson 2004), wo die Transmembrandomäne einen Kanal bildet, durch den die z. T. entfaltete LC ins Cytosol der Zelle gelangt (Koriazova und Montal 2003). Nach dem Eintritt wird die Disulfidbrücke reduziert, so dass sich die LC von der HC löst (Koriazova und Montal 2003; Simpson 2004).

Die 50 kDa große Bindungsdomäne (H_C) lässt sich in eine N-terminale (H_{CN}) und eine C-terminalen Domäne (H_{CC}) unterteilen und vermittelt die neurospezifische Bindung des Neurotoxins an Neuronen, sowie die Aufnahme des Neurotoxins durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (Binz und Rummel 2009). Die Sequenzidentität des H_C -Fragments der CNTs ist niedriger als die der LC und H_N -Domäne, sie liegt auf Aminosäureebene zwischen 21 und 62 %.

Die genaue Funktion der 25 kDa großen H_{CN} -Domäne ist zurzeit noch unklar. Die Arbeitsgruppe um Montecucco postulierte 2009, dass sie sehr schwach die Bindung von BoNT/A an Phosphatidylinositolmonophosphat (PIP) vermittelt und so an mit Sphingomyelin angereicherte Membranmikrodomänen bindet (Muraro et al. 2009). Die H_{CN} -Domäne von TeNT bindet nicht an Spinalganglionzellen aus Ratten (Figueiredo et al. 1995) und NGF-differenzierte PC12-Zellen (Herreros et al. 2000a). Eine direkte Beteiligung der H_{CN} -Domäne von BoNT/A an der Translokation haben Fischer und Mitarbeiter allerdings ausgeschlossen (Fischer et al. 2008). Die H_{CN} -Domäne besteht aus β -Faltblättern und faltet sich als *jelly roll* wie zahlreiche Lektine, weshalb ihr kurzzeitig die Rolle als Träger der Kohlenhydrat-bindungsstelle zugeschrieben wurde (Umland et al. 1997).

$H_{CC}A$	$H_{CC}B$	$H_{CC}C$	$H_{CC}D$	$H_{CC}E$	$H_{CC}F$	$H_{CC}G$	$H_{CC}T$	X
----	24.5	18.7	16.3	31.5	34.8	22.5	22.1	$H_{CC}A$
----	19.2	18.4	24.5	21.9	43.8	25.2		$H_{CC}B$
----		23.0	17.4	19.3	19.2	15.7		$H_{CC}C$
----			19.6	18.2	19.9	16.3		$H_{CC}D$
----				39.7	22.3	19.6		$H_{CC}E$
----					19.8	16.0		$H_{CC}F$
----						23.8		$H_{CC}G$
----								$H_{CC}T$

Abbildung 8: Aminosäuresequenzähnlichkeiten zwischen der H_{CC} -Domäne der BoNT und des TeNT.

Die Identitätswerte von H_{CC} -Domänesequenzvergleichen wurden mittels MegAlign 4.04 kalkuliert (DNASTAR, Madison). Werte über 30 % sind in weißen Zahlen auf schwarzem Hintergrund hervorgehoben (modifiziert nach Binz und Rummel 2009).

Die eigentliche Bindung des Neurotoxins an die Synapse erfolgt über die H_{CC} -Domäne (Binz und Rummel 2009), welche sich als β -*trefoil* faltet. Hierbei bilden zwölf Cluster bestehend aus fünf hochkonservierten Aminosäuren die Kernstruktur der H_{CC} -Domäne (Ginalski et al. 2000). Die verbindenden Bereiche können sehr variabel gestaltet sein und erlauben daher die niedrigen Sequenzhomologien der H_{CC} -Domäne (s. Abbildung 8), welche die Unterschiede in der Rezeptorerkennung unter den BoNTs und somit ihre Spezifität erklären (s. Kap. 6). Die H_{CC} -Domäne ist auch für die intrazelluläre Sortierung der Neurotoxine verantwortlich, die TeNT zu den inhibitorischen Rückenmarksneuronen leitet und BoNT an den Motoneuronenendigungen der NMJ belässt (Schiavo et al. 2000).

5.3 Kristalle und Co-Kristalle der CNT

Um einen besseren Einblick in die Struktur und Bindung der Neurotoxine zu bekommen, wurden bis heute schon mehr als 100 Strukturen der CNT mittels Röntgenstrukturanalyse von Einkristallen bestimmt. Zum Teil wurde das Holotoxin, zum Teil wurden nur einzelne Domänen kristallisiert. Für einige Neurotoxine liegt auch ein Co-Kristall mit Gangliosiden, ihrem Proteinrezeptor bzw. ihrem Substrat vor (s. Tabelle 3).

Als erstes wurde die Bindungsdomäne H_C von TeNT kristallisiert (Umland et al. 1997; Knapp et al. 1998). Lacy und Stevens haben 1998 die erste Kristallstruktur des Holotoxins von BoNT/A mit einer Auflösung von 3,3 Å bestimmt (Lacy et al. 1998), welche die ersten Einblicke in die Domänenorganisation der CNT gibt. Die Kristallstruktur zeigt den Aufbau aus vier funktionell unabhängigen Domänen (s. Abbildung 6).

Ebenso sind die Kristallstrukturen der Holotoxine BoNT/B (1,8 Å, (Swaminathan und Eswaramoorthy 2000a, 2000b)) und BoNT/E (2,65 Å, Kumaran et al. 2009, s. Tabelle 3) bekannt. Im Kristall von BoNT/E wird deutlich, dass sich die Domänenanordnung in BoNT/E deutlich von der in BoNT/A und B (s. Abbildung 6) unterscheidet. In BoNT/E sind sowohl das H_C -Fragment als auch die LC auf derselben Seite der Translokationsdomäne positioniert (Kumaran et al. 2009). Für BoNT/B wurde auch der Co-Kristall mit einem 20 mer Synaptotagmin (Syt)-II Peptid mit einer Auflösung von 2,6 Å bestimmt (Chai et al. 2006). Die Struktur des Komplexes zeigt, dass Syt-II eine kleine Helix bildet, die in der hydrophoben Furche in der Bindungsdomäne von BoNT/B bindet. Im Jahr 2000 wurde schon der Co-Kristall von BoNT/B mit Sialyllactose aufgeklärt (2,6 Å, Swaminathan und Eswaramoorthy 2000b, s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die Kristallstrukturen der CNT.

apo	[Å]	PDB	Quelle	Komplex mit	[Å]	PDB	Quelle
BoNT/A	3,30	3BTA	(Lacy et al. 1998)				
BoNT/B	1,80	1EPW	(Swaminathan und Eswaramoorthy 2000a, 2000b)	Syt-II Sialyllactose	2,60 2,60	2NP0 1F31	(Swaminathan und Eswaramoorthy 2000b; Chai et al. 2006)
BoNT/E	2,65	3FFZ	(Kumaran et al. 2009)				
LC/A	1,80	1E1H	(Segelke et al. 2004)	hSNAP-25 141-204 SNAP-25 197-202	2,10 1,50	1XTG 3DDA	(Breidenbach und Brunger 2004; Kumaran et al. 2008)
LC/B	2,20	1F82	(Hanson und Stevens 2000)				
LC/C	1,75	2QN0	(Jin et al. 2007)				
LC/D	1,65	2FPQ	(Arndt et al. 2006)				
LC/E	2,16	1T3A	(Agarwal et al. 2004)	SNAP-25 180-183	2,25	3D3X	(Agarwal und Swaminathan 2008)
LC/F	2,00	2A8A	(Agarwal et al. 2005)				
LC/G	2,35	1ZB7	(Arndt et al. 2005)				
LC/T	2,30 2,60	1Z7H 1YVG	(Breidenbach und Brunger 2005; Rao et al. 2005)				
LH_NA	2,60	2W2D	(Masuyer et al. 2009)				
LH_NB	2,70	3ZUQ	(Masuyer et al. 2010)				
H_cA	1,70 1,80	2VUA 3FUO	(Stenmark et al. 2008; Fu et al. 2009)	GT1b	1,60	2VU9	(Stenmark et al. 2008)
H_cB				Syt-II	2,15	2NM1	(Jin et al. 2006)
H_cC	2,20 2,50	3R4U 3N7K	(Strotmeier et al. 2011) (Karalewitz et al. 2010)	Sialinsäure	2,15	3R4S	(Strotmeier et al. 2011)
H_cD SA	2,00	3N7L	(Karalewitz et al. 2010)				
H_cD SA W1252A	2,60	3N7M	(Karalewitz et al. 2010)				
H_cCD	1,56	3PME	(Zhang et al. 2011a)				
H_cD	1,72 1,65 2,00	3OBR 3OGG 3N7J	(Strotmeier et al. 2010) (Zhang et al. 2010b) (Karalewitz et al. 2010)	Sialinsäure	2,00	3OBT	(Strotmeier et al. 2010)
H_cD F1240A	2,75	3RMX	(Kroken et al. 2011)				
H_cD W1238A	2,30	3RMY	(Kroken et al. 2011)				
H_cF	2,10	3FUQ	(Fu et al. 2009)	GD1a	2,00	3RSJ	(Benson et al. 2011)
H_cG	1,90 1,98	2VXR 3MPP	(Schmitt et al. 2010; Stenmark et al. 2010)				
H_cT	2,70 1,61	1AF9 1A8D	(Umland et al. 1997) (Knapp et al. 1998)	synthetisiertes GT1b N-Acetyl- galactosamin Lactose Sialinsäure Galactose Disialyllactose Tripeptid YEW	2,50 2,30 2,10 1,80 2,60 2,00 2,30 2,20	1FV2 1FV3 1D0H 1DLL 1DFQ 1DIW 1YYN 1YXW	(Fotinou et al. 2001) (Fotinou et al. 2001) (Emsley et al. 2000) (Emsley et al. 2000) (Emsley et al. 2000) (Emsley et al. 2000) (Jayaraman et al. 2005) (Jayaraman et al. 2005)

Einleitung

Die Kristallstrukturen aller LC von BoNT und TeNT, sowie die LC von BoNT/A, B und E im Co-Kristall mit Substratpeptiden (s. Tabelle 3) liegen ebenfalls vor. Außerdem wurde die LC von BoNT/A zusammen mit möglichen Inhibitoren kristallisiert, wie z. B. mit 2-Mercapto-3-Phenylpropionyl-RATKML (Burnett et al. 2007) und 4-Chlorzimtsäurehydroxamat (Silvaggi et al. 2007), die die enzymatische Aktivität der LC blockieren. Die Inhibitoren bestehen aus Peptiden oder kleinen Molekülen und könnten sowohl als Prophylaktika als auch als Therapeutika für die Behandlung nach einer Aufnahme von BoNT dienen (Burnett et al. 2007; Willis et al. 2008).

Die isolierte H_N-Domäne wurde bisher noch nicht kristallisiert, aber Masuyer und Mitarbeiter haben die Struktur der LC zusammen mit der H_N-Domäne von A (LH_NA) sowie analog LH_NB kristallisiert (2,6 Å, Masuyer et al. 2009; Masuyer et al. 2010, s. Tabelle 3).

Die Kristalle der Bindungsdomäne von BoNT/A, F und G sowie von TeNT liegen ebenfalls vor (s. Tabelle 3). Für H_CA, F und H_CT liegen auch die Co-Kristalle mit Gangliosid bzw. für H_CB mit dessen Proteinrezeptor Syt-II vor (s. Tabelle 3). Die Kristalle der Bindungsdomänen geben einen sehr guten Einblick in die Bindung der Neurotoxine an ihre Rezeptoren.

6 Zwei-Rezeptor-Modell für die Bindung und Aufnahme der BoNT

Montecucco hat 1986 das Zwei-Rezeptor-Modell für die Bindung und Aufnahme von BoNT an Motoneuronen vorgestellt (s. Abbildung 9). Demzufolge werden die BoNT zunächst über Bindung an Ganglioside an der Zelloberfläche angereichert und binden im Zuge des Recycling von synaptischen Vesikeln an einen spezifischen Proteinrezeptor, der sich intravesikulär darstellt. Anschließend werden sie durch Rezeptor-vermittelte Endozytose als Clathrin-bedeckte Vesikel in die Zelle aufgenommen (Simpson 1989).

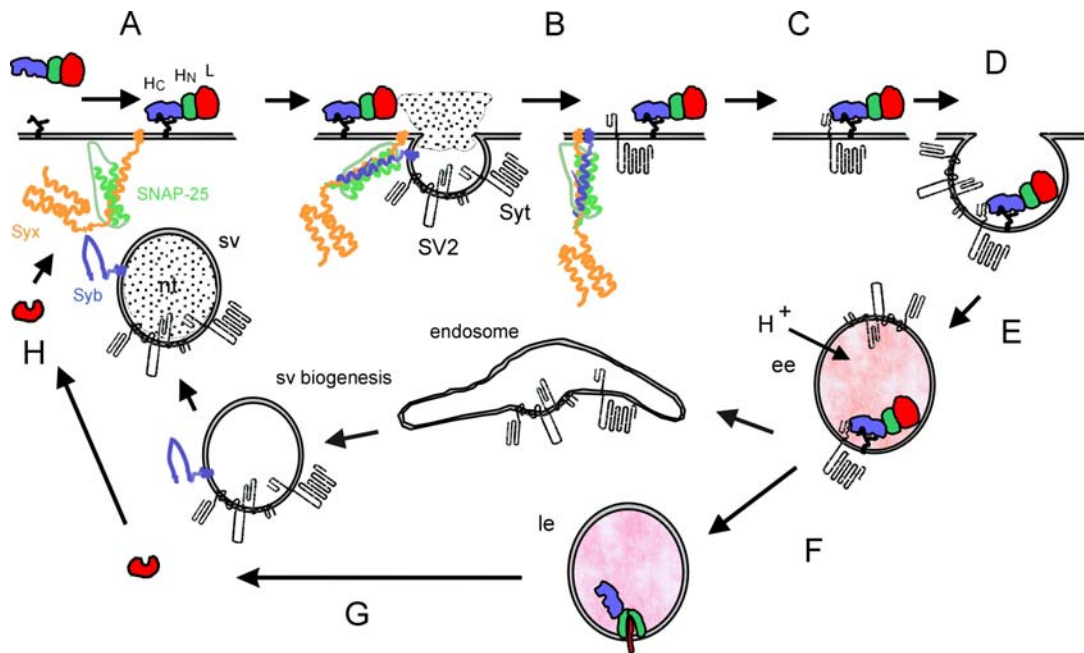


Abbildung 9: Modell für die Aufnahme von BoNT in Nervenzellen.

(A) BoNT bindet zunächst an Ganglioside auf der Zelloberfläche. (B) der intravesikuläre Teil der synaptischen Vesikelproteine ist nach der SNARE-vermittelten Freisetzung der Neurotransmitter auf der Plasmamembran exponiert. (C) BoNT bindet an seinen Proteinrezeptor (hier beispielhaft Syt), während es weiterhin an den Gangliosidrezeptor gebunden ist. (D) Nach der Bindung erfolgt die Endozytose des Neurotoxins mittels Recycling der synaptischen Vesikel. (E) Das Lumen der recycelten Vesikel wird über die vesikuläre Protonenpumpe angesäuert. (F) Die Ansäuerung bewirkt eine Membraninsertion der H_N-Domäne und eine Konformationsänderung der LC, wobei die H_N-Domäne einen Kanal durch die Vesikelmembran formt. (G) Die LC passiert den Kanal kurz nach der teilweisen Entfaltung und wird ins Cytoplasma freigesetzt, nachdem die Reduktion der Disulfidbrücke erfolgte. (H) Hier spaltet die LC ihr spezifisches SNARE(s) Protein: Synaptobrevin 2 (Syb, hellblau), Syntaxin 1A (Syx, orange), oder SNAP-25 (hellgrün), wodurch der synaptische Vesikelkreislauf blockiert wird. ee, frühes Endosom; le, spätes Endosom; sv, synaptisches Vesikel (Binz und Rummel 2009).

6.1 Interaktion der CNT mit Gangliosiden

Ganglioside sind Glykosphingolipide, die negativ geladene Sialinsäuren (NAcNeu/SA) enthalten (s. Abbildung 10). Sie bestehen zudem aus einem hydrophoben Ceramid- und

Einleitung

einem Zuckeranteil. Sie sind am Aufbau der äußeren Plasmamembran beteiligt und insbesondere auf der neuronalen Zelloberfläche zu finden (van Echten und Sandhoff 1993).

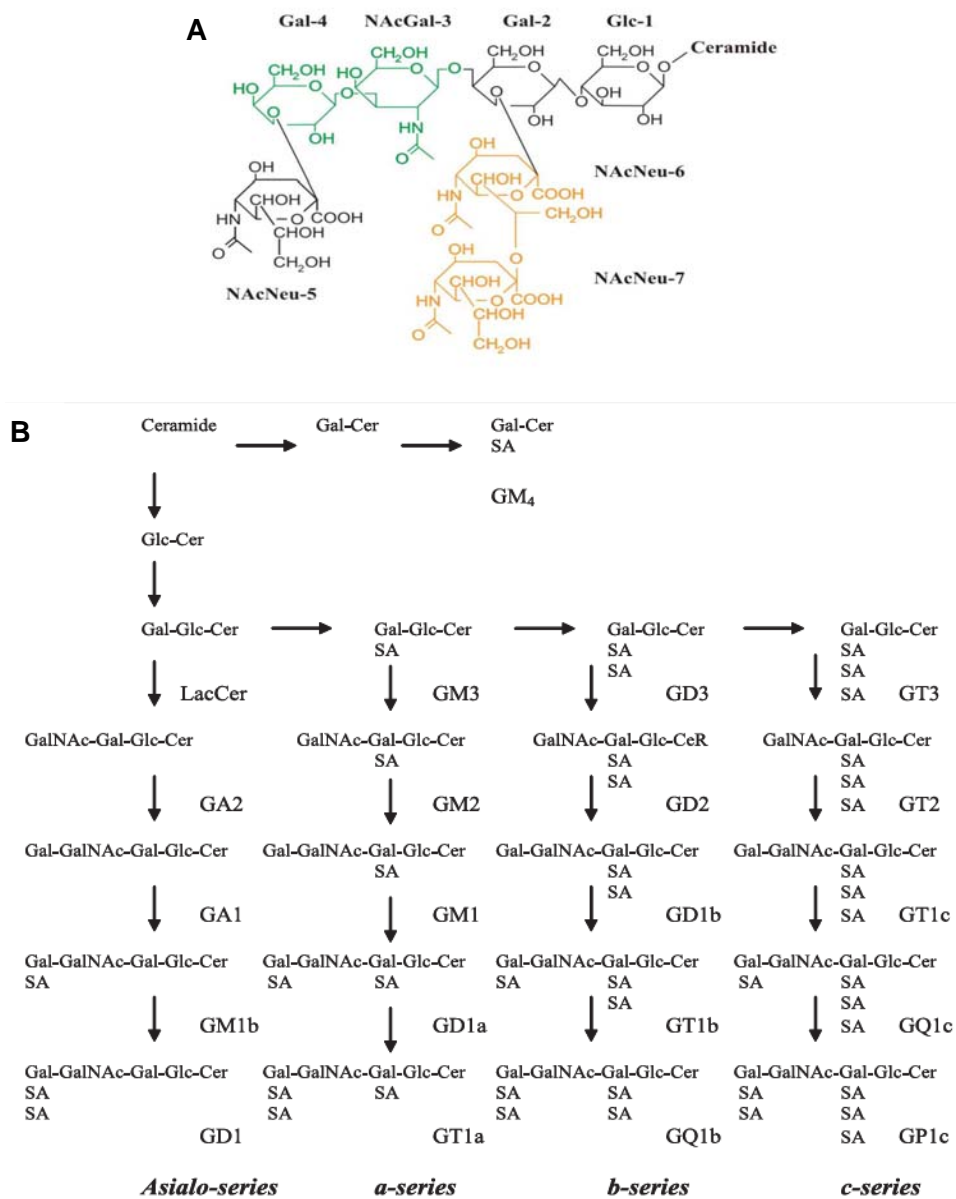


Abbildung 10: Chemische Struktur des Polysialogangliosids GT1b (A, Binz und Rummel 2009) und Synthesewege der Ganglioside im Organismus (B, Hu et al. 2009).

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass Polysialoganglioside an der neurospezifischen Bindung von CNT beteiligt sind (Yowler und Schengrund 2004b). Die Bindung von TeNT an Ganglioside aus Rindergehirn wurde schon 1961 durch van Heyningen und Miller gezeigt. Sie stellten heraus, dass die Bindung von TeNT abhängig von der Anzahl der verfügbaren Sialinsäuren und ihrer freien Carboxygruppen ist (Van Heyningen und Miller 1961). Simpson und Rapport waren die ersten, die die Interaktion von BoNT mit Gangliosiden darstellen

Einleitung

konnten (Simpson und Rapport 1971a, 1971b).

Bigalke und Mitarbeiter haben 1986 gezeigt, dass die Behandlung von neuronalen Membranen mit Neuraminidase, die terminale Sialinsäuren abspaltet, die Aufnahme und folglich die Toxizität von BoNT/A in neuronale Zellen verhindert. Sie schlossen daraus, dass für die Wirkung von BoNT/A vermutlich Neuraminidase-sensitive Strukturen wichtig sind. Die Ergebnisse für TeNT ließen darauf schließen, dass dessen Bindung an einer Stelle auftritt, die insensitive für Neuraminidase ist (Bigalke et al. 1986). Critchley und Mitarbeiter haben allerdings im selben Jahr gezeigt, dass TeNT nach der Behandlung von Rattengehirnmembranen mit Neuraminidase eben nicht mehr an solche bindet (Critchley et al. 1986). Ebenso wurde gezeigt, dass die Vorbehandlung von Synaptosomen mit Neuraminidase die Bindung von BoNT/A verringert, wohingegen die Behandlung mit Trypsin und β -Bungarotoxin nur einen leichten bis gar keinen Effekt auf die Bindung hatte (Kitamura und Sone 1987). Auf Membranen von Liposomen erhöht die Anwesenheit von Gangliosiden die Bindung von BoNT/A, B und E an die lipidhaltige Vesikeloberfläche (Montecucco et al. 1988). Diese Daten lassen vermuten, dass die Bindung von BoNT und TeNT an ihre neuronale Zielzelle durch negativ geladene Lipide und Polysialoganglioside auf der Zellmembran erfolgt (Montecucco et al. 1988). BoNTs binden an GD1a, GD1b und GT1b, die zwei bzw. drei Sialinsäuren enthalten (Kitamura et al. 1980; Montecucco 1986; Binz und Rummel 2009). So zeigen TeNT und BoNT/A, B, C, E und F in verschiedenen *in vitro* Bindungsstudien mit immobilisierten Polysialogangliosiden abhängig von der Ionenstärke Affinitäten im hohen nM-Bereich, wohingegen CNT bei der Bindung an Synaptosomen aus neuronalem Gewebe eine viel höhere Affinität ($K_d = 1.2$ nM) aufweisen (Binz und Rummel 2009).

Des Weiteren wurde die Bindung von BoNT an verschiedenen *Knock out* (KO)-Mäusen getestet, die bestimmte Ganglioside nicht mehr exprimieren. KO-Mäuse, bei denen das Gen für die N-Acetylgalactosamin (NAcGal)-Transferase deletiert wurde und die folglich keine a- und b-Serien Ganglioside, sondern nur noch Lactose-Ceramid (Lac-Cer), GM3 und GD3 exprimieren (s. Abbildung 10), waren gegenüber der Behandlung mit TeNT und BoNT/A und B resistent (Kitamura et al. 1999; Bullens et al. 2002). In KO-Mäusen, denen nur die b-Serien Ganglioside (GD2, GD1b, GT1b und GQ1b, s. Abbildung 10) durch das Ausschalten der α -2,8 Sialyltransferase (GD3-Synthase) fehlen (Okada et al. 2002), sind BoNT/A, B und E trotzdem genauso so toxisch wie in der Wildtyp-Maus, wohingegen TeNT in der Wildtyp-Maus um ca. das 70-fache toxischer ist als in der KO-Maus (Kitamura et al. 2005). Folglich scheinen b-Serien Ganglioside wichtig für die Intoxikation in Mäusen für TeNT aber nicht für BoNT/A, B und E zu sein (Kitamura et al. 2005). Für die BoNTs konnte dieses Ergebnis aber nicht bestätigt werden: Für die Bindung und Aufnahme von BoNT/A, B, E und G werden komplexe Polysialoganglioside benötigt (Dong et al. 2007; Dong et al. 2008). Für BoNT/B

Einleitung

und G konnte gezeigt werden, dass KO-Mäuse, die nur noch das Gangliosid GM3 exprimieren (Kawai et al. 2001), eine hohe Resistenz gegenüber BoNT/B und G zeigen (Rummel et al. 2007). Auch haben Rummel und Mitarbeiter 2009 gezeigt, dass die Neurotoxizität von BoNT/A, C, E und F von komplexen Polysialogangliosiden wie GD1b und GT1b abhängig ist (Rummel et al. 2009). GM3-Synthase KO-Mäuse, die nur noch Lac-Cer exprimieren sollten, sind insensitiv für BoNT/C (Tsukamoto et al. 2005).

Folglich vermitteln komplexe Polysialoganglioside wie GT1b, GD1b und GD1a den ersten Zellkontakt aller CNT und spielen eine essenzielle Rolle in ihrer spezifischen Bindung an neuronale Zellen (Binz und Rummel 2009).

Für BoNT/A, B, E, F und G konnte das Zwei-Rezeptor-Modell von Montecucco mittlerweile bestätigt werden. Für diese fünf Serotypen wurden sowohl die Gangliosidbindungstasche als auch die Proteinrezeptoren (s. Kap. 6.2) sowie teilweise ihre Bindungsplätze identifiziert.

Bei der Gangliosidbindungstasche handelt es sich um einen konservierten Bereich in der Primärstruktur der BoNT, der das Gangliosid-Bindungsmotiv E...H(K)...SXWY...G trägt. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bilden eine Seite und den Boden der Tasche für den hydrophoben Teil eines Zuckerrings des Gangliosids. Die polaren Aminosäuren, wie Glutamat, Serin und Asparagin, sind gegenüber des Tryptophans positioniert, so dass sie mit der Hydroxygruppe eines Zuckers interagieren können. Die polaren Interaktionen werden durch ein Histidin oder in BoNT/E durch ein Lysin unterstützt (Binz und Rummel 2009). Dieses Motiv konnte in der H_{CC}-Domäne von BoNT/A (Rummel et al. 2004a; Stenmark et al. 2008), BoNT/B (Swaminathan und Eswaramoorthy 2000b; Rummel et al. 2004a; Swaminathan 2011), BoNT/E (Kumaran et al. 2009; Rummel et al. 2009), BoNT/F (Fu et al. 2009; Rummel et al. 2009), BoNT/G (Rummel et al. 2004a; Rummel et al. 2007; Stenmark et al. 2010) und TeNT (Fotinou et al. 2001; Louch et al. 2002; Rummel et al. 2003) identifiziert werden. Somit fehlte der Nachweis eines Gangliosid-Bindungsmotivs nur in BoNT/C und BoNT/D.

In den Co-Kristallen des H_C-Fragments von TeNT mit Lactose (Lac), Galactose (Gal), NAcGal oder Sialinsäure wurden vier Kohlenhydratbindungsstellen identifiziert ((Emsley et al. 2000), s. Kap. 5.3). Hierbei hatte die Lactose in der Gangliosidbindungstasche an das konservierte Gangliosid-Bindungsmotiv gebunden. An einer zweiten Stelle konnte eine Kohlenhydratbindungsregion ausgemacht werden, in der sowohl das NAcGal als auch in dessen Nähe die Sialinsäure gebunden hat. Wenig später konnte mittels eines Co-Kristalls des H_C-Fragments von TeNT mit synthetischem GT1b gezeigt werden, dass TeNT zwei Gangliosidbindungsstellen besitzt: eine Lactose-Bindungsstelle um das Tryptophan W1289 („W“-Tasche) des Gangliosid-Bindungsmotivs und eine Sialinsäurebindungsstelle um das

Einleitung

Arginin R1226 („R“-Tasche) (Fotinou et al. 2001). Diese beiden Bindungsstellen wurden mittels Mutationsstudien, Massenspektrometrie und physiologischer Studien detailliert charakterisiert (Rummel et al. 2003). Chen und Mitarbeiter untersuchten 2008 die jeweilige Gangliosidspezifität der Lactose- und Sialinsäurebindungsstelle (Chen et al. 2008). Sie konnten biochemisch und kristallographisch zeigen, dass das Gangliosid GM1a in der W-Tasche und GD3 in der R-Tasche bindet (Chen 2009). Ganglioside sind somit ein hoch affiner Rezeptor von TeNT und könnten die einzigen Rezeptoren von TeNT sein (Chen 2009). Es ist aber nicht auszuschließen, dass bevorzugt die Sialinsäurebindungstasche in TeNT in einem späteren Schritt während der Endozytose oder des intrazellulären Transports mit einem Proteinrezeptor in Wechselwirkung tritt (Chen et al. 2008).

Im Gegensatz zu TeNT besitzen BoNT/A und B nur eine Gangliosidbindungsstelle. Diese trägt das Gangliosid-Bindungsmotiv (Rummel et al. 2004a). Für BoNT/D wurde postuliert, dass es nicht mit Gangliosiden interagiert, da in einer Dünnschichtchromatographie mit Lipidextrakten aus Synaptosomen keine Bindung an Ganglioside nachgewiesen werden konnte und da das Fehlen der Polysialoganglioside in Kleinhirngranularneuronen (*cerebellar granular neurons*, CGN) aus GM3-Synthase KO-Mäusen die Aufnahme von BoNT/D in diese Neuronen nicht verminderte (Tsukamoto et al. 2005). Zudem zeigte dieselbe Forschungsgruppe, dass BoNT/D möglicherweise mit Phosphatidylethanolamin (PE) interagiert (Tsukamoto et al. 2005; Zhang et al. 2010b). Sie räumte aber auch ein, dass es doch eher unwahrscheinlich sein könnte, dass PE als neurospezifischer Rezeptor fungiert, da PE hauptsächlich auf der cytosolischen Seite der Membran vorkommt (Op den Kamp 1979). Allerdings wurde schon gezeigt, dass PE durch ATP-Bindekassetten-Transporter an die Außenseite der Membran gelangt (Williamson und Schlegel 2002). Für BoNT/C schließen sie hingegen eine ausschließliche Bindung an Ganglioside nicht aus. Sie konnten zeigen, dass sowohl H_CC als auch H_CD noch an Synaptosomen binden, die zuvor mit Proteinase K behandelt oder erhitzt wurden. Dies lässt darauf schließen, dass der Rezeptor nicht aus einem Polypeptid besteht (Tsukamoto et al. 2005). Kürzlich wurde die Bindung von H_CC an negativ geladene Phospholipide, insbesondere an Phosphoinositide, gezeigt, dessen Interaktion die Bindung zwischen neuronaler Membran und BoNT/C stärken soll (Zhang und Varnum 2011b). Die Bindung von BoNT/C an GD1a, GD1b und GT1b erfolgt unter vielen verschiedenen Bedingungen, während BoNT/B und F nur bei schwach ionischen Bedingungen und 37°C binden (Ochanda et al. 1986). Die Bindung an Ganglioside und PE erfolgt auch bei BoNT/C bzw. D mittels der H_{CC}-Domäne, wobei beim Serotyp C das Peptidmotiv um W1258 (Rummel et al. 2009) und beim Serotyp D die beiden Lysine K1113 und K1135 beteiligt sein sollen (Tsukamoto et al. 2008). Auffällig ist, dass sowohl in BoNT/C als auch BoNT/D das Gangliosid-Bindungsmotiv fehlt.

6.2 Proteinrezeptoren der CNT

Bereits 1986 hat Montecucco postuliert, dass neben den Gangliosiden noch ein Proteinrezeptor in die Bindung involviert ist. Dies könnte auch eine Erklärung für den unterschiedlichen Wirkort von BoNT und TeNT liefern (Montecucco und Schiavo 1994). Die Bindung an Ganglioside vermittelt zunächst die Anreicherung der CNT an die Zelloberfläche, wodurch die Bindung an einen in viel geringeren Konzentrationen und nicht permanent zugänglichen Proteinrezeptor erhöht wird. Schließlich folgt die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der CNT in die Zelle (Simpson 1989).

Für TeNT konnte gezeigt werden, dass das rekombinante H_C-Fragment an NGF-differenzierte PC12-Zellen und an primäre Kulturen von Rückenmarkmotoneuronen bindet und speziell mit einem 15 bis 20 kDa N-glykosylierten Bindeprotein (p15) interagiert (Schiavo et al. 1991; Herreros et al. 2000a). Dieses Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Glykoprotein wurde als Thy-1 in NGF-differenzierten PC12-Zellen identifiziert (Herreros et al. 2001). Thy-1-KO-Mäusen sind aber weiterhin sensitiv gegenüber TeNT (Persönliche Mitteilung von G. Schiavo an A. Rummel).

Es scheint also ein neuronaler Proteinrezeptor für TeNT zu existieren, der genauso wie die Ganglioside über die H_{CC}-Domäne von TeNT gebunden wird (Herreros et al. 2000b). Die Bindung an PC12-Zellen erfolgt aber unabhängig von einer Behandlung mit Proteinase K (Chen et al. 2009). Als Proteinrezeptor für TeNT wurde vor Kurzem das Synaptische Vesikel Glykoprotein 2 (SV2) postuliert (Yeh et al. 2010). TeNT bindet aber sowohl an stimulierte als auch an nicht stimulierte kortikale Neuronen (Chen et al. 2009; Yeh et al. 2010; Kroken et al. 2011). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass SV2 vermutlich doch nicht der relevante Rezeptor für TeNT ist, da TeNT bei saurem pH des Umgebungsmediums direkt über die Zellmembran in CGN und PC12-Zellen aufgenommen wurde, wohingegen BoNT/A, dessen Proteinrezeptor SV2 ist, nicht bei saurem Milieu in die Zellen aufgenommen wurde (Pirazzini et al. 2011).

Für BoNT/B wurde in mehreren *in vitro* Studien eine Bindung an Synaptotagmin (Syt)-I und -II gezeigt (Nishiki et al. 1994; Nishiki et al. 1996a). Synaptotagmin ist ein synaptisches Vesikelmembranprotein, das eine Rolle in der Regulation der Fusion der synaptischen Vesikel spielt (Perin et al. 1990; Geppert et al. 1991). Zudem wird vermutet, dass es die Calcium-abhängige Regulation der Membranverschmelzung vermittelt (Yoshihara und Montana 2004). Die Arbeitsgruppe um Chapman bestätigte 2003 die Bindung von BoNT/B an Syt-I und -II und grenzte sie auf den 20 Aminosäuren umfassenden Bereich der luminalen Domäne der Transmembrandomäne ein (Dong et al. 2003, s. Abbildung 12).

In Syt-II interagieren sechs hydrophobe Aminosäuren mit zwei benachbarten Rezeptor-

Einleitung

bindungstaschen im H_C-Fragment von BoNT/B (s. Abbildung 11). Besonders wichtig sind die beiden Phenylalanine F47 und F54 sowie das Glutamat E57, das eine wichtige Salzbrücke zur Aminosäure K1192 von H_CB bildet (Chai et al. 2006; Jin et al. 2006, s. Abbildung 11). Zudem konnte eine zehnfach höhere Affinität von BoNT/B an die Isoform II als an die Isoform I von Syt gezeigt werden (Nishiki et al. 1996a). Jin et al. konnten 2006 sogar eine 100-fach höhere Affinität von BoNT/B an Syt-II ($K_d = 39$ nM) gegenüber Syt-I zeigen (Jin et al. 2006). Diese Diskrepanz ist auf die Substitution von F55 und I58 in Syt-II durch M47 und L50 aus Syt-I zurückzuführen (Jin et al. 2006).

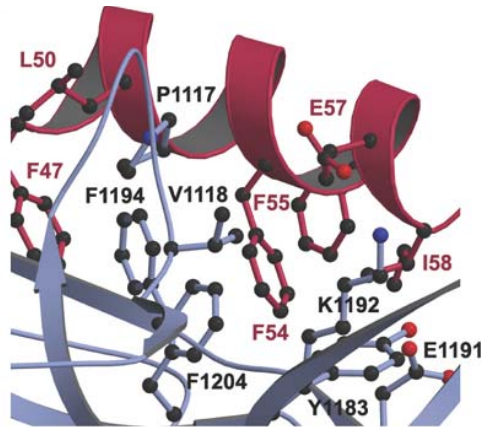


Abbildung 11: Der H_CB-Syt-II Komplex wird durch mehrere intermolekulare Interaktionen stabilisiert.

Vier Syt-II (rot) Reste, F54, F55, E57 und I58, interagieren mit der Rezeptortasche in H_CB (grau) bestehend aus K1113, S1116, P1117, V1118, Y1183, E1191, K1192, F1194 and F1204 (Jin et al. 2006).

Nach der Identifizierung des Proteinrezeptors für BoNT/B und nachdem gezeigt worden war, dass einige der BoNT stimulationsabhängig in neuronale Zellen aufgenommen werden (Hughes und Whaler 1962; Black und Dolly 1986; Keller et al. 2004), konzentrierte sich die Suche nach den Proteinrezeptoren für die anderen BoNT ebenfalls auf synaptische Vesikelproteine.

Als Proteinrezeptoren für BoNT/A wurden die drei Isoformen SV2A, B und C vom Synaptischen Vesikel Glykoprotein 2 (Dong et al. 2006; Mahrhold et al. 2006) identifiziert. BoNT/E bindet an N-glykosyliertes SV2A und B (Dong et al. 2008). Die große luminale Domäne 4 von SV2 vermittelt die Aufnahme dieser BoNTs in Motoneurone (s. Abbildung 12). Für BoNT/F wurden zunächst durch Fu et al. 2009 ebenfalls SV2 und durch Rummel et al. 2009 alle drei Isoformen von SV2 mittels Wettbewerbsassays und Coimmunopräzipitation als Interaktionspartner vorgeschlagen (Fu et al. 2009; Rummel et al. 2009). Jedoch wurde 2011 die Bindung von BoNT/F an SV2 wieder in Frage gestellt. Die Arbeitsgruppen um Dong und

Einleitung

Chapman konnten an SV2A/B-Doppel-KO-Hippocampus Neuronen Aufnahme von BoNT/F nachweisen (Yeh et al. 2010; Peng et al. 2011). Hier ist aber zu beachten, dass diese Doppel-KO-Neuronen immer noch signifikante Mengen an SV2C exprimieren, das die Bindung vermitteln könnte (Peng et al. 2011).

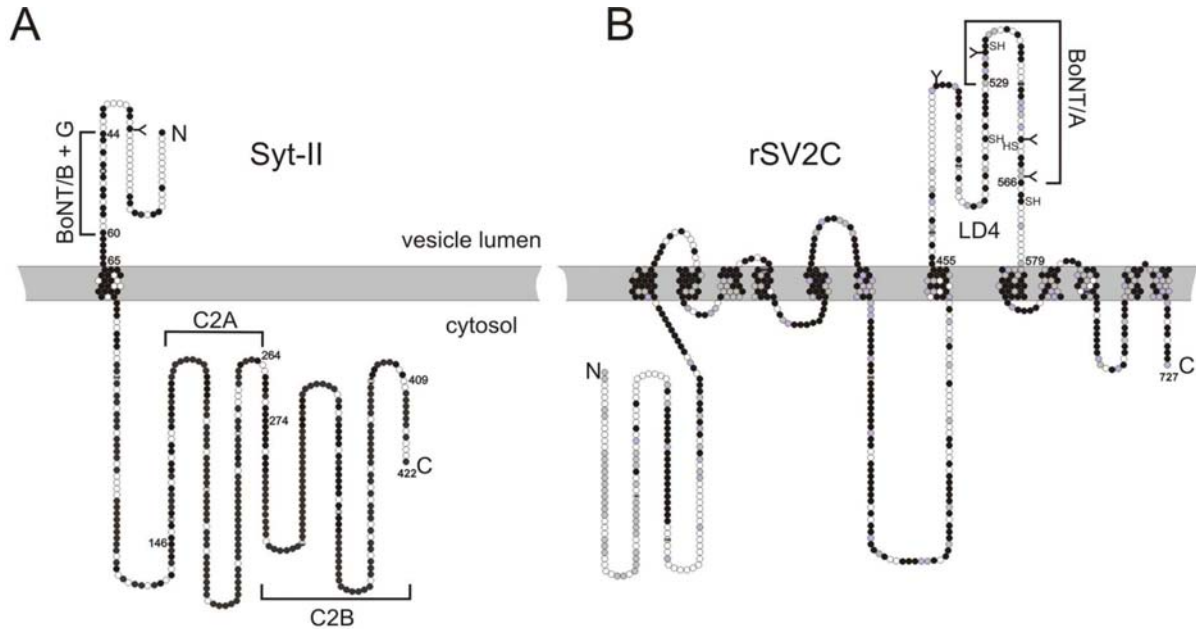


Abbildung 12: Membrantopologie der BoNT Proteinrezeptoren (Binz und Rummel 2009).

(A) Syt-II ist ein Typ I Membranprotein bestehend aus 422 Aminosäuren (AS). Die 65 N-terminalen AS sind im Lumen der synaptischen Vesikel lokalisiert. Zwei Ca^{2+} -bindende C2 Domänen bilden den cytosolischen Teil (angegeben in Klammern: C2A: AS 146–264; C2B: AS 274–409). Konservierte Reste in Syt-I sind in schwarz dargestellt. Der Teil, der die Bindung an BoNT/B und G vermittelt, ist durch Klammern angezeigt. „Y“ repräsentiert eine N-Glykosylierungsstelle, die nicht die Bindung an BoNT/B und G vermittelt. (B) SV2C repräsentiert ein Glykoprotein bestehend aus 727 AS mit 12 putativen Transmembrandomänen. Identische Reste sind in schwarz dargestellt, solche in SV2A und SV2B in grau. Der C-terminale Teil (angedeutet durch Klammern) der großen luminalen Domäne (LD4), die aus 125 AS besteht und vier N-Glykosylierungsstellen (angedeutet durch ein „Y“) besitzt, vermittelt die Interaktion mit BoNT/A und E. SH steht für die Cysteine, die vermutlich eine Disulfidbrücke formen. Die Bindung von BoNT/E an SV2A und SV2B erfordert die Glykosylierung an der 3. N-Glykosylierungsstelle (Dong et al. 2008).

BoNT/B und G teilen sich die Rezeptoren Syt-I und -II (s. Abbildung 12, Nishiki et al. 1994; Nishiki et al. 1996a; Dong et al. 2003; Rummel et al. 2004b; Dong et al. 2007; Rummel et al. 2007). Hier vermittelt das intravesikuläre Segment von Syt die Aufnahme von BoNT/B und G. Der Co-Kristall von BoNT/B mit Syt-II unterstützt die Mutationsstudien zur Identifizierung der Bindungstasche (Chai et al. 2006; Jin et al. 2006). Kein anderer Serotyp der BoNT bindet spezifisch an Syt-I oder -II (Rummel et al. 2004b). Für BoNT/C und D konnte bisher noch kein Proteinrezeptor identifiziert werden.

7 Aufgabenstellung

Erste Hinweise deuteten darauf hin, dass das H_C-Fragment eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit dem NTNHA spielt (Chen et al. 1997). In Kooperation mit R. Jin (Sanford-Burnam Institut, La Jolla, CA) soll der M-PTC von BoNT/A kristallisiert und an der Komplexbildung beteiligte Domänen bzw. Aminosäuren aus BoNT/A identifiziert werden.

Für BoNT/B war bekannt, dass es im Menschen mit einer ca. 10-fach höheren Dosis eingesetzt werden muss als in der Maus. Da das Substrat von BoNT/B in beiden Spezies zu 100 % identisch ist, muss dieser Unterschied in der Rezeptorerkennung begründet sein. So war es ein Ziel dieser Arbeit, die Bindung des H_C-Fragments von BoNT/B an Syt-II aus Ratte und Mensch mittels GST-Pulldown zu analysieren und Unterschiede auf Aminosäureebene herauszustellen.

Der Aufnahmemechanismus für die beiden Serotypen BoNT/C und BoNT/D war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Aufnahmemechanismus für BoNT/C und D aufzuklären, indem sowohl die neuronalen Rezeptoren als auch deren Bindungstaschen in den BoNT/C und D H_C-Fragmenten identifiziert und die Rezeptor-H_C-Wechselwirkungen charakterisiert werden soll.

Hierzu soll an dem *ex vivo* Maus-Präparat *Nervus phrenicus*-Hemidiaphragma aus Gangliosid-defizienten Mäusen eine Veränderung der Neurotoxizität der BoNT/C und D ermittelt und deren physiologische Relevanz geklärt werden. Anschließend soll in der Zellbindungsdomäne (H_C) von BoNT/C und D mittels gerichteter Mutagenese und verschiedenen Bindungs- und Toxizitätsassays die Gangliosidbindungstasche identifiziert werden. Hierzu sollte initial die Analyse eines Sequenzalignments sowie die Berechnung von Homologiemodellen Anhaltspunkte für potenzielle Bindungsstellen geben. Aufgrund der geringen Homologie der H_{CC}-Domäne von BoNT/C und D zu den anderen Serotypen war die Erstellung eines aussagekräftigen Sequenzalignments, das Anhaltspunkte für potenzielle Bindungsstellen geben könnte, problematisch. Zur Unterstützung soll die Lösung der Kristallstruktur der Bindungsdomänen der beiden Serotypen Einblicke in mögliche Bindungsstellen geben.

Ergebnisse

Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex.

Shenyan Gu, Sophie Rumpel, Jie Zhou, Jasmin Strotmeier, Hans Bigalke, Kay Perry, Charles B. Shoemaker, Andreas Rummel, Rongsheng Jin (2012).

publiziert in Science. 335 (6071): 977-81. (24.02.2012)

Reprinted with permission from AAAS.

(<http://www.sciencemag.org/content/335/6071/977.short>)

"Readers may view, browse, and/or download material for temporary copying purposes only, provided these uses are for noncommercial personal purposes. Except as provided by law, this material may not be further reproduced, distributed, transmitted, modified, adapted, performed, displayed, published, or sold in whole or in part, without prior written permission from the publisher."

Strotmeier: folgende Experimente entworfen, durchgeführt und analysiert:

- Klonierung NTNHA-A
- Charakterisierung von BoNT/A^{R861A/E868P/K871P} und BoNT/A^{L862K/L863E/T867K}
 - a. Circular Dicroism
 - b. GST-Pulldown zur Rezeptorbindekapazität
 - c. Katalytische Aktivität

Botulinum Neurotoxin Is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex

Shenyang Gu,¹ Sophie Rumpel,² Jie Zhou,¹ Jasmin Strotmeier,² Hans Bigalke,² Kay Perry,³ Charles B. Shoemaker,⁴ Andreas Rummel,² Rongsheng Jin^{1*}

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are highly poisonous substances that are also effective medicines. Accidental BoNT poisoning often occurs through ingestion of *Clostridium botulinum*-contaminated food. Here, we present the crystal structure of a BoNT in complex with a clostridial nontoxic nonhemagglutinin (NTNHA) protein at 2.7 angstroms. Biochemical and functional studies show that NTNHA provides large and multivalent binding interfaces to protect BoNT from gastrointestinal degradation. Moreover, the structure highlights key residues in BoNT that regulate complex assembly in a pH-dependent manner. Collectively, our findings define the molecular mechanisms by which NTNHA shields BoNT in the hostile gastrointestinal environment and releases it upon entry into the circulation. These results will assist in the design of small molecules for inhibiting oral BoNT intoxication and of delivery vehicles for oral administration of biologics.

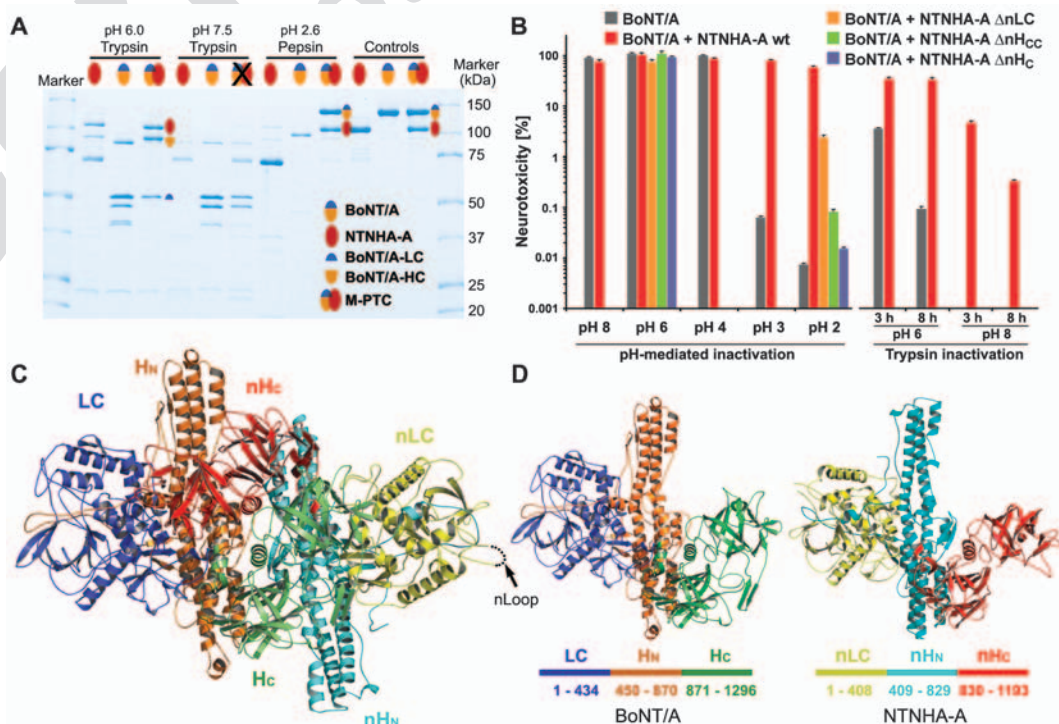
The seven serotypes of botulinum neurotoxin (BoNT) (named A to G) are sequence-specific endopeptidases. They invade nerve cells at neuromuscular junctions, where they inhibit the release of the neurotransmitter acetylcholine by cleaving SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) proteins, and subsequently paralyze the affected muscles (1). Although BoNT poisoning often occurs through oral ingestion of tainted food products, the molecular mechanism by which BoNTs avoid destruction in the hostile environment of the gastrointestinal (GI) tract is unknown.

Naturally occurring BoNTs are protected within progenitor toxin complexes (PTCs), which are high molecular weight multiprotein complexes composed of the BoNT and several nontoxic neurotoxin-associated proteins (NAPs) (2). The NAPs include the 140-kD NTNHA (nontoxic nonhemagglutinin), which together with BoNT forms the minimally functional PTC (M-PTC), and three hemagglutinin (HA) proteins, which assemble with the M-PTC and have been suggested to facilitate BoNT transcytosis across the intestinal barrier (1, 3). The protecting function of M-PTC is sufficiently effective that it reduces the oral me-

dian lethal dose (LD₅₀) of BoNT 10- to 20-fold compared with free BoNT (4, 5). Intriguingly, the protected BoNT is released from the PTC upon transition from acidic to neutral pH, as occurs during absorption from the intestine into the bloodstream (6). Once in the circulation, free BoNT travels to neuromuscular junctions, where it invades neurons. The molecular architecture of PTC is largely unknown, with the exception of two low-resolution structures revealed by electron crystallography (30 Å) and electron microscopy (7, 8).

We focused our study on the M-PTC of serotype BoNT/A1 because it is a major cause of human botulism and is a concern for bioterrorism (9). We established a robust recombinant system in *Escherichia coli* to produce a genetically modified, catalytically inactive BoNT/A (~150 kD) that carries three mutations [Glu²²⁴→Gln²²⁴, Arg³⁶³→Ala³⁶³, and Tyr³⁶⁶→Phe³⁶⁶ (E224Q/R363A/Y366F)] in the catalytic site (10) and the corresponding full-length NTNHA-A1 (~140 kD, referred to as NTNHA-A) (11). BoNT/A^{E224Q/R363A/Y366F}

Fig. 1. The architecture of M-PTC. (A) NTNHA-A protects BoNT/Ai against trypsin and pepsin digestion when they assemble into M-PTC in an acidic environment. (B) NTNHA-A protects active BoNT/A against low pH-mediated inactivation. It also protects BoNT/A against trypsin inactivation at pH = 6.0 but not at pH = 8.0. wt, wild type. (C) Cartoon presentation of the M-PTC. BoNT/Ai domains are blue (LC), orange (H_N), and green (H_C). NTNHA-A domains are yellow (nLC), cyan (nH_N), and red (nH_C). (D) Individual structures of BoNT/Ai and NTNHA-A in the M-PTC.



adopts a structure essentially identical to that of wild-type BoNT/A and is referred to here as BoNT/Ai (fig. S1 and table S2). The free forms of BoNT/Ai and NTNHA-A are monomeric at pH = 6.0 and 7.5 (fig. S2) and assemble into a monomeric M-PTC at pH = 6.0 with a dissociation constant (K_d) of ~30.8 nM and 1:1 stoichiometry, as analyzed by analytic ultracentrifugation and isothermal titration calorimetry (fig. S2 and table S1). By contrast, no assembly occurs at pH = 7.5.

Free BoNT/Ai and NTNHA-A are inherently fragile, as shown by *in vitro* cleavage by digestive proteases such as trypsin and pepsin (Fig. 1A). Free wild-type BoNT/A is inactivated by trypsin or by incubation at pH = 3 or less, on the basis of *ex vivo* mice phrenic nerve hemidiaphragm (MPN) assays (Fig. 1B). In contrast, the structural integrity and activity of BoNT/A is protected in the *in vitro*-reconstituted M-PTC at low, but not at neutral or alkaline, pH (Fig. 1, A and B). Thus, the recombinant M-PTC faithfully mimics the behavior of native M-PTC.

To understand the molecular mechanism underlying BoNT/A protection and the pH-dependent assembly of the M-PTC, we determined a 2.7 Å resolution crystal structure of the M-PTC facilitated by a BoNT/A-specific nanobody, as well as the structure of a nanobody-free M-PTC at 3.9 Å resolution (Fig. 1, C and D; figs. S3 and S4; and table S2). Nanobodies are the smallest antigen-binding fragments (~12 to 15 kD) of naturally occurring heavy-chain-only antibodies (VHH) present in camelids and have been exploited as inhibitors of BoNTs (12). The VHH binds on the surface of BoNT/Ai far from the NTNHA-A-interacting sites. It facilitates a more compact crystal packing and thus improves the diffraction quality of the crystals (fig. S5 and table S3). The two independently solved crystal structures of the M-PTC are indistinguishable, demonstrating that the structure presented here represents the physiological conformation of the M-PTC, independent of VHH or crystal packing (fig. S3B).

BoNT/Ai and NTNHA-A form an interlocked compact complex and bury an unusually large solvent-accessible area (~3600 Å² per molecule) through multivalent interfaces (Fig. 1). BoNT/Ai is composed of a 50-kD light chain (LC, a Zn²⁺-endoprotease) and a 100-kD heavy chain (HC), which has two domains: The N-terminal domain (H_N) mediates LC translocation across the endosomal membrane, whereas the C-terminal domain (H_C) is the receptor-binding domain (1). Unexpectedly, the protective component NTNHA-A has a structure highly similar to BoNT/Ai despite a low sequence identity (~20%). NTNHA-A also displays three domains that, when compared pairwise with LC, H_N, or H_C, yield root mean square deviations of 2.2 Å (314 C α pairs), 2.3 Å (300), and 1.9 Å (319), respectively, and thus are termed nLC, nH_N, and nH_C ("n" indicates NTNHA) (Fig. 1, C and D, and fig. S6). At the center of the complex is the H_C fragment that is surrounded by all three domains of NTNHA-A (table S4). Notably,

H_C rotates about 140° around a linker connecting H_N and H_C, resulting in a distinct conformation in comparison to the free form of BoNT/A (Fig. 2) (13). Complementing this, H_N also forms many polar interactions with nH_N and nH_C (Fig. 3, D and E). In contrast, LC does not bind NTNHA-A.

Despite their similarities, a structural comparison between NTNHA-A and BoNT/Ai revealed several features specific to NTNHA-A (fig. S6). NTNHA-A does not possess most of the characteristic structural features of BoNT/A that are crucial to its functions: (i) nLC does not have the catalytic zinc-binding HEXxH+E signature motif that is conserved among all BoNT serotypes; (ii) NTNHA-A does not have the homologous long loop (Val⁴³¹ to Leu⁴⁵³) that in BoNT/A connects LC and HC and is cleaved posttranslationally to activate BoNT/A; (iii) a functionally essential disulfide bond (Cys⁴³⁰-Cys⁴⁵⁴ in BoNT/A) that is involved in translocation of LC and is conserved in all BoNTs is not present in NTNHA-A (14); (iv) nH_C maintains the core structure of H_C but has deletions in many surface areas that are not directly involved in BoNT/Ai binding; and (v) none of the ganglioside-binding residues of H_C, including the highly conserved ganglioside-binding motif (E+H+SxWY) found in many BoNT serotypes, is conserved in NTNHA-A (15, 16).

NTNHA-A has a large insert in nLC (nGly¹¹⁶ to nAla¹⁴⁸, termed the nLoop) that is not present in LC. Furthermore, the nLoop is conserved in NTNHA A1, B, C, D, and G but is missing in A2, E, and F (fig. S7). Notably, many of the known spontaneous nicking sites in NTNHA are located in the nLoop (17), and, consistent with this, we observed that recombinant NTNHA-A was nicked between nLys¹³³ and nLys¹³⁴ during long-term storage. The nicking sites in NTNHA are masked in the HA-bound PTC, and the

M-PTC-containing the nicked NTNHA can no longer assemble with HAs (17, 18). Moreover, NTNHA-A2, E, and F, which lack the nLoop, do not have accompanying HA proteins and only form the HA-negative M-PTC (19–21). The crystal structure reveals that the nLoop is fully exposed on the M-PTC surface and has no visible electron density, presumably because of its high flexibility (Fig. 1C). Collectively, these data suggest that the nLoop could participate in the interaction with HAs to assemble the larger PTCs.

The conformation of BoNT/Ai in the M-PTC brings the receptor-binding site located in the C-terminal subdomain of H_C close to the C-terminal boundary of the long rodlike H_N (Fig. 2). This conformation contrasts with crystal structures of the free BoNT/Ai (fig. S1), free BoNT/A, and free BoNT/B serotype, where the receptor-binding site in H_C points to the N-terminal boundary of H_N (13, 22–24). The H_C reorientation is mediated by a linker between H_N and H_C (Leu⁸⁴⁵ to Thr⁸⁷⁶ in BoNT/A, referred to as the H_N-H_C linker), which adopts an essentially identical structure in free BoNT/A and BoNT/B but changes its conformation in the M-PTC (Fig. 2 and fig. S8). The conformational change is likely induced by NTNHA-A rather than pH because the same conformation is adopted by all structures of free BoNT/A or BoNT/B crystallized at pHs ranging from 5.0 to 7.0 (13, 22–24).

We speculated that the flexible H_N-H_C linker may play a role in coordinating H_C-mediated receptor binding and H_N-mediated translocation, given that the membrane-anchored receptors impose some geometric restrictions on the position of H_C with respect to the membrane surface (24, 25) and that the long helical H_N needs to strategically orientate on the membrane to achieve efficient translocation of LC to the cytosol (26–28). To

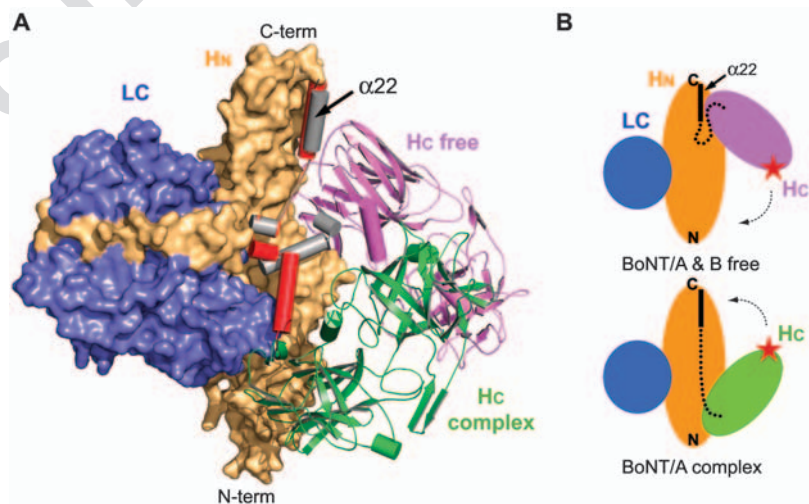


Fig. 2. The H_C fragment of BoNT/A can rotate around a linker connecting H_N and H_C. **(A)** Superposition of the free and complex forms of BoNT/A based on C α atoms in LC and H_N. H_C of free BoNT/A is violet; LC and H_N are omitted for clarity. Linkers in the free and complex forms of BoNT/A are gray and red, respectively. **(B)** Cartoon model showing two distinct conformations of BoNT/A that bring the receptor-binding site in H_C (red star) close to the opposite tip of the long helical H_N.

test this, we produced two mutants of BoNT/A in which the structure of the H_N - H_C linker was altered by point mutations. BoNT/A^{R861A/E868P/K871P}, containing the helix breaker proline (P) and where K indicates Lys, is expected to destabilize the helical linker, whereas BoNT/A^{L862K/L863E/T867K}, with extra ion pairs and T indicating Thr, will likely stabilize the helical structure. The two BoNT/A mutants showed wild-type-like characteristics with respect to protein folding, receptor binding capability, Zn^{2+} -endoprotease activity, and NTNHA-A binding (fig. S9). However, the toxicity of both mutants was significantly decreased by ~sixfold in the MPN assay. Although the exact conformations of the two mutants are not known, we conclude that the observed decrease in toxicity is due to the disrupted coordination between H_N and H_C , leading to decreased efficiency of LC translocation. These data further suggest that any disturbance in the structural integrity of the H_N - H_C linker may affect the optimal positioning of H_C and H_N during BoNT intoxication. Thus, the structural features of the H_N - H_C linker might represent a serotype-specific signature for the various BoNTs. For example, BoNT/E serotype has a more rapid LC translocation, which has been suggested to result from its intrinsically more flexible linker (fig. S8) (27, 29).

To validate the physiological relevance of the M-PTC structure, we performed systematic truncation studies. The isolated H_C fragment bound

to NTNHA-A with high affinity at pH = 6.0 ($K_d \sim 48.3$ nM) but not at pH = 7.5 and thus largely replicated the binding behavior of full-length BoNT/Ai. Consistent with this, the H_C -deleted BoNT/Ai (LH_N) no longer bound NTNHA-A (fig. S10). BoNT/Ai has a larger unfavorable binding entropy than H_C ($\Delta\Delta S \sim -16.8$ cal mol⁻¹ K⁻¹) (table S1), which could be due to a loss of conformational entropy of BoNT/Ai upon NTNHA-A binding and may be related to the reorientation of H_C . Truncating n H_C or the C-terminal subdomain of n H_C (n H_{CC}) in NTNHA-A abolished the protective function of NTNHA-A at pH = 2, suggesting that n H_C is crucial for shielding the sensitive H_C of BoNT/A (Fig. 1B).

Additional support for the M-PTC structure is provided by structure-based mutagenesis studies. Interactions between H_C and NTNHA-A were gradually weakened as more intra-PTC charge-charge interactions were disrupted: The binding affinity at pH = 6.0 decreased in the order of H_C -K1000A > H_C -K1000A/K1039A > H_C -K1000A/K1039A/K1121A (Fig. 3F and fig. S10). Even a single point mutation, H_C -K1000A, significantly decreased the binding affinity by ~sevenfold ($K_d \sim 337.5$ nM). The H_C -centered protection by NTNHA-A is biologically relevant. Although the integrity of H_C is crucial to enrich BoNT/A on the neuron surface at the early stage of intoxication, it is much more sensitive to

proteolysis than LC and H_N in the free BoNT/A (30, 31).

To understand how a pH change can trigger the disassembly of the PTC, we focused on H_C because it largely replicates the binding features of full-length BoNT/Ai. We specifically concentrated on residues located in the complex interface that are titratable in an acidic environment (e.g., His, Glu, and Asp). We found four acidic residues in H_C , each of which is located in the vicinity of an intra-PTC salt bridge or a long-range electrostatic interaction: Glu⁹⁸² is near Lys¹⁰⁰⁰-nAsp⁸⁰⁸, Asp¹⁰³⁷, Lys¹⁰³⁹-nGlu⁸¹⁰; Asp¹¹¹⁸, Lys¹¹²¹-nAsp⁴⁵⁵; and Asp¹¹⁷¹, Arg¹¹⁷⁵-nAsp¹¹¹⁰ (Fig. 4 and fig. S11). Our mutagenesis studies show that these charge-charge interactions are crucial for the assembly of the M-PTC (Fig. 3F). Analyzing the surface electrostatic potentials shows that BoNT/Ai is generally positively charged around these acidic residues, whereas the opposing NTNHA-A surface is largely negatively charged (fig. S11). Therefore, negatively charged BoNT/Ai residues in these areas pose an unfavorable force, which could potentially weaken the local electrostatic interactions in a pH-dependent manner.

To address the potential roles of these acidic residues in pH sensing, we mutated them individually to nontitratable residues. Single point mutants of the H_C fragment (E982A, D1037A, D1118A, or D1171A, where D indicates Asp) all folded correctly (fig. S12) and bound NTNHA-A

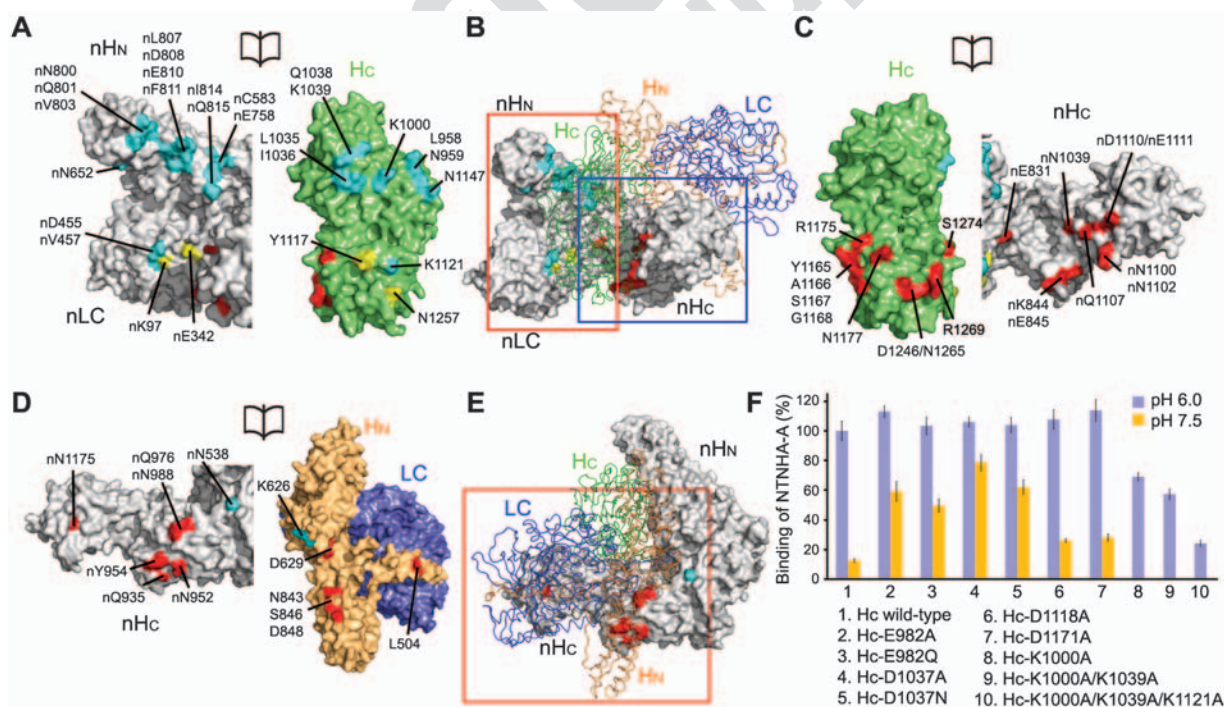


Fig. 3. M-PTC is stabilized by extensive intermolecular interactions. (A to C) H_C interacts with all three domains of NTNHA-A. The overall structure of the M-PTC is shown in (B), where NTNHA-A is in surface representation (gray) and BoNT/Ai is blue, orange, and green for LC, H_N , and H_C respectively. Open-book views of the interfaces highlighted in the red and blue boxes are shown in (A) and (C), respectively. Residues in H_C that form hydrogen bonds

or salt bridges with nLC, n H_N , or n H_C are yellow, cyan, and red, respectively. C, Cys; I, Ile; S, Ser; V, Val. (D) Open-book view of the interface highlighted in the red box of (E). H_N directly contacts n H_C (interacting residues shown in red) and n H_N (cyan), but not nLC. (F) Precipitation assays between full-length NTNHA-A (prey) and H_C variants (baits). Bar graph shows mean \pm SD, $n = 3$. Binding of samples 8 to 10 at pH = 7.5 was not detectable.

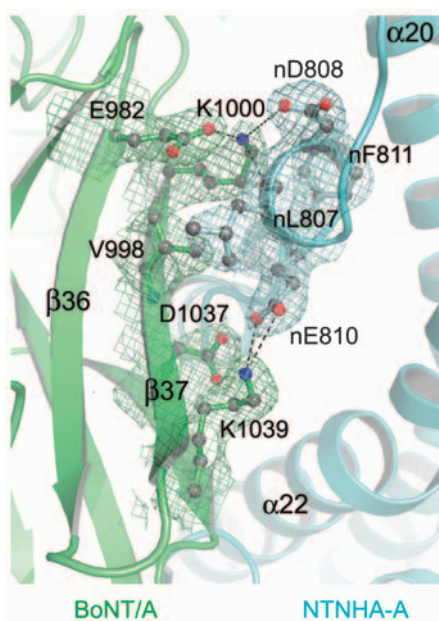


Fig. 4. A pH-sensing mechanism. A close-up view of pH-sensing residues Glu⁹⁸² and Asp¹⁰³⁷, which are buried in the M-PTC in the vicinity of intra-PTC charge-charge interactions. Key residues in the interface are shown as ball-and-stick models. Hydrogen bonds and charge-charge interactions are indicated by dotted lines. A simulated-annealing omit map of the M-PTC contoured at 1σ was overlaid with the final refined model.

at pH = 6.0 to a similar extent as the wild-type H_C. H_C-E982A and H_C-D1037A showed significant binding to NTNHA-A at pH = 7.5 (Fig. 3F and fig.S10). Thermodynamic studies showed that H_C-E982A binds to NTNHA-A similar to binding to the wild-type H_C at pH = 6.0, predominantly driven by enthalpy ($K_d \sim 39.4$ nM); it also binds to NTNHA-A at pH = 7.5, driven by both enthalpy and entropy ($K_d \sim 279.5$ nM) (table S1). Furthermore, a single mutation of E982A significantly increased binding between the full-length BoNT/Ai and NTNHA-A at pH = 7.5, as measured in a precipitation assay ($\sim 20\%$ binding by mutant versus $<5\%$ by the wild-type protein). These data suggest that Glu⁹⁸² and Asp¹⁰³⁷ are important pH-sensing residues that modulate the pH-dependent assembly of the M-PTC.

The pK_a (where K_a is the acid dissociation constant) of the ionizable groups in proteins may be substantially shifted from the intrinsic pK_a depending on the microenvironment surrounding these groups (32). Glu⁹⁸² and Asp¹⁰³⁷ of BoNT/A are predicted (33) to have clearly increased pK_a values upon binding to NTNHA-A, partly because of desolvation effect when they are buried in the

context of the M-PTC. Thus, Glu⁹⁸² and Asp¹⁰³⁷ are likely protonated at pH = 6.0 as their pK_a values increase during the BoNT/A–NTNHA-A interaction, leading to a stable M-PTC. In contrast, these residues are deprotonated in a neutral or alkaline environment, generating repulsive charge interactions with NTNHA-A to destabilize the M-PTC assembly. We replaced Glu⁹⁸² and Asp¹⁰³⁷ with the isosteric, nontitratable residues Gln and Asn (N), respectively, to mimic their protonated state. Both H_C-E982Q and H_C-D1037N showed significant binding with NTNHA-A at pH = 7.5, further supporting the pH-sensing role of these two residues (Fig. 3F and fig. S10). At the same time, thermodynamic studies revealed a loss of enthalpy on binding of H_C-E982A to NTNHA-A at pH = 7.5 compared to pH = 6.0 ($\Delta\Delta H \sim 6.3$ kcal mol⁻¹) (table S1), suggesting that the protein-protein interaction network between H_C and NTNHA-A is partly impaired at pH = 7.5. Thus, additional pH-sensing components might exist in H_C that become fully engaged in binding with NTNHA-A only at pH = 6.0.

Collectively, these data suggest that the assembly of the M-PTC is dynamically regulated by key pH-sensing residues that switch protonation states in response to the environmental pH. These interaction sites would likely be the most malleable parts of the PTC and could be specifically targeted for the development of small-molecule inhibitors to break up the PTC in the acidic GI tract. A pharmacological approach such as this, which focuses on preventive countermeasures at the earliest stage of BoNT intoxication, would complement current efforts to design inhibitors that block the subsequent neuronal action of BoNT. Our results also suggest mechanisms for the development of an oral drug delivery system in which proteinaceous drugs could be conjugated to a BoNT fragment and protected from degradation with NTNHA.

References and Notes

1. C. Montecucco, G. Schiavo, *Q. Rev. Biophys.* **28**, 423 (1995).
2. M. D. Collins, A. K. East, *J. Appl. Microbiol.* **84**, 5 (1998).
3. H. Ito *et al.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **61**, 323 (2011).
4. I. Ohishi, S. Sugii, G. Sakaguchi, *Infect. Immun.* **16**, 107 (1977).
5. L. W. Cheng *et al.*, *Toxicology* **249**, 123 (2008).
6. K. H. Eisele, K. Fink, M. Vey, H. V. Taylor, *Toxicol.* **57**, 555 (2011).
7. F. Burkard, F. Chen, G. M. Kuziemko, R. C. Stevens, *J. Struct. Biol.* **120**, 78 (1997).
8. K. Hasegawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **282**, 24777 (2007).
9. S. S. Arnon *et al.*, *JAMA* **285**, 1059 (2001).
10. T. Binz, S. Bade, A. Rummel, A. Kollwe, J. Alves, *Biochemistry* **41**, 1717 (2002).
11. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
12. J. Dong *et al.*, *J. Mol. Biol.* **397**, 1106 (2010).
13. D. B. Lacy, W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. DasGupta, R. C. Stevens, *Nat. Struct. Biol.* **5**, 898 (1998).
14. A. de Paiva *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**, 20838 (1993).
15. A. Rummel, S. Mahrhold, H. Bigalke, T. Binz, *Mol. Microbiol.* **51**, 631 (2004).
16. P. Stenmark, J. Dupuy, A. Imamura, M. Kiso, R. C. Stevens, *PLoS Pathog.* **4**, e1000129 (2008).
17. Y. Sagane *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 434 (2002).
18. H. Kouguchi, T. Watanabe, Y. Sagane, H. Sunagawa, T. Ohyama, *J. Biol. Chem.* **277**, 2650 (2002).
19. N. Fujii *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* **139**, 79 (1993).
20. A. K. East, M. D. Collins, *Curr. Microbiol.* **29**, 69 (1994).
21. G. Lin, W. H. Tepp, C. L. Pier, M. J. Jacobson, E. A. Johnson, *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 40 (2010).
22. S. Swaminathan, S. Swaramoorthy, *Nat. Struct. Biol.* **7**, 693 (2000).
23. S. Swaramoorthy, D. Kumaran, J. Keller, S. Swaminathan, *Biochemistry* **43**, 2209 (2004).
24. Q. Chai *et al.*, *Nature* **444**, 1096 (2006).
25. R. Jin, A. Rummel, T. Binz, A. T. Brunger, *Nature* **444**, 1092 (2006).
26. M. R. Baldwin, J. J. Kim, J. T. Barbieri, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 9 (2007).
27. D. Kumaran *et al.*, *J. Mol. Biol.* **386**, 233 (2009).
28. M. Montal, *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 591 (2010).
29. J. Wang *et al.*, *J. Biol. Chem.* **283**, 16993 (2008).
30. C. C. Shone, P. Hambleton, J. Melling, *Eur. J. Biochem.* **151**, 75 (1985).
31. F. Chen *et al.*, *Infect. Immun.* **65**, 1626 (1997).
32. C. N. Pace, G. R. Grimsley, J. M. Scholtz, *J. Biol. Chem.* **284**, 13285 (2009).
33. H. Li, A. D. Robertson, J. H. Jensen, *Proteins* **61**, 704 (2005).

Acknowledgments: We thank A. Brunger and T. Binz for critical reading of the manuscript; the staff of beamline 9-2 at the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL) and the NE-CAT staff of the Advanced Photon Source (APS), particularly K. Rajashankar, for assistance in data collection; G. Yao, N. Krez, A. M. Krueel, and J. Tremblay for excellent technical assistance; and R. Liddington and A. Bobkov for assistance with Ixxxx Txxxx Cxxxx and Axxxx Uxxxx Cxxxx. This work was partly supported by an Alfred P. Sloan Research Fellowship (R.J.), by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Exzellenzinitiative GSC 108 to S.R.), by the Robert-Koch-Institut (1362/I-979 to A.R.), and by grants from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH, Department of Health and Human Services (HHS), under award number U54 AI057159 (C.B.S.). Atomic coordinates and structure factors for the VHH-bound M-PTC, M-PTC, and BoNT/Ai have been deposited with the Protein Data Bank under accession codes 3VOA, 3VOB, and 3VOC, respectively. Sanford-Burnham Medical Research Institute has a pending patent application, titled "Botulinum neurotoxin protective complex delivery compositions," that was filed in November of 2011. BoNT availability is subject to the restrictions that apply to HHS select agents and NIAID Category A pathogens.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/335/6071/[PAGE]/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S13
Tables S1 to S4
References (34–51)

21 September 2011; accepted 12 January 2012
10.1126/science.1214270



Supporting Online Material for

Botulinum Neurotoxin Is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex

Shenyan Gu, Sophie Rumpel, Jie Zhou, Jasmin Strotmeier, Hans Bigalke, Kay Perry, Charles B. Shoemaker, Andreas Rummel, Rongsheng Jin*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: rjin@sanfordburnham.org

Published 24 February 2012, *Science* **335**, 977 (2012)DOI: 10.1126/science.1214270

This PDF file includes:

Materials and Methods

Figs. S1 to S13

Tables S1 to S4

References

Materials and Methods

Construct design and cloning

BoNT/A containing the three mutations in the LC catalytic site, E224Q/R363A/Y366F, was generated by QuikChange site-directed mutagenesis (Stratagene) using pBoNTAS as the template DNA (15). Either the E224Q/Y366F or the R363A/Y366F double mutation is sufficient to reduce the catalytic activity of BoNT/A-LC to undetectable levels (10, 34-36). BoNT/A^{E224Q/R363A/Y366F} displays no detectable neurotoxicity at 30,000-fold higher concentrations than wild-type BoNT/A in the MPN hemidiaphragm assay. We determined the crystal structure of BoNT/A^{E224Q/R363A/Y366F} at 4.3 Å by molecular replacement using the structure of wild-type BoNT/A (PDB code: 3BTA) as the search model. We confirmed that the triple mutations do not alter the overall structure of BoNT/A in comparison to the wild-type protein (r.m.s.d. 0.59 Å/1277 Cα pairs) (fig. S1) (13). In this report, BoNT/A^{E224Q/R363A/Y366F} is referred to as BoNT/Ai.

The full-length NTNHA-A1 (referred to as NTNHA-A) gene was synthesized with codon usage optimized for *E. coli* expression (Geneart, Regensburg, Germany). The BoNT/Ai and NTNHA-A genes were cloned into the pQE 30 and pRSFDuet expression vectors, respectively. NTNHA-A has an N-terminal His-tag and a thrombin cleavage site, while BoNT/Ai has no affinity tag. The H_C fragment of BoNT/A (H_CA, residues Asn⁸⁷²–Leu¹²⁹⁶) was inserted into the pQE 30 vector following a His-tag and a PreScission cleavage site. All the H_CA mutants were prepared using QuikChange. A BoNT/A-specific VHH was cloned into the pET-32 vector downstream of the Trx-tag and an enterokinase cleavage site.

Protein expression and purification

Recombinant nontoxic BoNT/Ai and NTNHA-A were co-expressed in the *E. coli* strain BL21RIL (DE3) (Novagen). H_CA and its mutants, as well as VHH, were also expressed in the same strain. Bacteria were grown at 37 °C in TB medium and expression was induced with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) when OD600 had reached 0.6. The temperature was then decreased to 20 °C and expression was continued for ~16 hours.

The complex of BoNT/Ai–NTNHA-A was bound to a Ni-NTA (nitrilotriacetic acid) affinity column in a buffer containing 50 mM MES (pH 6.0), 400 mM NaCl, and 20 mM imidazole, and subsequently eluted in the same buffer containing 300 mM imidazole. The pooled eluted fractions were dialyzed overnight at 4 °C against a buffer composed of 50 mM MES (pH 6.0) and 400 mM NaCl, and thrombin was added to remove the His-tag from NTNHA-A. HCA and VHH were purified on a Ni-NTA column in 50 mM Tris (pH 8.0) and 400 mM NaCl. The VHH Trx-tag was cleaved by enterokinase. The VHH and His-tagged HCA were further purified by size-exclusion chromatography (GE Healthcare) in 20 mM Tris (pH 8.0) and 150 mM NaCl.

The partially purified His-tag–cleaved M-PTC and VHH were mixed at a molar ratio of 1:1.5 at room temperature for 1 hour, and then re-bound to a Ni-NTA affinity column. The flow-through was then loaded onto a size-exclusion chromatography column (GE Healthcare) in a buffer composed of 50 mM MES (pH 6.0) and 400 mM NaCl. The protein purity was further increased by MonoQ ion-exchange chromatography (GE Healthcare) in 20 mM MES (pH 6.0) and eluted with a NaCl gradient. The VHH-bound M-PTC was exchanged into 20 mM MES (pH 6.0) plus 200 mM NaCl, and concentrated to ~5 mg/ml for crystallization. The VHH-free M-PTC was prepared using a similar protocol in the absence of VHH.

Crystallization and diffraction data collection

Initial crystallization screens for the M-PTC or the VHH-bound M-PTC were carried out using a Phoenix crystallization robot (Art Robbins Instrument) and commercial high-throughput crystallization screen kits from Hampton Research, Qiagen, or Emerald BioSystems. After extensive manual optimization, the best M-PTC crystals were grown by hanging-drop vapor diffusion at 20 °C, in which the protein (~5 mg/ml) was mixed in 1:1 ratio with a reservoir solution containing 1.2 M sodium malonate (pH 5.8) and 0.5% n-dodecyl-N,N-dimethylamine-N-oxide (LDAO). The optimized crystallization condition for the VHH-bound M-PTC was 12% PEG MME 2000, 16% pentaerythritol propoxylate (5/4 PO/OH), 0.1 M ammonium sulfate and 50 mM MES (pH 6.2). Micro-seeding was necessary to obtain single crystals for both the MPTC and the VHH-bound M-PTC.

The VHH-free M-PTC crystals were cryoprotected in 3 M lithium acetate and flash-frozen in liquid nitrogen. The crystals belong to space group P6222, with unit cell dimensions $a = b = 282.2 \text{ \AA}$, $c = 374.8 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. After screening numerous crystals at beamline 9-2 of Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL), the best native data set we collected was at 3.9 Å resolution. We have also collected a 5.8 Å data set at a wavelength of 0.97945 Å using a tantalum bromide cluster-derivatized crystal. Extensive optimization failed to improve the crystal quality. The crystals of the VHH-bound M-PTC were cryoprotected in the same mother liquor by gradually increasing the concentration of 5/4 PO/OH to 25%, and then flash-frozen in liquid nitrogen. The X-ray diffraction data were collected at 100 K at beam line 24-ID-C, Advanced Photon Source (APS), using an ADSC Q315 detector. The crystals belong to space group P41212, with unit cell dimensions $a = b = 156.1 \text{ \AA}$, $c = 324.6 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. The best diffraction data were collected at 2.7 Å. All data sets were processed and scaled using iMosflm (37) and CCP4i (38). Data collection statistics are summarized in Table S2.

Structure determination

Using the native and the derivative data, we solved the structure of the VHH-free M-PTC to 3.9 Å by SIRAS (single isomorphous replacement with anomalous scattering) using PHENIX (39). Four tantalum bromide clusters were found. The resulting electron density map was readily interpretable (fig. S3). To our surprise, we were able to model two copies of BoNT/A (PDB code 3BTA) when LC, HN, and HC of BoNT/A were used as models separately. However, one molecule of “BoNT/A” fit the electron density poorly with clear mismatches between the BoNT/A model and the electron density, indicating that it should be NTNHA-A. This was further confirmed by resolving the crystals by SDS-PAGE, which clearly showed BoNT/Ai and NTNHA-A in an equimolar ratio.

This preliminary model of the M-PTC composed of two molecules of BoNT/A was used as the search model to solve the 2.7 Å resolution structure of the VHH-bound M-PTC by molecular replacement using Phaser (40). The identity of BoNT/A was clearly confirmed by the VHH, which specifically binds to BoNT/A LC. The manual model building and refinements were performed in COOT (41) and PHENIX (39) in an iterative manner. The refinement progress was monitored with the free R value using a 5% randomly selected test set (42). The VHH-bound MPTC structure was refined to 2.7 Å with $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.18/0.22$. The final structure model contains the full-length BoNT/Ai and NTNHA-A except for residues Ile⁴³⁵–Ala⁴⁴⁹ in BoNT/Ai and residues nGly¹¹⁴–nAla¹⁴⁸ and nTry⁴⁴²–nAsn⁴⁵⁰ in NTNHA-A, which are not visible in the electron density maps. The structure was validated through the MolProbity web server (43) and showed excellent stereochemistry. In the Ramachandran plots, 97.2% of residues are in the favored regions and no residue is in the disallowed regions. Structural refinement statistics are listed in Table S2. The coordinate and diffraction data have been deposited

in the Protein Data Bank.

Sequence alignments were made using PROMALS (44) and ESPript (45). Isoelectric surface calculations were made using the APBS (46) add-on in PyMOL (<http://www.pymol.org>). The structure-based protein p*K*_a prediction was performed using PROPKA 3.1 (33). The rotation of BoNT/Ai-HC was measured by DynDom (47). All structure figures were prepared with PyMol.

Pull-down assay

NTNHA-A was used as the prey while His-tagged LHN, wild-type HC, or HC mutants were the bait. The pull-down assays were performed in parallel in 50 mM sodium phosphate (pH 6.0 or 7.5) and 300 mM NaCl using Ni-NTA resin. The amounts of NTNHA-A present after pull-down were normalized based on the amount of bait, and then scaled against NTNHA-A that bound to the wild-type HC at pH 6.0. To analyze the full-length BoNT/Ai (wild type, E982A, R861A/E868P/K871P, or L862K/L863E/T867K), N-terminal His-tagged NTNHA-A was the bait.

Analytical ultracentrifugation (AUC)

Sedimentation equilibrium (SE) experiments were performed in a ProteomeLab XL-I (BeckmanCoulter) analytical ultracentrifuge. Purified BoNT/Ai-VHH, NTNHA-A, and the VHH-bound M-PTC were dialyzed extensively against a buffer containing 50 mM sodium phosphate (pH 6.0 or 7.5) and 300 mM NaCl. Protein samples at concentrations of 0.28, 0.14, and 0.07 mg/ml were loaded in 6-channel equilibrium cells and run at 20 °C in an An-50 Ti 8place rotor at 8,000 rpm until equilibrium was achieved, and thereafter at 10,000 rpm. Data sets for 8,000 and 10,000 rpm were analyzed independently using HeteroAnalysis software (by J.L. Cole and J.W. Lary, University of Connecticut).

Isothermal titration calorimetry (ITC)

The calorimetry titration experiments were performed at 23 °C on an ITC200 calorimeter from Microcal/GE Life Sciences (Northampton, MA). The full-length NTNHA-A was used as the titrand in the cell, and the full-length BoNT/Ai, H_CA, H_CA-E982A, and H_CA-K1000A were used as titrants in the syringe at a 10-fold higher concentration. Prior to each titration, protein samples were dialyzed extensively against the appropriate titration buffer to control for heat of dilution effects. A buffer containing 50 mM sodium phosphate (pH 6.0) and 300 mM NaCl was used for titration at acidic pH; and 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) and 300 mM NaCl for titration at neutral pH. The data were analyzed using the Origin software package provided by the ITC manufacturer. The thermodynamic values reported are the average of three independent experiments. Representative titration curves are shown in Fig. S13.

Proteolysis with trypsin or pepsin

NTNHA-A, BoNT/Ai, and M-PTC were subjected to limited proteolysis with trypsin and pepsin overnight at room temperature. The trypsin digestions were performed at two different pHs in buffers containing 50 mM sodium phosphate (pH 6.0 or 7.5) and 300 mM NaCl. The trypsin:sample ratios (w/w) were 1:10 (pH 6.0) or 1:20 (pH 7.5). The digestions were stopped by adding 1 mM PMSF and boiling samples in reducing SDS-loading buffer for 10 minutes. The pepsin digestions were performed at a 1:100 ratio (w/w) of pepsin:sample in a buffer containing 50 mM citrate acid (pH 2.6, an optimal pH for the pepsin reaction) and 300 mM NaCl. Pepsin digestions were terminated by addition of a 1M Tris-HCl (pH 8.0) stock solution to give a final concentration of 200 mM and samples were then boiled in the reducing SDS-loading buffer. All samples were subjected to SDS-PAGE.

Toxicity assay

The protection of active BoNT/A by NTNHA-A against low pH or tryptic digestion was verified by MPN hemidiaphragm assays. Wild-type and truncated M-PTC were assembled in a 1:1 stoichiometry at pH 6.0 overnight. The free or complex forms of BoNT/A were incubated for 2 h at various pHs as indicated. Tryptic digestion (0.01 U of trypsin-agarose per μg of BoNT/A) was performed at pH 6.0 and 8.0 for 3 h and 8 h, respectively. Subsequent MPN toxicity assays were carried out at pH 7.4.

The MPN hemidiaphragm assay was performed as described previously (15). The phrenic nerve was continuously stimulated at 5–25 mA with a frequency of 1 Hz and a pulse duration of 0.1 ms. Isometric contractions were transformed using a force transducer and recorded with VitroDat Online software (FMI GmbH, Seeheim, Germany). The time required to decrease the amplitude to 50% of the starting value (paralytic half-time) was determined. To determine the altered neurotoxicity of BoNT/A due to the various treatments, a concentration-response curve was performed with concentrations of the monomeric, untreated wild-type BoNT/A tested 15 times, to which a power function was ascribed: $y(3.2, 1.6, 0.8 \text{ pM}) = 70.615x^{-0.25142}$, $R = 0.9974$. The resulting paralytic half-times of pH- or trypsin-treated free or complex forms of BoNT/A were converted to the corresponding concentrations of monomeric, untreated wild-type BoNT/A and expressed as relative neurotoxicity.

Characterization of BoNT/A^{R861A/E868P/K871P} and BoNT/A^{L862K/L863E/T867K}

Circular dichroism (CD) data was collected with a Jasco J-810 spectropolarimeter in a 1 mm path length cuvette with a concentration of $\sim 1.0 \mu\text{M}$ degassed BoNT/A in PBS. Temperature induced denaturation was performed by monitoring the CD signal at 208 nm while increasing the temperature from 30 °C to 60 °C with an average increase of 0.5 °C/min. GST pull-down assays were performed using GST-SV2C (454-579) as previously described (48). The catalytic activity of BoNT/A was measured using 3 μM of recombinant SNAP-25H6 in 20 mM Hepes-KOH, pH 7.2, 150 mM potassium glutamate at 37 °C for 60 min, as previously described (10).

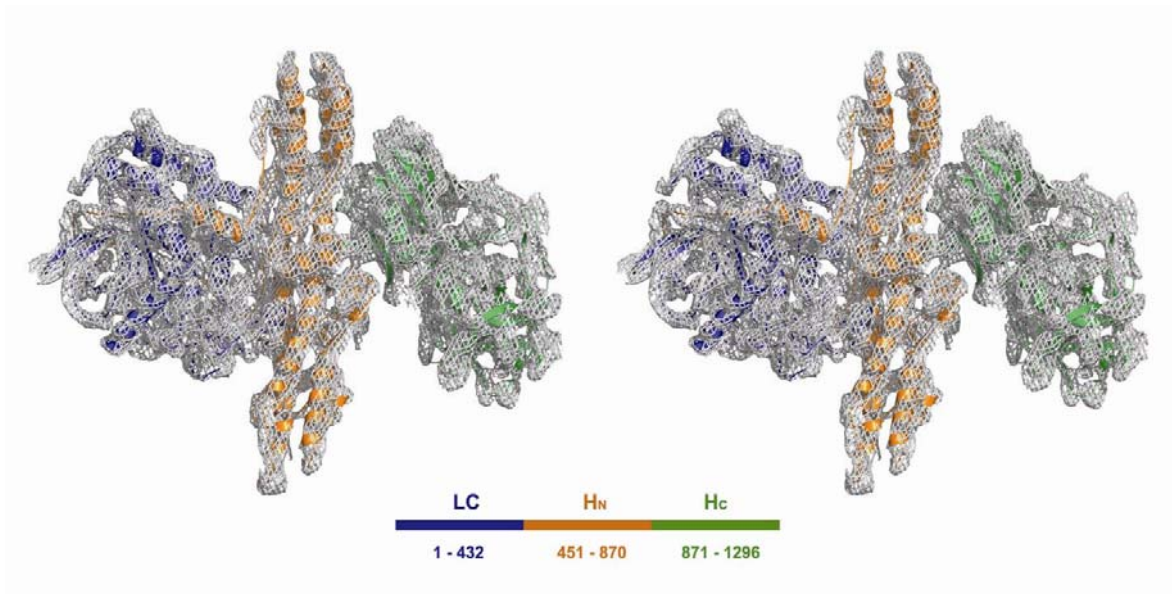


Fig. S1. A stereo diagram showing a σ_A -weighted $2F_o - F_c$ electron density map (contoured at 1.5σ) of free BoNT/Ai (BoNT/A^{E224Q/R363A/Y366F}) at 4.3 Å, overlaid with the final refined model. BoNT/Ai domains are blue (LC), orange (H_N), and green (H_C).

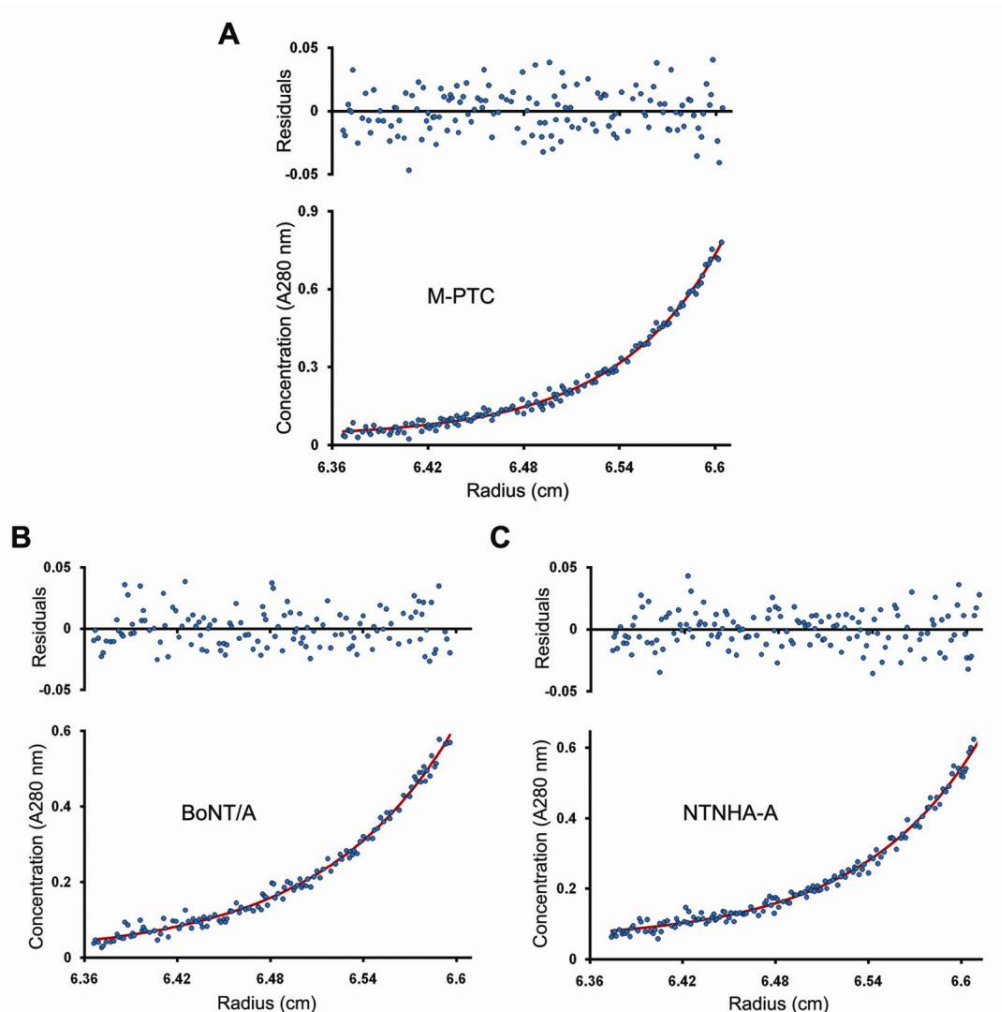


Fig. S2. Association properties of BoNT/Ai, NTNHA-A, and the M-PTC in solution characterized by analytic ultracentrifugation. **(A)** The M-PTC is predominately monomeric in solution. A representative figure is shown from the sedimentation equilibrium study on the MPTC (pH 6.0), performed using a loading concentration of 0.14 mg/ml and rotor speed of 8,000 rpm. Lower panel: absorbance data (blue dots) fit to a single-species model (red line). Upper panel: residuals from the fit. **(B)** BoNT/Ai is predominantly monomeric in solution. The representative figure shows data at pH 6.0 for a loading concentration of 0.14 mg/ml and rotor speed of 10,000 rpm. Lower panel: absorbance data (blue dots) fit to a single-species model (red line). **(C)** NTNHA-A weakly dimerizes in solution. The representative figure shows data at pH 6.0 for a loading concentration of 0.14 mg/ml and rotor speed of 10,000 rpm. Absorbance data (blue dots) were fit to a monomer-dimer model (red line) with an average K_d of ~ 22 μM , suggesting that NTNHA-A is monomeric under physiological conditions.

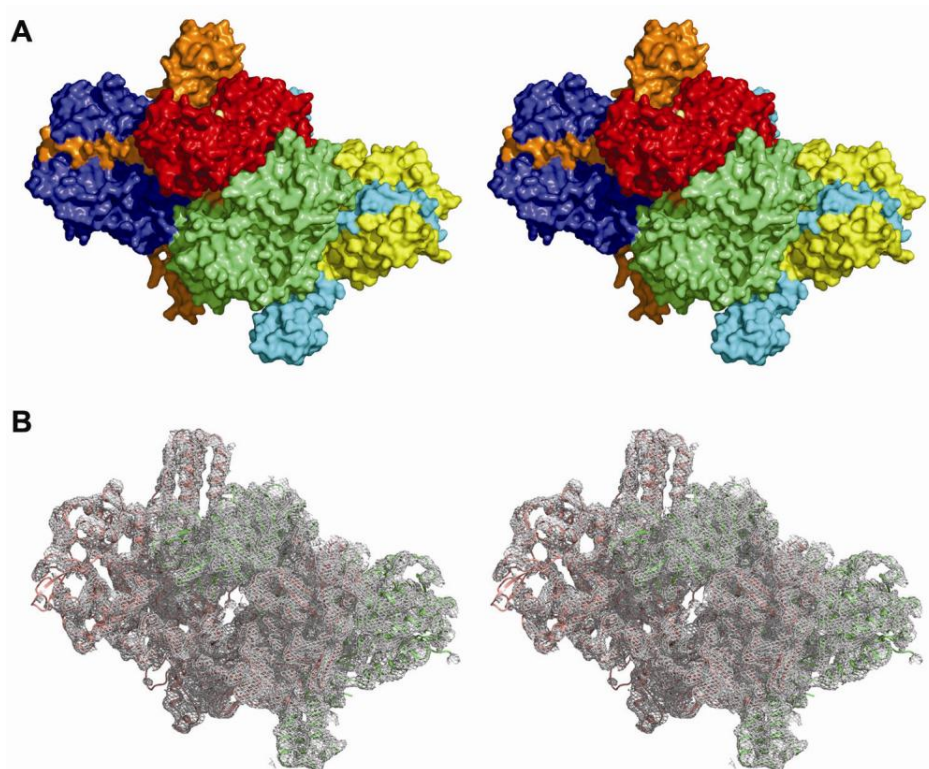


Fig. S3. Structure of the M-PTC. **(A)** A stereo view of the M-PTC as a surface representation. The three domains of BoNT/Ai are colored in blue (LC), orange (H_N), and green (H_C), and in NTNHA-A the domains are yellow (nLC), cyan (nH_N), and red (nH_C). **(B)** A stereo diagram showing the experimental SIRAS (single isomorphous replacement with anomalous signal) phased electron density map. This map was calculated using a 3.9 Å data set collected on a VHH-free M-PTC crystal. The map is contoured at 1.5 σ and overlaid with the final refined model of the VHH-bound M-PTC, except that VHH is omitted. Note that the VHH-bound MPTC, where BoNT/Ai and NTNHA-A are colored salmon and green, respectively, fits well into the electron density of the VHH-free M-PTC, indicating that the two M-PTCs have identical architecture.

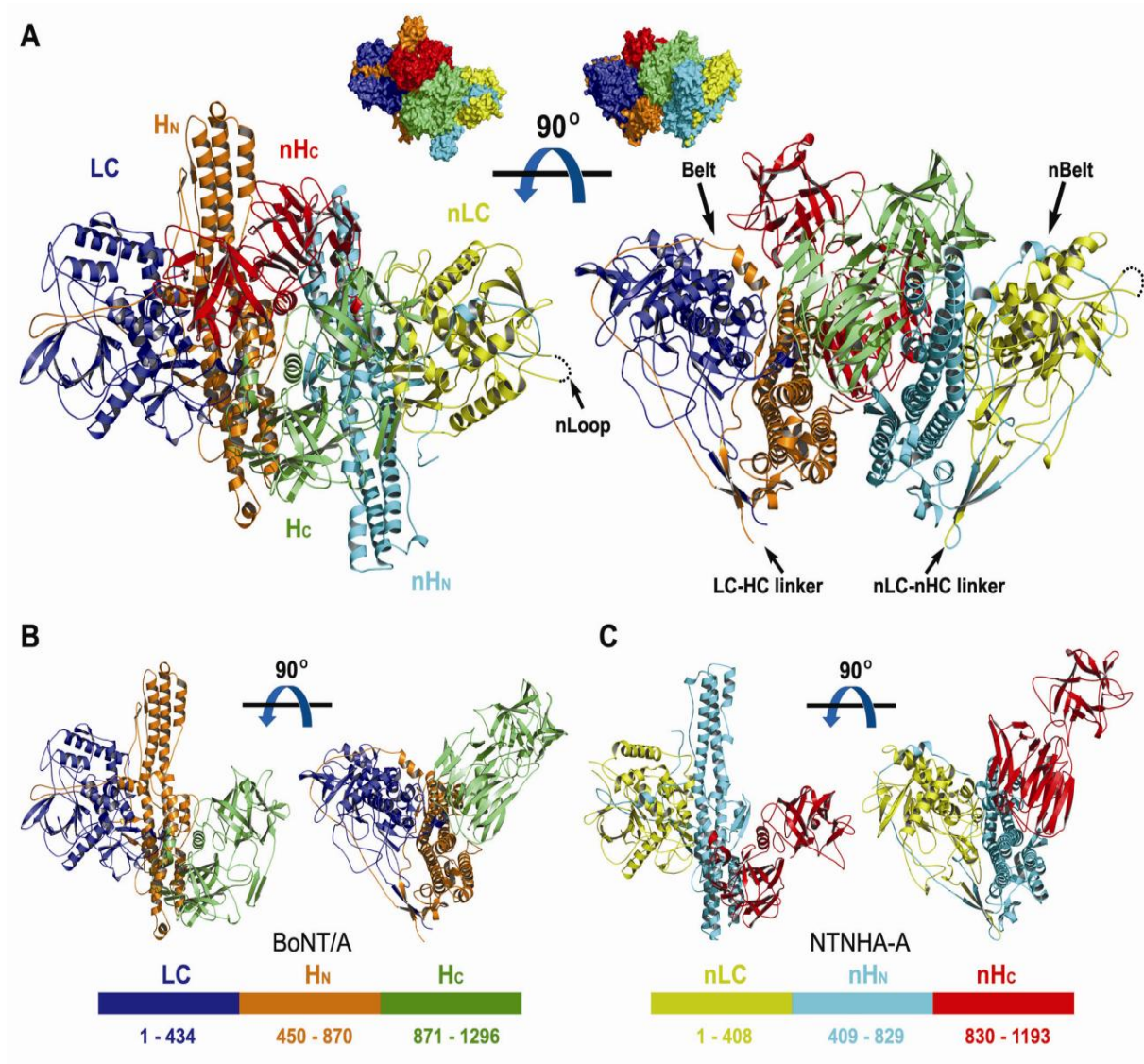


Fig. S4. Structure of the M-PTC. **(A)** Cartoon presentation of the M-PTC. BoNT/Ai and NTNHA-A are colored as in Fig. 1. Corresponding surface representations of the M-PTC are shown on the top. **(B-C)** Individual structures of BoNT/Ai and NTNHA-A in the M-PTC.

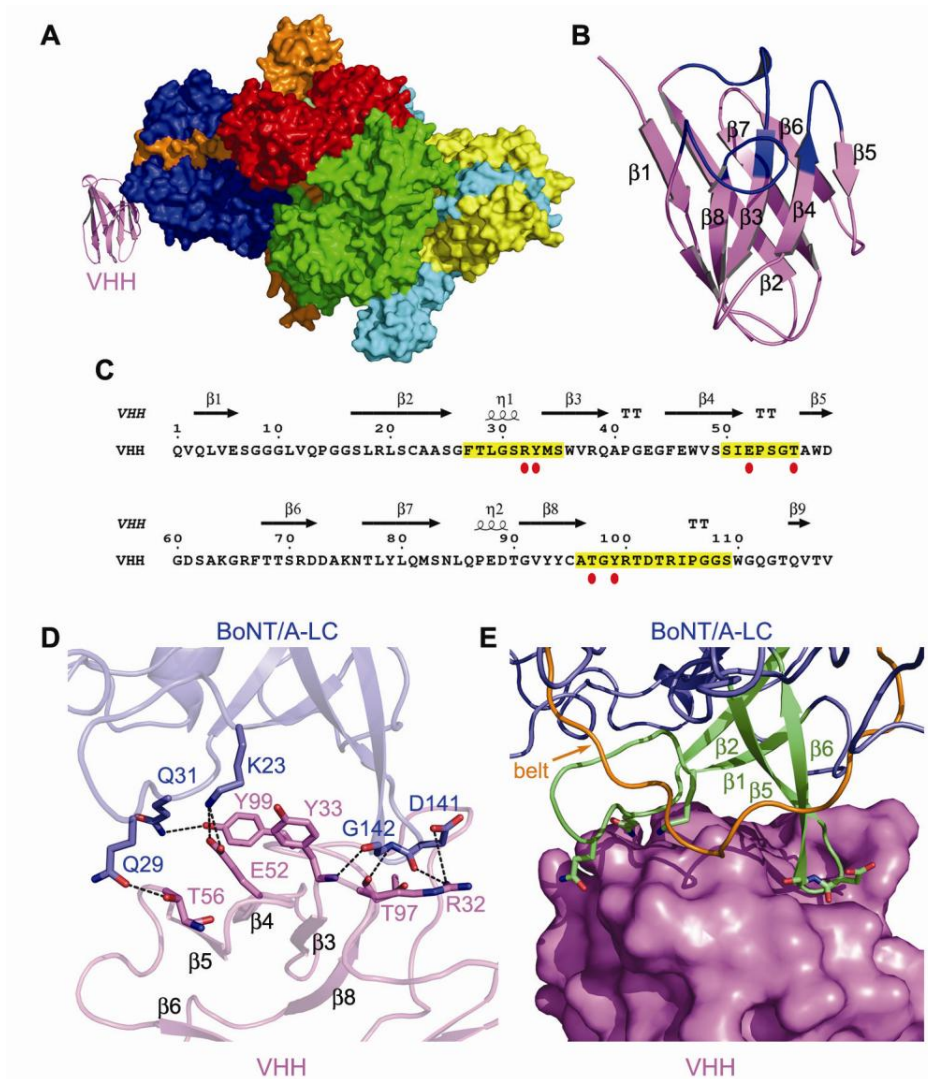


Fig. S5. Interactions between BoNT/Ai and VHH. **(A)** An overall view of the VHH-bound M-PTC. The M-PTC is shown as a surface representation and is colored in the same scheme as that in Fig. 1. VHH bound to BoNT/Ai-LC is shown as a cartoon model in purple. A close-up view of VHH is shown in panel **B**. The three complementarity-determining regions (CDRs) are highlighted in blue. **(C)** The sequence and secondary structure of VHH. The three CDRs are highlighted in yellow. Key residues that bind to BoNT/Ai are all located in the CDRs and are labeled with red ovals. **(D)** A close-up view of the interface between BoNT/Ai (blue) and VHH (purple). Interacting residues are shown as sticks and hydrogen bonds are indicated by dotted lines. A similar view of the BoNT/Ai-VHH interface is shown in panel **E** except that the molecular surface of VHH is drawn. Two loop regions of LC (green) connecting β 1- β 2 and β 5 β 6 are bound by VHH. The belt of BoNT/Ai (orange) that wraps around LC does not directly interact with VHH.

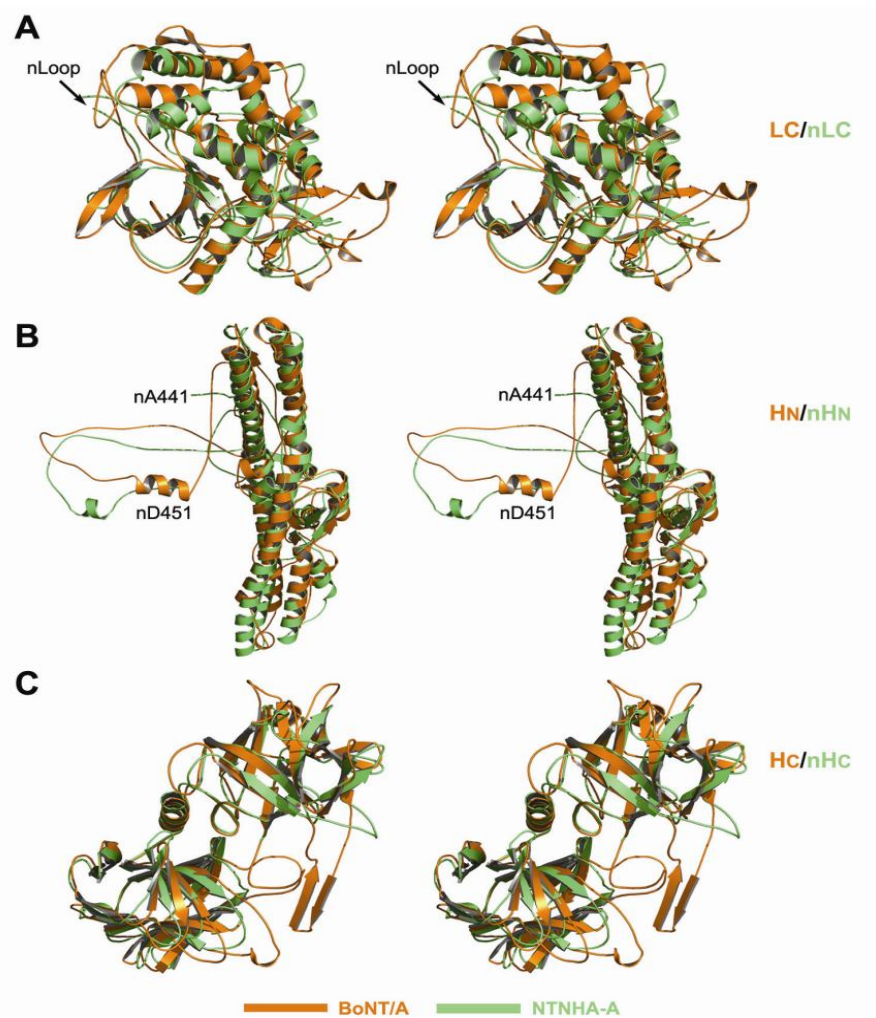


Fig. S6. The structure of NTNHA-A is highly similar to that of BoNT/A. The homologous domains of BoNT/Ai (orange) and NTNHA-A (green) are superimposed based on C α atoms, and are shown as stereo views. (A) BoNT/Ai-LC (residues 1–434) vs. NTNHA-A-nLC (residues 1–408). Residues nGly¹¹⁴–nAla¹⁴⁸ are not visible in the electron density map. (B) BoNT/Ai-H_N (residues 450–870) vs. NTNHA-A-nH_N (residues 409–829). NTNHA-A maintains the homologous belt region of BoNT/A (nAsp⁴⁵¹–nAsn⁴⁹⁶, referred to as nBelt). The BoNT/A belt is a mostly extended loop that wraps around LC and is suggested to be a pseudosubstrate inhibitor of the LC protease, and/or a chaperone during translocation of LC into the cytosol (49). Nine residues (nTyr⁴⁴²–nAsn⁴⁵⁰) just upstream of the nBelt are not visible in the crystal structure. We resolved the crystals of the M-PTC by SDS-PAGE and confirmed that this region of NTNHA-A is intact, suggesting that the region has a very flexible conformation. (C) BoNT/Ai-H_C (residues 871–1296) vs. NTNHA-A-nH_C (residues 830–1193). nH_C has deletions in many areas that are present in H_C. Among the most prominent deletions in nH_C are between β 34– β 35 (7 residues), β 42– β 43 (11 residues), β 50– β 51 (8 residues), and the loss of 10 residues at the C-terminus.

NTNHA_A1 1 TT 10 β1 20 TT 30 β2 40 β3 50 TT η1 60 TT 70

NTNHA_A1 MNIINDNLSINSPVDNKNVIVRARKKTDVFFKAFKQVAPNIWVAPERYYGESLIDEEYKVDGGIYDSNFLS
 NTNHA_A2 MKIINNFNIDSLIDNRDVAIVRGKKTDTFFKVFQVAPNIWIAPERYYGESLINDQKSDGGIYDSNFLS
 NTNHA_B MNIINDNLSINSPVDNKNVIVRARKKTDVFFKAFKQVAPNIWVAPERYYGESLIDEEYKVDGGIYDSNFLS
 NTNHA_C1 MDIINDDLNINSPVDNKNVIVRARKKNTFFKAFKQVAPNIWVAPERYYGEPDIAEEYKLDGGIYDSNFLS
 NTNHA_D MDIINDDLNINSPVDNKNVIVRARKKNTFFKAFKQVAPNIWVAPERYYGEPDIAEEYKLDGGIYDSNFLS
 NTNHA_E MKIINGNLIIDSPVDNKNVIVRARKSDVFFKAFQVAPNIWVAPERYYGESLINDQKSDGGIYDSNFLS
 NTNHA_F MKIINNFNIDSPVDNKNVIVRARKKTDVFFKVFQVAPNIWVAPERYYGESLINDQKSDGGIYDSNFLS
 NTNHA_G MKIINSLTINSPIDNKNVIVRARETSKFFKAFKQVAPNIWVAPERYYGESLIDEEYKVDGGIYDSNFLS

NTNHA_A1 α1 80 α2 90 100 110 120 130 140

NTNHA_A1 QDS EKDKFLQAIITLLKRLNSTNAGEKLLSLISTAIPFPYGYIIGGGYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLIS
 NTNHA_A2 TND EKDEFLQAITVKKILQRINNNVIGAKLLSLISTAIPFPYGYIKPG.....
 NTNHA_B QDS EKDKFLQAIITLLKRLNSTNAGEKLLSLISTAIPFPYGYIIGGGYAPNMITFGSAPKSNKKLNSLIS
 NTNHA_C1 QDS ERENFLQAIITLLKRINNTISGKQLLSLISTAIPFPYGYIIGGGYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVT
 NTNHA_D QDS ERENFLQAIITLLKRINNTISGKQLLSLISTAIPFPYGYIIGGGYSSPNIFTFGKTPKSNKKLNSLVT
 NTNHA_E TND EKDEFLQAITVKKILQRINNNVIGAKLLSLISTAIPFPYGYENNT.....
 NTNHA_F TND EKDEFLQAITVKKILQRINNNVIGAKLLSLISTAIPFPYGYIKPG.....
 NTNHA_G QNNEKDKFLQAIITLLKRLINSNIAGEKLLSLVSTAIPFPYGYIIGGGYICPNIVTFGSTIKYNKKINSLIS

NTNHA_A1 β4 150 TT 160 β5 170 β6 180 TT 190 α3 200 β8 210 β9

NTNHA_A1 STIIPFPYAGYRETNYSSEDNKSFYASNIIVIFGPGAANIVENNTVFYKKEBDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK
 NTNHA_A2DYRQTNYLVSKDNRHYHTANLVIIFGPGTNIVENNAIYKKEBDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK
 NTNHA_B STIIPFPYAGYRETNYSSEDNKSFYASNIIVIFGPGAANIVENNTVFYKKEBDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK
 NTNHA_C1 STIIPFPYAGYRETNYSSEDNKSFYASNIIVIFGPGSNIVENNVLYYKKNDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK
 NTNHA_D STIIPFPYAGYRETNYSSEDNKSFYASNIIVIFGPGSNIVENNVLYYKKNDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK
 NTNHA_EDYRQTNYLVSKDNRHYHTANLVIIFGPGSNIKNNVLYYKKEBDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK
 NTNHA_FDYRQTNYLVSKDNRHYHTANLVIIFGPGTNIVENNAIYKKEBDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK
 NTNHA_G TTIIPFPYGGYRETNYSSEDNKSFYASNIIVIFGPGAANIVENNTVFYKKEBDAENGMGTMAEIVFQPPFLTYK

NTNHA_A1 β10 220 α4 230 TT 240 β11 250 TT 260 β12 270 α5 280 η2

NTNHA_A1 YDE FYIDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRSELNIEYFSQLNIVDLVSGGIDPKFINTDIP
 NTNHA_A2 YGQ FVVDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRSELNIEYFSQLNIVDLVSGGIDPKFINTDIP
 NTNHA_B YDE FYIDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRSELNIEYFSQLNIVDLVSGGIDPKFINTDIP
 NTNHA_C1 YNK FYIDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRTELNDKQFSQLNIVDLVSGGIDLEFINTDIP
 NTNHA_D YNK FYIDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRTELNDKQFSQLNIVDLVSGGIDLEFINTDIP
 NTNHA_E YDE FVVDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRSELNIEYFSQLNIVDLVSGGIDPKFINTDIP
 NTNHA_F YDQ FVVDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRSELNIEYFSQLNIVDLVSGGIDPKFINTDIP
 NTNHA_G YDQ FVVDPAELIKCLIKSLYFLYGKIPSDDLVVPYRLRSELNIEYFSQLNIVDLVSGGIDPKFINTDIP

NTNHA_A1 α6 290 α7 310 α8 320 α9 330 340 350

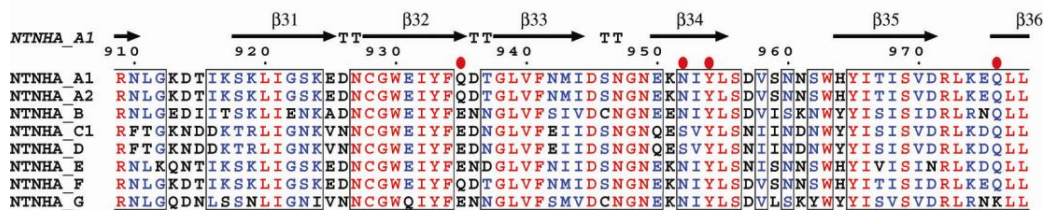
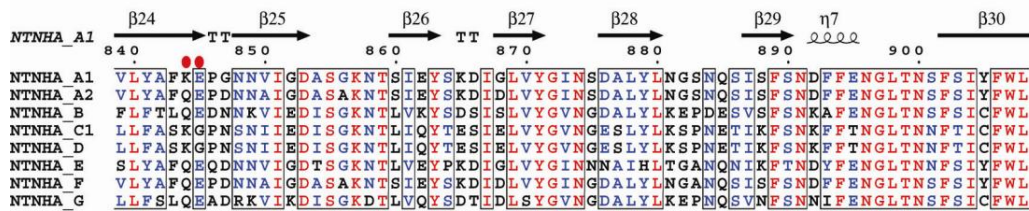
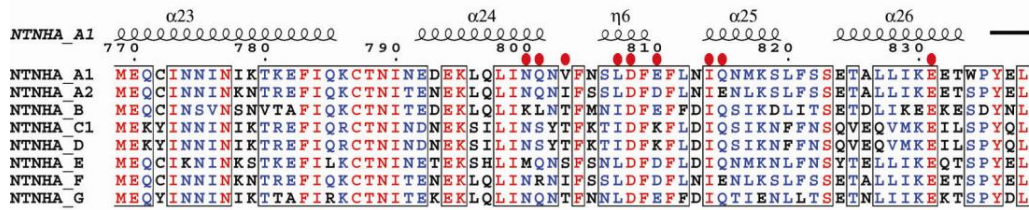
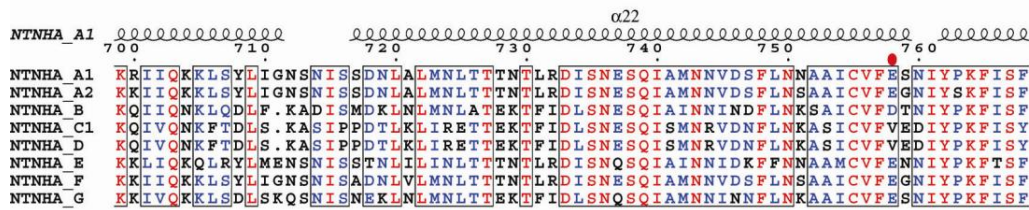
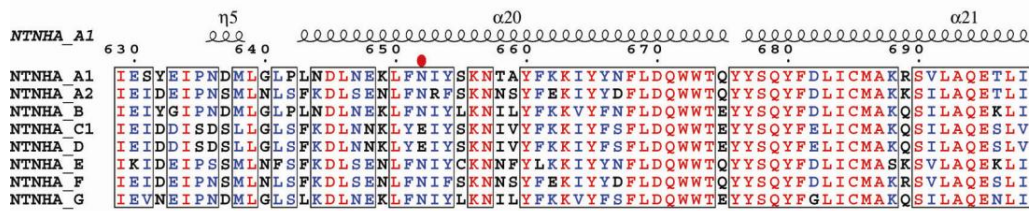
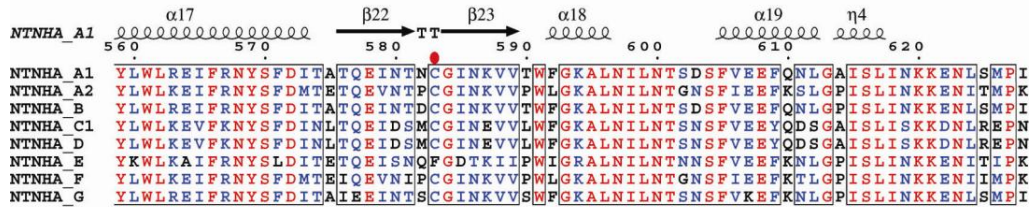
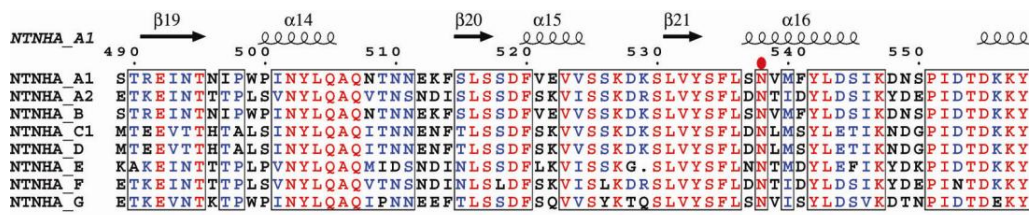
NTNHA_A1 YWFTDNYFSNAKIVFEDHRNIYETETEGNNAIGNDIKLRLLKQKFRININDIWEIENLNYFSKEFISIMPPDR
 NTNHA_A2 YWFTDNYFIDAPKNFKEYKNDYETKIKNNNDIANSIKLYLEQKFKTNAQDIWEIENLNYFSKEFISIMPEI
 NTNHA_B YWFTDNYFSNAKIVFEDHRNIYETQIEGNNAIGNDIKLRLLKQKFRININDIWEIENLNYFSKEFISIMPPDR
 NTNHA_C1 YWFTNSYFNSIKMFEKYNKYKTEIEGNNAIGNDIKLRLLKQKFRINVDIWEIENLNYFQSFNSIIPDR
 NTNHA_D YWFTNSYFNSIKMFEKYNKYKTEIEGNNAIGNDIKLRLLKQKFRINVDIWEIENLNYFQSFNSIIPDR
 NTNHA_E YWFTDNYFIDTSKKNFKEYKNDYETKIKNNNDIANSIKLYLEQKFKINVDIWEIENLNYFSKEFISIMPER
 NTNHA_F YWFTDNYFSDAPKNFKEYKNDYETKIKNNNDIANSIKLYLEQKFKINAQDIWEIENLNYFSKEFISIMPEI
 NTNHA_G YWFIDSYFNSNAKIVFEDHRSIYETELKGNNAIGNDIKLRLLKQKFRITTVHDIWEIENLNYFSKEFISIMPER

NTNHA_A1 α10 360 β13 370 β14 β15 α11 380 β16 η3 390 β17 400 TT 410 β18 420

NTNHA_A1 FNNALKHFFYRKQYYKIDYDPEKNSYINGFVNGQINQLSLSLDRNQDIINKPEEIVNLLNGNNVSLMRSNIYG
 NTNHA_A2 FNNALNHYYRKEEYVIDYDFKNYINGFVNGQIKTILPLSKYKNIINKPEELVVNLLNENNVLMKSNVYG
 NTNHA_B FNNALKHFFYRKQYYKIDYDPEKNSYINGFVNGQINVLQLSLSLDRNQDIINKPEEIVNLLNGNNVSLMRSNIYG
 NTNHA_C1 FSNALKHFFYRKQYYTMDYTDNYINGFVNGQINTKLLPLSKNKNNTIISKPEKVVNLLVNEENISLMKSNVYG
 NTNHA_D FSNALKHFFYRKQYYTMDYTDNYINGFVNGQINTKLLPLSKNKNNTIISKPEKVVNLLVNEENISLMKSNVYG
 NTNHA_E YNNALNHYYRKEEYVIDYDFKNYINGFVNGQIKTILPLSKYKNIINKPEELVVNLLNENNVLMKSNVYG
 NTNHA_F FNNALNHYYRKEEYVIDYDFKNYINGFVNGQIKTILPLSKYKNIINKPEELVVNLLNENNVLMKSNVYG
 NTNHA_G FNNALKHYRKEEYVIDYDPEKYSIAGFVNGQINQLSLSLDRNQDIINKPEEIVNLLNENNVLMRSNIYG

NTNHA_A1 α12 430 TT 440 α13 450 460 470 480

NTNHA_A1 DGLKSTVDDFYSNYKIPYNRAVEYHFNNSNDSSLDNVNIGVINDNPEI...IDVNPYKENCDFKFSVQKIT
 NTNHA_A2 DGLKGTMDNFYAAKIPYNIIGDEYHINYS...YLNNVNVEEININIPINDADIYPRKNSDPFIPVYNIIT
 NTNHA_B DGLKSTVDDFYSNYKIPYNRAVEYHFNNSNDSSLDNVNIGVINDNPEI...IDVNPYKENCDFKFSVQKIT
 NTNHA_C1 DGLKGTTEDEYFSTYKIPYNEEYBYRFNDSDNFPLLNNSISEVDSIPEI...IDINPYKNSDNLVFTQITS
 NTNHA_D DGLKGTTEDEYFSTYKIPYNEEYBYRFNDSDNFPLLNNSISEVDSIPEI...IDINPYKNSDNLVFTQITS
 NTNHA_E DGLKGTMDNFYASNYIIPYNLVYBHSINYS...YLDNVNVEEIEKIPINDEADIYPRKNSDPFIPVYNIIT
 NTNHA_F DGLKGTMDNFYAVYKIPYNIIGDEYHINYS...YLNNVNVEEININIPINDADIYPRKNSDPFIPVYNIIT
 NTNHA_G DGLKYTMDNFYSTYKIPYNAVEYHFNNSSTSSLDNVNVEEININIPINDEADIYPRKNSDPFIPVYNIIT



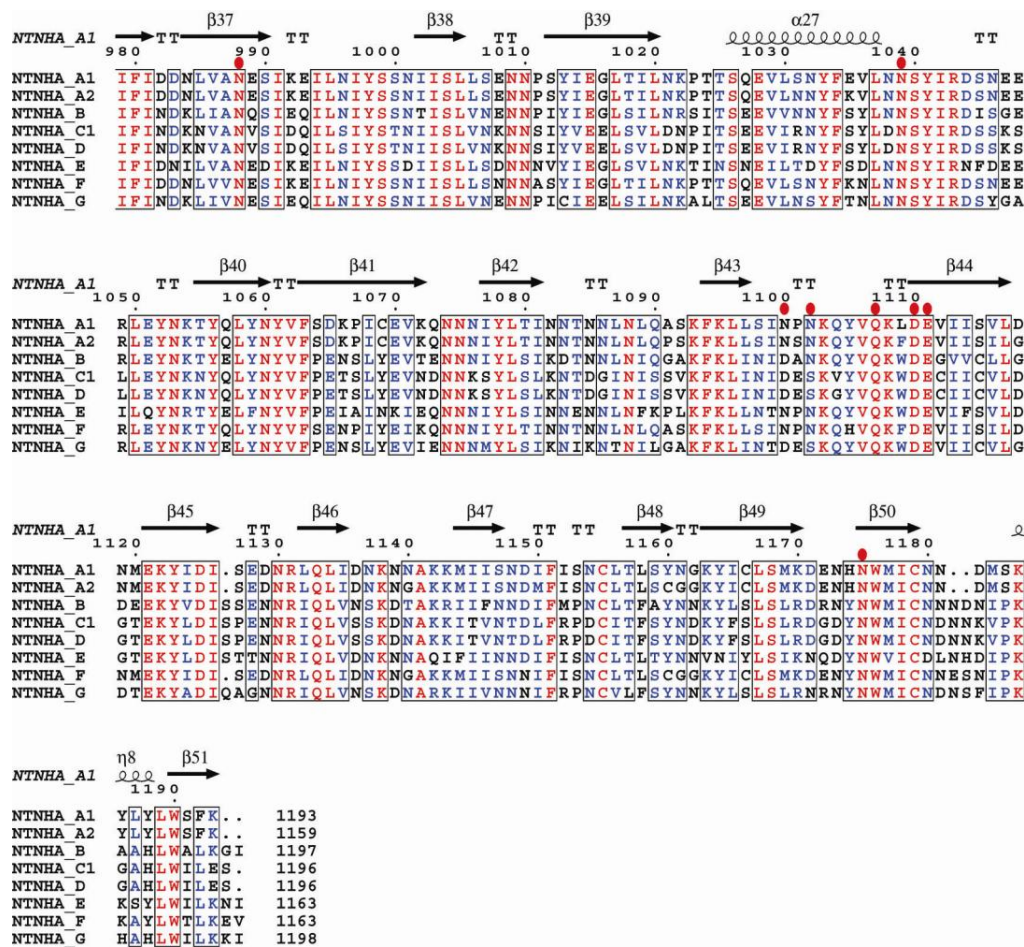


Fig. S7. Sequence alignment of representative serotypes of NTNHA. Sequence analysis was performed using the available NTNHA sequences, and a phylogenetic tree was generated. For clarity, representative NTNHA sequences were selected to cover all serotypes: A1 (YP_001253341.1), A2 (YP_002803126.1), B (YP_001693308.1), C1 (YP_398515.1), D (BAA75083.1), E (ZP_04822317.1), F (YP_001390122.1), and G (CAA61228.1). Identical residues are in red and similarly conserved residues are in blue. The secondary structure of NTNHA-A1, as part of the M-PTC studied in this work, is shown on the top. Residues are numbered according to NTNHA-A1. Residues forming hydrogen bonds and salt bridges with BoNT/Ai are indicated by red ovals. Two regions of NTNHA-A (nGly114–nAla148 and nTyr442–nAsn450) that are not visible in the structure of the M-PTC are indicated by dotted lines. Some of the known nicking sites in NTNHA are highlighted in yellow (17, 50). Sequence alignments were made using PROMALS (44) and ESPrict (45).

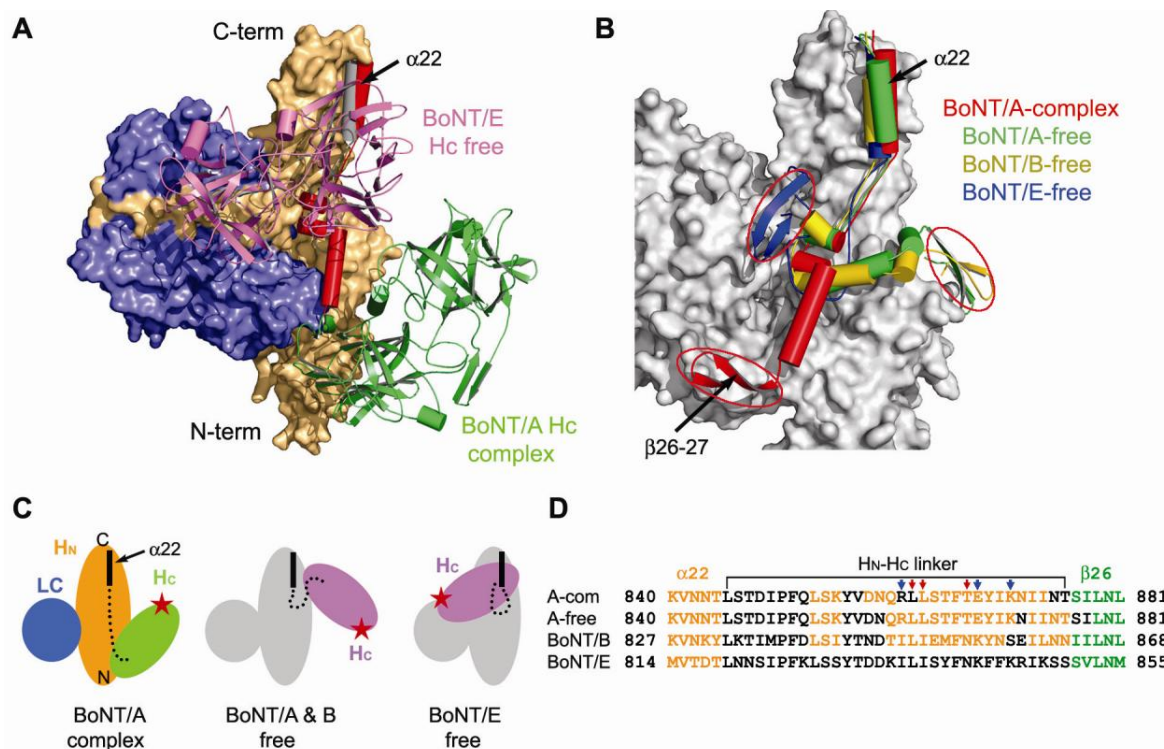


Fig. S8. The H_C fragment can rotate around the H_N-H_C linker. (A) Superposition of the complex form of BoNT/A_i and free BoNT/E based on C α atoms in LC and H_N. The complex form of BoNT/A_i is colored as in Fig. 1. The H_C fragment of free BoNT/E is violet, while its LC and H_N are omitted for clarity. The linkers are red and gray in the complex form of BoNT/A_i and free BoNT/E, respectively. (B) Structural superposition of the free forms of BoNT/A (green), BoNT/B (yellow), BoNT/E (blue), and the complex form of BoNT/A_i (red). LC and H_N moieties of the complex form of BoNT/A_i are shown as a gray surface model. For clarity, the H_C fragment is omitted except that $\beta 26-27$ (Ser⁸⁷⁷-Asn⁸⁹⁰) is shown to indicate the location of the N-terminus of H_C (red circle). (C) Cartoon model showing the three conformations of the H_C fragment. The receptor-binding site in H_C is indicated by a red star. (D) Sequence alignments in the H_N-H_C linker. Residues that adopt an α -helix or β -sheet are in orange or green, respectively. The linker in BoNT/E does not adopt rigid secondary structure. The triple mutations, R861A/E868P/K871P and L862K/L863E/T867K, are highlighted with blue and red arrows, respectively.

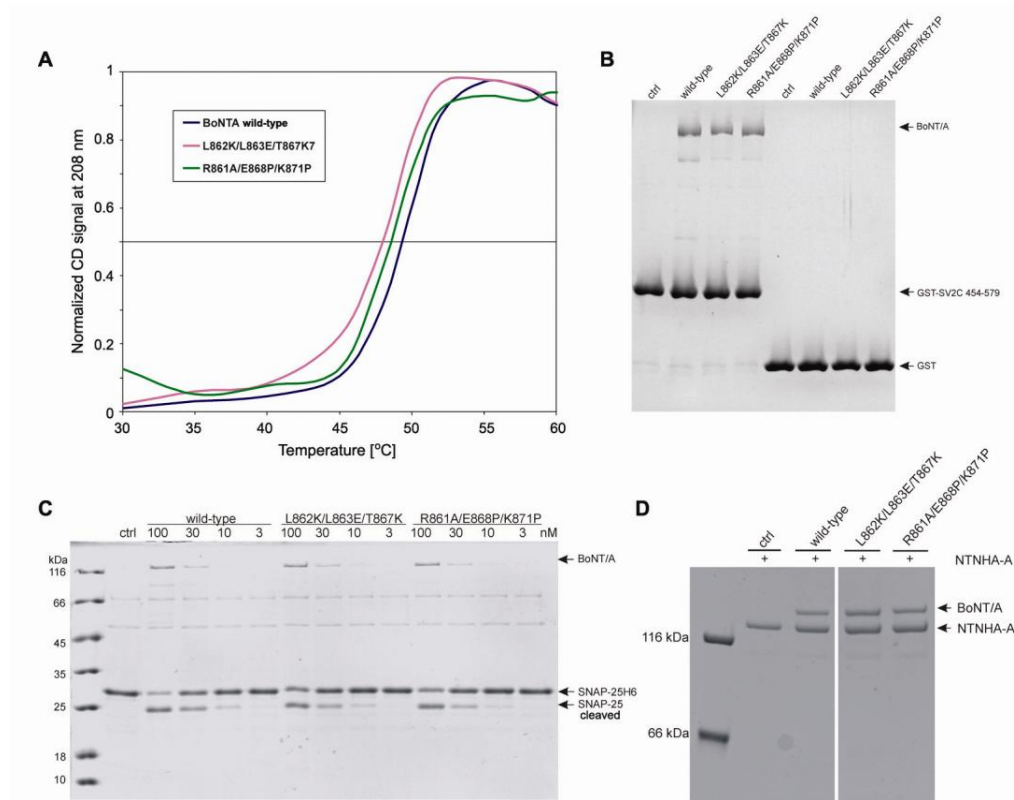


Fig. S9. Characterization of BoNT/A^{R861A/E868P/K871P} and BoNT/A^{L862K/L863E/T867K}. **(A)** Thermal denaturation analysis by circular dichroism suggests that the BoNT/A mutants adopt the wildtype-like structure. T_m values for the wild-type BoNT/A, BoNT/A^{R861A/E868P/K871P}, and BoNT/A^{L862K/L863E/T867K} are 49.3 °C, 48.0 °C, and 47.0 °C, respectively. **(B)** Binding of the BoNT/A mutants to the protein receptor SV2C in a GST pull-down assay was similar to the wild-type BoNT/A. **(C)** Mutants displayed unaltered catalytic activity towards the neuronal substrate (recombinant SNAP-25). **(D)** Mutants bound NTNHA-A comparably to the wild-type BoNT/A.

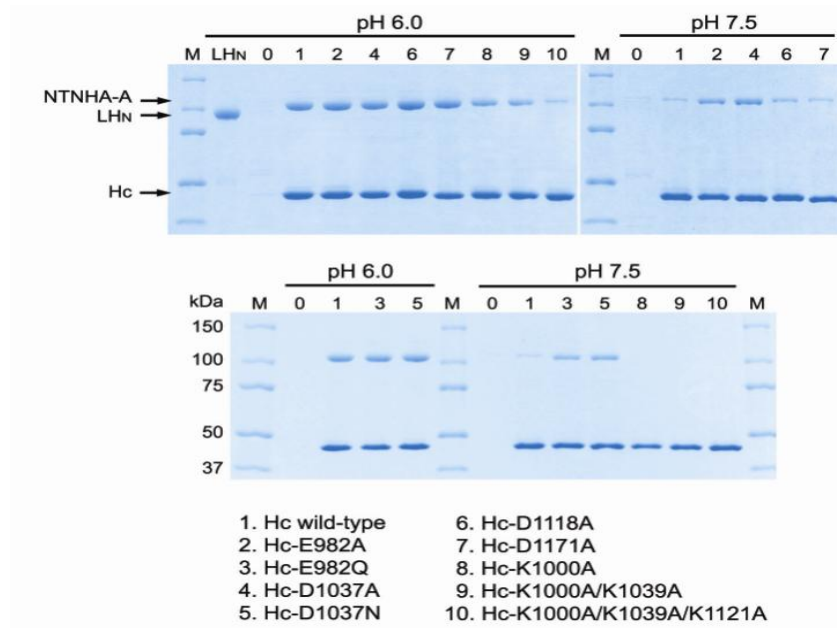


Fig. S10. Pull-down assays between full-length NTNHA-A (prey) and BoNT/A truncations or H_CA variants (baits). LH_N is the H_C-deleted BoNT/Ai. Sample #0 is the negative control with no bait.

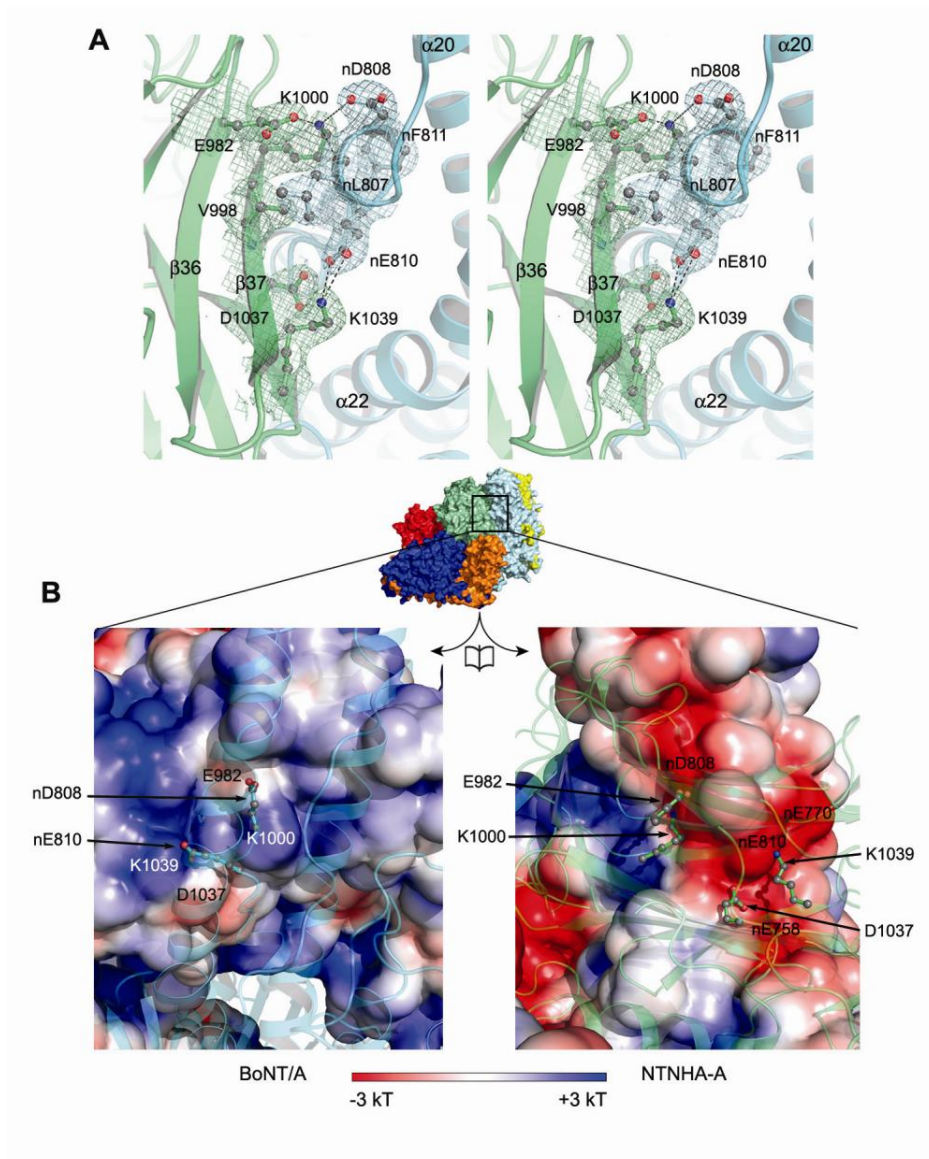


Fig. S11. A pH-sensing mechanism. **(A)** Stereo view of part of the intra-PTC interface between BoNT/Ai-H_C (green) and NTNHA-A-nH_N (cyan). The location of this interface is highlighted by a box on a surface representation of the M-PTC shown below. Key interface residues are shown as ball-and-stick models. Hydrogen bonds and charge-charge interactions are indicated by dotted lines. A simulated-annealing omit map of the M-PTC contoured at 1 σ was overlaid with the final refined model. **(B)** Same interface as in panel **A** shown as an open-book view, with molecular surfaces colored according to the electrostatic potential.

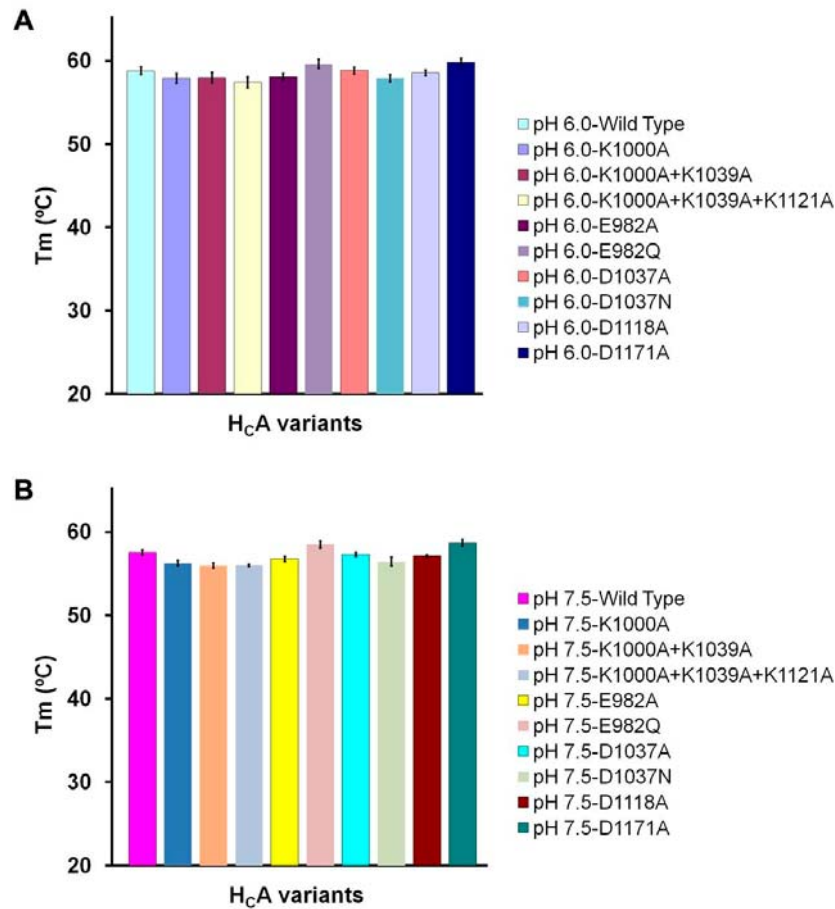


Fig. S12. Mutants of BoNT/A-H_c (H_cA) adopt wild-type-like structures. The thermal stability of the H_cA variants was measured using a fluorescence-based thermal shift assay on a LightCycler 480 system (Roche) (51). Specifically, protein melting was monitored using a hydrophobic binding dye, SYPRO Orange (Sigma-Aldrich), as the temperature was gradually increased from 20 °C to 95 °C. The midpoint (T_m value) of the protein-melting curve was determined using the melting curve analysis software provided by the instrument manufacturer. The data is represented as mean ± SD, n = 3. All H_cA mutants showed indistinguishable T_m to wild-type H_cA both at pH 6.0 (**A**) and pH 7.5 (**B**), indicating correct protein folding.

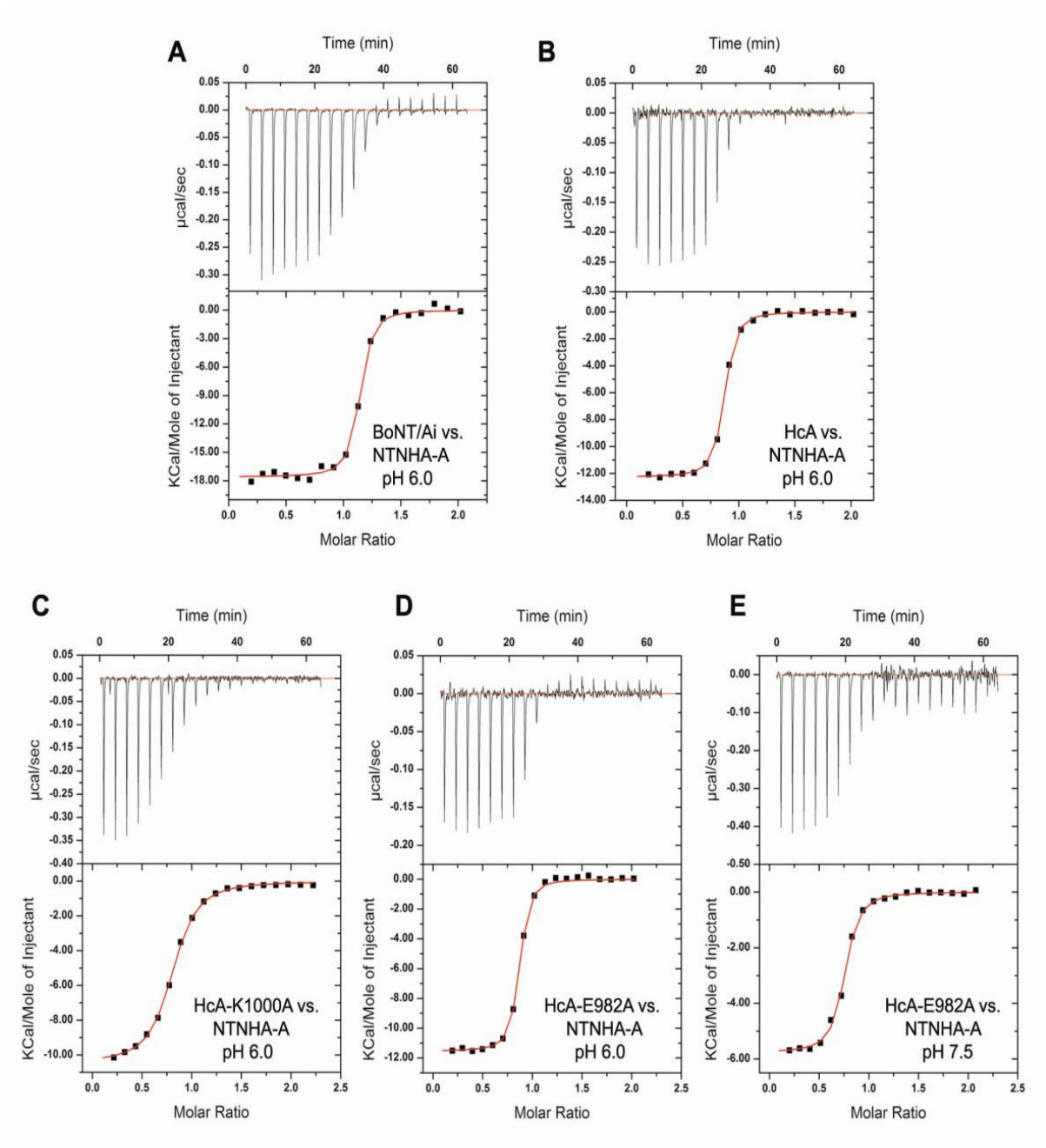


Fig. S13. Thermodynamic studies of the interactions between BoNT/Ai and NTNHA-A by isothermal titration calorimetry (ITC). The representative ITC data are shown for (A) full-length BoNT/Ai vs. NTNHA-A at pH 6.0, (B) wild-type H_cA vs. NTNHA-A at pH 6.0, (C) H_cA-K1000A vs. NTNHA-A at pH 6.0, (D) H_cA-E982A vs. NTNHA-A at pH 6.0, and (E) H_cA-E982A vs. NTNHA-A at pH 7.5.

Table S1. ITC characterization of the interactions between NTNHA-A and BoNT/A variants.

BoNT/A variants	pH	Kd (nM)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/K)	N
BoNT/Ai	6.0	30.8 ± 5.6	-17.6 ± 0.1	-24.8 ± 0.1	1.1 ± 0.01
H _C A	6.0	48.3 ± 8.3	-12.3 ± 0.1	-8.0 ± 0.5	0.8 ± 0.05
H _C A-K1000A	6.0	337.5 ± 50.1	-10.4 ± 0.1	-5.6 ± 0.4	0.8 ± 0.06
H _C A-E982A	6.0	39.4 ± 22.1	-11.5 ± 0.4	-4.7 ± 0.3	0.8 ± 0.09
H _C A-E982A	7.5	279.5 ± 32.6	-5.2 ± 0.5	12.3 ± 1.4	0.8 ± 0.05

Table S2. Data collection and refinement statistics

	M-PTC-VHH	M-PTC	BoNT/Ai
Data collection			
Space group	P4 ₁ 2 ₁ 2	P6 ₂ 22	P3 ₁ 2
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	156.1, 156.1, 324.6	282.2, 282.2, 374.8	167.5, 167.5, 158.7
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 120	90, 90, 120
Resolution (Å)	49.8–2.7(2.9–2.7)	50–3.9 (4.0–3.9)	50–4.3 (4.4–4.3)
<i>R</i> _{merge}	12.7 (76.8)	7.7 (67.3)	11.0 (70.7)
<i>I</i> σ <i>I</i>	13.6 (2.7)	11.9 (2.6)	8.4 (2.6)
Completeness (%)	99.9 (99.8)	92.2 (93.2)	100 (100)
Redundancy	6.2 (6.1)	5.6 (5.2)	7.4 (7.5)
Refinement			
Resolution (Å)	49.4–2.7	48.5–3.9	45.1–4.3
No. reflections	109,570	73,988	17,863
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	17.6/22.4	25.2/28.0	32.2/34.9
No. atoms			
Protein	20,722	19,829	10,390
Ligand/ion	148/2	0/2	0/1
Water	294	0	0
B-factors			
Protein	63.4	179.6	235.0
Ligand/ion	122.4/65.0	N.A./359.5	N.A./147.9
Water	47.9	N.A.	N.A.
r.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.006	0.006	0.027
Bond angles (°)	1.017	0.978	1.380

One crystal was used for each structure.

Highest resolution shell is shown in parenthesis.

Table S3. Interactions between BoNT/Ai and VHH

BoNT/Ai	Distance (Å)	VHH
Lys23 [NZ]	3.01	Glu52 [OE2]
Lys23 [NZ]	3.08	Glu52 [OE1]
Gln29 [OE1]	2.83	Thr56 [OG1]
Gln31 [NE2]	3.22	Tyr99 [OH]
Asp141 [O]	2.63	Arg32 [NH1]
Asp141 [OD2]	3.83	Arg32 [NH1]
Gly142 [O]	2.84	Tyr33 [N]
Gly142 [N]	3.18	Thr97 [O]

Table S4. Interactions between BoNT/Ai and NTNHA-A

<u>BoNT/Ai</u>			<u>NTNHA-A</u>		
Domain	Residues	Distance (Å)	Domain	Residues	
H_N	Lys626 [NZ]	2.79	nH_N	Asn538 [OD1]	
	Leu504 [O]	2.98	nH_C	Asn1175 [ND2]	
	Asp629 [OD1]	3.35		Gln976 [NE2]	
	Asp629 [OD1]	2.98		Asn988 [ND2]	
	Asn843 [O]	3.13		Gln935 [NE2]	
	Ser846 [OG]	3.38		Asn952 [ND2]	
	Ser846 [O]	3.23		Asn952 [ND2]	
	Asp848 [O]	2.93		Tyr954 [N]	
Asp848 [N]	2.74	Asn952 [O]			
H_C	Tyr1117 [OH]	2.67	nLC	Glu342 [OE1]	
	Tyr1117 [OH]	3.37		Glu342 [OE2]	
	Asn1257 [OD1]	3.30		Lys97 [NZ]	
	Leu958 [O]	2.89	nH_N	Gln801 [NE2]	
	Asn959 [ND2]	2.91		Gln801 [O]	
	Asn959 [ND2]	3.41		Asn800 [O]	
	Asn959 [ND2]	3.14		Val803 [O]	
	Lys1000 [NZ]	3.12		Leu807 [O]	
	Lys1000 [NZ]	5.18		Asp808 [OD1]	
	Lys1000 [NZ]	5.73 *		Phe811 [OD1]	
	Leu1035 [O]	3.28		Gln815 [N]	
	Ile1036 [O]	2.82		Ile814 [N]	
	Gln1038 [NE2]	3.03		Glu758 [OE1]	
	Gln1038 [NE2]	3.12		Cys583 [O]	
	Lys1039 [NZ]	3.09		Glu810 [OE1]	
	Lys1039 [NZ]	3.42		Glu810 [OE2]	
	Lys1121 [NZ]	3.19		Asp455 [OD1]	
	Asn1147 [ND2]	2.72		Asn652 [OD1]	
	Asn1257 [ND2]	3.08		Val457 [O]	
	Tyr1165 [O]	2.73		nH_C	Asn1100 [ND2]
	Tyr1165 [O]	3.28			Asn1102 [ND2]
	Ala1166 [O]	3.35			Asn1100 [ND2]
	Ser1167 [O]	3.38	Asn1100 [ND2]		
	Gly1168 [O]	3.06	Glu1111 [N]		
	Arg1175 [NH1]	3.23	Asp1110 [OD1]		
	Asn1177 [O]	2.99	Gln1107 [NE2]		
	Asn1177 [ND2]	2.89	Asn1039 [O]		
	Asp1246 [N]	2.74	Lys844 [O]		
	Asn1265 [ND2]	3.11	Glu845 [OE2]		
	Arg1269 [NH2]	4.81	Glu845 [OE1]		
	Arg1269 [NH2]	4.71	Glu845 [OE2]		
	Ser1274 [OG]	3.50	Glu831 [OE2]		

* Cation- π interaction.

References and Notes

34. L. Li, T. Binz, H. Niemann, B. R. Singh, Probing the mechanistic role of glutamate residue in the zinc-binding motif of type A botulinum neurotoxin light chain. *Biochemistry* **39**, 2399 (2000). [doi:10.1021/bi992321x](https://doi.org/10.1021/bi992321x) [Medline](#)
35. M. A. Breidenbach, A. T. Brunger, Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. *Nature* **432**, 925 (2004). [doi:10.1038/nature03123](https://doi.org/10.1038/nature03123) [Medline](#)
36. Z. Fu *et al.*, Light chain of botulinum neurotoxin serotype A: structural resolution of a catalytic intermediate. *Biochemistry* **45**, 8903 (2006). [doi:10.1021/bi060786z](https://doi.org/10.1021/bi060786z) [Medline](#)
37. T. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell, A. G. Leslie, iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr.* **D67**, 271 (2011). [Medline](#)
38. E. Potterton, P. Briggs, M. Turkenburg, E. Dodson, A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr.* **D59**, 1131 (2003). [doi:10.1107/S0907444903008126](https://doi.org/10.1107/S0907444903008126) [Medline](#)
39. P. D. Adams *et al.*, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr.* **D66**, 213 (2010). [doi:10.1107/S0907444909052925](https://doi.org/10.1107/S0907444909052925) [Medline](#)
40. A. J. McCoy *et al.*, Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658 (2007). [doi:10.1107/S0021889807021206](https://doi.org/10.1107/S0021889807021206) [Medline](#)
41. P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.* **D60**, 2126 (2004). [doi:10.1107/S0907444904019158](https://doi.org/10.1107/S0907444904019158) [Medline](#)
42. A. T. Brünger, Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472 (1992). [doi:10.1038/355472a0](https://doi.org/10.1038/355472a0) [Medline](#)
43. V. B. Chen *et al.*, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.* **D66**, 12 (2010). [doi:10.1107/S0907444909042073](https://doi.org/10.1107/S0907444909042073) [Medline](#)
44. J. Pei, N. V. Grishin, PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics* **23**, 802 (2007). [doi:10.1093/bioinformatics/btm017](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm017) [Medline](#)
45. P. Gouet, E. Courcelle, D. I. Stuart, F. Métoz, ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305 (1999). [doi:10.1093/bioinformatics/15.4.305](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/15.4.305) [Medline](#)
46. N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10037 (2001). [doi:10.1073/pnas.181342398](https://doi.org/10.1073/pnas.181342398) [Medline](#)
47. S. Hayward, H. J. Berendsen, Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins* **30**, 144 (1998). [doi:10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980201\)30:2<144::AID-PROT4>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980201)30:2<144::AID-PROT4>3.0.CO;2-N) [Medline](#)
48. S. Mahrhold, A. Rummel, H. Bigalke, B. Davletov, T. Binz, The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* **580**, 2011 (2006). [doi:10.1016/j.febslet.2006.02.074](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.074) [Medline](#)
49. A. T. Brunger *et al.*, Botulinum neurotoxin heavy chain belt as an intramolecular chaperone for the light chain. *PLoS Pathog.* **3**, e113 (2007). [doi:10.1371/journal.ppat.0030113](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030113) [Medline](#)
50. R. Fujita *et al.*, Molecular characterization of two forms of nontoxic nonhemagglutinin components of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *FEBS Lett.* **376**, 41 (1995). [doi:10.1016/0014-5793\(95\)01241-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01241-5) [Medline](#)
51. M. C. Lo *et al.*, Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal. Biochem.* **332**, 153 (2004). [doi:10.1016/j.ab.2004.04.031](https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.031) [Medline](#)

Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: Increased therapeutic dosage and immunogenicity.

Jasmin Strotmeier, Gesche Willjes, Thomas Binz, Andreas Rummel (2012).

publiziert in *FEBS Lett.*; 586(4):310-3. (17.02.2012)

Strotmeier:

- GST-Pulldown Experimente entworfen, durchgeführt und analysiert



Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: Increased therapeutic dosage and immunogenicity

Jasmin Strotmeier^a, Gesche Willjes^b, Thomas Binz^b, Andreas Rummel^{a,*}

^a Institut für Toxikologie, OE 5340, Medizinische Hochschule Hannover, 30623 Hannover, Germany

^b Institut für Biochemie, OE 4310, Medizinische Hochschule Hannover, 30623 Hannover, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2011

Accepted 27 December 2011

Available online 16 January 2012

Edited by Maurice Montal

Keywords:

Botulinum neurotoxin B

BoNT/G

Protein receptor

Human synaptotagmin-II

RimabotulinumtoxinB

ABSTRACT

Botulinum neurotoxins (BoNTs) inhibit neurotransmitter release by hydrolysing SNARE proteins essential for exocytosis. The synaptic vesicle protein synaptotagmin-II of rat and mouse acts as neuronal high affinity receptor for BoNT/B and BoNT/G. Here, we show that human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for BoNT/B and G due to a phenylalanine to leucine mutation in its luminal domain present only in humans and chimpanzees. It eliminates one of three major interactions between synaptotagmin-II and BoNT/B and hereby explains the disparity in potency of BoNT/B in humans and mice as well as the 40-fold higher dosage of rimabotulinumtoxinB versus onabotulinumtoxinA.

Structured summary of protein interactions:

rSyt-II binds to **BoNT/G** by pull down (View Interaction: [1](#), [2](#))

rSyt-II binds to **BoNT/B** by pull down (View Interaction: [1](#), [2](#))

© 2012 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are extremely poisonous bacterial protein toxins causing the disease botulism due to blockade of the acetylcholine release at the neuromuscular junction. On the other hand they are extensively employed as highly effective medicines to treat diseases like cervical dystonia, blepharospasm, hyperhidrosis and overactive bladder syndrome. The seven BoNT serotypes A–G are composed of four domains which play individual roles in their intoxication mechanism. The C-terminal H_{CC} domain harbours the two receptor binding sites for gangliosides and/or a synaptic vesicle protein [1]. The function of the adjacent H_{CN} domain is the least understood. It can interact with phosphatidylinositol phosphates [2] and might trigger the translocation step [3]. Together, they constitute the 50 kDa H_C-fragment which forms together with the H_N domain the 100 kDa heavy chain (HC). The H_N domain spans a pore into the synaptic vesicle membrane thereby translocating the partially unfolded light chain (LC), a Zn²⁺ dependent endopeptidase, into the neuronal cytosol to specifically hydrolyse certain soluble N-ethylmaleimide sensi-

tive attachment protein receptors of the vesicular fusion machinery [4]. This results in disruption of the Ca²⁺ triggered fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane thereby blocking release of acetylcholine.

Local injections of BoNT are widely recognised as the most effective treatment for cervical dystonia. BoNT/B (rimabotulinumtoxinB) and BoNT/A (onabotulinumtoxinA) have been shown to be effective for cervical dystonia in multiple open-label and controlled trials [5]. Both drugs were compared within the indication cervical dystonia (CD) using a randomized, double-blind, parallel-arm study design [6]. Both serotypes had equivalent benefit in subjects with CD at 4 weeks. However, the mean dosage was 205 ± 50 units (U) onabotulinumtoxinA and 8520 ± 1892 U rimabotulinumtoxinB (one U is defined as one mouse LD₅₀) which corresponds to ~40-fold higher dosage of rimabotulinumtoxinB [6]. Such high protein dosage causes a high frequency of antibody induced therapy failure [7,8]. On the other hand, the specific activities in mice were determined to be 20–35 U/ng for onabotulinumtoxinA [9,10] and to be 90–107 U/ng for rimabotulinumtoxinB [11] which differs only by factor 3–5. Hence, this approximately 10-fold lower potency of rimabotulinumtoxinB in human versus mouse has to be attributable to species differences on the molecular level. Analysis of the amino acid sequences 53–92 and 51–90 of VAMP-1 and VAMP-2, respectively, the neuronal substrates of BoNT/B, revealed 100% identity between human and mouse VAMP-1 and -2, respectively, excluding impaired substrate hydrolysis in human [12]. Therefore a difference in receptor recognition might cause the disparity in potency.

Abbreviations: BoNT, botulinum neurotoxin; HC, heavy chain; H_C, carboxyl-terminal half of HC; H_{CC}, carboxyl-terminal half of H_C; H_{CN}, amino-terminal half of H_C; H_N, amino-terminal half of HC; LC, light chain; SV2, synaptic vesicle glycoprotein 2; hSyt, mSyt, rSyt, human, mouse and rat synaptotagmin, respectively; CD, cervical dystonia

* Corresponding author. Fax: +49 511 532 8021.

E-mail address: Rummel.Andreas@mh-hannover.de (A. Rummel).

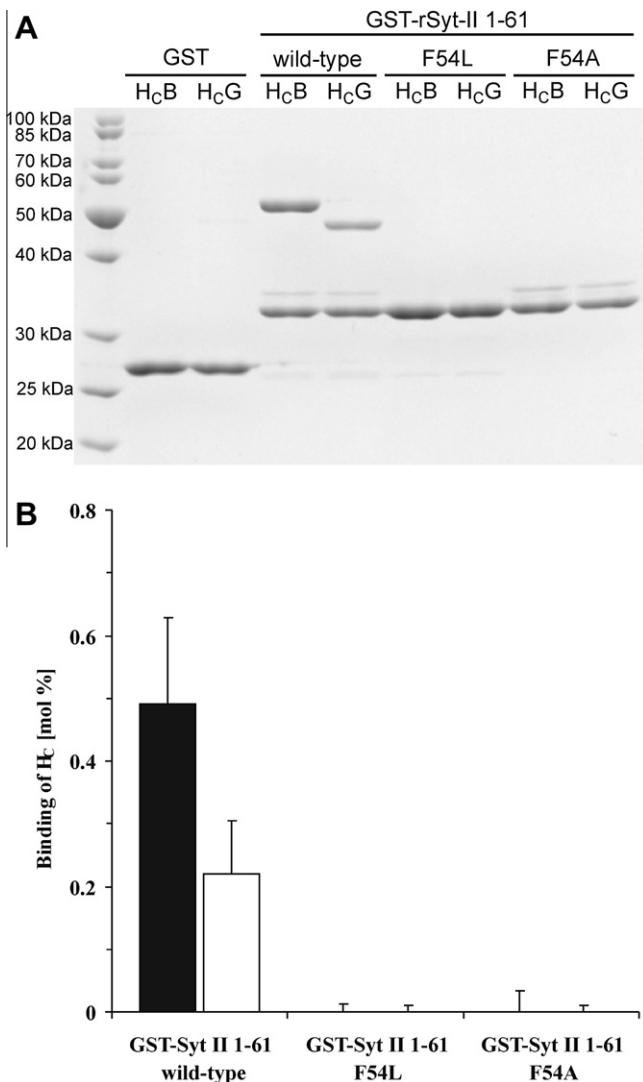


Fig. 2. BoNT/B and G H_c-fragments do not bind to GST-rSyt-II 1-61 F54L. (A) GST (25 kDa), GST-rSyt-II 1-61 wild-type (33 kDa) and its mutants F54A and F54L were immobilised on glutathione-sepharose beads and incubated with H_cB and H_cG (50 kDa) for 2 h at 4 °C. Proteins bound to the solid phase were visualised by Coomassie blue staining. (B) Amounts of bound H_cB (filled) and H_cG (empty column) are quantified ($n = 4$, \pm S.D.).

2.1. Plasmid constructions and production of proteins

Production and purification of the H_c-fragments of BoNT/B and G carrying a carboxyl-terminal StrepTag as well as GST-rSyt-II 1-61 were previously described [17,25]. Mutations of GST-rSyt-II were generated by the Genetailor method (Invitrogen) using suitable primers and pGEXSytII-61C as template DNA [17]. Nucleotide sequences of all mutants were verified by DNA sequencing.

2.2. GST-pull-down assays

GST-fusion-proteins (150 pmol each) immobilised to 10 μ l of glutathione-sepharose-4B matrix were incubated with recombinant H_c-fragments (100 pmol each) in a total volume of 100 μ l 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2 supplemented with 0.5% Triton X-100 (Tris/NaCl/Triton) buffer for 2 h at 4 °C. Beads were collected by centrifugation and washed three times each with 160 μ l Tris/NaCl/Triton buffer. Washed pellet fractions were boiled in SDS sample buffer, analysed by 12.5% SDS-polyacrylamide gel

electrophoresis, detected by Coomassie blue staining and subsequently quantified.

3. Results and discussion

3.1. Human and chimpanzee Syt-II display a unique single mutation at position 51

The amino acid sequences of the intraluminal domains of human, rat, and mouse Syt-I and Syt-II were aligned (Fig. 1A). According to biochemical data and crystallographic studies, only the membrane juxtaposed 17 amino acids of Syt-I and Syt-II interact with the H_c-fragment of BoNT/B (Fig. 1B) [15,17,22–24]. Here, F47 and F54 as well as E57 of rSyt-II and mSyt-II form the main interactions with BoNT/B [22,23]. Identical residues are found within the homologous segment of human, mouse and rat Syt-I (F39, F46 and E49). In contrast, residue 51 of human and chimpanzee Syt-II corresponding to F54 in mouse and rat Syt-II is a leucine (Fig. 1A). According to the receptor-toxin structure H_cB-rSyt-II, F54 constitutes one of two major hydrophobic interactions with BoNT/B, and its mutation to alanine completely abolished binding of H_cB in a pull-down assay [23]. Thus, L51 of hSyt-II is a likely candidate for impaired affinity to BoNT/B and G.

3.2. BoNT/B and G H_c-fragments do not bind GST-rSyt-II 1-61 F54L

To test the effect of the Phe to Leu replacement at position 51 in hSyt-II we generated the GST-fusion protein GST-rSyt-II 1-61 F54L to allow a better comparison with previous binding experiments of H_cB employing rSyt-II. The substitution D52 in rSyt-II versus E52 and E49 in mSyt-II and hSyt-II, respectively, is irrelevant since residue 52 does not interact with H_cB and the mutant mSyt-II E52A displays wild-type binding characteristics [22]. The GST-rSyt-II 1-61 F54L mutant was recombinantly expressed in *Escherichia coli* and could be isolated in yields comparable to the wild-type construct. Subsequently, we performed GST-pull-down assays and tested the binding of H_cB and H_cG to the mutant F54L in comparison to wild-type and mutant F54A [23]. H_cB and H_cG bound to GST-rSyt-II 1-61 wild-type with 49 ± 14 and 22 ± 9 mol%, respectively (Fig. 2B). The lower affinity of H_cG to Syt-II versus H_cB is in accordance with previous data [14,17]. Removing the phenyl ring of residue 54 (F54A) abolished binding of H_cB as well as of H_cG to GST-rSyt-II 1-61 as shown previously [22,23,26]. Finally, mutant F54L corresponding to hSyt-II similarly deletes binding of H_cB and H_cG to GST-rSyt-II 1-61. As F54L is the only replacement of hSyt-II versus mSyt-II among interacting amino acids, human Syt-II will bind BoNT/B and G with much lower affinity than mouse or rat Syt-II. This result underlines the importance of the phenyl side chain at residue 54 for mediating the hydrophobic interaction with both BoNT serotypes and is further supported by the mutation of F54 to methionine which also deleted binding with BoNT/B [26].

In conclusion, this finding explains the minimum 10-fold lower potency of BoNT/B in humans compared to mice. Furthermore, although BoNT/B binds Syt-I with a 10- to 100-fold higher dissociation constant [23,24], it seems that in humans presumably Syt-I mediates the neuronal uptake of BoNT/B since the three key residues (F40, F47 and E50) are conserved in human Syt-I. In addition, hereby we provide one explanation for the rareness of human botulism cases caused by BoNT/G [27]. Moreover, this study also sheds light onto the problematic issue of extrapolating results of animal experiments or non-human cell line based assays for pharmaceutical applications in humans. In this case, only experiments in chimpanzees and no other mammals would have yielded results valid for humans. In the future, employing the detailed knowledge of

BoNT-Syt receptor interaction, one could increase the low binding affinity to human Syt-II by rationale site directed mutagenesis in the Syt binding site thereby increasing the potency of BoNT/B in humans to provide a highly effective alternative treatment for BoNT/A-non-responding patients with movement disorders.

Acknowledgements

We thank Nadja Krez for excellent technical assistance. This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (BI 660/2-1) to T.B. and (GSC108) to G.S., respectively.

References

- [1] Binz, T. and Rummel, A. (2009) Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *J. Neurochem.* 109, 1584–1595.
- [2] Muraro, L., Tosatto, S., Motterlini, L., Rossetto, O. and Montecucco, C. (2009) The N-terminal half of the receptor domain of botulinum neurotoxin A binds to microdomains of the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 76–80.
- [3] Fischer, A., Mushrush, D.J., Lacy, D.B. and Montal, M. (2008) Botulinum neurotoxin devoid of receptor binding domain translocates active protease. *PLoS Pathog.* 4, e1000245.
- [4] Montal, M. (2010) Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 591–617.
- [5] Comella, C.L. (2008) The treatment of cervical dystonia with botulinum toxins. *J. Neural. Transm.* 115, 579–583.
- [6] Comella, C.L., Jankovic, J., Shannon, K.M., Tsui, J., Swenson, M., Leurgans, S. and Fan, W. (2005) Comparison of botulinum toxin serotypes A and B for the treatment of cervical dystonia. *Neurology* 65, 1423–1429.
- [7] Dressler, D. and Bigalke, H. (2005) Botulinum toxin type B de novo therapy of cervical dystonia: frequency of antibody induced therapy failure. *J. Neurol.* 252, 904–907.
- [8] Solstice_Neurosciences_Inc. (2010). Myobloc® (rimabotulinumtoxinB) Injection: prescribing information revised 05/2010 [online]. Available from URL: <http://www.myobloc.com/myobloc/hp_about/PL_5-19-10.pdf> [Accessed 2011 Dec. 8].
- [9] Allergan_Inc. (2011). BOTOX (Botulinum toxin type A) purified neurotoxin complex: prescribing information revised 08/2011 [online]. Available from URL: <http://www.allergan.com/assets/pdf/botox_pi.pdf> [Accessed 2011 Dec. 8].
- [10] Hunt, T. (2007). Improved botulinum toxin composition. Available from URL: <<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2007016018&IA=US2006028603&DISPLAY=DESC>>. [Accessed 2011 Dec 8] US Patent application 2007/0025019.
- [11] Callaway, J.E. (2004) Botulinum toxin type B (Myobloc): pharmacology and biochemistry. *Clin. Dermatol.* 22, 23–28.
- [12] Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J. and Poulain, B. (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* 82, 427–446.
- [13] Montecucco, C. (1986) How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.* 11, 314–317.
- [14] Rummel, A. et al. (2007) Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 359–364.
- [15] Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A. and Chapman, E.R. (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* 162, 1293–1303.
- [16] Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M. and Kozaki, S. (1994) Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 10498–10503.
- [17] Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H. and Binz, T. (2004) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* 279, 30865–30870.
- [18] Chapman, E.R. (2002) Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 498–508.
- [19] Sudhof, T.C. (2002) Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277, 7629–7632.
- [20] Geppert, M., Archer 3rd, B.T. and Sudhof, T.C. (1991) Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 266, 13548–13552.
- [21] Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R. and Sudhof, T.C. (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260–263.
- [22] Chai, Q., Arndt, J.W., Dong, M., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Chapman, E.R. and Stevens, R.C. (2006) Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* 444, 1096–1100.
- [23] Jin, R., Rummel, A., Binz, T. and Brunger, A.T. (2006) Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* 444, 1092–1095.
- [24] Nishiki, T. et al. (1996) The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett.* 378, 253–257.
- [25] Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H. and Binz, T. (2004) The H_{CC}-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol. Microbiol.* 51, 631–643.
- [26] Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E.R. and Stevens, R.C. (2010) Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding. *J. Mol. Biol.* 397, 1287–1297.
- [27] Sonnabend, O., Sonnabend, W., Heinze, R., Sigrist, T., Dirnhofer, R. and Krech, U. (1981) Isolation of Clostridium botulinum type G and identification of type G botulinum toxin in humans: report of five sudden unexpected deaths. *J. Infect. Dis.* 143, 22–27.

Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner.

Reproduced with permission, from

Jasmin Strotmeier, Kwangkook Lee, Anne K. Völker, Stefan Mahrhold, Yinong Zong, Johannes Zeiser, Jie Zhou, Andreas Pich, Hans Bigalke, Thomas Binz, Andreas Rummel and Rongsheng Jin (2010).

publiziert in *Biochem. J.*, **431**, 207–216 © the Biochemical Society.

Strotmeier: folgende Experimente entworfen und durchgeführt:

- Klonierungen: 70 % der Mutanten in pHcDS, pSPHcDS, pBoNTDSL
- Produktion rekombinanter Proteine: 70 %
- Protein für Kristallographie aufgereinigt
- Synaptosomenassay: 70 %
- MPN mit Wildtyp- und KO-Mäusen: 50 %

Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner

Jasmin STROTMEIER^{*1}, Kwangkook LEE^{†1}, Anne K. VÖLKER^{*1}, Stefan MAHRHOLD[‡], Yinong ZONG[†], Johannes ZEISER^{*}, Jie ZHOU[†], Andreas PICH^{*}, Hans BIGALKE^{*}, Thomas BINZ[‡], Andreas RUMMEL^{*2} and Rongsheng JIN^{†2}

^{*}Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany, [†]Center for Neuroscience, Aging and Stem Cell Research, Sanford-Burnham Medical Research Institute, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, U.S.A., and [‡]Institut für Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany

The extraordinarily high toxicity of botulinum neurotoxins primarily results from their specific binding and uptake into neurons. At motor neurons, the seven BoNT (botulinum neurotoxin) serotypes A–G inhibit acetylcholine release leading to flaccid paralysis. Uptake of BoNT/A, B, E, F and G requires a dual interaction with gangliosides and the synaptic vesicle proteins synaptotagmin or SV2 (synaptic vesicle glycoprotein 2), whereas little is known about the cell entry mechanisms of the serotypes C and D, which display the lowest amino acid sequence identity compared with the other five serotypes. In the present study we demonstrate that the neurotoxicity of BoNT/D depends on the presence of gangliosides by employing phrenic nerve hemidiaphragm preparations derived from mice expressing the gangliosides GM3, GM2, GM1 and GD1a, or only GM3

[a description of our use of ganglioside nomenclature is given in Svennerholm (1994) *Prog. Brain Res.* **101**, XI–XIV]. High-resolution crystal structures of the 50 kDa cell-binding domain of BoNT/D alone and in complex with sialic acid, as well as biological analyses of single-site BoNT/D mutants identified two carbohydrate-binding sites. One site is located at a position previously identified in BoNT/A, B, E, F and G, but is lacking the conserved SXWY motif. The other site, co-ordinating one molecule of sialic acid, resembles the second ganglioside-binding pocket (the sialic-acid-binding site) of TeNT (tetanus neurotoxin).

Key words: botulinum neurotoxin D (BoNT/D), crystal structure, ganglioside-binding site, H_C fragment, sialic acid complex.

INTRODUCTION

BoNT/D (botulinum neurotoxin serotype D), produced by *Clostridium botulinum*, belongs to the family of CNTs (clostridial neurotoxins). CNTs comprise the seven BoNT serotypes A–G and TeNT (tetanus neurotoxin) that cause the diseases botulism and tetanus respectively. Their neurospecific binding to unmyelinated areas of nerve terminals [2] is the main cause of toxicity and they have a median lethal dose (LD₅₀) below 1 ng per kg of body weight, electing them to the most toxic agents known [3]. At motor neurons, BoNTs inhibit acetylcholine release, leading to flaccid paralysis, whereas TeNT is subjected to retrograde transport into inhibitory neurons and blocks release of glycine and γ -aminobutyric acid, which results in spastic paralysis.

The crystal structures of the 150 kDa BoNT/A, B and E holotoxins [4–6] revealed that all CNTs are composed of four functionally independent domains, which perform individual tasks in the multi-step intoxication process [7]. The 100 kDa HC (heavy chain) contains three of the four domains. The C-terminal 25 kDa H_{CC} (C-terminal H_C) domain mediates the neurospecific binding and uptake of BoNT/A, B, E, F and G, as the first step to attack neurons (for a review, see [8]) [9]. The role of the N-terminally neighbouring 25 kDa H_{CN} (N-terminal H_C) domain in the intoxication mechanism is still unclear,

although it is suggested that BoNT/A H_{CN} weakly interacts with phosphatidylinositol phosphates [10]. Together the H_{CC} and H_{CN} domains form the 50 kDa H_C fragment that displays intact neurospecific binding; the H_C fragment can be isolated from full-length BoNT by proteolytic digestion or can be autonomously expressed in *Escherichia coli*. So far, the crystal structures of isolated H_C fragments alone or in complex with carbohydrates or receptor peptides have been determined for BoNT/A, B, F, G and TeNT [11–17], whereas the structures of BoNT/C and D are still unknown. The N-terminal half of the HC, the 50 kDa H_N translocation domain, forms a channel and delivers the partially unfolded disulfide-bond-linked 50 kDa LC (light chain) into the cytosol [18,19]. Within the cytosol, the released LC, a Zn²⁺-dependent endopeptidase, hydrolyses members of the three neuronal SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein-attachment protein receptors), thereby blocking Ca²⁺-triggered exocytosis [7].

Widely distributed gangliosides represent low-affinity neuronal receptors responsible for accumulating CNTs on neuronal surfaces. This interaction has been studied extensively using *in vitro* assays for all serotypes (for reviews, see [20,21]). Their physiological role has been demonstrated for all CNTs using mice or mouse hippocampal neurons displaying different expression patterns of polysialogangliosides, as a result of

Abbreviations used: BoNT, botulinum neurotoxin; CNT, clostridial neurotoxin; GD3S, GD3 synthetase; GM3S, GM3 synthetase; HC, heavy chain; H_CA, BoNT/A H_C fragment; H_CB, BoNT/B H_C fragment; H_CD, BoNT/D H_C fragment; KO, knockout; LC, light chain; MALDI, matrix-assisted laser-desorption ionization; MPN, mice phrenic nerve; NAcGal, N-acetylgalactosamine; NAcGalT, β -1,4-N-acetylgalactosamine transferase; NAcNeu, N-acetylneuraminic acid (sialic acid); PEG, poly(ethylene glycol); RMSD, root mean square deviation; SV, synaptic vesicle; Syt, synaptotagmin; TeNT, tetanus neurotoxin; TOF, time-of-flight.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence may be addressed to either of these authors (email rummel.andreas@mh-hannover.de or rjin@sanfordburnham.org).

The co-ordinates and diffraction data for the apo-BoNT/D H_C fragment and BoNT/D H_C fragment–NAcNeu have been deposited in the PDB under codes 3OBR and 3OBT respectively.

specific gene KOs (knockouts) [8,9]. Surprisingly, only BoNT/D does not seem to require gangliosides for neuronal uptake, but uses phosphatidylethanolamine instead [22]; however, it was previously demonstrated that the biological activity of BoNT/D is inhibited in mice and hemidiaphragm preparations by pre-incubation with GT1b in a dose-dependent manner [23].

Several studies have demonstrated an accelerated uptake of BoNT/A–G and TeNT into the phrenic nerve prepared together with the adjacent hemidiaphragm and into isolated neuronal cultures, upon electrical and chemical stimulation respectively, as neuronal stimulation causes increased rates of exo- and endocytosis of SVs (synaptic vesicles) (for a review, see [8]) [9]. The N-terminal luminal domains of the SV membrane proteins Syt (synaptotagmin)-I and Syt-II were identified as the protein receptors for BoNT/B [24,25]. Co-crystallization of Syt-II with BoNT/B refined the binding segment to an α -helical 17-mer peptide adjacent to the transmembrane domain of Syt-II [12,26]. BoNT/G interacts with identical segments of Syt-I and Syt-II, but none of the other CNTs bind to either Syt-I or Syt-II [27]. Thereafter, the three isoforms of SV2 (SV glycoprotein 2), a 12-transmembrane-domain protein, were identified as protein receptors for BoNT/A [28,29], BoNT/E [30] and BoNT/F [9,13]. It is still under debate whether BoNT/C and D engage protein receptors for their neuronal uptake [22].

In more recent years, a conserved ganglioside-binding site in the H_{CC} domain, containing an 'E(D)...H...SXWY...G' motif that interacts with the terminal NAcGal β 3–1Gal β (where NAcGal is *N*-acetylgalactosamine and Gal is galactose) moiety of GT1b and GD1a, has been described for BoNT/A [11,31], BoNT/B [5,31], BoNT/E [9], BoNT/F [9,13], BoNT/G [15,32] and TeNT [17,33]. A description of our use of ganglioside nomenclature is given in [1]. In addition, the binding site for the protein receptor of BoNT/B and G has been allocated to their H_{CC} domains [12,26,32,34]. Interestingly, the TeNT H_{CC} domain contains a second ganglioside-binding site (called the sialic-acid-binding site) at the homologous location with the protein-receptor-binding site in BoNT/B and G, which interacts either with the disialic acid branch of GD1b and GT1b [16,17,33,35,36], or, eventually, with a glycosylated protein receptor [37]. Only binding to both receptors allows CNTs to show neurospecific uptake, thereby confirming the double receptor mechanism [38]. However, analysis of an amino acid sequence alignment of all BoNT H_{CC} domains does not reveal such a conserved ganglioside binding motif in BoNT/D [31] and its potential binding to gangliosides is currently ambiguous.

In the present study we employed MPN (mice phrenic nerve) hemidiaphragm preparations derived from mice only expressing either GM3 or the α -series gangliosides (GM3, GM2, GM1 and GD1a), and demonstrate that the biological activity of BoNT/D depends on the expression of complex polysialogangliosides. Binding of GT1b to H_CD (BoNT/D H_C fragment) was revealed by MALDI (matrix-assisted laser-desorption/ionization)–TOF (time-of-flight)–MS. To further understand the mechanism underlying BoNT/D–ganglioside recognition, we have determined the crystal structures of H_CD alone and in complex with sialic acid at 1.7 Å (1 Å = 0.1 nm) and 2.0 Å respectively. A carbohydrate-binding site in BoNT/D was identified that locates similarly to the protein-receptor-binding site in BoNT/B and G, as well as the sialic-acid-binding site in TeNT. Structure-based site-directed mutagenesis in BoNT/D was performed, focusing on the newly identified sialic-acid-binding site, as well as the equivalent 'conserved' ganglioside-binding pocket as observed in BoNT/A, B, E, F and G. Mutants in either site showed drastically decreased binding to neuronal membranes, as well as severely reduced biological activity in the MPN hemidiaphragm assay. Hence BoNT/D binding to cell-surface gangliosides is

required in order to exert its neurotoxicity and it employs two receptor pockets within its H_{CC} domain for the carbohydrate interaction.

EXPERIMENTAL

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.03 software.

Plasmid construction

Plasmids encoding the H_C fragments (pH_CDS for recombinant expression in *E. coli*, pSP72-H_CD for *in vitro* transcription/translation) and the full-length BoNT/D (pBoNTDS) of *C. botulinum* strain BVD/-3 (EMBL accession number X54254) have been described previously [39,40]. Mutations in H_CD were generated using the GeneTailor™ method (Invitrogen) using suitable primers and pH_CDS and pSP72-H_CD as template DNA. Mutated expression plasmids for full-length BoNT/D were generated by swapping DNA fragments between pBoNTDS and mutated pH_CDS and pSP72-H_CD plasmids respectively. Nucleotide sequences of all mutants were verified by DNA sequencing.

Production of recombinant proteins

Recombinant full-length neurotoxins were expressed under biosafety level 2 containment (project number GAA A/Z 40654/3/123) in the *E. coli* strain M15[pREP4] (Qiagen), following 16 h of induction at 22 °C. Proteins were purified on Strep-Tactin® Superflow® columns (IBA) according to the manufacturer's instructions and were stored in 100 mM Tris/HCl, pH 8.0. All recombinant proteins were shock-frozen in liquid nitrogen, and kept at –70 °C.

Crystallization and diffraction data collection

The isolated wild-type H_CD was further purified with an ÄKTA Purifier using a Superdex-200 16/60 column (GE Healthcare) in buffer containing 30 mM Tris/HCl, pH 7.6, and 500 mM NaCl and were then concentrated to ~7 mg/ml for crystallization. Initial crystallization screens were carried out using a Phoenix crystallization robot (Art Robbins Instruments) and high-throughput crystallization screen kits from Hampton Research, Qiagen or Emerald BioSystems. The best crystals were grown at 18 °C by the hanging-drop vapour-diffusion method in an 1:1 (v/v) ratio of protein and reservoir solution containing 0.1 M Hepes, pH 8.0, and 7% (v/v) PEG [poly(ethylene glycol)] 10K. The crystals were cryoprotected in the same mother liquor, supplemented with 25% (v/v) glycerol, and then flash-frozen in liquid nitrogen. The crystals of the sialic acid complex H_CD–NAcNeu (*N*-acetylneuraminic acid or sialic acid) were obtained by soaking the H_CD crystals in a solution containing 10 mM Hepes, pH 8.0, 150 mM NAcNeu, 14% (v/v) PEG 10K and 25% (v/v) glycerol for 8 h at 18 °C. These crystals were then directly frozen in liquid nitrogen. The X-ray diffraction data of the apo-H_CD and the H_CD–NAcNeu complex were collected at 100K at beam line 9–2 of the SSRL (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory), using a Mar-325 CCD (charge-coupled-device) detector. All data sets were processed and scaled by using HKL2000 [41]. Data collection statistics are summarized in Table 1. The crystals of the apo-H_CD or the H_CD–NAcNeu complex belong to the *P* 2₁ 2₁ 2₁ space group with unit cell dimensions of *a* = 60.7 Å, *b* = 89.9 Å, *c* = 94.1 Å, or *a* = 60.2 Å, *b* = 90.0 Å, *c* = 93.5 Å respectively.

Table 1 Data collection and refinement statistics

Values in parentheses represent the highest resolution shell. $R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_j |I_{h,j} - \langle I_h \rangle| / \sum_i \sum_j I_{h,j}$; $R_{\text{work}} = (\sum \|F_o\| - |F_c|) / \sum \|F_o\|$; 5% of the reflections were set aside for calculation of R_{free} .

Parameter	Apo-H _C D	H _C D–NAcNeu
Data collection		
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> ; Å)	60.68, 89.87, 94.12	60.23, 90.04, 93.52
Resolution (Å)	50–1.72 (1.78–1.72)	50–2.00 (2.07–2.00)
Total observations	407,040	238,813
Unique observations	55,098	34,615
Average redundancy	7.4 (7.2)	6.9 (6.2)
Data completeness (%)	99.2 (91.8)	98.0 (95.2)
I/σ_1	47.5 (10.2)	33.4 (7.4)
R_{merge} (%)	8.5 (47.5)	6.7 (52.6)
Refinement		
No. of protein atoms	3483	3391
No. of water atoms	515	317
R_{work} (%)	17.6 (22.9)	17.4 (21.7)
R_{free} (%)	20.5 (27.2)	22.1 (29.7)
RMSD bond lengths (Å)	0.025	0.025
RMSD bond angles (°)	1.693	2.000
Ramachandran statistics		
Most favoured (%)	96.9	97.0
Additionally allowed (%)	3.1	3.0
Disallowed (%)	0	0

Structure determination and refinement

The structures of apo-H_CD and the H_CD–NAcNeu complex were determined by molecular replacement using Phaser [42] and the crystal structure of H_CA (BoNT/A H_C fragment; PDB code 2VU9) was used as the search model. The structures were subsequently refined with REFMAC5.5 and re-built with COOT in an iterative way [43,44]. Refinement progress was monitored with the R_{free} value using a 5% randomly selected test set [45]. The apo and the complex structures were refined to 1.72 Å with $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.18/0.21$ and to 2.0 Å with $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.17/0.22$ respectively. Both structures, with excellent stereochemistry, were validated through the Molprobity web server [46]. Structural refinement statistics are listed in Table 1. Figures were prepared with PyMol (<http://www.pymol.org>).

Synaptosome-binding assay

Binding of ³⁵S-labelled *in vitro* transcribed/translated H_CD mutants to freshly prepared rat brain synaptosomes was conducted as described previously [31].

MPN hemidiaphragm assay

The MPN hemidiaphragm assay was performed in Krebs–Ringer solution (1.19 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2.54 mM CaCl₂ and 11 mM glucose, pH 7.4) under an 95% oxygen/5% carbon dioxide atmosphere, as described previously [47]. The phrenic nerve was continuously stimulated at 5–25 mA with a frequency of 1 Hz, or, in the indicated cases, at 0.016 Hz (with an 0.1 ms pulse duration). Isometric contractions were transformed using a force transducer and recorded with VitroDat Online software (FMI). The time required to decrease the amplitude to 50% of the starting value (paralytic half-time) was determined. To determine the altered neurotoxicity of the BoNT mutants, or wild-type BoNT/D with ganglioside-deficient MPN hemidiaphragm

preparations, a concentration–response curve, consisting of five data points determined in triplicate was compiled to which a power function could be ascribed: $y(5, 15, 30, 50 \text{ or } 100 \text{ pM wild-type BoNT/D}) = 203.41x^{-0.3438}$, $R^2 = 0.9825$. Resulting paralytic half-times were converted into corresponding concentrations of the respective wild-type BoNT/D, using the equation given above, and neurotoxicity was finally expressed as the percentage of the wild-type BoNT/D neurotoxicity.

Complex-polysialoganglioside-deficient mice

Animal use was according to section 4.3 of German animal protection law; animals were killed by trained personnel before dissection of organs, with their number reported to the animal welfare officer of the Central Animal Laboratory and to the local authority Veterinäramt Hannover.

Phrenic nerves were derived from 20 g of wild-type NMRI mice or tissue from C57BL/6 mice lacking the genes *B4galnt1* encoding NAcGalT (β -1,4-N-acetylgalactosamine transferase; EC 2.4.1.92) and/or *St8sial1* encoding GD3S [GD3 synthetase (CMP-sialic acid:GM3 α -2,8-sialyltransferase); EC 2.4.99.8]. Whereas neurons of NMRI mice contain the full set of complex polysialogangliosides, the nerve cells of complex-ganglioside-deficient mice contain only GM3 or predominantly GM1 and GD1a [48]. No difference in the paralytic half-time was observed when phrenic nerve hemidiaphragm preparations from NMRI and wild-type C57BL/6 mice were compared.

MALDI-TOF-MS analysis

Samples were analysed in an AB Sciex 5800 MALDI-TOF mass spectrometer controlled by TOF/TOF Series Explorer 4.0.0. For each sample eight subspectra were generated with 200 shots and a laser intensity of 6297 instrument specific units. Masses were detected from 20000 *m/z* to 100000 *m/z*. Samples were co-crystallized with 13 mg/ml sinapinic acid solution in 50% acetonitril, 0.1% trifluoroacetic acid, mixed at a ratio of 1:1 (0.5 μ l of each) with sample directly on a stainless steel MALDI target plate. BSA (66430 Da), trypsinogen (23980 Da) and Protein A (44620 Da) were used as standard proteins for external calibration.

RESULTS AND DISCUSSION

Ganglioside deficiency clearly reduces the neurotoxicity of BoNT/D in the MPN assay

Almost all BoNT serotypes require complex polysialogangliosides as receptors to exert their neurotoxicity [8,9]. However, surprisingly BoNT/D does not lose its activity when applied to GM3S (GM3 synthetase)-deficient mice which should theoretically express only lactose-ceramide (Figure 1a) [22]. To clarify this discrepancy between BoNT/D and the other BoNT serotypes, we employed phrenic nerve hemidiaphragm preparations derived from *St8sial1*-KO mice or from a combined *St8sial1/B4galnt1*-double-KO mice to check the potency of BoNT/D in the MPN assay. The *St8sial1*-KO prevents synthesis of GD3S, resulting in expression of only GM3, GM2, GM1 and GD1a (Figure 1a). The double-KO mice lack GD3S and NAcGalT and thus express only GM3 [48]. We found that the neurotoxicity of BoNT/D is clearly reduced to 14% and 6% in GD3S-KO and GD3S/NAcGalT-KO MPN hemidiaphragms respectively (Figure 1b). In GD3S-KO hemidiaphragm preparations, the clear loss of potency of BoNT/D is in contrast with the moderate decrease in BoNT/A potency, which is due to the binding of BoNT/A to the terminal NAcGal β 3–1Gal β moiety present in the GM1 and GD1a

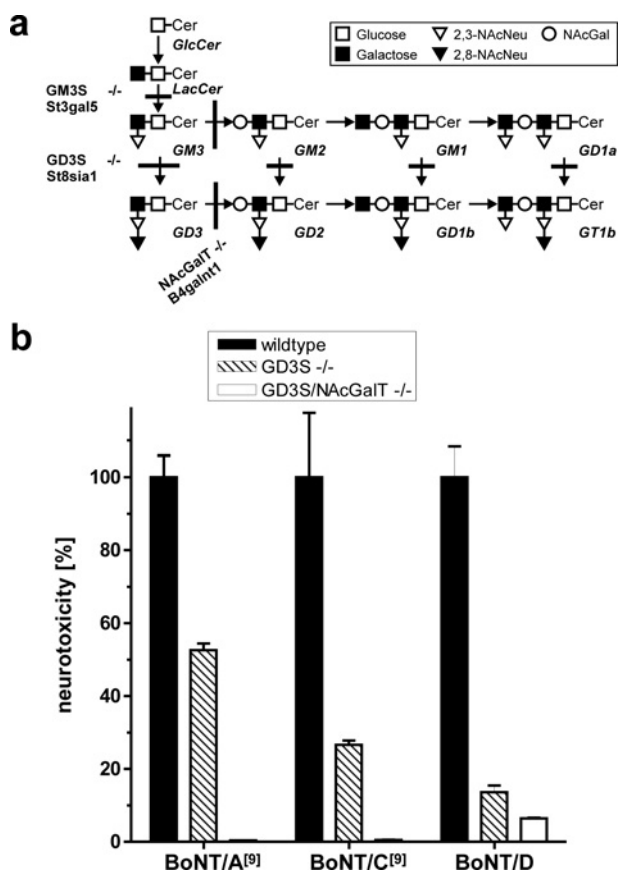


Figure 1 Ganglioside deficiency reduces neurotoxicity of BoNT/D

(a) Schematic representation of the biosynthetic pathway for complex polysialogangliosides. The scheme shows the enzymes GM3S, GD3S and NAcGalT, which are involved in ganglioside biosynthesis, and the encoding genes (*St3gal5*, *St8sia1* and *B4galnt1*), which are deleted in the respective KO mice leading to an altered ganglioside expression pattern. (b) BoNT/A, BoNT/C [9] and BoNT/D show reduced neurotoxicity when applied to phrenic nerve hemidiaphragm preparations obtained from single GD3S-KO or combined GD3S/NACGalT double-KO mice. These mice only express GM3, GM2, GM1 and GD1a, or GM3 respectively. Results are means \pm S.D. ($n = 3-9$).

gangliosides that are still expressed. Obviously, BoNT/D requires the 2-8NacNeu α present in the ganglioside b-series, such as GD1b and GT1b, to exert its biological activity. This explanation is supported by the fact that the neurotoxicity of BoNT/D is only moderately further diminished in hemidiaphragm preparations where only GM3 is expressed, especially when compared with BoNT/A and C, which display one order of magnitude lower potency in GM3-only neurons (Figure 1b) [9]. Hence the absence of the disialic acid moiety, such as is found in GD1b and GT1b, clearly interferes with BoNT/D activity and indicates that sialic acid is the direct binding partner. This finding is supported by the results of a carbohydrate screen showing that H_cD displays highest affinity to GD2, which also contains a disialic acid branch (http://www.functionalglycomics.org; primscreen_1682). Furthermore, similar to earlier reports [31,33], we detected a direct binding of at least one GT1b molecule to H_cD when employing MALDI-TOF-MS (Figure 2). Incubation of the wild-type H_cD with GT1b in a molar ratio of 1:4 yielded an additional peak (asterisk in Figure 2b) with a mass of 51921 Da. This mass increase corresponds to approximately one molecule of GT1b. An earlier study reported the inactivation of BoNT/D by GT1b, which represents another piece of evidence for the interaction of BoNT/D with gangliosides [23]. We presume that the alternative expression

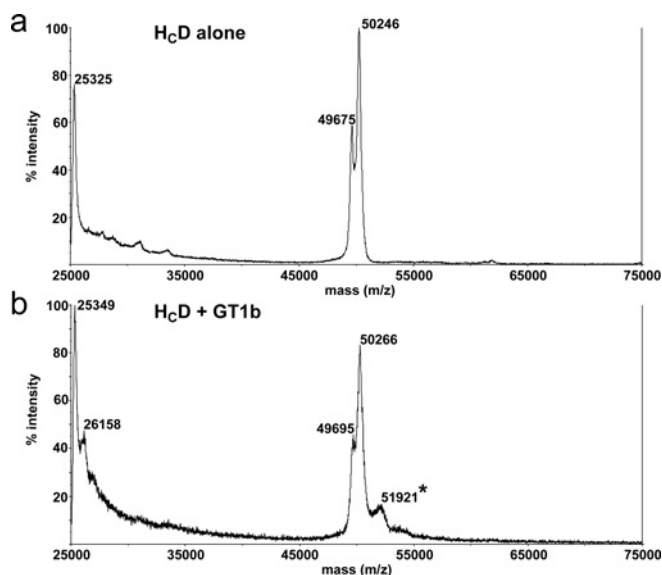


Figure 2 Binding of GT1b to the H_c fragment of BoNT/D (H_cD) detected by MALDI-TOF-MS

(a) The molecular mass of the wild-type H_cD (theoretical molecular mass of 50271 Da) was determined as 50246 Da by MALDI-TOF-MS. The signal at m/z 49675 belongs to an N-terminally truncated protein, due to a methionine at amino acid position six. (b) The wild-type H_cD (25 μ M) was incubated with GT1b (molecular mass of 2145 Da) in a molar ratio of 1:4 for 30 min at 37 °C and subsequently analysed by MALDI-TOF-MS. A significant additional peak (*) was visible at m/z 51921, indicating the binding of one molecule of GT1b.

of GM1b and GD1c in the GM3S-deficient mice [22] can interact with BoNT/D and facilitate its uptake. In contrast, the GM3-only double-KO mice used in the present study clearly express no complex polysialogangliosides [48] thereby demonstrating the ganglioside dependence of BoNT/D.

High-resolution crystal structure of the H_c fragment of BoNT/D

Since BoNT/D clearly shows polysialoganglioside-dependent neurotoxicity, it is important to understand the mechanism underlying the BoNT/D-ganglioside recognition. To this end, the crystal structure of H_cD was determined. The construct of H_cD (residues Ser⁸⁶³-Glu¹²⁷⁶, GenBank[®] accession number CAA38175, with an N-terminally added MRGSAMA and a C-terminally fused PPTPGWSPHFQFEK Strep-tag) was designed based on homology modelling with the crystal structures of H_cA and H_cB (BoNT/B H_c fragment) and secondary-structure prediction [11,12]. Isolated H_cD retains its full binding ability as it inhibits the biological activity of full-length BoNT/D in the MPN hemidiaphragm assay [9]. The structure of H_cD was determined to 1.72 Å resolution using X-ray crystallography (Figure 3a and Table 1). Electron density was clearly visible for all residues except for two residues (Gly¹¹⁸⁰-Gly¹¹⁸¹) that located in a flexible surface loop with minimal electron density and were not modelled.

The structure of H_cD can be divided into two domains: the N-terminal domain H_{cN}, composed of residues Ser⁸⁶³-Arg¹⁰⁸², and the C-terminal domain H_{cC}, composed of residues Asn¹⁰⁸³-Glu¹²⁷⁶. H_{cN}D is formed from two anti-parallel β -sheets organized into a jelly-roll barrel motif (β -barrel domain) whose function is still unknown. H_{cC}D adopts a β -trefoil fold similar to the other known BoNT H_{cC} domains that are directly involved in dual receptor recognition [8].

Despite different receptor-binding specificities, the overall structure of H_cD is similar to the H_c fragment of the other BoNT serotypes, as reflected by high DALI Z-scores when comparing

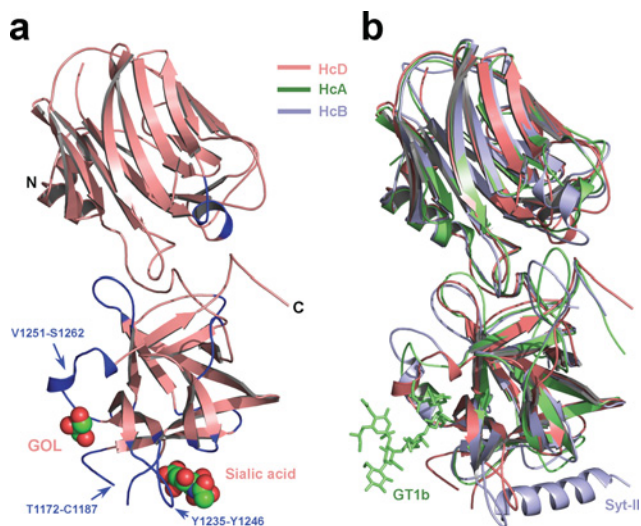


Figure 3 Crystal structure of the H_c fragment of BoNT/D (H_cD)

(a) Ribbon diagram of H_cD (PDB code 3OBT). Sialic acid and the one glycerol molecule (GOL) that binds at the conserved ganglioside-binding site are shown in a space-filling model. Regions that show large conformational differences in comparison with the structures of H_cA and H_cB are coloured blue. (b) An overall C α atom alignment of the structures of H_cD (salmon), H_cA-GT1b complex (PDB code 2VU9; green) [11] and H_cB-Syt-II complex (PDB code 2NM1; light blue) [12]. The carbohydrate portion of GT1b is shown as sticks (green) and Syt-II is shown as a ribbon (blue). The orientation of H_cD is the same as that in (a).

protein structures in three-dimensions [49]. The Z-scores are 41.6, 39.5, 40.6, 41.2, 40.2 and 40.3 for BoNT/A, B, E, F, G and TeNT respectively (it should be noted that pairs with Z-scores of 2.0 are already considered to be structurally similar). The pairwise structure comparison between H_cD and the H_c fragments of BoNT/A (PDB code 2VUA), B (PDB code 2NM1), E (PDB code 3FFZ), F (PDB code 3FUQ), G (PDB code 2VXR), and TeNT (PDB code 3HMY) shows RMSD (root mean square deviation) values of 1.8 Å, 1.9 Å, 1.8 Å, 1.7 Å, 1.9 Å and 2.0 Å over the 366, 365, 356, 364 and 369 best-aligned amino acids respectively [6,11–13,15,50]. We selected H_cA and H_cB for further structural analyses because the mechanism by which they interact with their dual receptors has been well characterized, as revealed by

biochemical data and the crystal structures of H_cA-GT1b and H_cB-Syt-II complexes [11,12,31,32].

The structural differences among H_cD, H_cA and H_cB mostly reside within the solvent-exposed loops of the H_{CC} domain. The loops with the largest differences in H_cD comprise residues Glu¹¹¹⁴-Val¹¹¹⁷, Tyr¹¹²³-Leu¹¹²⁹, Ser¹¹⁴¹-Tyr¹¹⁴⁶, Thr¹¹⁷²-Cys¹¹⁸⁷, Ser¹¹⁹⁵-Ile¹²⁰², Asn¹²⁰⁹-Cys¹²¹⁷, Ser¹²²³-Asn¹²²⁷, Tyr¹²³⁵-Tyr¹²⁴⁶ and Val¹²⁵¹-Ser¹²⁶² respectively (coloured blue in Figure 3a). Interestingly, the Thr¹¹⁷²-Cys¹¹⁸⁷ loop of H_cD is much longer and adopts an extended conformation when compared with its counterpart in H_cA (loop Asn¹¹⁹⁶-Val¹²⁰²) and H_cB (loop Tyr¹¹⁸³-Glu¹¹⁸⁹). The conformation of this loop is expected to be flexible as evident by the relatively weak electron density in this area. The function of this loop is unclear. The Tyr¹²³⁵-Tyr¹²⁴⁶ loop of H_cD corresponds to a loop in H_cB that separates the binding sites for the ganglioside and the protein receptor. Its hydrophobic segment Phe¹²⁴²-Tyr¹²⁴⁶ is likely to be involved in membrane association. In H_cD, this loop moves closer to the previously defined protein-receptor-binding site, as revealed by the H_cB-Syt-II complex. Structural comparison between H_cD and H_cB suggests that the loop of H_cD will physically clash with the C-terminus of Syt-II and prevent its binding in a mode observed in the H_cB-Syt-II complex. Lastly, the Val¹²⁵¹-Ser¹²⁶² loop of H_cD adopts a significantly different conformation in comparison with other BoNT serotypes. The equivalent region in H_cA (loop Ser¹²⁶⁴-Gly¹²⁷⁹) has five residues, Ser¹²⁶⁴, Trp¹²⁶⁶, Tyr¹²⁶⁷, Ser¹²⁷⁵ and Arg¹²⁷⁶, which are directly involved in GT1b binding [11,31].

Crystal structure of BoNT/D H_c fragment in complex with sialic acid

Since our data clearly demonstrated that BoNT/D requires gangliosides as a receptor and sialic acid as a direct binding partner, the next goal was to explore the structural basis of the BoNT/D-ganglioside interactions. To this end, we determined the structure of the H_cD-NACNeu complex at 2.0 Å. One sialic acid molecule was clearly observed to bind at the tip of the H_{CC} domain via extensive interactions with H_cD (Figures 4a and 4b). The carboxy group of sialic acid forms four pairs of hydrogen bonds or salt bridges with residues Thr¹¹⁷² (main chain nitrogen), Asp¹¹⁷³ (main chain nitrogen), Lys¹¹⁹² (NZ atom) and Arg¹²³⁹ (NH2 atom). In parallel, the O-2 of sialic acid contributes two more hydrogen bonds with the NH2 and NE atoms of Arg¹²³⁹; the O-6

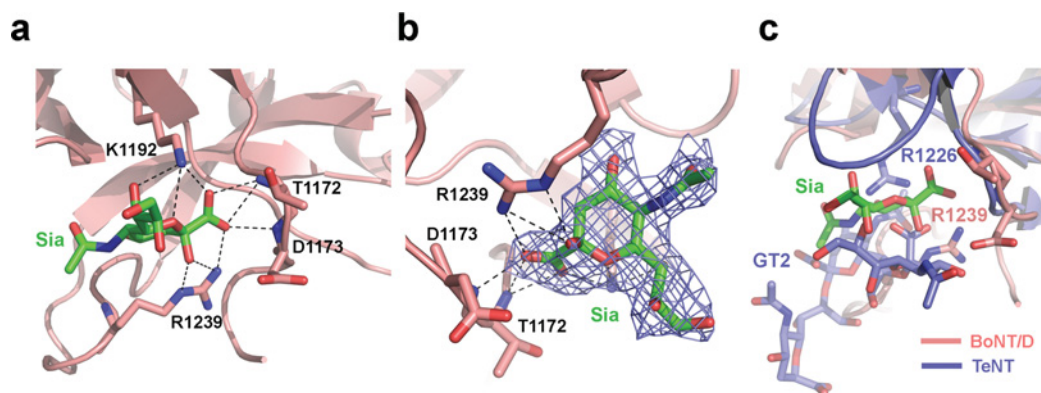


Figure 4 Structure of the H_cD-sialic acid complex

(a) Close-up view of the sialic-acid-binding pocket in H_cD (PDB code 3OBT). H_cD is in salmon and sialic acid (Sia) is in green. Key residues involved in complex interactions are shown in a stick representation. Hydrogen bonds and salt bridges are indicated by black dashed lines. (b) A σ_A weighted $F_o - F_c$ omit electron density map (contoured at 1.5 σ) around the bound sialic acid, overlaid with the final model. (c) The sialic-acid-binding site in H_cD partially overlaps with the known sialic-acid-binding site in TeNT. The superimposed structures of H_cD (salmon) and the TeNT H_c-fragment (H_cT) in complex with GT2 (PDB code 3HMY; blue) [50] are shown as a ribbon model. Sialic acid (binding to H_cD) and GT2 (binding to H_cT) are shown as stick models in green and blue respectively.

and O-7 atoms of sialic acid form hydrogen bonds with the NZ atom of Lys¹¹⁹². Besides the direct interaction between sialic acid and H_cD, several well-defined water molecules were identified in the sialic-acid-binding pocket which bridge the O-2, O-4, O-7 and O-10 atoms of sialic acid to H_cD (Supplementary Table S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/431/bj4310207add.htm>). Surprisingly, the sialic-acid-binding site in H_cD partially overlaps with the protein-receptor-binding site identified previously in BoNT/B and BoNT/G [32]. The novel sialic-acid-binding site in BoNT/D is reminiscent of the two carbohydrate-binding sites present in TeNT (a lactose-binding site and a sialic-acid-binding site [17,33]). The sialic-acid-binding site of H_cD is indeed similar to the sialic-acid-binding site of TeNT (Figure 4c); Arg¹²³⁹ of H_cD adopts the functional role of Arg¹²²⁶, the key residue involved in sialic acid binding in TeNT [33], whereas Lys¹¹⁹² of H_cD aligns structurally with Arg¹²²⁶ in TeNT. The similarity of these sialic-acid-binding sites is reflected by biochemical data showing that H_cD can inhibit the potency of TeNT and H_cT that of active full-length BoNT/D in the MPN hemidiaphragm assay [9]. When comparing the apo-H_cD and H_cD-NAcNeu structures, one sees that the side chain of Lys¹¹⁹² moves to form hydrogen bonds with sialic acid, whereas Arg¹²³⁹ is unaltered. Also, the side chain of Asp¹¹⁷¹ moves away to accommodate the carboxy group of sialic acid.

Several glycerol molecules were observed in the structure of the H_cD-NAcNeu complex, which was used as the cryoprotectant for X-ray diffraction data collection at 100 K. Interestingly, one glycerol was found in a pocket (Figures 3a and 5) that has been described as the 'conserved' ganglioside-binding pocket from the structures of H_cA-GT1b (PDB code 2VU9) [11] and BoNT/B-sialyllactose (PDB code 1F31) [5]. This glycerol molecule forms two hydrogen bonds with the main chain oxygen of Thr¹²⁵² and Asn¹²⁵³ in the loop of Val¹²⁵¹-Ser¹²⁶². A similar glycerol molecule was also observed in the structure of apo-H_cD. As discussed above, the equivalent loop in H_cA is directly involved in GT1b binding. Therefore one might assume that BoNT/D accommodates a second receptor-binding site in an area where BoNT/A, B, E, F and G possess their singular conserved ganglioside-binding site. However, the Val¹²⁵¹-Ser¹²⁶² loop of BoNT/D misses the conserved 'SXWY' motif in which the tryptophan residue is responsible for the parallel packing of the hydrophobic side of the terminal galactose. It implies that BoNT/D might have a different carbohydrate-binding property within this site, which will be further characterized below.

Mutagenesis and membrane-binding studies reveal two carbohydrate-binding sites in the H_c fragment of BoNT/D

We have now identified two potential ganglioside-binding pockets in BoNT/D: one is the newly identified sialic-acid-binding site and the other is the counterpart of the conserved ganglioside-binding pocket in BoNT/A, B, E, F and G (these are referred to as the sialic acid site and the conserved binding site respectively in the following discussion). To study further the physiological relevance of these two sites, we performed a series of structure-based mutagenesis studies on H_cD, focusing on key residues that reside in these two sites. The H_cD mutants were then examined for binding with synaptosomes that were freshly isolated from rat brain and display predominantly complex polysialogangliosides in their physiological environment on their outer membrane. *In vitro* transcribed/translated ³⁵S-labelled H_cD mutants were incubated with synaptosomes at 0 °C and the amount of bound radioactive H_cD was quantified.

Mutation of Arg¹²³⁹ in the sialic acid site into alanine and tyrosine caused a drastic decrease in binding by 80 % and 65 %

respectively (Figure 5) because the important salt bridge between O-1 of sialic acid and the NH₂ atom of Arg¹²³⁹, as well as the hydrogen bond between O-2 of sialic acid and the NE atom of Arg¹²³⁹, was destroyed (Figure 4a). The hydrogen bonding of sialic acid with Lys¹¹⁹² seems to play a supporting role since the binding of H_cD-K1192A was only reduced by 35 %. Interestingly, mutation of Trp¹²³⁸ and Phe¹²⁴⁰ caused drastic reductions in binding although they are not directly involved in co-ordination of the sialic acid. Whereas the lack of the phenyl ring of Phe¹²⁴⁰ reduces binding by 70 %, a replacement with a tryptophan residue exceeds the binding of wild-type H_cD. The indole ring of Trp¹²³⁸ is crucial for the structural integrity of the sialic acid site because neither the aliphatic leucine residue nor the aromatic phenylalanine and tyrosine residues could rescue its loss. It is conceivable that both residues might interact with the adjacent galactose in the carbohydrate chain of gangliosides. As expected, removal of the carboxy group of Asp¹¹⁷³, whose main chain nitrogen forms a hydrogen bond with the carboxy group of sialic acid, did not alter the binding affinity. Combining the mutations K1192A and R1239A to remove important hydrogen bonding interactions with sialic acid markedly reduces the binding of H_cD (by 92 %; Figure 5). Similar behaviour has been demonstrated for TeNT by mutation of Arg¹²²⁶ in the sialic acid site [33]. The residual binding of H_cD with mutations in the sialic acid site is presumably mediated by a second binding site.

One molecule of glycerol binds to the analogue of the singular conserved ganglioside-binding site in BoNT/A, B, E, F and G, which is also the lactose-binding pocket in TeNT. Whereas the conserved pocket consists of an 'E(D) . . . H . . . SXWY . . . G' motif and is split up into a hydrophilic and a hydrophobic side in other BoNTs, this motif is neither found in the primary sequence nor in the three-dimensional structure of H_cD. The functional role of the conserved binding site in BoNT/D was assessed by mutations N1186A, D1233A, Y1235A/W, V1251F, N1253A, K1257A and S1262F, which were selected by structural homology modelling based on the structure of the H_cA-GT1b complex (Figure 5) [11]. Whereas the binding to synaptosomes could be blocked efficiently by the mutation V1251F, only a minor effect was observed in the case of S1262F. Mutation of the sterically neighbouring Asp¹²³³ and Tyr¹²³⁵ to an alanine residue showed a clear loss of binding by 80 % and 45 % respectively. Again, introduction of a tryptophan residue at position 1235 preserves wild-type levels of binding. Removing the side chains of Asn¹²⁵³ and Lys¹²⁵⁷ caused a moderate impact on binding, whereas the mutant N1186A did not alter the binding affinity of H_cD. The clear effects upon mutation of Asp¹²³³, Tyr¹²³⁵ and Val¹²⁵¹ demonstrate the presence of a second ganglioside-binding site in BoNT/D that is located in the position of the conserved binding site, but does not display a conserved architecture in comparison with other BoNTs. Combining the most severe substitution in each pocket, D1233A in the conserved site and R1239A in the sialic acid site, one obtains a double-mutant that displays hardly any detectable binding to neuronal membranes, further supporting the presence of two receptor pockets (Figure 5).

Interestingly, the Tyr¹²³⁵-Tyr¹²⁴⁶ loop of H_cD, which directly connects the sialic acid site and the bottom of the conserved site, contains three partially hydrophobic residues (Phe¹²⁴², Asn¹²⁴⁴ and Tyr¹²⁴⁶) that are surface-exposed but do not contribute to the crystal packing. Mutation of these three residues into alanine or serine residues reduced the neuronal binding of H_cD by ~ 70 %, whereas the mutant F1242W behaved like the wild-type protein. Similar motifs are present in BoNT/A (Phe¹²⁵², Gln¹²⁵⁴ and Phe¹²⁵⁵) and BoNT/B (Phe¹²⁵⁰, Glu¹²⁵¹ and Tyr¹²⁵³). We hypothesize that this amino acid stretch could substantially contribute to interactions of H_c with the neuronal membrane surface.

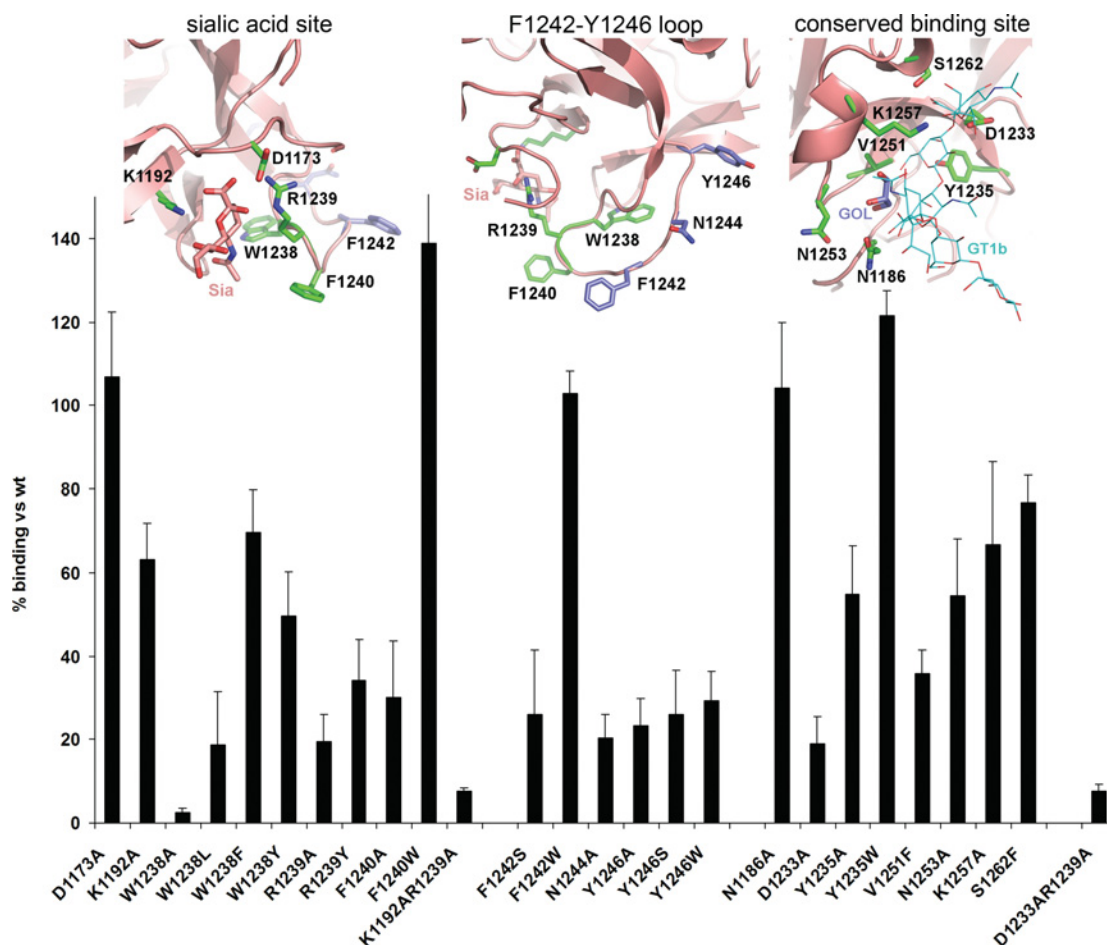


Figure 5 Site-directed mutagenesis analysis of binding of H_cD mutants to synaptosomes

In vitro translated ³⁵S-labelled H_cD mutants were bound to freshly prepared rat brain synaptosomes for 2 h at 0°C and quantified by SDS/PAGE and subsequent autoradiography. Results are means ± S.D. (*n* = 3–12). H_cD mutants are grouped for mutations in the 'sialic acid site' (the structure is shown in the top left-hand panel; residues in green sticks), the 'F1242–Y1246 loop' (structure in the top middle panel; residues in blue sticks), and the 'conserved binding site' [structure in the top right-hand panel; residues in green sticks, with a GT1b molecule (cyan) that is modelled based on the structure of the H_cA–GT1b complex].

In a previous study the mutants H_cD E1114K and G1132K displayed an improved binding affinity to synaptosomes [51]. Neither residue participates in the formation of the sialic acid or the conserved site. Gly¹¹³² is found far away, on the side opposite to the conserved site, whereas Glu¹¹¹⁴ stabilizes the Tyr¹²³⁵–Tyr¹²⁴⁶ loop, which is important for sialic acid binding, through formation of a salt bridge to Lys¹²⁴³. The reason for the improved binding affinity of these two mutants needs to be further studied.

Reduced ganglioside binding decreases the neurotoxicity of BoNT/D

To further examine the effects of mutants in BoNT/D on its physiological function, selected mutations were transferred to full-length BoNT/D and their impact on the neurotoxicity of recombinant BoNT/D was determined employing the MPN hemidiaphragm assay (Figure 6). The low synaptosomal binding affinity of mutants R1239A or R1239Y similarly caused a reduction of neurotoxicity by more than 95%. Removing all hydrogen-bonding side chains in the sialic acid site, as in the double mutant K1192A/R1239A, decreased the potency of

BoNT/D to well below 2%. In addition, the lack of the indole ring at position 1238 resulted in proteins displaying less than 2% neurotoxicity; only introduction of another aromatic side chain could attenuate this loss. A similar result was observed for Phe¹²⁴⁰. Mutations in the conserved site correspondingly reduced the neurotoxicity of full-length BoNT/D, as the mutants D1233A and V1251F were 70% and Y1235A was 60% less potent than the wild-type protein. However, the effects of mutations in the sialic acid site turned out to be much more drastic than those in the conserved site, indicating a higher receptor affinity towards the sialic acid site. It seems that the lack of the conserved amino acid architecture within the conserved site causes a lower binding affinity to carbohydrates in comparison with other BoNTs. Combining the key mutations of both sites, the BoNT/D–D1233A/R1239A double-mutant exerts less than 0.4% neurotoxicity, approx. one order of magnitude lower potency than the single-site BoNT/D–R1239A mutant, thereby supporting a double receptor interaction for BoNT/D. Furthermore, the removal of aromatic residues Phe¹²⁴⁰, Phe¹²⁴² and Tyr¹²⁴⁶ also impaired the neurotoxicity, indicating that the putative membrane interaction contributes to the uptake of BoNT/D. In summary, the selected BoNT/D mutants, with mutations in either binding site,

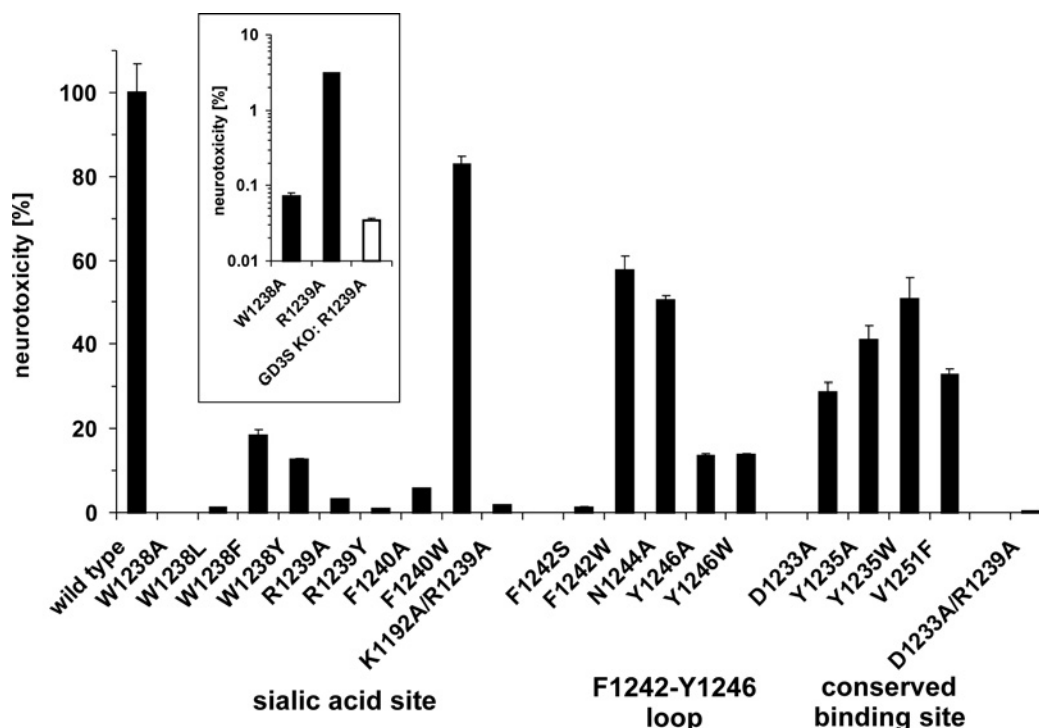


Figure 6 Reduced ganglioside binding of BoNT/D leads to a drastic decrease in neurotoxicity

Selected recombinant full-length BoNT/D mutants were analysed in the MPN hemidiaphragm assay and the remaining paralytic half-times were converted by a corresponding power function to a percentage of the neurotoxicity of the wild-type. Results are means \pm S.D. ($n = 3-6$). The biological activity of BoNT/D-R1239A mutant, which displays a deactivated sialic-acid-binding site, was also analysed via MPN hemidiaphragm preparations derived from GD3S-KO mice (inset; plotted on a logarithmic scale).

show altered synaptosomal binding and similarly display changed neurotoxicity.

To further prove that BoNT/D contains a second ganglioside-binding site, other than the sialic-acid-binding site, we applied the BoNT/D-R1239A mutant to GD3S-KO MPN preparations. Since the BoNT/D-R1239A mutant bears a deactivated sialic-acid-binding site, one would not expect a significant change in residual potency when applied to the wild-type or the KO mice preparation in the absence of a second site. However, we found that the potency of the mutant BoNT/D R1239A is ~ 90 -fold lower when applied to GD3S-KO MPN preparations in comparison with the wild-type MPN preparations (Figure 6, inset). This drastic decrease strongly suggests the presence of a second binding site in BoNT/D that can partially compensate the deactivation of the sialic-acid-binding site as long as the receptor portfolio is intact.

Conclusion

We have clearly demonstrated that the biological activity of BoNT/D depends on the expression of complex polysialogangliosides. This proceeds from our findings in MPN hemidiaphragm preparations derived from mice only expressing either GM3 or the α -series gangliosides (GM3, GM2, GM1 and GD1a). This finding is endorsed by detection of a H_C D-GT1b complex in MALDI-TOF-MS studies. Our results are also supported by earlier studies showing that BoNT/D activity is inhibited by GT1b [23] and that its H_C fragment binds to the disialoganglioside GD2 (http://www.functionalglycomics.org; primscreen_1682). Thus, in the first step of attacking motor neurons, all BoNTs accumulate on the cell surface via interaction with complex polysialogangliosides followed by receptor-mediated

endocytosis. Despite the lowest amino acid sequence identity between BoNT/D and the human pathogenic BoNT/A, B and E serotypes ($\sim 25\%$), the high-resolution crystal structure of the BoNT/D H_C fragment displays a similar overall architecture as the H_C fragments of BoNT/A, B, E, F, G and TeNT. Furthermore, the co-crystal structure of H_C D in complex with sialic acid, a key building block of gangliosides, exhibits a novel carbohydrate-binding site that locates similarly to the protein-receptor-binding site in BoNT/B and G, as well as the sialic-acid-binding site in TeNT. Site-directed mutagenesis within this sialic acid site yielded mutants that showed drastically decreased binding to neuronal membranes, as well as severely reduced biological activity in the MPN hemidiaphragm assay. In addition, mutation of residues within a pocket in the H_{CC} domain of BoNT/D, which is the analogue of the conserved ganglioside-binding pocket identified previously in BoNT/A, B, E, F and G, also clearly reduced the binding affinity and potency of BoNT/D. However, this pocket of BoNT/D lacks the conserved 'E(D)...H...SXWY...G' motif found in other BoNTs; this might cause a reduced carbohydrate-binding affinity of BoNT/D in comparison to, e.g., TeNT, which also displays two ganglioside-binding sites. In conclusion, BoNT/D binds to the cell-surface gangliosides and employs two receptor pockets within its H_{CC} domain to exert its neurotoxicity.

AUTHOR CONTRIBUTION

Jasmin Strotmeier and Anne Katrin Völker designed and performed the mutagenesis studies, recombinant protein expression, the synaptosomal binding assay and the MPN hemidiaphragm experiments, and acquired and analysed the data as part of their Ph.D. theses. Yinong Zong, Kwangkook Lee and Jie Zhou performed the protein characterization,

crystallization, structure determination and analysis. Johannes Zeiser performed the MS experiments and Andreas Pich validated and interpreted the MS data. Stefan Mahrhold, Hans Bigalke and Thomas Binz contributed important intellectual content during the project and assisted in revision of the manuscript. Rongsheng Jin and Andreas Rummel supervised the project and wrote the manuscript, with all authors involved.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nadja Krez, Ulrike Fuhrmann, Beate Winter, Bianca Janzen and Dr Shenyan Gu for excellent technical assistance, and Dr Tino Karnath for support with FPLC. We also thank Dr Stuart Lipton and Dr Robert Liddington for support. Portions of this research were carried out at the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, a national user facility operated by Stanford University on behalf of the U.S. Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences.

FUNDING

This work was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung [grant number 01KI0742 (to H.B.)]; the Deutsche Forschungsgemeinschaft [grant numbers IIB2-Bi 660/2-3 (to T.B.), GSC108 (Exzellenzinitiative grant to A.K.V.)]; the Alfred P. Sloan Research Fellowship (to R.J.); and by the start-up research fund from the Sanford-Burnham Medical Research Institute (to R.J.). The SSRL Structural Molecular Biology Program is supported by the U.S. Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research, and by the National Institutes of Health, National Center for Research Resources, Biomedical Technology Program and the National Institute of General Medical Sciences.

REFERENCES

- Svennerholm, L. (1994) Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog. Brain Res.* **101**, XI–XIV
- Dolly, J. O., Black, J., Williams, R. S. and Mellings, J. (1984) Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature* **307**, 457–460
- Gill, D. M. (1982) Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* **46**, 86–94
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R. and Stevens, R. C. (1998) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 898–902
- Swaminathan, S. and Eswaramoorthy, S. (2000) Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 693–699
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Furey, W., Navaza, J., Sax, M. and Swaminathan, S. (2009) Domain organization in *Clostridium botulinum* neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation. *J. Mol. Biol.* **386**, 233–245
- Brunger, A. T. and Rummel, A. (2009) Receptor and substrate interactions of clostridial neurotoxins. *Toxicon* **54**, 550–560
- Binz, T. and Rummel, A. (2009) Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *J. Neurochem.* **109**, 1584–1595
- Rummel, A., Häfner, K., Mahrhold, S., Darashchonak, N., Holt, M., Jahn, R., Beermann, S., Karnath, T., Bigalke, H. and Binz, T. (2009) Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J. Neurochem.* **110**, 1942–1954
- Muraro, L., Tosatto, S., Motterlini, L., Rossetto, O. and Montecucco, C. (2009) The N-terminal half of the receptor domain of botulinum neurotoxin A binds to microdomains of the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 76–80
- Stenmark, P., Dupuy, J., Imamura, A., Kiso, M. and Stevens, R. C. (2008) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b: insight into the toxin–neuron interaction. *PLoS Pathog.* **4**, e1000129
- Jin, R., Rummel, A., Binz, T. and Brunger, A. T. (2006) Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* **444**, 1092–1095
- Fu, Z., Chen, C., Barbieri, J. T., Kim, J. J. and Baldwin, M. R. (2009) Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry* **48**, 5631–5641
- Schmitt, J., Karalewitz, A., Benefield, D. A., Mushrush, D. J., Pruitt, R. N., Spiller, B. W., Barbieri, J. T. and Lacy, D. B. (2010) Structural analysis of botulinum neurotoxin type G receptor binding. *Biochemistry* **49**, 5200–5205
- Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E. R. and Stevens, R. C. (2010) Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding. *J. Mol. Biol.* **397**, 1287–1297
- Jayaraman, S., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D. and Swaminathan, S. (2005) Common binding site for disialyllactose and tri-peptide in C-fragment of tetanus neurotoxin. *Proteins* **61**, 288–295
- Fotinou, C., Emsley, P., Black, I., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., Sinha, K. A., Fairweather, N. F. and Isaacs, N. W. (2001) The crystal structure of tetanus toxin H_C-fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. *J. Biol. Chem.* **276**, 32274–32281
- Korizova, L. K. and Montal, M. (2003) Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 13–18
- Fischer, A. and Montal, M. (2007) Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 10447–10452
- Halpern, J. L. and Neale, E. A. (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **195**, 221–241
- Yowler, B. C. and Schengrund, C. L. (2004) Glycosphingolipids: sweets for botulinum neurotoxin. *Glycoconj. J.* **21**, 287–293
- Tsakamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M. and Kozaki, S. (2005) Binding of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **280**, 35164–35171
- Simpson, L. L. and Rapport, M. M. (1971) Ganglioside inactivation of botulinum toxin. *J. Neurochem.* **18**, 1341–1343
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M. and Kozaki, S. (1994) Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10498–10503
- Dong, M., Richards, D. A., Goodnough, M. C., Tepp, W. H., Johnson, E. A. and Chapman, E. R. (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell. Biol.* **162**, 1293–1303
- Chai, Q., Arndt, J. W., Dong, M., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Chapman, E. R. and Stevens, R. C. (2006) Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* **444**, 1096–1100
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H. and Binz, T. (2004) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* **279**, 30865–30870
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R. and Chapman, E. R. (2006) SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* **312**, 592–596
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B. and Binz, T. (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* **580**, 2011–2014
- Dong, M., Liu, H., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Janz, R. and Chapman, E. R. (2008) Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 5226–5237
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H. and Binz, T. (2004) The H_{CC}-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol. Microbiol.* **51**, 631–643
- Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., Sandhoff, K., Proia, R. L., Acharya, K. R., Bigalke, H. and Binz, T. (2007) Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 359–364
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H. and Binz, T. (2003) Two carbohydrate binding sites in the H_{CC}-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J. Mol. Biol.* **326**, 835–847
- Kohda, T., Ihara, H., Seto, Y., Tsutsuki, H., Mukamoto, M. and Kozaki, S. (2007) Differential contribution of the residues in C-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin type B to its binding to the ganglioside GT1b and the synaptotagmin 2/GT1b complex. *Microb. Pathog.* **42**, 72–79
- Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E. and 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.* **275**, 8889–8894
- Chen, C., Baldwin, M. R. and Barbieri, J. T. (2008) Molecular basis for tetanus toxin coreceptor interactions. *Biochemistry* **47**, 7179–7186
- Herrerros, J., Lalli, G. and Schiavo, G. (2000) C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem. J.* **347**, 199–204
- Montecucco, C. (1986) How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.* **11**, 314–317
- Bade, S., Rummel, A., Reisinger, C., Karnath, T., Ahnert-Hilger, G., Bigalke, H. and Binz, T. (2004) Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *J. Neurochem.* **91**, 1461–1472
- Binz, T., Kurazono, H., Popoff, M. R., Eklund, M. W., Sakaguchi, G., Kozaki, S., Kriegelstein, K., Henschen, A., Gill, D. M. and Niemann, H. (1990) Nucleotide sequence of the gene encoding *Clostridium botulinum* neurotoxin type D. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5556
- Otinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326

- 42 McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674
- 43 Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
- 44 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- 45 Brunger, A. T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472–475
- 46 Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, 3rd, W. B., Snoeyink, J., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **35**, W375–W383
- 47 Habermann, E., Dreyer, F. and Bigalke, H. (1980) Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission *in vitro* like botulinum A toxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **311**, 33–40
- 48 Kawai, H., Allende, M. L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crawley, J. N., Werth, N., Bierfreund, U. et al. (2001) Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J. Biol. Chem.* **276**, 6885–6888
- 49 Holm, L. and Rosenstrom, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **38**, W545–W549
- 50 Chen, C., Fu, Z., Kim, J. J., Barbieri, J. T. and Baldwin, M. R. (2009) Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin. *J. Biol. Chem.* **284**, 26569–26577
- 51 Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. and Kozaki, S. (2008) Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. *Microb. Pathog.* **44**, 484–493

Received 12 July 2010/11 August 2010; accepted 12 August 2010

Published as BJ Immediate Publication 12 August 2010, doi:10.1042/BJ20101042

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner

Jasmin STROTMEIER^{*1}, Kwangkook LEE^{†1}, Anne K. VÖLKER^{*1}, Stefan MAHRHOLD[‡], Yinong ZONG[†], Johannes ZEISER^{*}, Jie ZHOU[†], Andreas PICH^{*}, Hans BIGALKE^{*}, Thomas BINZ[‡], Andreas RUMMEL^{*2} and Rongsheng JIN^{†2}

^{*}Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany, [†]Center for Neuroscience, Aging and Stem Cell Research, Sanford-Burnham Medical Research Institute, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, U.S.A., and [‡]Institut für Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany

Table S1 Water-mediated interactions between sialic acid and H_CD

Sialic acid	Water molecule number	H _C D
0-2	248	Asp ¹¹⁷³ -OD2
0-4	130	Arg ¹²³⁹ -N
0-4	154	Asp ¹¹⁷¹ -OD2 and Pro ¹²³⁷ -O
0-4	301	Asn ¹¹¹⁶ -O
0-7	134	Asn ¹¹¹⁶ -ND2
0-10	134	Asn ¹¹¹⁶ -ND2

Received 12 July 2010/11 August 2010; accepted 12 August 2010

Published as BJ Immediate Publication 12 August 2010, doi:10.1042/BJ20101042

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence may be addressed to either of these authors (email rummel.andreas@mh-hannover.de or rjin@sanfordburnham.org).

The co-ordinates and diffraction data for the apo-BoNT/D H_C fragment and BoNT/D H_C fragment–NAcNeu have been deposited in the PDB under codes 3OBR and 3OBT respectively.

The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites.

Jasmin Strotmeier, Shenyang Gu, Stephan Jutzi, Stefan Mahrhold, Jie Zhou, Andreas Pich, Timo Eichner, Hans Bigalke, Andreas Rummel, Rongsheng Jin and Thomas Binz (2011).

publiziert in *Molecular Microbiology*, **81**(1), 143–156

Strotmeier: folgende Experimente entworfen, durchgeführt und analysiert:

- Klonierungen: 60 %
- Produktion rekombinanter Proteine: 60 %
- Protein für Kristallographie aufgereinigt
- Synaptosomenassay: 70 %
- MPN mit Wildtyp- und KO-Mäusen: 50 %
- ELISA: 50 %

The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites

Jasmin Strotmeier,^{1†} Shenyan Gu,^{3†} Stephan Jutzi,^{2†}
Stefan Mahrhold,² Jie Zhou,³ Andreas Pich,¹
Timo Eichner,⁴ Hans Bigalke,¹ Andreas Rummel,^{1*}
Rongsheng Jin^{3*} and Thomas Binz^{2*}

¹Institut für Toxikologie, OE 5340, and ²Institut für Biochemie, OE 4310, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany.

³Center for Neuroscience, Aging and Stem Cell Research, Sanford-Burnham Medical Research Institute, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA.

⁴Astbury Centre for Structural Molecular Biology and Institute of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK.

Summary

The seven botulinum neurotoxins (BoNT) cause muscle paralysis by selectively cleaving core components of the vesicular fusion machinery. Their extraordinary activity primarily relies on highly specific entry into neurons. Data on BoNT/A, B, E, F and G suggest that entry follows a dual receptor interaction with complex gangliosides via an established ganglioside binding region and a synaptic vesicle protein. Here, we report high resolution crystal structures of the BoNT/C cell binding fragment alone and in complex with sialic acid. The WY-motif characteristic of the established ganglioside binding region was located on an exposed loop. Sialic acid was co-ordinated at a novel position neighbouring the binding pocket for synaptotagmin in BoNT/B and G and the sialic acid binding site in BoNT/D and TeNT respectively. Employing synaptosomes and immobilized gangliosides binding studies with BoNT/C mutants showed that the ganglioside binding WY-loop, the newly identified sialic acid-co-ordinating pocket and the area corresponding to the established ganglioside binding region of other BoNTs are

involved in ganglioside interaction. Phrenic nerve hemidiaphragm activity tests employing ganglioside deficient mice furthermore evidenced that the biological activity of BoNT/C depends on ganglioside interaction with at least two binding sites. These data suggest a unique cell binding and entry mechanism for BoNT/C among clostridial neurotoxins.

Introduction

Botulinum neurotoxins (BoNTs, serotypes A–G) and the closely related tetanus neurotoxin (TeNT) are produced as ~ 150 kDa single chain proteins by bacteria of the genus *Clostridium* and subsequently activated by proteolytic cleavage yielding a ~ 100 kDa heavy chain (HC) and a ~ 50 kDa light chain (LC). LC and HC remain connected via a single disulfide bridge and non-covalent interactions. The LCs act as zinc metalloproteases and specifically hydrolyse a SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) protein, i.e. VAMP (vesicle associated membrane protein)/synaptobrevin, SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) or syntaxin. BoNT/C is unique in that it hydrolyses a single peptide bond in both syntaxin and SNAP-25 (Blasi *et al.*, 1993; Schiavo *et al.*, 1995; Foran *et al.*, 1996; Osen-Sand *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1996; Vaidyanathan *et al.*, 1999). SNARE cleavage blocks release of neurotransmitters from synaptic vesicles into the synaptic cleft. The HCs mediate neurospecific binding, uptake by receptor mediated endocytosis, and transport of the LC across the endosomal membrane into the cytosol where the LCs encounter their substrates (Schiavo *et al.*, 2000; Montal, 2010). The ~ 50 kDa amino-terminal domain of HC (H_N) provides the translocation apparatus for the LC (Koriatzova and Montal, 2003). The carboxyl-terminal half of HC, referred to as the H_C-fragment, consists of two domains of ~ 25 kDa each, H_{CN} and H_{CC}. The function of H_{CN} is still vague, although low affinity binding to phosphatidylinositolmonophosphate has recently been reported for BoNT/A (Muraro *et al.*, 2009). In contrast, H_{CC} has the ability to mediate nerve cell binding and uptake [reviewed in Binz and Rummel (2009)]. It probably also governs the intracellular routing, through which TeNT ascends to inhibitory spinal cord neurons and BoNTs remain in motoneuron terminals at the neuromuscular junction. That is why BoNTs and TeNT cause opposite clinical symptoms, flaccid or spastic paralysis respectively

Accepted 21 April, 2011. *For correspondence. E-mail binz.thomas@mh-hannover.de; Tel. (+49) 511 532 2859; Fax (+49) 511 532 2849, E-mail rjin@sanfordburnham.org; Tel. (+1) 858 795 5274; Fax (+1) 858 795 5273, or E-mail rummel.andreas@mh-hannover.de; Tel. (+49) 511 532 2819; Fax (+49) 511 532 8021. †Authors contributed equally to this work.

(Herreros *et al.*, 2000; Schiavo *et al.*, 2000). BoNT/C is unique as it usually does not cause disease in human, but type C strains can be responsible for infant botulism (Oguma *et al.*, 1990). Despite this, BoNT/C has been shown to be a suitable drug for the treatment of dystonia (Eleopra *et al.*, 1997).

What confers the neuron specific action of clostridial neurotoxins (CNT)? According to the present dual receptor model they initially bind to complex gangliosides, which are largely confined to nerve cells and are abundantly distributed in the outer leaflet of the plasma membrane. Gangliosides have been recognized as receptors for CNTs many years ago (van Heyningen and Miller, 1961; Simpson and Rapport, 1971). Their important role was later on verified by more sophisticated methods like inhibition of their biosynthesis (Kitamura *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 1999). However, based on additional experimental findings, the model proposes that gangliosides merely function as device to concentrate the neurotoxins on the plasma membrane and protein receptors are required for uptake into motoneurons (Montecucco, 1986). This view has been corroborated during the past few years for BoNT/A, B, E, F and G. It was demonstrated that luminal segments of synaptic vesicle proteins are utilized for cell entry. The large luminal domain of synaptic vesicle protein 2 (SV2) mediates the entry of BoNT/A, E and probably F (Dong *et al.*, 2006; 2008; Mahrhold *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2009; Rummel *et al.*, 2009), whereas the intravesicular segment of synaptotagmin (Syt)-I and -II is harnessed by BoNT/B and G (Nishiki *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2003; 2007; Rummel *et al.*, 2004a). These results revealed that BoNTs exploit the synaptic vesicle recycling pathway in order to gain access to the nerve terminal cytosol. On the other hand, results being inconsistent with the involvement of protein receptors or the uptake via the synaptic vesicle recycling pathway were published for BoNT/C and D (Tsukamoto *et al.*, 2005).

In the meantime, binding pockets for gangliosides have been identified and characterized by X-ray crystallography as well as mutagenesis approaches for TeNT and all BoNTs except BoNT/C (Swaminathan and Eswaramoorthy, 2000; Fotinou *et al.*, 2001; Rummel *et al.*, 2003; 2004b; 2007; 2009; Stenmark *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009; Strotmeier *et al.*, 2010). The binding pockets are similarly positioned in the H_{CC} domain near the C-terminal tip of the toxins, and the amino acids forming these pockets are conserved in the primary structure among BoNT/A, B, E, F, G and TeNT. Consequently, the pocket has been termed so far 'conserved ganglioside binding pocket'. To account for the fact that the pocket of BoNT/D does not exhibit the conserved SXWY . . . G motif (Strotmeier *et al.*, 2010), these sites are termed here 'established ganglioside binding region'. In line with the dual receptor model, crystal structures combined with mutagenesis

studies revealed that Syt-II binds to a separate site of BoNT/B in the direct neighbourhood of the established ganglioside binding region at the very C-terminal tip (Chai *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006; Rummel *et al.*, 2007), thereby sterically permitting simultaneous binding of both receptor molecules. Interestingly, the position corresponding to the Syt-II binding site in BoNT/B has earlier been identified as a second ganglioside binding site in TeNT (Fotinou *et al.*, 2001; Rummel *et al.*, 2003) and very recently as carbohydrate binding site in BoNT/D (Strotmeier *et al.*, 2010) and has been termed 'sialic acid binding site'. The sialic acid binding site in TeNT could be in charge of mediating an interaction with a sialic acid-containing glycoprotein, as such molecules have been reported to constitute a receptor molecule for TeNT (Herreros *et al.*, 2001; Munro *et al.*, 2001). In BoNT/D this site might mediate a second physiologically relevant ganglioside interaction (Strotmeier *et al.*, 2010). To account for these findings, this area is generally designated 'second receptor binding region' in this study.

In order to understand the cell entry mechanism of BoNT/C we characterized the H_C-fragment of BoNT/C (H_CC). We determined the crystal structure of H_CC alone and in complex with sialic acid, which revealed a novel binding pocket for sialic acid that locates at a unique position neighbouring to the position of the second receptor binding region present in other CNT. Analyses of single site BoNT/C mutants by various binding assays demonstrated ganglioside binding at this site. In addition, the established ganglioside binding region and the exposed loop containing the WY-motif (WY-loop) that is in BoNT/A, B, E, F and G otherwise integral part of the established ganglioside binding region are also involved in ganglioside binding. Mice phrenic nerve (MPN) hemidiaphragm assays showed that these sites are crucial for the biological activity of BoNT/C. Thus, the data suggest that among CNTs BoNT/C attacks nerve cells by a unique mechanism involving structurally novel ganglioside binding sites.

Results

High resolution crystal structure of the BoNT/C H_C-fragment

To set up the basis for detailed structural analyses of the BoNT/C receptor binding sites, we crystallized recombinant H_CC. Extensive attempts using the molecular replacement method and various known BoNT H_C-fragment structures all failed to solve the structure suggesting that H_CC might exhibit large conformational changes in comparison with other BoNT serotypes. The challenge on structure determination was eventually overcome by using the H_{CN} and H_{CC} domains of H_CB separately as independent molecular replacement search models, and by deletion of all loops in H_CB to minimize

Table 1. Data collection and refinement statistics.

	Apo H _c C	H _c C-sialic acid
Data collection		
Wavelength (Å)	0.9979	0.9979
Space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Unit cell (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> in Å)	98.0, 76.5, 104.9	98.4, 77.0, 108.6
	90°, 116.3°, 90°	90°, 116.7°, 90°
Resolution (Å) ^a	44.1–2.2 (2.28–2.20)	44.3–2.15 (2.22–2.15)
Unique observations	71 548	78 700
Average redundancy ^a	3.9 (3.8)	5.3 (5.4)
Data completeness (%) ^a	98.9 (90.0)	99.6 (99.0)
<i>I</i> / σ _{<i>i</i>} ^a	17.2 (2.9)	20.4 (3.3)
<i>R</i> _{merge} (%) ^{a,b}	8.0 (47.2)	8.5 (53.2)
Refinement		
No. of protein atoms	6932	6956
No. of water atoms	711	870
<i>R</i> _{work} (%) ^{a,c}	17.1 (21.9)	16.8 (21.7)
<i>R</i> _{free} (%) ^{a,d}	21.0 (27.2)	20.6 (28.2)
r.m.s.d. bond lengths (Å)	0.007	0.007
r.m.s.d. bond angles (deg)	1.021	1.013
Ramachandran statistics		
Most favoured (%)	96.5	96.9
Additional allowed (%)	3.5	3.1
Disallowed (%)	0	0

a. Values in parentheses represent the highest resolution shell.

b. $R_{\text{merge}} = \frac{|\sum_i \sum_j |I_{h_j} - \langle I_h \rangle|}{\sum_i \sum_j |I_{h_j}|}$.

c. $R_{\text{work}} = \frac{(\sum |F_o| - |F_c|)}{\sum |F_o|}$.

d. Five percent of the reflections were set aside for calculation of *R*_{free}.

model bias (Jin *et al.*, 2006). Finally, the structure was determined to 2.2 Å resolution using X-ray crystallography (Table 1). Electron density was clearly visible for all residues (N867–E1291). The overall structure of H_cC proved to be similar to the H_c-fragment of other BoNTs and to a very recently solved apo structure of H_cC strain Stockholm [PDB code: 3N7K; Space group *P*2₁; 2.5 Å resolution; structural superposition of C- α backbone yielded a root-mean-square deviation (r.m.s.d.) of 0.5 Å over 419 best aligned amino acids (Karalewitz *et al.*, 2010)]. H_{cN} of BoNT/C (H_{cN}C) consisting of residues A864–Q1093 is formed from two antiparallel β -sheets organized into a jelly roll barrel fold. H_{cC} of BoNT/C (H_{cC}C) comprising residues Y1094–E1291 adopts a β -trefoil fold. Structural comparison among H_cC and the H_c-fragments of BoNT/A [PDB code: 2VUA (Stenmark *et al.*, 2008)], B [2NM1 (Jin *et al.*, 2006)], D [3OBR (Strotmeier *et al.*, 2010)], E [3FFZ (Kumaran *et al.*, 2009)], F [3FUQ (Fu *et al.*, 2009)], G [2VXR (Stenmark *et al.*, 2010)] and TeNT [3HMY (Chen *et al.*, 2009)] showed that there is an unexpected twist between H_{cN} and H_{cC} in H_cC with an angle of 17.2 degree when analysed by DynDom server (Hayward and Berendsen, 1998), which is unique to BoNT/C (Fig. 1B). This twist is probably not caused by crystal packing as identical structures of H_cC in similar space group *P*2₁ were observed in two other crystal forms of H_cC that we have crystallized (data not shown). The func-

tional relevance of this structural difference is currently unknown.

Nevertheless, the structures are conserved within each domain. Pair-wise structure comparisons of H_{cN} and H_{cC} domains with those of BoNT/A, B, D, E, F, G and TeNT showed r.m.s.d. values of 1.5–2.0 Å (Table 2). We selected H_{cA} and H_{cB} for further structural analyses because the mechanism by which they interact with their receptors has been well characterized as revealed by biochemical data and the crystal structures of H_{cA}-GT1b and H_{cB}-Syt-II complexes (Rummel *et al.*, 2004b; 2007; Chai *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006; Stenmark *et al.*, 2008). In spite of the conserved core structure, large structural differences among H_cC, H_{cA} and H_{cB} are found in many surface-exposed loops. Five such areas reside in H_{cN} (Fig. 1B) and nine loops in the H_{cC} domain (Fig. 1C). These regions are coloured blue in Fig. 1A. The most significant conformational changes are observed in three loops in the H_{cC} domain: F1182–D1197 (loop-1), R1251–Y1263 (loop-2) and K1269–S1281 (loop-3) (Fig. 1A and C). Loop-1 and loop-3 are close to the position of the established ganglioside binding region of other CNTs that is best characterized by the structure of the H_{cA}-GT1b complex. In H_{cA}, the counterpart of loop-3 comprises five residues, S1264, W1266, Y1267, S1275 and R1276, which are directly involved in GT1b binding (Stenmark *et al.*, 2008). Loop-1 of H_cC is much longer when com-

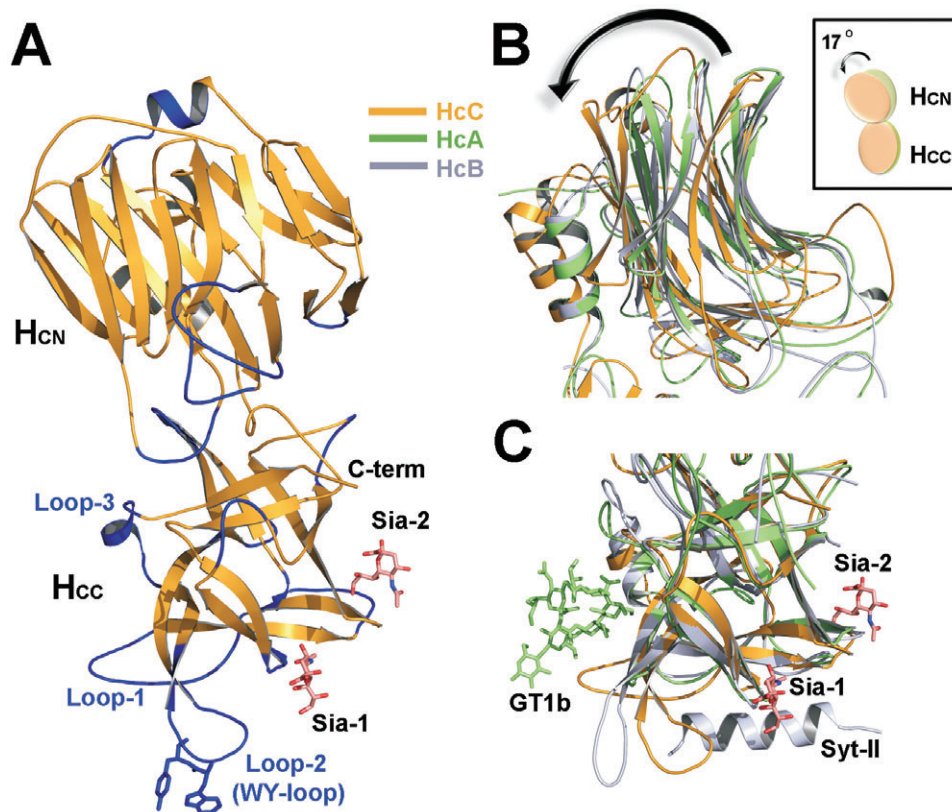


Fig. 1. Crystal structure of the BoNT/C Hc-fragment.

A. Ribbon diagram of HcC-sialic acid complex. Two sialic acid molecules (Sia-1 & 2) are shown as a stick model. Regions that show large conformational differences in comparison with the structures of HcA and HcB are coloured in blue. The WY-motif of loop-2 is shown as stick model.

B, C. The structures of HcC (orange), HcA-GT1b complex [green, PDB code: 2VU9 (Stenmark *et al.*, 2008)] and HcB-Syt-II complex [gray, PDB code: 2NM1 (Jin *et al.*, 2006)] are superimposed based on the C α atoms only in the HcC domain. The superimposed HcCN and HcCC domains are shown in (B) and (C) respectively. The carbohydrate portion of GT1b is shown as stick model in green, and Syt-II is shown as a ribbon. The overall structures within the HcCN and HcCC domains are highly conserved among HcC, HcA and HcB. However, the HcCN and HcCC domains in HcC are twisted by about 17.2 degree in comparison with HcA and HcB. The inset is a simplified model showing the twist between the HcCN and HcCC domains in HcC (orange) in comparison with HcA (green).

pared with its counterpart in HcA (A1194-V1202) and HcB (Y1181-E1189), and extends into the hypothetical position of the established ganglioside binding region (Fig. 1A and C). The structure of this long loop is well defined even

Table 2. R.m.s.d. values for pair-wise structural comparisons of HcCN and HcCC domains.

	HcCN	HcCC
BoNT/A	1.5 Å (199) ^a	1.9 Å (168)
BoNT/B	1.6 Å (201)	1.9 Å (161)
BoNT/D	1.6 Å (203)	1.5 Å (173)
BoNT/E	1.5 Å (201)	1.8 Å (158)
BoNT/F	1.4 Å (196)	1.6 Å (154)
BoNT/G	1.4 Å (194)	1.8 Å (153)
TeNT	1.7 Å (208)	2.0 Å (172)

a. Values in parentheses represent numbers of best-aligned amino acids used for the calculations.

though it is not involved in any crystal packing. Its function is yet unclear.

The primary structure of BoNT/C displays the motif GXWY . . . S, which is related to the SXWY . . . G motif of the established ganglioside binding region in BoNT/A, B, E, F, G and TeNT (Fig. S1). Unexpectedly, loop-2, which corresponds to a loop in HcB (Y1244-K1254) that separates the established ganglioside binding region and the second receptor binding region, and not loop-3 like in other CNTs, comprises W1258 and Y1259 of this motif, which we therefore term WY-loop here. As a consequence W1258 and Y1259 reside outside the HcC core structure and seem to be highly exposed to the solvent (Figs 1A and 2E). We have determined structures of HcC in three different crystal forms and the WY-loop was in each case involved in various crystal packing. Thus, it might be that crystal packing had affected positioning of the WY-loop. To investigate this we carried out molecular dynamics simulations.

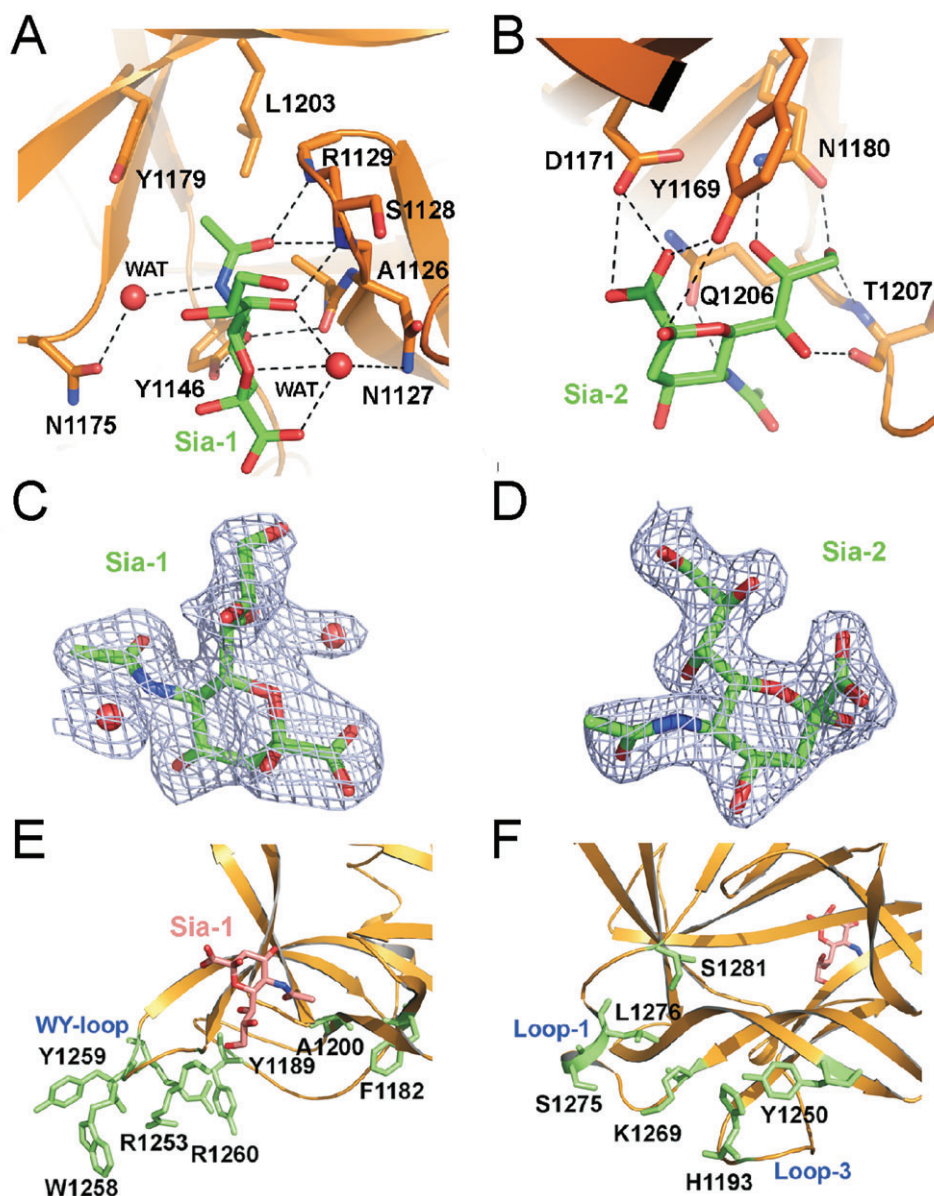


Fig. 2. Close-up views of potential receptor binding sites in H_cC.

A, B. H_cC is shown in orange and sialic acid (Sia-1 & 2) in green. Key residues of H_cC involved in sialic acid co-ordination are shown in stick representation. Two water molecules that mediate the H_cC–Sia-1 interactions are shown as spheres. Hydrogen bonds are indicated by black dashed lines.

C, D. σ_A weighted Fo–Fc omit electron density map (contoured at 1.0 σ) around the bound sialic acid, overlaid with the final model.

E. Close-up view of the WY-loop of H_cC and the site corresponding to the second receptor binding region of BoNT/B, D, G and TeNT.

F. Close-up view of the H_cC region that corresponds to the established ganglioside binding region of BoNT/A, B, D, E, F, G and TeNT.

E, F. Key residues selected for mutagenesis studies are shown as green sticks.

The results showed that the structure equilibrated in less than 10 ns as indicated by plotting the average structure r.m.s.d. value versus time (data not shown). On this time scale the WY-loop fluctuated between 2–3 Å and 4–5 Å at 310 K and 410 K respectively. However, these values were comparable with those of other loop regions in H_cC. Furthermore, detailed analysis of the dynamic trajectories revealed non-directional fluctuations of the WY-loop even

at elevated temperatures (410 K). This suggests that the extended conformation of this loop is populated in solution in the absence of receptor molecules and therefore might match the native conformation. Ganglioside-docking, however, might trigger large conformational changes so as to bring W1258 and Y1259, e.g. into a position between loop-1 and -3 (Fig. 1A). Alternatively, the WY-loop might represent a non-native, trapped conformation that can only

reach the native state through thermal motions on μs time scales. Such time scales are not accessible by conventional molecular dynamics simulations. Thus, the concluding description of this BoNT/C region awaits microsecond molecular dynamics simulations and/or studies like nuclear magnetic resonance experiments. Despite this lack of clarity, this region is unique for BoNT/C.

Another unexpected finding was that H_cC formed a non-crystallographic symmetric dimer in crystals. An identical dimeric H_cC was observed in all three different crystal forms. The two protomers of H_cC are related by a non-crystallographic twofold symmetry in a head-to-tail manner and symmetric intra-dimer interactions exist between the H_cN and H_cC domains (Fig. S2). This dimeric arrangement has probably no physiological relevance as mutation of residues positioned at the interface of the two monomers (N1019, N1240 and N1272 to alanine) did not significantly affect the biological activity of BoNT/C (data not shown).

Structure of BoNT/C H_c in complex with sialic acid

To obtain further information about the interaction of H_cC with gangliosides, we determined the structure of a H_cC-sialic acid complex at 2.15 Å (Fig. 1A and C, Table 1). Two sialic acid molecules (Sia-1 & -2) were clearly observed to bind to the H_cC domain (Fig. 1A and C). Sia-1 as β -anomer [being the dominant configuration in aqueous solution (Jaques *et al.*, 1977)] bound to a position near the tip of H_c neighbouring to the sialic acid binding site of TeNT and BoNT/D (Emsley *et al.*, 2000; Jayaraman *et al.*, 2005; Strotmeier *et al.*, 2010) or the Syt-II binding site of BoNT/B and G (Chai *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006; Rummel *et al.*, 2007), the second receptor binding region. Five pairs of direct hydrogen bonds were observed that involve the O4, O7 and O10 atoms of sialic acid and residues A1126 (O), S1128 (N), R1129 (N) and Y1146 (OH) in H_cC (Figs 2A and C and Table S1). In addition, two well-defined water molecules were observed in the Sia-1 binding pocket. One water molecule bridges the O1A, O6 and O7 atoms of sialic acid to N1127 (OD1) in H_cC; the other connects the N5 atom of sialic acid to N1175 (OD1) of H_cC (Fig. 2A and Table S1). As the carboxyl group of Sia-1 is pointing away from H_cC and is not involved in protein binding, the α - or β -anomer could equivalently bind to this pocket.

The second sialic acid binding pocket selectively bound an α -anomer, Sia-2 (Figs 2B and D). The carboxyl group of Sia-2 forms three pairs of hydrogen bonds with residues Y1169 (OH) and D1171 (OD2) in H_cC. Additional hydrogen bonds were observed among the O2, N5, O7, O8 and O9 atoms of Sia-2 and residues Y1169, N1180, Q1206 and T1207 in H_cC (Figs 2B and D and Table S2).

The WY-loop, the Sia-1 site and the established ganglioside binding region are crucial for cell binding and neurotoxicity, but not the Sia-2 site or the second receptor binding region

In addition to the established ganglioside binding region and the second receptor binding region, the structure of the H_cC-sialic acid complex revealed three new possible sites that might be involved in receptor interaction, the Sia-1 and Sia-2 sites and the WY-loop. To check which of them represent relevant binding sites, we studied binding of BoNT/C mutants to gangliosides in their natural context and used rat brain synaptosomal membranes and ³⁵S-labelled H_c-fragments as experimental system. In agreement with previous results, the binding affinity dropped drastically, if W1258 of the WY-loop was mutated [(Tsukamoto *et al.*, 2008; Rummel *et al.*, 2009); Fig. 3]. Also, the three mutations in the Sia-1 pocket (Fig. 2A; Y1146A, Y1179S, L1203F) significantly diminished the affinity of H_cC. As expected the combination of mutations in Sia-1 site and WY-loop (Y1179S/W1258L) yet more drastically harmed binding to synaptosomes. In contrast, none of the six mutations introduced at the position of the Sia-2 co-ordination site (Fig. 2B) as well as the three mutations around the second receptor binding region (Fig. 2E) showed a significant effect on binding of H_cC to synaptosomal membranes (Fig. 3), implying that these sites are not involved in toxin binding. Interestingly, we found that of the six mutations analysed in the established ganglioside binding region (Fig. 2F), only S1281Y caused a clear effect on binding of H_cC (Fig. 3).

Next, the biological activity of the corresponding full-length BoNT/C mutants was assessed at MPN hemidiaphragm preparations, a physiological site of BoNT action. The mutations in the WY-loop, W1258A, W1258L, Y1259A and Y1259S, reduced the neurotoxicity of BoNT/C to 2.8%, 16.6%, 21.5% and 35.2% respectively (Fig. 4). Likewise, the mutations Y1146A, Y1179S and L1203F in the Sia-1 co-ordination site decreased the neurotoxicity to 1.8%, 4.0% and 0.5% respectively (Fig. 4). BoNT/C-Y1179S/L1203F showed similar neurotoxicity to BoNT/C-L1203F suggesting that mutation of L1203 to phenylalanine suffices to deactivate this binding site. Figure S6 illustrates how the replacement of L1203 with phenylalanine in H_cC would displace the sialic acid of gangliosides in the Sia-1 site. In contrast, the combined mutations W1258A and Y1259A further decreased the neurotoxicity to 0.4%. As expected from the binding data, simultaneous mutation in the Sia-1 site and the WY-loop (BoNT/C-Y1179S/W1258L and BoNT/C-Y1179S/L1203F-W1258A/Y1259A) showed a very strong effect displaying a residual activity of 0.15% and 0.05% versus wild-type BoNT/C respectively. This value roughly corresponds to the multiplication of the individual effects. Also in this

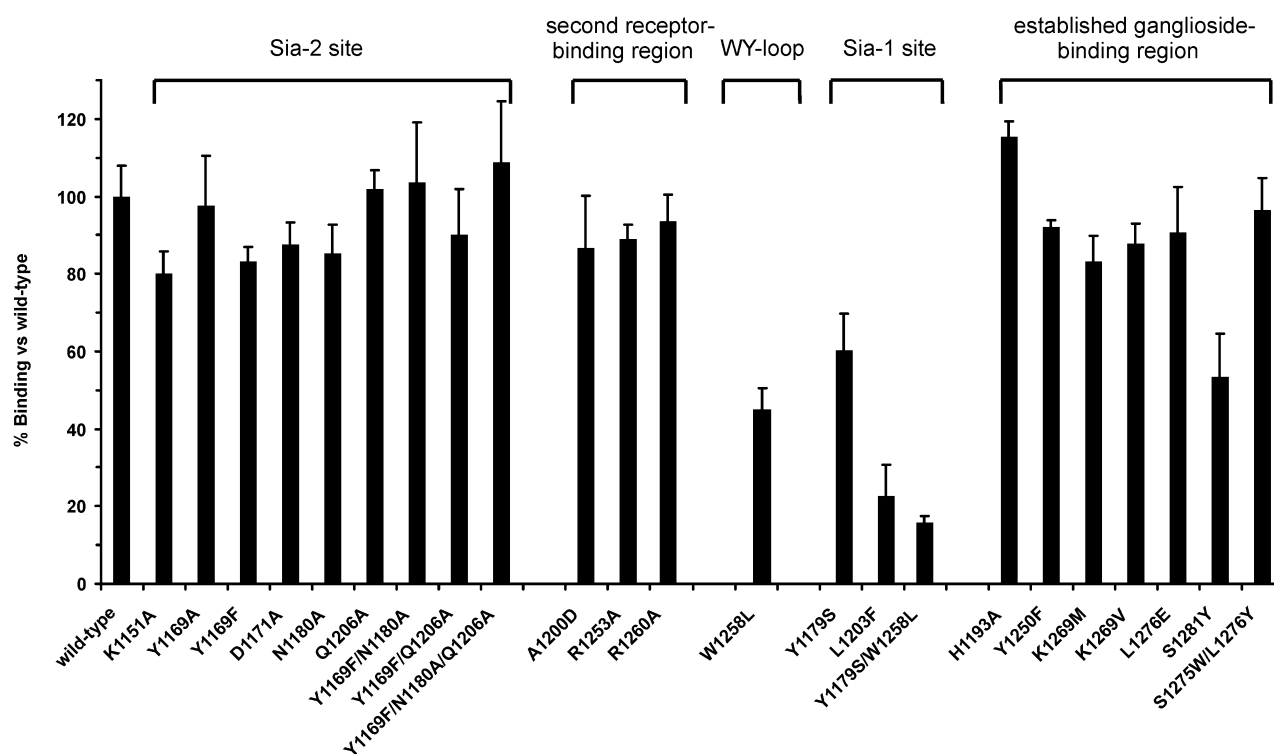


Fig. 3. Binding of H_cC mutants to synaptosomal membranes. ³⁵S-labelled wild-type and mutated H_c-fragments generated by *in vitro* translation were incubated with rat brain synaptosomes in physiological buffer for 2 h at 0°C. Washed pellet fractions were subjected to SDS-PAGE, and the amount of bound ³⁵S-H_c-fragment mutants was quantified by phosphor imaging and depicted as a percentage of binding versus wild-type H_cC. (*n* = 3–13, mean ± SD). Data for the mutants are arranged according to binding sites they belong to: Sia-1 and Sia-2 sites, co-ordination sites for sialic acid as observed in the H_cC-sialic acid structure; second receptor binding region, position of the binding site for Syt-II in BoNT/B and G and sialic acid in BoNT/D and TeNT; WY-loop, loop-2 in Fig. 1A; established ganglioside binding region, comprises the conserved ganglioside binding motif SXWY . . . G of BoNT/A, B, E, F, G and TeNT.

assay, mutations in the Sia-2 site or the second receptor binding region exerted no or weak effects, except for A1200D, indicating that the latter two sites do not contribute to binding. As analysed by CD-spectroscopy, the effect of the mutation of A1200 to aspartic acid is probably due to an impairment of its structural stability, whereas the other mutants displaying reduced binding and neurotoxicity did not significantly differ in their secondary structure content as well as thermal stability from H_cC wild-type (Figs S3 and S4). The observation that mutation of S1281 interferes with toxin binding was confirmed by a reduction of the neurotoxicity of BoNT/C-S1281Y to ~ 15% (Fig. 4).

Altogether the results evidence the presence of more than one relevant binding site in BoNT/C H_c as opposed to BoNT/A, B, E, F and G.

Three regions of BoNT/C H_c-fragment contribute to ganglioside binding

As it has been proposed that in contrast to other CNTs the entry of BoNT/C was only dependent upon interaction with gangliosides (Tsukamoto *et al.*, 2005), we examined

next, whether the identified receptor binding sites of BoNT/C mediate interaction with gangliosides. To this end we performed binding studies using immobilized gangliosides and H_cC mutants. These exhibited either a mutation at the Sia-1 site (Y1179S, L1203F), the WY-loop (W1258L, Y1259S) or the established ganglioside binding region (S1281Y). Figure 5 shows that mutations in either region drastically reduced the binding affinity to gangliosides in physiological ionic strength conditions. H_cC carrying mutations at two sites (Y1179S/W1258L) showed a yet lower binding affinity to immobilized gangliosides (Fig. 5). Together, the existing data demonstrate that BoNT/C possesses at least two sites that can mediate the binding of ganglioside molecules.

The WY-loop and the Sia-1 site mediate physiologically crucial ganglioside interactions

The so far obtained results provide strong evidence for the existence of at least two essential binding sites in H_cC that can bind gangliosides. They do not yet prove that gangliosides act as receptors under physiological

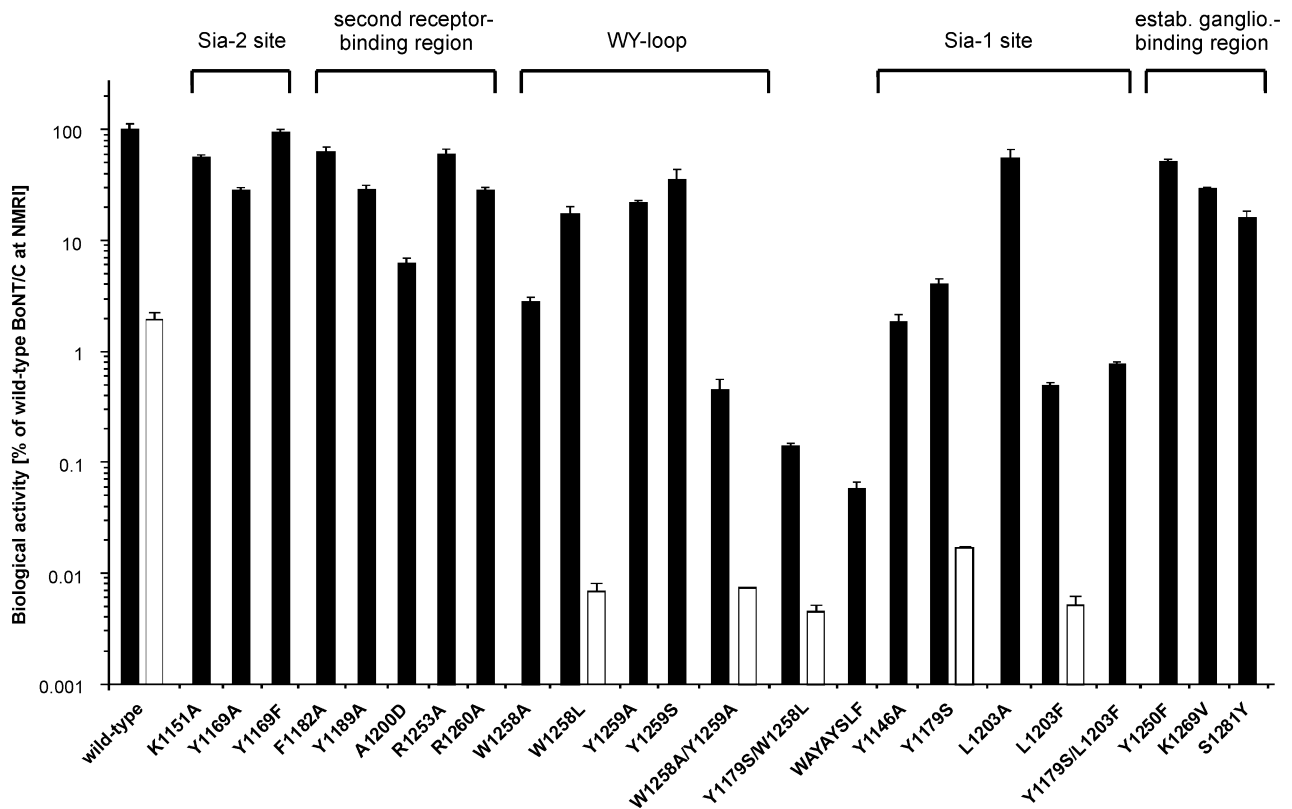


Fig. 4. Biological activity of BoNT/C and various mutants at wild-type (filled columns) and GM3-only (empty columns) MPN hemidiaphragm preparations. To dose–response curves of recombinant wild-type BoNT/C a power function was fitted. The resulting paralytic half-times of BoNT/C mutants were converted to the corresponding concentrations of wild-type BoNT/C using the power function. The toxicities were finally expressed relative to wild-type BoNT/C ($n = 3–5$, mean \pm SD). Data for the mutants are arranged according to binding sites they belong to as defined in Fig. 3. WAYAYSLF indicates BoNT/C-W1258A/Y1259A/Y1179S/L1203F.

conditions and thus, the idea of gangliosides as the sole receptors for BoNT/C. It would still be feasible that the carbohydrate portion of a glycosylated receptor protein occupies one of the identified sites in the internalization process. To rule out this possibility, we studied the toxicity of BoNT/C mutants with deactivated ganglioside binding sites at phrenic nerve preparations of ganglioside deficient mice. We used mice in which the genes for GD3 synthetase (GD3S) and N-acetylgalactosamine (NAcGal) transferase (NAcGalT) were deleted [DKO/GM3-only mice (Kawai *et al.*, 2001)]. These mice do not synthesize complex gangliosides, and GM3 represents the end point of ganglioside synthesis. The neurotoxicity of wild-type BoNT/C at DKO MPN hemidiaphragm preparations was 2% compared with MPN hemidiaphragm preparations of wild-type NMRI mice (Fig. 4, empty columns). The toxicities of BoNT/C-W1258L, BoNT/C-W1258A/Y1259A (mutated in the WY-loop), BoNT/C-Y1179S and BoNT/C-L1203F (mutated in the Sia-1 site) are ~16.6%, 0.4%, 4% and 0.5%, respectively, of wild-type BoNT/C at wild-type NMRI mice (Fig. 4, filled columns). At DKO MPN hemidiaphragm

preparations, the activities of these mutants are further reduced by factors > 700, ~ 65, > 200 and > 90 respectively (Fig. 4, empty columns). Such reductions in activity are not observed when BoNT/B or BoNT/G mutants of the established ganglioside binding site (their sole ganglioside binding site) are analysed at DKO MPN hemidiaphragm preparations (Rummel *et al.*, 2007). Thus, the additional drastic reductions indicate that another physiologically relevant intact ganglioside binding site exists in each single site inactivated BoNT/C mutant.

It was unexpected to note that the activity of wild-type BoNT/C at DKO MPN hemidiaphragm preparations was > 100-fold higher than that of BoNT/C-W1258L, BoNT/C-W1258A/Y1259A, BoNT/C-Y1179S and BoNT/C-L1203F. A plausible explanation for this finding might be a significant affinity of GM3, which is hardly displayed in wild-type mice but accumulates under knock-out conditions in large amounts (Kawai *et al.*, 2001), to either of the ganglioside binding sites of BoNT/C. The remaining interaction with GM3 is synergistic in wild-type BoNT/C because of the presence of at least two functional sites.

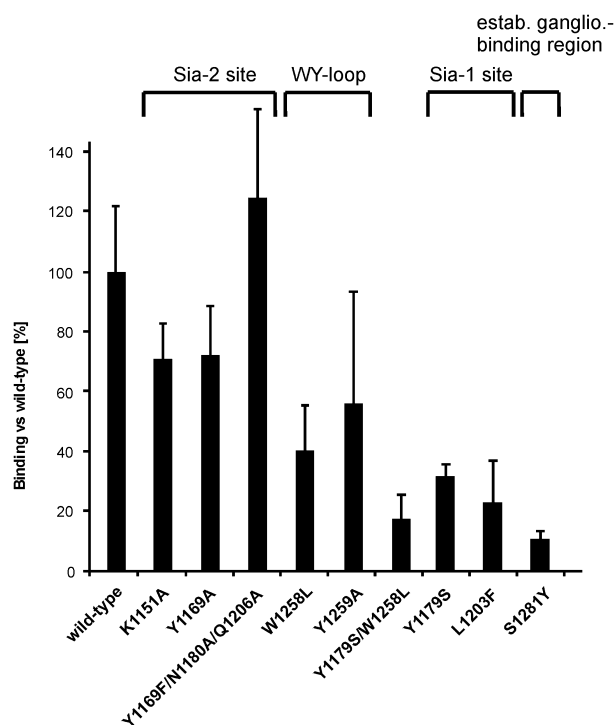


Fig. 5. Ganglioside binding of H_cC mutants. Mixed bovine brain gangliosides (5 µg well⁻¹) were immobilized on microtiter plates and incubated for 2 h at 4°C with purified H_cC in PBS/0.5% BSA. After removal of unbound protein bound H_cC was detected by StrepTactin conjugated alkaline phosphatase. (*n* = 4, mean ± SD). Data for the mutants are arranged according to binding sites they belong to as defined in Fig. 3.

Discussion

Comparison of CNT ganglioside binding sites

A ganglioside binding pocket conserved with respect to amino acid sequence (SXWY . . . G ganglioside binding motif), shape and position within H_c has been identified in all hitherto established CNT structures except BoNT/D. In the latter merely the positioning within H_{cc} is maintained (Strotmeier *et al.*, 2010). BoNT/C possesses a WY-motif related to the conserved SXWY . . . G ganglioside binding motif of BoNT/A, B, E, F, G and TeNT (Fig. S1), but the structure of the corresponding region in H_cC appears completely different. The WY-motif is located as part of a solvent exposed loop outside the H_cC core structure. A very recent study of Karalewitz and coworkers on H_cC of strain Stockholm (PDB code: 3N7K) yielded the same result (Karalewitz *et al.*, 2010). The observed relocation of the WY-loop might be due to crystal packing constraints as its conformation was identical in three different crystal forms of H_cC. However, refolding was not supported by molecular dynamics simulations (Fig. S5), which might indicate ganglioside binding in a bidentate manner. Alternatively, it might be that ganglioside binding at the estab-

lished ganglioside binding region (S1281) causes W1258 and Y1259 to turn back towards this site under physiological conditions to ligate one of the ganglioside's terminal sugar monomers in a sandwich-like fashion. A joint binding of these two sites is suggested by the less pronounced effects of mutations in these regions compared with those evoked by mutations in the Sia-1 site (Figs 3–5). A turn towards the Sia-1 site appears less likely as a result of sterical hindrances and as the extent of effects observed in MPN toxicity tests argue for two independent ganglioside binding sites.

However, it is unlikely that the established ganglioside binding region adopts a shape similar to the ganglioside binding pocket of BoNT/A, B, E, F, G and TeNT on this potential loop movement. One argument is that the mutations W1258L and Y1259S in BoNT/C caused one and two orders of magnitude, respectively, lesser effects compared with the corresponding mutations in BoNT/A, B and TeNT (~ 5% and ~ 30% versus ~ 0.5% and 0.3% residual toxicity) (Rummel *et al.*, 2003; 2004b). In addition, extensive loop rearrangements would have to occur. Thus, the ganglioside binding site in BoNT/C involving W1258 and Y1259 is novel and unparalleled by known ganglioside binding sites in other proteins.

The Sia-1 site in H_cC is located directly adjacent to the site that corresponds to the second receptor binding region in TeNT. This pocket of TeNT was initially also identified by its ability to co-ordinate sialic acid (Emsley *et al.*, 2000). R1226 of TeNT is the central residue in this pocket forming a salt bridge with the carboxyl group of the terminal sialic acid in the disialic acid branch present in GT1bβ (Fotinou *et al.*, 2001), GT2 (Chen *et al.*, 2009) or disialyllactose (Jayaraman *et al.*, 2005). Interestingly, a recently discovered sialic acid binding site at the equivalent place in BoNT/D displays also a central arginine (R1239) that mediates crucial ligand interactions (Strotmeier *et al.*, 2010). We found that the BoNT/C Sia-1 site can acquire a ganglioside molecule like the second receptor binding region of TeNT, but a basic amino acid that could take over the role of R1226 and R1239 of TeNT and BoNT/D, respectively, is lacking. In contrast, the carboxyl group of sialic acid is pointing away from the pocket that allows the co-ordination of both the α- and β-anomer. Here, a set of hydrogen bond interactions exist (Table S1), as well as hydrophobic interactions involving the side-chains of A1126, I1131, M1172 and I1174. L1203 probably does not directly contribute to binding, as its mutation to alanine has only a marginal effect on neurotoxicity of BoNT/C (Fig. 4). In contrast, the replacement of the isobutyl group of L1203 with a phenyl group clashes with the acetyl group of sialic acid as revealed by the crystal structure of H_cC-L1203F mutant thereby completely blocking the Sia-1 site (Fig. S6). Amino acid Y1179, whose mutation showed drastic effects on binding

and neurotoxicity of BoNT/C, makes indirect interaction between its OH atom and the N5 atom of Sia-1 mediated by two sequential water molecules (Fig. 2A). However, it cannot be ruled out that Y1179 might interact with an adjacent sugar unit, if the co-ordinated sialic acid would not represent a terminal sialic acid of a ganglioside molecule, as seen in the H_CT-GT1b β structure (Fotinou *et al.*, 2001). Alternatively, a longer carbohydrate chain present in complex polysialogangliosides might change the mode of binding. Its binding mode can ultimately be clarified through complex structures of H_CC with larger carbohydrate portions of gangliosides.

BoNT/C features at least two ganglioside interaction sites that are indispensable for its biological activity

Recent studies have shown that TeNT, BoNT/B, BoNT/D and BoNT/G exhibit a second receptor binding region in the neighbourhood to the established ganglioside binding region at the C-terminal tip of the molecule (Fotinou *et al.*, 2001; Chai *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006; Rummel *et al.*, 2007; Strotmeier *et al.*, 2010). In this study, we have identified the Sia-1 site in BoNT/C adjacent to the second receptor binding region that interacts like TeNT with gangliosides. This conclusion is based on the finding that mutation of three amino acids located in and around this Sia-1 site markedly reduced the biological activity of BoNT/C at natural target neurons (phrenic nerves) and the binding affinity to synaptosomal membranes. In addition, mutations in this newly identified receptor binding site showed drastic effects in binding assays performed under physiological salt conditions employing isolated immobilized gangliosides (Fig. 5).

The involvement of W1258 and Y1259 of the WY-loop in receptor binding and neurotoxicity has been discovered in previous studies (Tsukamoto *et al.*, 2008; Rummel *et al.*, 2009; Karalewitz *et al.*, 2010). These findings were confirmed and extended in the present study.

The following considerations argue for the crucial involvement of both binding sites as independent ganglioside binding sites in the binding and entry mode of BoNT/C. Mutation of the central tryptophan of the sole ganglioside binding site of other BoNTs reduces the neurotoxicity approximately by a factor of 50–100 [BoNT/A: (Rummel *et al.*, 2004b); BoNT/B and BoNT/G: (Rummel *et al.*, 2007); BoNT/E and BoNT/F: (Rummel *et al.*, 2009)]. In the present study we observe that mutation of the Sia-1 or the WY-loop in both instances leads to a reduction in neurotoxicity by a factor of ~ 200 (Fig. 4). Second, BoNT/C with mutated WY-loop should display roughly similar activity at MPN hemidiaphragm preparations of wild-type and complex ganglioside deficient mice, if this region was the only ganglioside interacting site. Indeed, such measurements for corresponding mutants of

the established ganglioside binding regions in BoNT/B and G, i.e. BoNT/B-W1262L and BoNT/G-W1268L, yielded a merely 2- or 3-fold lower neurotoxicity at DKO MPN hemidiaphragm preparations (Rummel *et al.*, 2007). (The merely 2- or 3-fold reduced activity at DKO MPN hemidiaphragm preparations is likely due to an imperfect deactivation of the binding pockets by the tryptophan to leucine mutations.) In contrast to these two BoNTs, whose second binding site mediates the interaction with their protein receptor Syt, the neurotoxicity of BoNT/C-W1258L and BoNT/C-W1258A/Y1259A is > 700-fold or ~ 65-fold lower at DKO versus wild-type MPN hemidiaphragm preparations respectively (Fig. 4). This marked difference cannot only be due to an incomplete deactivation of the site containing the WY-loop by the tryptophan to leucine mutation, as this mutation led to an 18-fold reduction in neurotoxicity at wild-type MPN hemidiaphragm preparations. Vice versa, the ~ 235-fold lower activity of BoNT/C-Y1179S at DKO compared with wild-type MPN hemidiaphragm preparations also unequivocally argues for the presence of another physiologically important ganglioside binding pocket, which is obviously the site comprising the WY-loop (Fig. 4). Thus, these data together strongly suggest a mode of action involving two ganglioside molecules as receptors.

Are gangliosides the sole receptors of BoNT/C?

The BoNT/C region analogously positioned to the Syt binding site of BoNT/B and G (second receptor binding region) displays a different surface and, as outlined above, a pocket interacting with a ganglioside molecule is located nearby (Sia-1 site). This raises the question whether entry of BoNT/C is mediated merely by the discovered ganglioside binding sites, thus without interaction with a protein receptor. In favour of such an assumption is the observation by Tsukamoto and colleagues that the binding of BoNT/C to synaptosomal membranes was not affected by prior membrane treatment with proteinase K or heating (Tsukamoto *et al.*, 2005). Our data are also in support of this view, as simultaneous mutation in the ganglioside and the protein receptor binding site of BoNT/B and G (Rummel *et al.*, 2007) led to a comparable enormous reduction in neurotoxicity compared with mutations in the WY-loop and the Sia-1 site of BoNT/C (Fig. 4).

In this context the recently published evidence for an activity dependent uptake of BoNT/C in MPN toxicity assays has to be reassessed (Rummel *et al.*, 2009). These data have been utilized to argue that BoNTs are generally taken up via the synaptic vesicle recycling pathway. But how can a ligand become guided to this recycling pathway if not bound to the luminal domain of a synaptic vesicle resident transmembrane protein? It must be assumed that certain complex gangliosides are

endocytosed together with synaptic vesicles proteins via the synaptic vesicle recycling pathway. Although the protein composition of synaptic vesicles has been analysed in great detail, corresponding information on the glycolipid content is lacking (Takamori *et al.*, 2006; Gronborg *et al.*, 2010). So, the question remains unsolved whether the hexylceramides detected in synaptic vesicles represent the ganglioside receptors of BoNT/C. At this time the possibility cannot be excluded that at a later stage of the entry process a yet unknown glycoprotein replaces a ganglioside at one binding site or binds to a third yet undiscovered site and thereby directs the toxin to an acidic organelle from where LC translocation can take place. However, there must be a different sorting mechanism compared with TeNT, which can also bind two ganglioside molecules, but has to reach the retrograde transcytosis track in peripheral neurons.

Experimental procedures

Plasmid constructions and mutagenesis

The *Escherichia coli* expression plasmid for BoNT/C H_C-fragment (pH_CCS) and full-length BoNT/C (pBoNTCS-thro) as well as the H_C-fragment encoding plasmid for *in vitro* transcription/translation (pSP72H_CC) have been described earlier (Rummel *et al.*, 2004a; 2009). Mutations were generated employing the GeneTailor site-directed mutagenesis system (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) using suitable primers and pH_CCS, pSP72H_CC or pBoNTCS-thro as template DNA. Some were transferred from pH_CCS by subcloning using the singular Agel recognition site of the BoNT/C coding region and the SmaI site. Nucleotide sequences of all mutants were verified by DNA sequencing.

Purification of recombinant protein

Wild-type and mutated recombinant H_C-fragments and full-length BoNT/C were produced, the latter under biosafety level 2 containment (project number GAA A/Z 40654/3/57), utilizing the *E. coli* strain M15pREP4 (Qiagen) during 16 h of induction at 22°C in the presence of 0.2 mM IPTG, and were purified on StrepTactin-sepharose beads (IBA GmbH, Göttingen, Germany) according to the manufacturer's instructions. Fractions containing the desired protein were pooled, dialysed against PBS (140 mM NaCl, 7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.2), frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C. Protein concentrations and the extent of hydrolytic activation of full-length BoNT/C by *E. coli* proteases were determined subsequent to SDS-PAGE and Coomassie blue staining by using a LAS-3000 imaging system (Fuji Photo Film), the AIDA 3.51 program, and various known concentrations of BSA as standards. The degree of BoNT/C activation averaged around 85%.

Crystallization and diffraction data collection

The isolated wild-type H_CC was further purified by ÄKTA Purifier using a Superdex-200 16/60 column (GE Healthcare,

Munich, Germany) in buffer containing 30 mM Tris-HCl (pH 7.6), 300 mM NaCl and then concentrated to ~6 mg ml⁻¹ for crystallization. Initial crystallization screens were carried out using a Phoenix crystallization robot (Art Robbins Instrument) and high throughput crystallization screen kits from Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA), Qiagen or Emerald BioSystems (Bainbridge Island, WA, USA). The best crystals were grown at 18°C by the hanging-drop vapour-diffusion method with 1:1 (v/v) ratio of protein and reservoir solution containing 10% (v/v) PEG 4000, 0.1 M sodium citrate (pH 4.4) and 3% (w/v) 6-aminohexanoic acid. The crystals were cryoprotected in the same mother liquor supplemented with 20% glycerol, and then flash-frozen in liquid nitrogen. The crystals of the H_CC-sialic acid complex were obtained by soaking the H_CC crystals in a solution containing the same mother liquor supplemented with 100 mM sialic acid for 12 h at 18°C. The X-ray diffraction data of the apo H_CC and the H_CC-sialic acid complex were collected at -173°C at beam line 9-2, Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL), using a Mar-325 CCD detector. All data sets were processed and scaled by using HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997). Data collection statistics are summarized in Table 1.

Structure determination and refinement

The structure of the apo form of H_CC was determined by molecular replacement using Phaser (McCoy *et al.*, 2007). Two independent search models, the isolated H_{CN} and H_{CC} domains of H_CB (PDB code 2NM1), were used. The preliminary structural model was subsequently refined with Phenix 1.5 (Adams *et al.*, 2010) and rebuilt with COOT (Emsley and Cowtan, 2004) in an iterative way. Refinement progress was monitored with the free *R*-value using a 5% randomly selected test set (Brunger, 1992). The structure of the H_CC-sialic acid complex was determined by Phaser using the apo H_CC as the search model. The apo H_CC and the H_CC-sialic acid complex were refined to 2.2 Å with $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.17/0.21$, and 2.15 Å with $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.17/0.21$ respectively. Both structures have excellent stereochemistry and were validated through MolProbity web-server (Davis *et al.*, 2007). Structural refinement statistics are listed in Table 1. The co-ordinates and diffraction data for both structures have been deposited in the Protein Data Bank with accession numbers 3R4U (apo structure) and 3R4S (complex with sialic acid). Figures were prepared with PyMol (<http://www.pymol.org>).

Molecular dynamics simulations

Molecular dynamics simulations were carried out using the AMBER10 software package (<http://ambermd.org/>). All calculations used explicit solvent and the protein was surrounded by an octahedral periodic box of TIP3P water molecules to a minimum distance of 10 Å from the solute before equilibration using a standard multistate protocol (Shields *et al.*, 1997). The structure of the H_CC domain as solved by crystallography was simulated for 30 ns at 310 and 410 K. Residue specific structure r.m.s.d. was calculated using the PTRAJ module available within AMBER. Secondary structure analysis was performed using the Dictionary of Secondary Structure of Protein (Kabsch and Sander, 1983).

In vitro transcription and translation

H_c-fragments were synthesized *in vitro* from pSP72H_cC derivatives using the reticulocyte lysate system (Promega) and L-[³⁵S]methionine (320 KBq, > 37 TBq mmol⁻¹; Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Germany), in a total volume of 25 µl.

Binding to rat brain synaptosomes

Binding of ³⁵S-labelled H_cC to freshly prepared rat brain synaptosomes was studied as detailed previously (Rummel *et al.*, 2004b) except that bound H_c-fragment was visualized using a FLA-9000 laser scanner (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Germany), and quantified applying the Multi Gauge 3.2 software (Fujifilm Europe GmbH).

Binding to immobilized gangliosides

Ganglioside mixture (Matreya, Pleasant Gap, PA, USA) was dissolved to 50 µg ml⁻¹ in ethanol and applied to medium binding 96-well F96 POLYSORB immunoplates (Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Germany; 100 µl well⁻¹). The solvent was evaporated at 22°C and the wells were washed twice with 200 µl of PBS buffer and then blocked with 200 µl of the same buffer supplemented with 3% (w/v) of casein. After two interim washing steps, 100 µl per well containing 2.5 µg of H_cC or its mutants diluted in PBS/0.5% BSA were added and incubated for 2 h at 4°C. Unbound protein was removed by two washing steps with PBS/Tween 20 [0.05% (v/v)]. After another blocking step with avidin (2 µg ml⁻¹ in PBS/0.05% Tween) bound H_c-fragments were detected by incubation with StrepTactin conjugated alkaline phosphatase (ST-AP, IBA GmbH) in PBS/0.5% BSA buffer for 2 h at 22°C according to the manufacturer's instructions. After four additional washing steps, twice with PBS/0.05% Tween and twice with PBS, p-Nitrophenylphosphate (1 mg ml⁻¹ in 100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 10.4) was used as substrate for alkaline phosphatase. The extinction was measured at 405 nm with a Sunrise microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

MPN hemidiaphragm toxicity assay

According to §4 Abs. 3 [killing of animals for scientific purposes, German animal protection law (TSchG)] animals were sacrificed by trained personnel before dissection of organs and its number reported yearly to the animal welfare officer of the Central Animal Laboratory and to the local authority, Veterinäramt Hannover. The MPN toxicity assay was set up as described earlier (Habermann *et al.*, 1980; Wohlfarth *et al.*, 1997). Electrical stimulation of the phrenic nerve was continuously performed at a frequency of 1 Hz. Isometric contractions were transformed via a force transducer and recorded with the VitroDat Online software (FMI GmbH, Seeheim, Germany). The time required to decrease the amplitude to 50% of the starting value (paralytic half-time) was measured. Recombinant BoNT/C-thro wild-type was applied in triplicates at final concentrations of 15, 50, 70, 100 and 233 pM. To the concentration–response curve the power

function $y = 148.95x^{-0.2089}$ ($R^2 = 0.9806$) was fitted. The resulting paralytic half-times of BoNT/C-thro mutants were converted to the corresponding concentrations of wild-type BoNT/C, using the equation mentioned above. The toxicities were finally expressed relative to wild-type BoNT/C. Because of the differing degrees of activation among BoNT/C preparations only activated BoNT/C was taken into account for determination of protein concentrations because of the 10-fold lower potency of the single chain BoNT/C in the MPN toxicity assay.

Complex ganglioside deficient mice

Mice phrenic nerve organs were derived from 20 g NMRI mice (wild-type) and C57BL/6 mice lacking GD3 synthetase (CMP-sialic acid: GM3 α -2,8-sialyltransferase, EC 2.4.99.8) and β -1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase (EC 2.4.1.92). Whereas neurons of NMRI mice contain the full set-up of complex polysialo-gangliosides, the nerve cells of complex ganglioside deficient mice harbour only GM3 (Kawai *et al.*, 2001). No difference in paralytic half-time was observed when NMRI and wild-type C57BL/6 MPN hemidiaphragm preparations were compared.

Acknowledgements

We thank Nadja Krez, Beate Winter, Bianca Janzen and Gundhild Schmeding for excellent technical assistance, and Tino Karnath for support with FPLC. X-ray diffraction was in part carried out at the Stanford Synchrotron Radiation Light-source, a national user facility operated by Stanford University on behalf of the U.S. Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences. The SSRL Structural Molecular Biology Program is supported by the Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research, and by the National Institutes of Health, National Center for Research Resources, Biomedical Technology Program, and the National Institute of General Medical Sciences. This work was supported by grants from Bundesministerium für Bildung und Forschung to H. B. (01KI0742), by the Alfred P. Sloan Research Fellowship to R. J., by the start-up research fund from the Sanford-Burnham Medical Research Institute to R. J., and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft to T. B. (IIB2-Bi 660/2-3) and to S. J. (Exzellenzinitiative GSC108).

References

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., *et al.* (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 213–221.
- Binz, T., and Rummel, A. (2009) Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *J Neurochem* **109**: 1584–1595.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., and Jahn, R. (1993) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* **12**: 4821–4828.
- Brunger, A.T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**: 472–475.

- Chai, Q., Arndt, J.W., Dong, M., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2006) Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature* **444**: 1096–1100.
- Chen, C., Fu, Z., Kim, J.J., Barbieri, J.T., and Baldwin, M.R. (2009) Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin. *J Biol Chem* **284**: 26569–26577.
- Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., *et al.* (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **35**: W375–W383.
- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* **162**: 1293–1303.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W.H., Dean, C., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2006) SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* **312**: 592–596.
- Dong, M., Tepp, W.H., Liu, H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2007) Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons. *J Cell Biol* **179**: 1511–1522.
- Dong, M., Liu, H., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2008) Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell* **19**: 5226–5237.
- Eleopra, R., Tugnoli, V., Rossetto, O., Montecucco, C., and De Grandis, D. (1997) Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human. *Neurosci Lett* **224**: 91–94.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126–2132.
- Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N.F., Charles, I.G., Watts, C., *et al.* (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem* **275**: 8889–8894.
- Foran, P., Lawrence, G.W., Shone, C.C., Foster, K.A., and Dolly, J.O. (1996) Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. *Biochemistry* **35**: 2630–2636.
- Fotinou, C., Emsley, P., Black, I., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., *et al.* (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* **276**: 32274–32281.
- Fu, Z., Chen, C., Barbieri, J.T., Kim, J.J., and Baldwin, M.R. (2009) Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry* **48**: 5631–5641.
- Gronborg, M., Pavlos, N.J., Brunk, I., Chua, J.J., Munster-Wandowski, A., Riedel, D., *et al.* (2010) Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. *J Neurosci* **30**: 2–12.
- Habermann, E., Dreyer, F., and Bigalke, H. (1980) Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission *in vitro* like botulinum A toxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **311**: 33–40.
- Hayward, S., and Berendsen, H.J. (1998) Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins* **30**: 144–154.
- Herreros, J., Lalli, G., and Schiavo, G. (2000) C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem J* **347** (Part 1): 199–204.
- Herreros, J., Ng, T., and Schiavo, G. (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* **12**: 2947–2960.
- van Heyningen, W.E., and Miller, P.A. (1961) The fixation of tetanus toxin by ganglioside. *J Gen Microbiol* **24**: 107–119.
- Jaques, L.W., Brown, E.B., Barrett, J.M., and Brey, W.S.J.W. W., Jr (1977) Sialic acid. A calcium-binding carbohydrate. *J Biol Chem* **252**: 4533–4538.
- Jayaraman, S., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D., and Swaminathan, S. (2005) Common binding site for disialyllactose and tri-peptide in C-fragment of tetanus neurotoxin. *Proteins* **61**: 288–295.
- Jin, R., Rummel, A., Binz, T., and Brunger, A.T. (2006) Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* **444**: 1092–1095.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**: 2577–2637.
- Karalewitz, A.P., Kroken, A.R., Fu, Z., Baldwin, M.R., Kim, J.J., and Barbieri, J.T. (2010) Identification of a unique ganglioside binding loop within botulinum neurotoxins C and D-SA. *Biochemistry* **49**: 8117–8126.
- Kawai, H., Allende, M.L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., *et al.* (2001) Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J Biol Chem* **276**: 6885–6888.
- Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., and Furukawa, K. (1999) Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochim Biophys Acta* **1441**: 1–3.
- Korazova, L.K., and Montal, M. (2003) Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol* **10**: 13–18.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Furey, W., Navaza, J., Sax, M., and Swaminathan, S. (2009) Domain organization in *Clostridium botulinum* neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation. *J Mol Biol* **386**: 233–245.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* **40**: 658–674.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006) The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* **580**: 2011–2014.
- Montal, M. (2010) Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem* **79**: 591–617.
- Montecucco, C. (1986) How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem Sci* **11**: 314–317.
- Munro, P., Kojima, H., Dupont, J.L., Bossu, J.L., Poulain, B., and Boquet, P. (2001) High sensitivity of mouse neuronal

- cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 623–629.
- Muraro, L., Tosatto, S., Motterlini, L., Rossetto, O., and Montecucco, C. (2009) The N-terminal half of the receptor domain of botulinum neurotoxin A binds to microdomains of the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **380**: 76–80.
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1994) Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **269**: 10498–10503.
- Oguma, K., Yokota, K., Hayashi, S., Takeshi, K., Kumagai, M., Itoh, N., et al. (1990) Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin. *Lancet* **336**: 1449–1450.
- Osen-Sand, A., Staple, J.K., Naldi, E., Schiavo, G., Rossetto, O., Petitpierre, S., et al. (1996) Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J Comp Neurol* **367**: 222–234.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* **276**: 307–326.
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H., and Binz, T. (2003) Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J Mol Biol* **326**: 835–847.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004a) Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem* **279**: 30865–30870.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. (2004b) The Hcc-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol* **51**: 631–643.
- Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., et al. (2007) Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 359–364.
- Rummel, A., Hafner, K., Mahrhold, S., Darashchonak, N., Holt, M., Jahn, R., et al. (2009) Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J Neurochem* **110**: 1942–1954.
- Schiavo, G., Shone, C.C., Bennett, M.K., Scheller, R.H., and Montecucco, C. (1995) Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* **270**: 10566–10570.
- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* **80**: 717–766.
- Shields, G.C., Laughton, C.A., and Orozco, M. (1997) Molecular dynamics simulations of the d(T.A.T) triple helix. *J Am Chem Soc* **119**: 7463–7469.
- Simpson, L.L., and Rapport, M.M. (1971) The binding of botulinum toxin to membrane lipids: sphingolipids, steroids and fatty acids. *J Neurochem* **18**: 1751–1759.
- Stenmark, P., Dupuy, J., Imamura, A., Kiso, M., and Stevens, R.C. (2008) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b—insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog* **4**: e1000129.
- Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2010) Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding. *J Mol Biol* **397**: 1287–1297.
- Strotmeier, J., Lee, K., Volker, A.K., Mahrhold, S., Zong, Y., Zeiser, J., et al. (2010) Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner. *Biochem J* **431**: 207–216.
- Swaminathan, S., and Eswaramoorthy, S. (2000) Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol* **7**: 693–699.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Gronborg, M., Riedel, D., et al. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**: 831–846.
- Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M., and Kozaki, S. (2005) Binding of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins. *J Biol Chem* **280**: 35164–35171.
- Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T., and Kozaki, S. (2008) Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. *Microb Pathog* **44**: 484–493.
- Vaidyanathan, V.V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dorries, C., Bade, S., Nauenburg, S., et al. (1999) Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem* **72**: 327–337.
- Williamson, L.C., Halpern, J.L., Montecucco, C., Brown, J.E., and Neale, E.A. (1996) Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem* **271**: 7694–7699.
- Williamson, L.C., Bateman, K.E., Clifford, J.C., and Neale, E.A. (1999) Neuronal sensitivity to tetanus toxin requires gangliosides. *J Biol Chem* **274**: 25173–25180.
- Wohlfarth, K., Goschel, H., Frevert, J., Dengler, R., and Bigalke, H. (1997) Botulinum A toxins: units versus units. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **355**: 335–340.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

1 **Supporting Information**

2

Table S1: Interactions between sialic acid (Sia-1) and H_CC

Sia-1	Distance (Å)	H _C C
O4	2.84	A1126 (O)
O4	2.66	Y1146 (OH)
O7	2.88	S1128 (N)
O10	3.05	S1128 (N)
O10	2.80	R1129 (N)
O1A/O6/O7	(2.97/3.19/2.58) - WAT ^a - (3.14)	N1127 (OD1)
N5	(3.10) - WAT ^a - (2.90)	N1175 (OD1)

^a Interactions are mediated by water molecules (WAT). The distances between sialic acid and water molecule are listed in the left column, and that between water molecule and H_CC are listed in the right column.

3

Table S2: Interactions between sialic acid (Sia-2) and H_CC

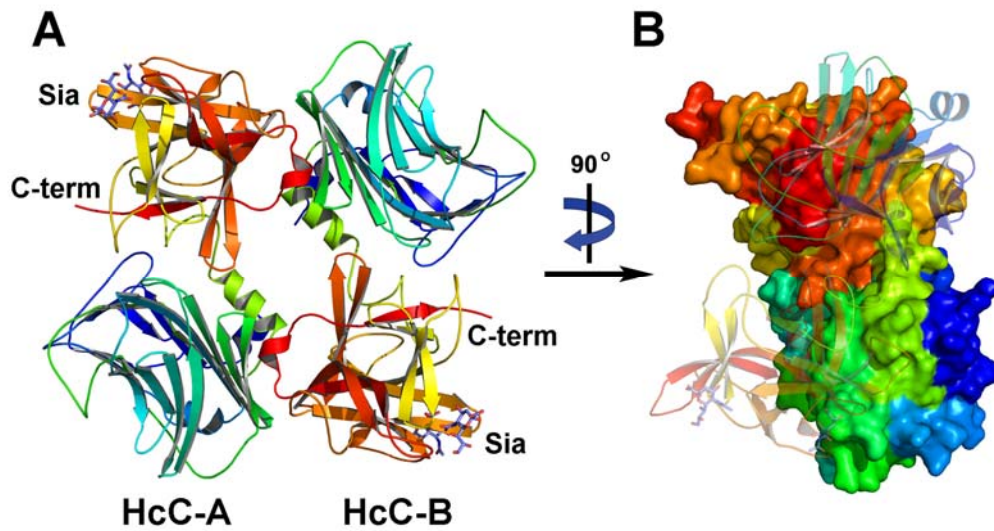
Sia-2	Distance (Å)	H _C C
O1A	2.68	Y1169 (OH)
O1A	2.69	D1171 (OD2)
O1B	3.32	D1171 (OD2)
O2	3.24	Y1169 (OH)
N5	2.83	Q1206 (OE1)
O7	2.64	T1207 (O)
O8	2.99	N1180 (ND2)
O9	2.46	N1180 (OD1)
O9	2.94	T1207 (N)
O9	3.28	T1207 (O)

4

5

6 C 1093 QYTNVVKDYWGNDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRN.....NN.
7 D 1080 ILRNVIKDYWGNPLKFDTEYYIIINDNYIDRYIAPESNVLVLVQYPD.....RS.
8 B 1079 SYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSPVGEILTRSKYNQ..NSKYINY
9 G 1087 SSTNTLKDFWGNPLRYDYOYLLFNQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRT...NFNNAAINY
10 E 1067 PNTNILKDFWGNLYLLYDKEYYLLNVLKPNNFIDRRKDSTLSINNIR.....STILLA
11 F 1087 PDPSILKNYWGNLYLLYNKKYYLFNLLRKDKYITLN.SGILNINQQRG...VTEGSVFLN
12 A 1092 SNSGILKDFWGDYLOYDKPYMMLNLYDPNKYVDVNNVVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLN
13 T 1109 LSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMYLTNAPSYTN..GKLNIIYY
14
15 C 1141 .DFNEG^YKI^IIKRIR...GNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADN...H
16 D 1128 .KLYTCNPITIKSVS...DKNPYSRILNGDNIILHMLYNSRKYMIIRD^TDTIYATQGGE
17 B 1137 RDLYIGEKFII^RRRKSN^SQ^SIN.DDIVRKEDYIYLDFFNLN.QEWRVYTYKYFKK.....
18 G 1143 QNLYLGLRFII^KKASNSRNINNDNIVREGDYIYLNIDNISDES^RVYV^LNSKE.....
19 E 1119 NRLYSGIKVKI^QRVN..NSSTNDNLVRKNDQVYIN^FVASKTHLFPLYADTATTN.....
20 F 1142 YKLYEGVEVI^IRKNGPIDISNTDNFVRKNDLAYIN.VVDRGVEYRLYADTKSE.....
21 A 1152 SSLYRGTKFI^IKKYA..SG.NKDNIVRNNDRVYIN.VVVKNKEYRLATNASQAG.....
22 T 1167 RRLYNGLKFII^KKRYTP..NNEIDSFV^KSGD^FIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNN....
23
24 C 1194 STEDIYAIGLREQTKDINDNII^FQI^QPMNNTYYYASQIFKSNFNGENIS^GICSIGTY...
25 D 1184 SQNCVYALKLQSNLGNYG.IGIFSIKNI^VSKN^KYCSQIFSS.FR.ENTMLLADIYK...
26 B 1189 .EEEKLF^LAPISDSDEFYNTI^QI^KEYDEQ.PTYSCQLL^FKKDEESTDEI^GLIGIHRFYES
27 G 1197 .IQ^TQLFLAPINDDPTFYDVL^QIKKYEK.TTYNCQILCEKD...TKTFGLFGIGK^FVKD
28 E 1171 .KEKTIKISSSGNR..FNQVVVMNS....VG.NCTMNF^KNN..NGNNIGLLGF^KADT..
29 F 1194 .KEKIIRTSNLNDS..LGQII^VMDS....IGNNCTMNFQ^N..NGSNI^GLLGFHSNN..
30 A 1202 .VEKILSALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDN..NGNDIGFIG^FHQFN^NI
31 T 1221 .LDRILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLR.DLKTYSVQLKLYDD..KNASLGLV^GTHNGQIG
32
33 C 1251RFR^LGD^WY^R.HNYLVPTVKQGN^YASLLEST^STH^WGFV^PVSE 1291
34 D 1237PWR^FS^FKNAYTPVAVTNYETKLLSTSS^FW^KFISRDPG^WVE 1276
35 B 1247 .GIVFEEYKDYFCI^SK^WY^LKEV^KRK^P.....YNLKL^GCN^WQ^FIPKDEG^WTE 1291
36 G 1252 YGYVWDTYDNYFCI^SQ^WY^LRRISENI.....NKLRL^GCN^WQ^FIPVDEG^WTE 1297
37 E 1218VVAST^WY^YTHMRDH.....TNSNG^CFW^NFISEEHG^WQEK 1251
38 F 1242LVASS^WY^YNNIRRN.....TSSNG^CFW^SSIKENG^WKE 1274
39 A 1259AKLVA^SN^WY^NRQIERS.....SRTL^GC^SW^EFIPVDDG^WGERPL 1296
40 T 1277NDPNRDILIAS^NW^YFNHLKDK.....IL^GC^DW^YFVPTDEG^WTND 1315
41
42

43 **Fig. S1.** Amino acid sequence alignment of TeNT (T) and BoNT (A-G) H_{CC}-fragments.
44 Identical amino acids are presented in white letters on black background. Amino acids conserved
45 in the majority of sequences are shaded grey, and those representing the SXWY...G motif are
46 highlighted as red characters. The database accession numbers of the neurotoxins used for the
47 alignment are: M30196 (BoNT/A), M81186 (BoNT/B), X53751 (BoNT/C), X54254 (BoNT/D),
48 X62089 (BoNT/E), M92906 (BoNT/F), X74162 (BoNT/G), and X04436 (TeNT).



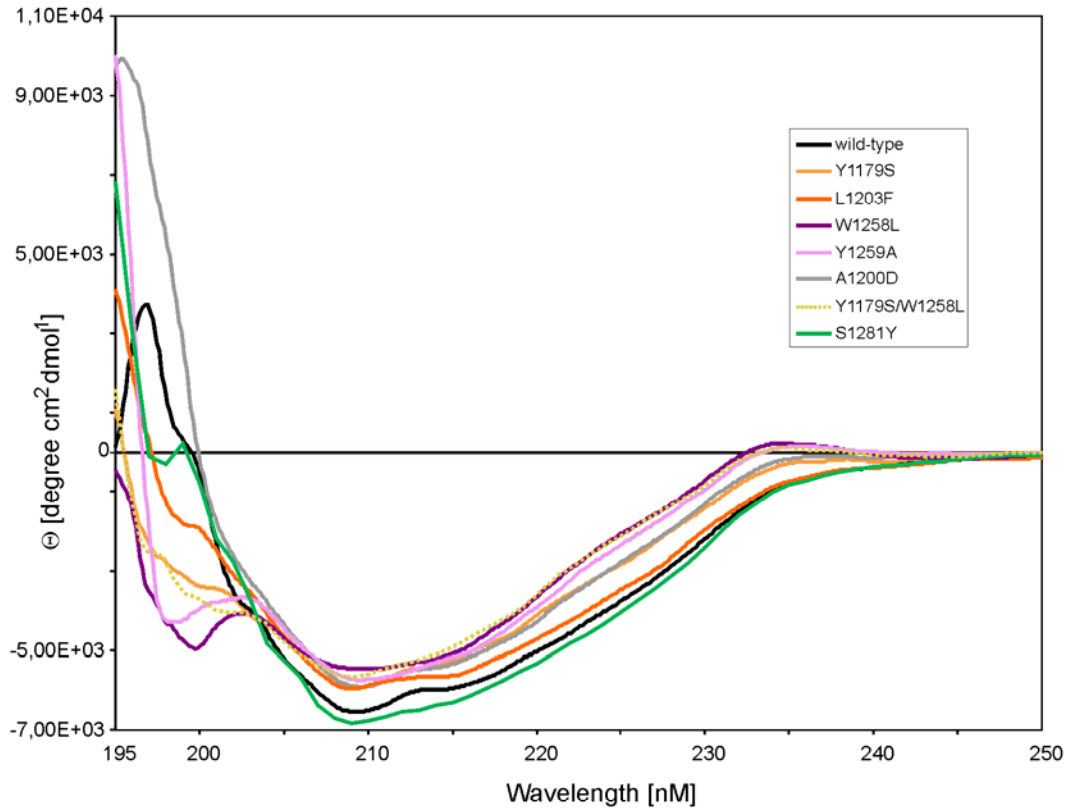
49

50

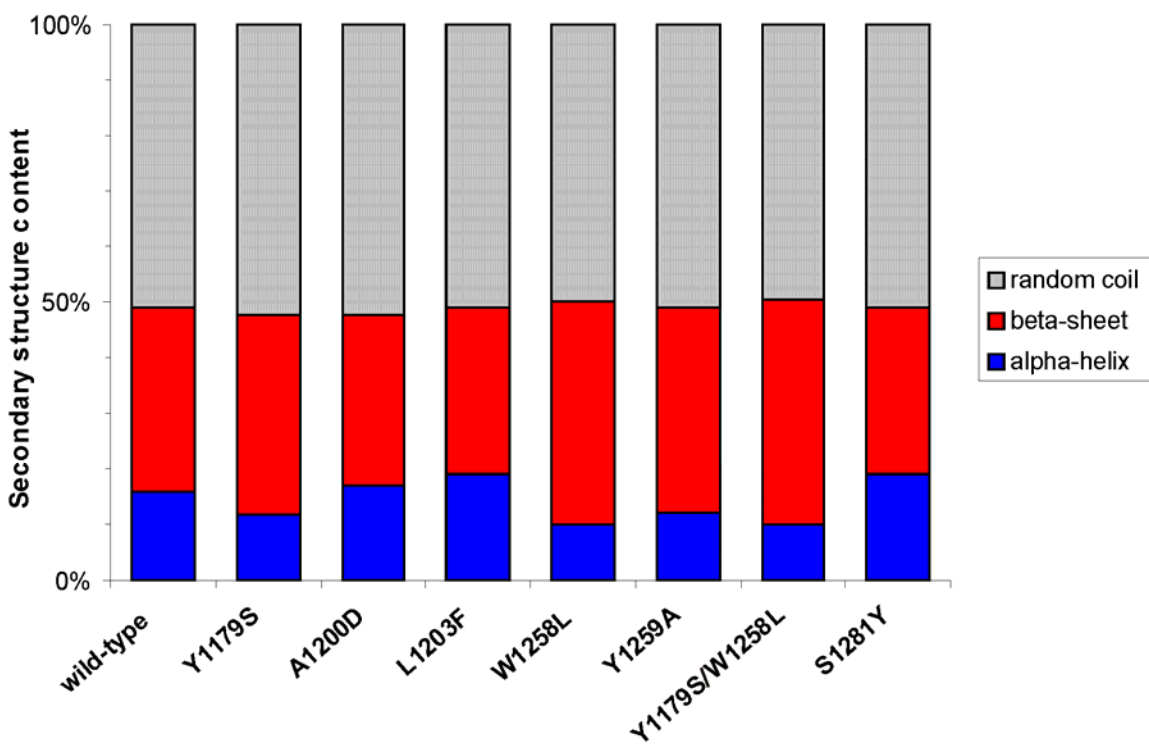
51 **Fig. S2.** H_CC forms a dimer.

52 (A) A head-to-tail dimeric H_CC is shown as a ribbon diagram. Each protomer is coloured in a
 53 rainbow spectrum varying from blue (N-terminus) to red (C-terminus). Symmetric intra-dimer
 54 interactions exist between the H_{CN} and H_{CC} domains. (B) The H_CC dimer is rotated 90° as
 55 indicated. The molecular surface of one protomer within a dimeric H_CC is shown in rainbow
 56 spectrum, the other as a transparent ribbon diagram.

A

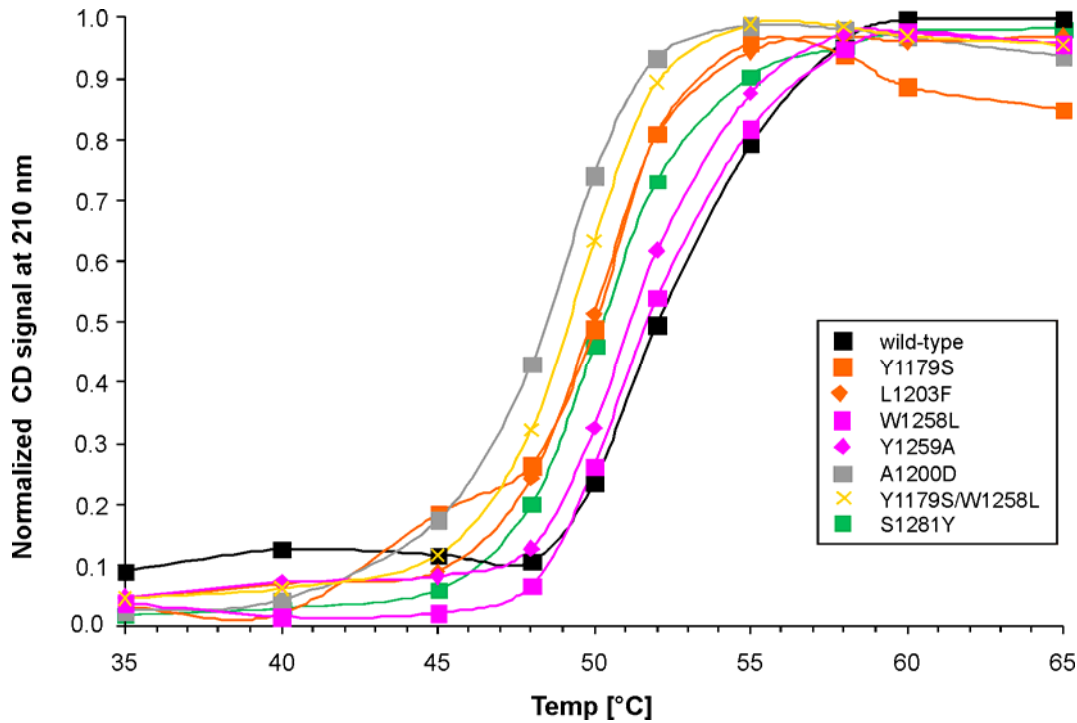


B



58 **Fig. S3.** Far UV CD-spectroscopy and secondary structure analysis of wild-type H_CC and its
59 mutants.

60 To exclude that impaired binding and impaired biological activity of individual mutants was due
61 to structural alterations, H_C-fragment mutants (Y1179S, A1200D, L1203F, W1258L, Y1259A,
62 S1281Y, Y1179S/W1258L) were analyzed by far UV CD-spectroscopy and thermal denaturation
63 experiments (Fig. S5). **(A)** Spectra were recorded at 22°C from 195-250 nm using a Jasco J-810
64 spectropolarimeter. CD-spectra of H_CC mutants were virtually indistinguishable from the
65 respective wild-type spectra. **(B)** Secondary structure content was calculated by the algorithm
66 K2d from the CD data between 200-240 nm content. Values averaged 14 ± 3 % α -helix, $35 \pm$
67 4 % β -sheet, and 51 ± 2 % random coil. Significant variations of the secondary structure content
68 did not become apparent for any of the mutants.



70

71

72 **Fig. S4.** Thermal denaturation of wild-type H_cC and its mutants.

73 Thermal denaturation experiments of wild-type and mutated H_cC yielded steep sigmoidal curves.

74 The melting temperature (T_m), defined by the inflection point, of wild-type H_cC was 52°C. T_m

75 values of the mutants Y1259S and the recently described W1258L (Rummel *et al.*, 2009) were

76 virtually indistinguishable from the wild-type value, whereas mutants Y1179S (50°C), L1203F

77 (50°C), and Y1179S/W1258L (49°C) displayed slightly reduced T_m values. Taking deviations of

78 $\pm 2^\circ\text{C}$ of T_m for separate measurements of the same sample into account, these results do not

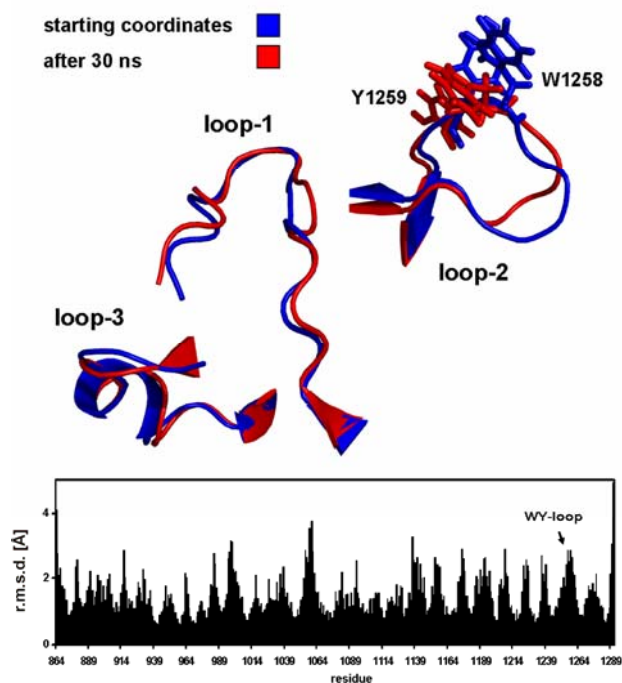
79 indicate structural disturbances in any of these mutants. However, A1200D showed an even

80 lower melting point, which might denote a structural damage. The fact that mutation did not

81 cause structural alterations was also evidenced via crystallization of H_cC-L1203F (Fig. S6). The

82 trace for a mutant of the second receptor-binding region is shown in gray and that for a mutant of

83 the established ganglioside-binding region in green. The traces for mutants of the WY-loop are
84 colored purple, whereas those for mutants of the Sia-1 site are depicted in orange.



85

86

87 **Fig. S5.** Molecular dynamics simulations of BoNT/C H_C-fragment (pdb code: 3R4U).

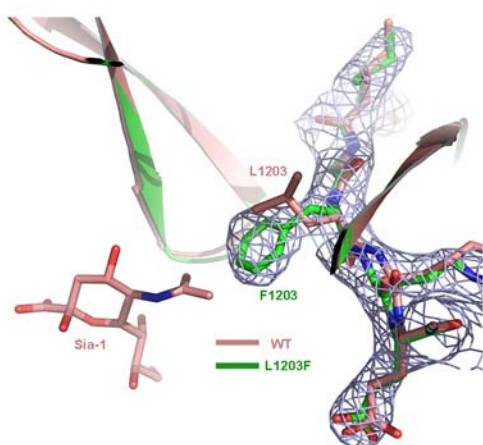
88 Cartoon representation showing loops 1, 2 (WY-loop), 3 of the first (in blue) and the last

89 trajectory (in red, 30 ns) of H_CC obtained at 310 K. The residues W1295 and Y1296 are

90 highlighted in sticks. The bar chart diagram shows the residue specific average r.m.s.d. at 310 K.

91 Note that the WY-loop does not reveal increased dynamics on a picosecond-to-nanosecond

92 timescale when compared to all the other loop regions in the protein.



93

94

95 **Fig. S6.** The L1203F mutation of H_CC interferes with ganglioside binding.

96 The structure of the wild-type H_CC in complex with sialic acid (pink) and apo H_CC-L1203F mutant
97 (green) are shown as ribbon diagrams. Selected residues around residue 1203 are shown as sticks.

98 A σ_A weighted 2Fo-Fc electron density map (contoured at 1.5 σ) around residue F1203 was shown

99 and overlaid with the final model.

100 CD spectroscopy
101 CD data was collected with a Jasco J-810 spectropolarimeter in a 1 mm path length cuvette with
102 a concentration of 3-4 μ M degassed H_CC in PBS. Spectra were recorded at 22°C from 195-
103 250 nm with 100 nm/min, response of 1 s, standard sensitivity, bandwidth of 1 nm and five
104 accumulations. Temperature-induced denaturation was performed by monitoring the CD signal
105 at 210 nm. Wild-type H_CC was measured with an average temperature increase of 0.5°C/min
106 from 20°C to 80°C.

107

108

109

110 **References**

111 Rummel, A., Hafner, K., Mahrhold, S., Darashchonak, N., Holt, M., Jahn, R., Beermann, S.,
112 Karnath, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2009) Botulinum neurotoxins C, E and F bind
113 gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with
114 botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J*
115 *Neurochem* **110**: 1942-1954.

116

117

Zusammenfassung und Diskussion

Wenn das natürlich vorkommende Botulinum Neurotoxin von Clostridien freigesetzt wird, liegt es in einem sogenannten PTC vor, der aus NAPs und dem BoNT besteht. Der kleinste der drei existierenden Komplexe besteht aus dem BoNT und dem NTNHA und hat eine Größe von ca. 300 kDa (M-PTC, 12S). Das BoNT wird im Magen-Darm-Trakt durch die nicht-toxischen Komponenten des PTC vor der Denaturierung durch sauren pH und dem Abbau durch pankreatische Enzyme geschützt.

Das Botulinum Neurotoxin und das NTNHA schützen sich gegenseitig durch Bildung eines miteinander verschlungenen Komplexes

Freies BoNT/A wird durch Proteasen wie Trypsin und Pepsin und bei einem pH-Wert < 4 nahezu komplett inaktiviert. Im Gegensatz dazu schützt das NTNHA von BoNT/A (NTNHA-A) das BoNT/A durch Bildung des M-PTC ab einem pH von 6,5 gegenüber Abbau durch Proteasen bzw. saure Hydrolyse, so dass das BoNT nahezu seine volle Aktivität behält (Gu et al. 2012). Der molekulare Aufbau der PTC ist zum größten Teil unbekannt. Bisher existieren lediglich zwei schwach aufgelöste EM-Strukturen von BoNT/A bzw. BoNT/D (Burkard et al. 1997; Hasegawa et al. 2007) sowie eine Antikörper-Kartierungs-Studie (Chen et al. 1997).

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, den M-PTC aus BoNT/A und NTNHA-A näher zu analysieren. Dazu wurden zunächst die inaktive Form des BoNT/A (BoNT/Ai) und das NTNHA-A in einen Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* co-exprimiert. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um R. Jin (Sanford-Burnam Institut, La Jolla, CA) ist es zum ersten Mal gelungen, den M-PTC für BoNT/A mit einer Auflösung von 2,7 Å bei pH 6,0 zu kristallisieren (Gu et al. 2012). Dabei zeigte sich, dass sich die eingesetzte rekombinante, inaktive Form des BoNT/A (BoNT/Ai) und das NTNHA-A in einem umschlungenen Komplex zusammenlagern, wodurch sich das NTNHA und das BoNT gegenseitig vor dem Abbau im GI-Trakt schützen. Auffällig war, dass das NTNHA-A eine sehr ähnliche Struktur zu der des BoNT/A annimmt, obwohl seine AS-Sequenzidentität (~20 %) sehr gering ist (Gu et al. 2012). So kann das NTNHA-A wie das BoNT auch in drei Domänen eingeteilt werden, die demzufolge als nLC, nH_N und nH_C (n für NTNHA) bezeichnet werden. Die charakteristischen strukturellen Eigenschaften, die dem BoNT/A seine Funktion verleihen, fehlen aber im NTNHA-A (Gu et al. 2012). So besitzt die nLC nicht das katalytische Zinkbindungsmotiv HEXXH...E und das Gangliosid-Bindungsmotiv E...H(K)...SXWY...G. Ebenfalls fehlt der lange, leicht zu hydrolysierende Loop sowie die Disulfidbrücke zwischen der nLC und nHC. Stattdessen besitzt das NTNHA-A in der nLC ein langes Insert (nG116-nA1148, benannt als

Zusammenfassung und Diskussion

nLoop) und wird zwischen nK133 und nK134 gespalten (Sagane et al. 2002; Gu et al. 2012). Im PTC mit gebundenen HA Proteinen wird diese Spaltstelle des NTNHA maskiert, so dass es nicht mehr an dieser Stelle gespalten werden kann (Kouguchi et al. 2002; Sagane et al. 2002). Die HA Proteine scheinen also in diesem Bereich zu binden. Die NTNHA von BoNT/A2, E und F besitzen diesen nLoop nicht und ebenfalls keine HA Proteine, so dass sie nur den M-PTC ohne HA Proteine bilden (Fujii et al. 1993; East und Collins 1994; Lin et al. 2010). Im Kristall zeigt sich, dass der nLoop exponiert ist, so dass HA Proteine hier gut binden könnten (Gu et al. 2012).

Das H_C-Fragment von BoNT/Ai bildet den Mittelpunkt des Kristalls und wird von allen drei Domänen des NTNHA-A umgeben. Aufgrund einer Rotation des BoNT/Ai H_C-Fragments von 140 ° um einen Linker zwischen H_N und H_C (L845–T876 in BoNT/A, im Folgenden als H_N-H_C-Linker bezeichnet) nimmt das BoNT/Ai in diesem Komplex mit NTNHA-A eine neue Konformation an. Dadurch rückt die Gangliosidbindungstasche in der Bindungsdomäne H_C des BoNT/Ai in die Nachbarschaft des C-terminalen Teils der H_N. Somit weicht die Quartärstruktur des komplexierten BoNT/Ai stark von der des freien BoNT/Ai sowie des nativen BoNT/A ab, in dem die Gangliosidbindungstasche im H_C eher zum N-terminalen Teil der H_N positioniert ist (Lacy et al. 1998; Gu et al. 2012). Diese Umorientierung des BoNT/Ai H_C-Fragments wird durch den H_N-H_C-Linker vermittelt. Zur weiteren Analyse dieses Linkers wurden zwei Mutanten hergestellt: BoNT/A-R861A/E868P/K871P, mit Prolinen, die die helikale Struktur zerstören sollten, und BoNT/A-L862K/L863E/T867K, mit zusätzlichen Ionenpaaren, die den helikalen Linker stärker stabilisieren sollten. In Bezug auf Proteinfaltung, Rezeptorbindungsaffinität und enzymatischer Aktivität der leichten Kette verhielten sich beide Mutanten identisch zum BoNT/A Wildtyp. Allerdings war ihre Toxizität im *mouse phrenic nerve* (MPN) Assay signifikant reduziert (Gu et al. 2012). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das BoNT/A H_C-Fragment durch die eingeführten Mutationen im Linker nicht optimal zur H_N-Domäne positioniert ist. Dadurch wird die Translokation der LC und folglich ihre biologische Aktivität vermindert. Somit ist die strukturelle Integrität des H_N-H_C-Linker wichtig für die optimale Positionierung der H_C und H_N (Gu et al. 2012).

Zwischen den jeweiligen H_C-Fragmenten von BoNT/Ai und NTNHA-A bilden sich viele polare Interaktionen aus (Gu et al. 2012). Insbesondere die Salzbrücken zwischen K1000-nD808, K1039-nE810, K1121-nD455, R1175-nD1110 und R1269-nE845 sorgen für einen festen Zusammenhalt. Mit Mutationsstudien und mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen essenziell für die Zusammenlagerung des Komplexes sind. Sie bindet BoNT/Ai mit einer K_d von 30,8 nM, H_CA mit einer K_d von 48,3 nM

Zusammenfassung und Diskussion

und H_CA K1000A mit einer K_d von 337,5 nM an das NTNHA-A (Gu et al. 2012).

Außerdem konnten mittels Punktmutationen Schlüsselpositionen im H_C-Fragment (E982 und D1037) in BoNT/A identifiziert werden, die für die pH-abhängige Zusammenlagerung von BoNT und NTNHA von großer Bedeutung sind (Gu et al. 2012). Die Substitution der protonierbaren Carboxyfunktion durch Amidgruppen (E982Q bzw. D1037N) an diesen beiden Positionen führen sowohl bei pH 6,0 als auch bei pH 7,5 zu einer signifikanten Bindung von der H_CA Mutante an NTNHA-A.

Verkürzungsstudien zeigten, dass auch das isolierte BoNT/A H_C-Fragment alleine an das NTNHA-A binden kann, wohingegen ein Konstrukt, dem die Bindungsdomäne fehlt (LH_N), nicht mehr an NTNHA-A bindet. Ebenso verliert das NTNHA, dem die nH_C oder nur der C-terminale Teil der nH_C (nH_{CC}) fehlt, seine Schutzfunktion bei pH 2, während ein Fehlen der nLC nur geringfügig den Schutz des BoNT/A vermindert (Gu et al. 2012).

Zusammenfassend konnte die erste Kristallstruktur eines BoNT im PTC, bestehend aus BoNT/Ai und NTNHA-A, mit einer Auflösung von 2,7 Å gelöst werden. Das NTNHA setzt sich wie das BoNT aus drei Domänen zusammen. Die Wechselwirkungen von H_C und nH_C sind essenziell für die Bildung des M-PTC und die Ausbildung der Schutzfunktion. Im Komplex nimmt das BoNT/A H_C im Vergleich zum freien BoNT/A eine andere Konformation ein, die durch den H_N-H_C-Linker vermittelt wird. Dieser Linker ist somit wichtig für die richtige Positionierung des H_C-Fragments zur H_N-Domäne sowohl bei der Komplexbildung als auch bei der durch niedrigen pH ausgelösten Kanalbildung der H_N. Für die pH-abhängige Zusammenlagerung des BoNT/A und NTNHA-A konnten Schlüsselpositionen identifiziert werden.

Mithilfe der Kristallstruktur des M-PTC von BoNT/A können neue Moleküle entwickelt werden, die die orale BoNT Intoxikation verhindern könnten. Außerdem könnte auf der Basis des Komplexes ein orales Arzneimittelfreisetzungssystem entwickelt werden, bei dem ein proteinhaltiges Arzneimittel an das BoNT gekoppelt und dessen Degradation durch Komplexbildung mit dem NTNHA geschützt wird.

Rolle des H_C-Fragments bei der Bindung an neuronale Rezeptoren

Nach der Resorption und Transzytose der BoNT, deren molekularer Mechanismus unbekannt ist, vermittelt wiederum das H_C-Fragment die neurospezifische Bindung an das Motoneuron. Eine Beteiligung von Gangliosiden bei der Bindung zahlreicher CNT war schon lange bekannt (Van Heyningen und Miller 1961; Simpson und Rapport 1971a, 1971b; Yowler und Schengrund 2004b). Zudem wurde angenommen, dass ein Proteinrezeptor für die Internalisierung der Neurotoxine benötigt wird (Montecucco 1986).

Analyse der Bindung von Botulinum Neurotoxin Serotyp B (BoNT/B) an humanes Synaptotagmin-II

Für BoNT/B ist bekannt, dass es ebenso wie BoNT/A sehr effektiv bei der Behandlung von zervikalen Dystonien ist (Comella 2008). Bei verschiedenen Studien an Menschen (Comella et al. 2005) und Mäusen (Callaway 2004; Hunt 2007; Allergan_Inc. 2011) zeigte sich, dass in Menschen eine 40-fach und in Mäusen eine 3-5-fach höhere Dosis von BoNT/B als von BoNT/A notwendig ist. Diese zehnfach schwächere Potenz von BoNT/B in Menschen gegenüber Mäusen muss auf speziesspezifische Unterschiede auf molekularer Ebene zurückzuführen sein. Da der von BoNT/B erkannte Bereich seines Substrats (Synaptobrevin 2) im Menschen und in der Maus zu 100 % identisch ist, könnte der Unterschied in der Potenz in der Rezeptorerkennung begründet sein. Die Proteinrezeptoren von BoNT/B sind Syt-I und -II.

Deshalb wurde die Aminosäuresequenz der intraluminalen Domäne von Synaptotagmin von Mensch, Schimpanse, Maus und Ratte (hSyt, cSyt, mSyt, rSyt) anhand eines Sequenzalignments auf Unterschiede analysiert. In allen Syt-I sind die drei wichtigen Aminosäuren (rSyt-I F39, F46, E49) für die Bindung an BoNT/B konserviert (Strotmeier et al. 2012). In rSyt-II spielen F47, F54 und E57 eine wichtige Rolle in der Bindung an BoNT/B (Chai et al. 2006; Jin et al. 2006). F47 und E57 sind in allen vier Spezies konserviert, aber die korrespondierende Aminosäure an der Position F54 in Maus und Ratte ist beim Menschen und Schimpansen zu Leucin (L51) mutiert. Dies stellt den einzigen Unterschied an interagierenden AS zwischen dem hSyt-II und m/rSyt-II dar (Strotmeier et al. 2012).

Das F54 wurde in rSyt-II 1-61 durch das korrespondierende Leucin ersetzt, um das hSyt-II nachzustellen, und so die Bindung von BoNT/B an hSyt-II in einem GST-Pulldown zu untersuchen. Im GST-Pulldown zeigte sich, dass H_CB mit 49 mol% an GST-rSyt-II 1-61 Wildtyp bindet (Strotmeier et al. 2012). Im Gegensatz dazu wird durch die Mutation F54L in GST-rSyt-II 1-61 (=hSyt-II) die Bindung von BoNT/B nahezu vollständig verhindert, da der

Phenylring, der die hydrophobe Interaktion mit BoNT/B vermittelt, entfernt wurde. Zuvor war bereits bekannt, dass auch die Mutation F54A die Bindung von BoNT/B aufhebt (Chai et al. 2006; Jin et al. 2006; Strotmeier et al. 2012). Somit wird BoNT/B von hSyt-II mit einer viel geringeren Affinität gebunden als von Maus oder Ratten Syt-II. Diese stark geschwächte Rezeptorerkennung erklärt die verminderte Potenz von BoNT/B in Menschen. Hier vermittelt vermutlich eher das um Faktor 100 niedriger affine Syt-I als Syt-II die Bindung an BoNT/B, da im hSyt-I die drei wichtigen Aminosäuren F40, F47, E50 konserviert sind (Strotmeier et al. 2012).

Gezielte Modifikationen der Syt-Bindungsstelle in BoNT/B könnten die Affinität an das humane Syt-II wieder verbessern und somit die Potenz im Menschen steigern. Dadurch könnte BoNT/B zu einer alternativen Behandlung für Patienten mit zervikalen Dystonien werden, die aufgrund von Antikörper Bildung gegen BoNT/A austherapiert sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das humane Syt-II im Gegensatz zum Ratten und Maus Syt-II kein hoch affiner Rezeptor für BoNT/B ist, da im hSyt-II das Phenylalanin, das in Maus und Ratte für die Bindung an BoNT/B relevant ist, durch ein Leucin in der luminalen Domäne ersetzt ist. Diese Mutation erklärt die unterschiedliche Potenz von BoNT/B in Menschen und Mäusen.

Für die fünf Serotypen BoNT/A, B, E, F und G konnte das von Montecucco postulierte „Zwei-Rezeptor-Modell“ bisher bestätigt werden. Für diese fünf Serotypen wurde gezeigt, dass sie zunächst an Ganglioside auf der neuronalen Zelloberfläche und anschließend an individuelle synaptische Proteinrezeptoren binden. In diesen fünf Serotypen ist das konservierte Gangliosid-Bindungsmotiv E...H(K)...SXWY...G in ihrer H_{CC}-Domäne vorhanden und funktionell aktiv. Für BoNT/C und D fehlten bis dato genauere Informationen zu ihren Rezeptoren bzw. ihrer Rezeptorerkennung.

Identifizierung und Charakterisierung der Rezeptorbindungsstellen von Botulinum Neurotoxin Serotyp D (BoNT/D)

Um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, ob BoNT/D auch gangliosidabhängig aufgenommen wird, wurde zunächst die Neurotoxizität von BoNT/D Wildtyp an gangliosiddefizienten Mäusen im MPN Assay getestet. Es wurden Zwerchfelle von KO-Mäusen verwendet, die entweder nur noch α -Serien Ganglioside (*St8sia1* ^{-/-}, Einzel-KO, EKO) oder nur noch das Gangliosid GM3 exprimierten (*St8sia1* ^{-/-} / *B4galnt1* ^{-/-}, Doppel-KO, DKO). Dabei zeigte sich eine starke Reduktion der Neurotoxizität von BoNT/D an den EKO- (14 %)

und DKO- (6 %) gegenüber Wildtyp-Mäusen (Strotmeier et al. 2010). Diese Ergebnisse beweisen, dass Ganglioside für die Aufnahme und somit die biologische Aktivität von BoNT/D eine wichtige Rolle spielen. Kürzlich konnten diese Ergebnisse durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt werden, die zeigten, dass keine Bindung mehr von BoNT/D an Neuronen von KO-Mäusen, die keine komplexen Ganglioside und stattdessen nur noch GM3 und GD3 exprimieren, erfolgte, solange keine exogenen Ganglioside zugegeben wurden (Peng et al. 2011).

Im Gegensatz dazu hatten Tsukamoto und Mitarbeiter keinen Einfluss auf die Neurotoxizität von BoNT/D bei KO-Mäusen, bei denen die GM3-Synthetase inaktiviert ist und die folglich nur noch Lac-Cer exprimieren sollten, gesehen (Tsukamoto et al. 2005). Diese widersprüchlichen Befunde von Tsukamoto und Mitarbeitern sind damit zu erklären, dass die Aufnahme von BoNT/D hier durch die alternativ exprimierten Ganglioside GM1b und GD1c vermittelt wird, also letztlich doch über Ganglioside. Im Gegensatz dazu exprimieren die für unsere Experimente verwendeten DKO-Mäusen kein anderes sialo-Gangliosid außer GM3 (Kawai et al. 2001).

Anhand unserer Ergebnisse spielen Ganglioside, insbesondere solche der b-Serie, wie GT1b und GD1b, für die Aufnahme von BoNT/D folglich eine physiologisch essenzielle Rolle. Die Bindung von BoNT/D an Ganglioside konnte auch durch MALDI-ToF-MS Experimente bestätigt werden. Hierbei war nach der Inkubation von H_CD mit GT1b zusätzlich zur Muttermasse (50.266 Da) ein Signal bei 51.921 Da zusehen. Diese Massenzunahme beruht auf der Bindung von einem Molekül GT1b an BoNT/D (Strotmeier et al. 2010). Diese Ergebnisse werden auch durch frühere Studien gestützt, die gezeigt hatten, dass die biologische Aktivität von BoNT/D sowohl in Mäusen als auch an Ratten-Zwerchfellen durch die Vorinkubation von BoNT/D mit GT1b vermindert wurde (Simpson und Rapport 1971a). Ebenfalls konnte in einem Kohlenhydrat-Screening gezeigt werden, dass das H_C-Fragment von BoNT/D die höchste Affinität an das Disialogangliosid GD2 hat (Kroken et al. 2011). GD2, GD1b und GT1b haben gemeinsam, dass sie zwei Sialinsäuren an der membrannahen Galactose besitzen. Somit scheint Sialinsäure ein direkter Bindungspartner von BoNT/D zu sein. Zwei Arbeitsgruppen haben auch eine Bindung von BoNT/D an PE gezeigt (Tsukamoto et al. 2005; Zhang et al. 2010b). Es ist aber eher unwahrscheinlich, dass PE als neurospezifischer Rezeptor für BoNT/D fungiert, da PE hauptsächlich auf der cytosolischen Seite der Membran vorkommt (Op den Kamp 1979). Allerdings wurde schon gezeigt, dass PE durch ATP-Bindekassetten-Transporter an die Außenseite der Membran gelangt (Williamson und Schlegel 2002).

Zusammenfassung und Diskussion

Aufgrund der geringen Homologie der H_{CC}-Domäne von BoNT/D zu den anderen Serotypen war es nur sehr schwer möglich, anhand eines Sequenzalignments mit den anderen BoNT Serotypen Anhaltspunkte für potenzielle Rezeptorbindungsstellen zu erhalten. BoNT/D besitzt auch nicht das Gangliosid-Bindungsmotiv (Rummel et al. 2004a; Tsukamoto et al. 2008). Mittels Strukturvorhersagen konnte ein putativ helikales 20 mer Peptidmotiv, welches reich an aromatischen Aminosäuren ist (**Y-1235-KPWRFSEFKNAYTPVAVTNY-1254**), identifiziert werden, das an der Bindung von BoNT/D an neuronale Zellen beteiligt sein könnte. Dieses 20 mer Peptid liegt im Sequenzalignment im Bereich der konservierten Gangliosidbindungsstelle der anderen BoNT. Mittels gerichteter Mutagenese wurde dieses 20 mer Peptid näher charakterisiert.

Zusätzlich wurde die Kristallstruktur des H_CD-Fragments (S863–E1276) mit einer Auflösung von 1,72 Å mittels Röntgenstrukturanalyse (PDB: 3OBR) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von R. Jin (Sanford-Burnam Institut, La Jolla, CA) bestimmt. Die Elektronendichte war für alle Reste außer für G1180 und G1181 deutlich sichtbar. Diese beiden Positionen liegen auf einem flexiblen Oberflächenloop mit minimaler Elektronendichte und wurden nicht modelliert. Die H_{CN}-Domäne von BoNT/D (S863–R1082) besteht aus zwei anti-parallelen β -sheets, die in einem *jelly roll* Fassmotiv angeordnet sind. Die H_{CC}-Domäne (N1083–E1276) nimmt eine β -trefoil Struktur an (Strotmeier et al. 2010). Somit ist die Grundstruktur von H_CD sehr ähnlich zu den anderen BoNT H_C-Fragmenten (Chai et al. 2006; Jin et al. 2006; Stenmark et al. 2008; Fu et al. 2009; Kumaran et al. 2009; Schmitt et al. 2010; Stenmark et al. 2010).

Parallel zu unserer Kristallstruktur wurde die Kristallstruktur von H_CD auch durch andere Arbeitsgruppen aufgeklärt (s. Tabelle 3, Karalewitz et al. 2010; Zhang et al. 2010b). Die C α -Atome dieser Strukturen haben zu unserer Kristallstruktur über 402 bzw. 400 AS RMSD Werte von 1,0 bzw. 0,59 Å und sind unserer Struktur folglich sehr ähnlich. Da die Mutanten H_CD-F1240A und H_CD-W1238A eine stark verminderte Bindung an Synaptosomen aufwiesen, wurde auch von diesen zwei Mutanten die Kristallstruktur bestimmt (Strotmeier et al. 2010; Kroken et al. 2011). Ebenso wurde die Kristallstruktur des H_C-Fragments von einem C/D Mosaiktoxin gelöst (Karalewitz et al. 2010; Zhang et al. 2011a, s. Tabelle 3).

Unsere Struktur von H_CD wurde mit H_CA und H_CB verglichen, da diese beiden sowohl biochemisch als auch kristallographisch am besten charakterisiert sind. Dabei zeigte sich in neun Loops ein struktureller Unterschied zwischen H_CD und H_CA bzw. H_CB (Strotmeier et al. 2010). Besonders auffällig waren hier zwei Loops, die an der Rezeptorbindung beteiligt sein könnten: Loop Y1235-Y1246 und V1251-S1262. Interessanterweise decken diese beiden Loops zum größten Teil auch das mittels Strukturvorhersagen identifizierte 20 mer Peptid ab.

Zusammenfassung und Diskussion

Das Gegenstück zum ersten Loop Y1235-Y1246 ist in H_CB so positioniert, dass es die Gangliosid- und die Proteinrezeptorbindungsstelle räumlich voneinander trennt. In H_CD könnte dieser Loop aufgrund seiner hydrophoben Aminosäuren an der Membranbindung beteiligt sein. Zudem ist dieser Loop in H_CD näher an der Stelle positioniert, wo sich in H_CB die Proteinrezeptorbindungsstelle befindet, und verhindert dadurch in H_CD vermutlich die Bindung an Syt-II (Strotmeier et al. 2010; Zhang et al. 2010b). Biochemisch konnte eine Bindung von BoNT/D an Syt bisher auch nicht bestätigt werden (Rummel et al. 2004b; Kroken et al. 2011; Peng et al. 2011). Außerdem behaupten Zhang et al., dass die Bindung von BoNT/D an SV2 in diesem Bereich aufgrund der räumlichen Anordnung vermutlich ausgeschlossen werden kann (Zhang et al. 2010b). Dennoch deutet die stimulationsabhängige Aufnahme von BoNT/D auf eine Beteiligung von synaptischen Vesikeln hin (Rummel et al. 2009; Peng et al. 2011). Kürzlich wurde die direkte Bindung von BoNT/D nur an SV2B gezeigt (Peng et al. 2011), allerdings bleibt die Interaktion sowohl in H_CD als auch in SV2 unidentifiziert. Kroken et al. konnten die direkte Bindung von H_CD an SV2 nicht bestätigen. Sie schließen aber nicht aus, dass es an der schwachen Affinität von H_CD an SV2 liegen könnte (Kroken et al. 2011). Dabei ist auch anzumerken, dass die Gruppe um Dong 100-fach mehr H_CD in ihrer Coimmunopräzipitation eingesetzt hatte als die Gruppe um Barbieri in ihrem GST-Pulldown/Coimmunopräzipitation (Kroken et al. 2011; Peng et al. 2011). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass BoNT/D bei einem saurem pH-Wert des Umgebungsmediums direkt über die Zellmembran in CGN und PC12-Zellen aufgenommen wird (Pirazzini et al. 2011). Im Gegensatz dazu wird BoNT/A, dessen Proteinrezeptor erwiesenermaßen SV2 ist, bei saurem Milieu nicht in diese Zellen aufgenommen. Wahrscheinlich befinden sich unter diesen experimentellen Bedingungen nicht ausreichend SV2 auf der Oberfläche der Zellen (Pirazzini et al. 2011). Dies spräche aber auch gegen SV2 als Rezeptor von BoNT/D. Nach diesem Resultat wäre es möglich, dass BoNT/D alleine durch Interaktionen mit Gangliosiden oder anderen synaptischen Vesikel Proteinen in die Nervenzelle aufgenommen wird. Ob SV2 als Proteinrezeptor von BoNT/D dient, bleibt also weiterhin unklar.

Der zweite Loop V1251-S1262 nimmt eine signifikant andere Konformation an als es in den korrespondierenden Loops der anderen BoNT Serotypen der Fall ist. In H_CA enthält der Loop fünf Aminosäuren, die direkt an der Bindung mit GT1b beteiligt sind (Rummel et al. 2004a; Stenmark et al. 2008). Deshalb wird dieser Loop im Folgenden als „konservierte Bindungsstelle“ bezeichnet. Die Funktion beider Loops für H_CD wurde biochemisch näher untersucht.

Neben dem Kristall der Apostruktur des H_C-Fragments von BoNT/D konnte auch die Kristallstruktur von H_CD im Komplex mit Sialinsäure (NAcNeu) gelöst werden. Dies gelang

Zusammenfassung und Diskussion

mit einer Auflösung von 2,0 Å (PDB: 3OBT). Die Bindung der Sialinsäure erfolgt im Bereich der Aminosäuren N1173, K1192 und W1238 an R1239 (Strotmeier et al. 2010) und wird im Folgenden als „Sialinsäurebindungsstelle“ bezeichnet. Diese Sialinsäurebindungsstelle überlappt zum Teil mit der Proteinrezeptorbindungsstelle in BoNT/B und G (Rummel et al. 2007) und ähnelt der Sialinsäurebindungsstelle in TeNT, wobei das Arginin R1239 in H_CD die funktionelle Rolle des R1226 aus der „R-Tasche“ in TeNT annimmt (Fotinou et al. 2001; Rummel et al. 2003; Strotmeier et al. 2010). Biochemische Daten unterstützen diese Beobachtung, da H_CD die Potenz von TeNT und H_CT die von BoNT/D im MPN Assay vermindert (Rummel et al. 2009). Dies lässt darauf schließen, dass sie um den gleichen Rezeptor kompetieren, der über das Arginin gebunden wird.

Außerdem konnten mehrere Glycerinmoleküle im Co-Kristall von H_CD mit Sialinsäure identifiziert werden. U.a. bindet ein Glycerin in dem bereits oben beschriebenen Bereich der konservierten Bindungsstelle (Loop V1251-S1262), welcher in H_CA GT1b und in BoNT/B Sialyllactose bindet (Swaminathan und Eswaramoorthy 2000b; Stenmark et al. 2008). Dieser Bereich ist die konservierte Gangliosidbindungstasche. Daher wird vermutet, dass BoNT/D in diesem Bereich eine zweite Bindungstasche besitzt. Diese enthält aber im Gegensatz zu den anderen BoNT Serotypen nicht das konservierte Gangliosid-Bindungsmotiv und bindet deshalb vermutlich andere Kohlenhydrate bzw. neuronalen Polysialoganglioside mit niedriger Affinität an dieser Stelle.

Der Bereich der konservierten Bindungsstelle (Loop V1251-S1262), die Sialinsäurebindungsstelle und der hydrophobe Loop F1242-Y1246 stellen somit potenzielle Bindungsbereiche in BoNT/D dar. Die Schlüsselstellen dieser Bereiche wurden mittels gerichteter Mutationsstudien näher analysiert.

Zunächst wurde die Bindung an frisch isolierten Synaptosomen aus Rattengehirn untersucht, die komplexe Polysialoganglioside in physiologischer Umgebung auf ihrer äußeren Membran besitzen. Die Mutanten, die einen Effekt in diesem Assay aufwiesen, wurden als volle Länge BoNT-Mutanten generiert und ihre Toxizität im MPN Assay bestimmt.

Die Mutationen von F1242 und Y1246 aus dem Loop F1242-Y1246 zu Alanin bzw. Serin zeigten sowohl eine verminderte Bindung an Synaptosomen als auch eine verringerte Toxizität im MPN Assay. Mittels dieses hydrophoben Bereichs könnte das H_C-Fragment von BoNT/D mit der neuronalen Membran interagieren (Strotmeier et al. 2010).

Tsukamoto und Mitarbeiter haben 2008 demonstriert, dass die Positionen E1114 und G1132 eine Rolle in der Bindung spielen (Tsukamoto et al. 2008). In der Kristallstruktur ist aber zu erkennen, dass keiner der beiden Reste direkt an der Bildung der Sialinsäure- oder konservierten Bindungstasche beteiligt ist. Allerdings bildet E1114 eine Salzbrücke mit

Zusammenfassung und Diskussion

K1243 und stabilisiert dadurch den Loop Y1235-Y1246, der wichtig für die Sialinsäurebindung ist.

Im Bindungsassay an Synaptosomen zeigte die Mutation des R1239 aus der Sialinsäurebindungsstelle in Alanin oder Tyrosin eine um 80 % bzw. 65 % reduzierte Bindung gegenüber H_CD Wildtyp, da durch das Entfernen der Guanidiniumgruppe die Salzbrücke zur Sialinsäure zerstört wurde. Ebenfalls zeigten Mutationen an den Positionen W1238 und F1240 eine stark verminderte Bindung. Diese beiden Aminosäuren könnten mit der Galactose in der Kohlenhydratkette der Ganglioside interagieren, aber auch strukturelle Aufgaben haben (Strotmeier et al. 2010). In der Kristallstruktur der Mutante H_CD-W1238A zeigte sich, dass aufgrund der Mutation von W1238A die Struktur des Loops Y1235-Y1246 ungeordnet ist und nicht mehr der des H_CD Wildtyps entspricht (Kroken et al. 2011). Das W1238 scheint den Loop Y1235-Y1246 also zu stabilisieren (Kroken et al. 2011). Im Gegensatz dazu entspricht in der Mutante H_CD-F1240A die Struktur des Loops der des H_CD Wildtyps (Kroken et al. 2011). Im MPN Assay konnte der Effekt der drei Mutanten R1239, W1238 und F1240 bestätigt werden. Sie zeigten alle eine stark reduzierte Neurotoxizität im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutante R1239A wurde ebenfalls an Zwerchfellen von KO-Mäusen getestet, die nur noch die α -Serien Ganglioside exprimieren. Dabei zeigte sich eine weitere Reduktion in der biologischen Aktivität dieser Mutanten. Dies deutet darauf hin, dass es neben dieser Bindungstasche noch eine weitere Bindungsstelle für Ganglioside in BoNT/D geben muss.

Durch biochemische Studien kann die Bedeutung dieses Bereiches für die Wechselwirkung mit Zellrezeptoren also bestätigt werden. Die zentrale Rolle spielt das R1239, analog zu TeNT, in dem auch ein Arginin (R1226) eine zentrale Rolle in der Bindung an Sialinsäure spielt (Fotinou et al. 2001; Rummel et al. 2003; Jayaraman et al. 2005; Chen et al. 2009). Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass das F1240 eine wichtige Aminosäure für die Bindung darstellt (Kroken et al. 2011), wobei diese im Co-Kristall mit Sialinsäure weiter von der Sialinsäure entfernt positioniert ist als das R1239 und keine Interaktion mit der Sialinsäure eingeht. F1240 interagiert also eher mit einem membrannäheren Zuckerrest.

Die Mutation K1192A in der Sialinsäurebindungsstelle, zur Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindung zur Sialinsäure, zeigte nur einen leichten Effekt bei der Bindung an Synaptosomen, wohingegen die Doppelmutante K1192A/R1239A die Bindung an Synaptosomen noch stärker reduziert als die Einzelmutation an der Stelle R1239 in Alanin oder Tyrosin. Im MPN Assay zeigte diese Doppelmutante kaum noch Aktivität. Dies lässt darauf schließen, dass die K1192 keine Rolle spielt, wenn R1239 vorhanden ist. Wenn die Guanidiniumgruppe an Position 1239 aber fehlt, könnte das benachbarte K1192 dessen

Zusammenfassung und Diskussion

Fehlen teilweise kompensieren.

Die Mutationen in den Aminosäurepositionen D1233, Y1235 und V1251 aus der konservierten Bindungsstelle zeigen ebenfalls eine schlechte Bindung an Synaptosomen. Im MPN Assay weisen diese drei Mutanten einen moderaten Effekt gegenüber H_CD Wildtyp auf. Dies deutet darauf hin, dass es sich in diesem Bereich um eine zweite Gangliosidbindungsstelle handelt, auch wenn das konservierte Gangliosid-Bindungsmotiv in diesem Bereich fehlt.

Eine Doppelmutante, die D1233A aus der konservierten Bindungsstelle und R1239A aus der Sialinsäurebindungsstelle beinhaltet, zeigt kaum noch Bindung an Synaptosomen, da durch die Mutationen beide Bindungsstellen inaktiviert wurden und somit keine Bindung mehr erfolgen kann. Dies unterstützt die Theorie von zwei Rezeptorbindungstaschen in BoNT/D (Strotmeier et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass BoNT/D vermutlich gangliosidabhängig über zwei Kohlenhydratbindungsstellen an neuronale Membranen bindet.

Identifizierung und Charakterisierung der Rezeptorbindungstaschen von Botulinum Neurotoxin Serotyp C (BoNT/C)

Für BoNT/C wird schon länger diskutiert, ob es im Gegensatz zu den anderen BoNT ausschließlich über Ganglioside an die neuronale Zelle bindet und aufgenommen wird (Tsukamoto et al. 2005). BoNT/C besitzt nicht das konservierte Gangliosid-Bindungsmotiv E...H(K)...SXWY...G, sondern eine abgewandelte Form, bei der das Glycin und das Serin in der Primärsequenz die Positionen getauscht haben (**G**XWY . . . **S**) (Strotmeier et al. 2011). Bei dem Tryptophan dieses Motivs handelt es sich um das W1258, das bereits zuvor analysiert wurde. Durch Mutationen an dieser Position wurde die Bindung an Rattengehirnsynaptosomen und isoliertes Gangliosid GT1b stark reduziert (Tsukamoto et al. 2008; Rummel et al. 2009).

Um einen Anhaltspunkt für potenzielle Bindungstaschen in BoNT/C zu bekommen, wurde zunächst die Kristallstruktur des H_C-Fragments von BoNT/C (N867-E1291) mit einer Auflösung von 2,2 Å in Kooperation mit R. Jin (Sanford-Burnam Institut, La Jolla, CA) bestimmt (PDB: 3R4U). Für alle Positionen war die Elektronendichte sichtbar und es zeigte sich, dass die Kristallstruktur von apo-H_CC in ihrer Kernstruktur sehr ähnlich zu der Kristallstruktur der anderen BoNT H_C-Fragmente ist. Parallel zu dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur von H_CC auch durch eine andere Arbeitsgruppe gelöst (Karalewitz et al. 2010, PDB: 3N7K, 2,5 Å, s. Tabelle 3), die zu unserer Kristallstruktur einen RMSD Wert von 8,07 Å

Zusammenfassung und Diskussion

(alle Peptidkettenatome; 8,15 Å: nur C α -Atome (867-1290), G1057 und L1058 fehlen in 3N7K) hat. Die H_{CN}-Domäne von BoNT/C bildet genauso wie die H_{CND} zwei antiparallele β -sheets, die in einem *jelly roll* Fassmotiv angeordnet sind. Die H_{CC}C nimmt eine β -trefoil-Struktur an. Auffällig ist, dass die H_{CN} und H_{CC}-Domäne in der Struktur von H_CC in einem Winkel von 17,2 ° zueinander stehen, was in den anderen BoNT Serotypen nicht vorliegt. Für weitere strukturelle Vergleiche wurden die Kristallstrukturen von H_CA und H_CB herangezogen, da diese beiden Serotypen sowohl biochemisch als auch kristallographisch am besten charakterisiert sind (Rummel et al. 2004a; Jin et al. 2006; Stenmark et al. 2008). Dabei stellten sich in mehreren exponierten Loops starke strukturelle Unterschiede heraus. Die größten Konformationsänderungen befinden sich in der H_{CC}-Domäne in den drei Loops F1182-D1197 (Loop-1), R1251-Y1263 (Loop-2) und K1269-S1281 (Loop-3) (Strotmeier et al. 2011). Loop-1 und Loop-3 befinden sich in der Nähe der konservierten Gangliosidbindungstasche der anderen CNT. Der zum Loop-3 korrespondierende Loop in H_CA ist direkt an der Gangliosidbindung beteiligt und trägt auch das Gangliosid-Bindungsmotiv. In BoNT/C hingegen enthält der Loop-2 die Aminosäuren W1258 und Y1259, die Teil des abgewandelten Gangliosid-Bindungsmotivs in BoNT/C sind. Deshalb wird dieser Loop-2 im Folgenden als „WY-Loop“ bezeichnet. Der WY-Loop ragt trotz seiner hydrophoben Seitenketten aus der Oberfläche von H_CC heraus, bildet so eher einen Ankerpunkt als eine Vertiefung und ist damit einzigartig unter allen BoNT H_C-Strukturen. Die kürzlich gelöste Kristallstruktur von H_CC durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigte diese Anordnung (Karalewitz et al. 2010). Eine mögliche Rückfaltung des WY-Loops in Lösung in die Richtung von Loop-3 konnte mittels *molecular dynamics simulations* weitgehend ausgeschlossen werden (Strotmeier et al. 2011).

Neben der Apostruktur des H_CC wurde auch die Raumstruktur des H_C-Fragments von BoNT/C mit daran gebundener Sialinsäure bestimmt. Dies gelang mit einer Auflösung von 2,15 Å (PDB: 3R4S). An zwei Stellen hat je ein Molekül Sialinsäure gebunden. Diese beiden Stellen werden im Folgenden als Sia-1 und Sia-2 bezeichnet. Durch die Bindung der Sialinsäuren wurde keine Konformationsänderung im Vergleich zur H_CC-Apostruktur induziert. Sia-1 liegt in der Nähe der Sialinsäurebindungsstelle in TeNT und BoNT/D bzw. der Proteinrezeptorbindungsstelle in BoNT/B und G (Emsley et al. 2000; Chai et al. 2006; Jin et al. 2006; Rummel et al. 2007; Strotmeier et al. 2010). Eine zentrale basische AS, die die Rolle der Arginine in TeNT (R1226) und BoNT/D (R1239) einnimmt, fehlt aber in diesem Bereich. Stattdessen zeigt die Carboxygruppe der Sialinsäure aus der Tasche heraus. Dadurch wird die Koordination sowohl des α - als auch des β -Anomers ermöglicht. Zudem gibt es in dem Bereich der gebundenen Sialinsäure viele Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen. Durch diese beiden Charakteristika unterscheidet sich diese

Zusammenfassung und Diskussion

Bindungsstelle sehr stark von den äquivalenten Bindungsstellen in BoNT/B, D, G und TeNT.

Das Sialinsäuremolekül der Sia-2 Tasche war analog zu Gal und NAcGal im Kristall mit H_CT (Emsley et al. 2000) auf der gegenüberliegenden Seite der konservierten Gangliosidbindungsstelle positioniert und bildet zu Y1169, D1171, N1180, Q1206 und T1207 Wasserstoffbrückenbindungen aus.

Somit haben sich anhand der Apo- und Co-Kristallstruktur drei potenzielle Bindungsstellen in BoNT/C ergeben: der WY-Loop, Sia-1 und Sia-2. Diese drei Bereiche sowie der Bereich, der der etablierten Gangliosidbindungstasche der anderen H_C-Fragmente entspricht, und der Bereich homolog zur zweiten Rezeptorbindungstasche, die bislang in BoNT/B, G und TeNT identifiziert worden waren, wurden biochemisch näher analysiert.

Die Bindung von radioaktiv markierten H_C-Mutanten wurde an Synaptosomen aus Rattengehirn untersucht, die Ganglioside in physiologischen Umgebung auf ihrer äußeren Membran enthalten. Die Mutation W1258L aus dem WY-Loop reduziert die Bindung auf ca. 43 % gegenüber Wildtyp. Somit konnte das Ergebnis von Rummel et al. bestätigt werden (Rummel et al. 2009). Tsukamoto et al. zeigten, dass die Mutationen von W1258 zu Alanin und Phenylalanin die Bindung an Synaptosomen ebenfalls stark bzw. signifikant reduzieren (Tsukamoto et al. 2008). Auch die Bindung der Mutanten Y1179S bzw. L1203F aus dem Sia-1 Bereich ist im Vergleich zum Wildtyp stark abgeschwächt. Eine Doppelmutante mit je einer Mutation im WY-Loop und einer im Sia-1 Bereich (Y1179S/W1258L) vermindert die Bindung noch stärker. Die Mutationen im Sia-2 Bereich zeigen ebenso wie die Mutationen im Bereich der zweiten Rezeptorbindungstasche keinen Effekt auf die Bindung an Synaptosomen. Auch die beiden Arginine R1253 und R1260, für die von Barbieri und Mitarbeitern eine Beteiligung an der Gangliosidbindung vorgeschlagen wurde (Karalewitz et al. 2010), befinden sich im Bereich der zweiten Rezeptorbindungstasche. Mutationen an diesen beiden Stellen zeigen aber keinen Einfluss auf die Bindung an Synaptosomen. Somit kann eine Bindung von BoNT/C an die neuronale Membran über Ganglioside durch den Sia-2 Bereich und den Bereich der zweiten Rezeptorbindungstasche ausgeschlossen werden. Von den Mutanten aus dem Bereich der etablierten Gangliosidbindungstasche zeigt nur die Mutante S1281Y eine reduzierte Bindung an Synaptosomen.

Zudem wurde die biologische Aktivität der volle Länge Mutanten im MPN Assay untersucht. Hierbei zeigten die Mutationen an beiden Positionen W1258 und Y1259 des WY-Loops eine starke Reduktion in der Neurotoxizität von BoNT/C. Diese Effekte sind aber eine Größenordnung geringer (10 zu 1 %) als die Effekte entsprechender Mutationen in der Gangliosidbindungstasche von BoNT/A, B und TeNT (Rummel et al. 2003; Rummel et al. 2004a). Die Mutanten der Sia-1 Stelle vermindern die Neurotoxizität drastischer. Die

Zusammenfassung und Diskussion

Doppelmutante in dieser Bindungstasche (BoNT/C Y1179S/L1203F) reduziert die Neurotoxizität ähnlich wie die Einzelmutante BoNT/C L1203F alleine auf 1 % bzw. 0,5 %. Dies lässt darauf schließen, dass die Mutation an Position L1203 für eine Deaktivierung dieser Bindungstasche ausreicht. Im Kristall der Mutante H_CC-L1203F wird zudem deutlich, dass das Phenylalanin den Platz für die N-Acetyl-Gruppe der Sialinsäure blockiert und folglich die Sialinsäure nicht mehr binden kann. Die Doppel- (BoNT/C Y1179S/W1258L) und Vierfachmutante (BoNT/C W1258A/Y1259A/Y1179S/L1203F) mit Mutationen sowohl im WY-Loop als auch in der Sia-1 zeigen die stärksten Effekte auf die Neurotoxizität (Strotmeier et al. 2011). Dies ist auf die Multiplikation der Einzeleffekte zurückzuführen. Die Mutante S1281Y aus dem Bereich der etablierten Gangliosidbindungstasche führt auch zu einer signifikanten Reduktion in der Neurotoxizität von BoNT/C. Da eine Rückfaltung des WY-Loops mittels *molecular dynamics simulations* weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, könnte eine Gangliosidbindung in einer zweizähligen Weise durch die terminale Sialinsäure und membrannahen Zuckerreste, z. B. des GT1b, an den WY-Loop bzw. den Bereich der etablierten Gangliosidbindungstasche um die Position S1281 erfolgen. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass sich der WY-Loop unter physiologischen Bedingungen oder nach Anlagerung eines Gangliosids in Richtung des Bereichs der etablierten Gangliosidbindungstasche um die Position S1281 orientiert, und so eine sandwich-ähnliche Bindungstasche um das Gangliosid bildet. Unterstützt wird diese These dadurch, dass die Effekte der Mutationen im WY-Loop weniger stark ausgeprägt sind als in der Sia-1 Region. Genauso wie im Synaptosomenassay zeigen die Mutanten aus der Sia-2 und dem Bereich der zweiten Rezeptorbindungstasche keine auffälligen Effekte im MPN Assay. Somit scheint BoNT/C mindestens zwei Bindungstaschen zu besitzen.

Mittels ELISA wurde getestet, ob die potenziellen Bindungstaschen die Gangliosidbindung von BoNT/C vermitteln. Die getesteten Mutanten des WY-Loops, der Sia-1 und der etablierten Gangliosidbindungstasche zeigen eine deutlich verminderte Bindung an immobilisiertes GT1b im Vergleich zum Wildtyp. BoNT/C besitzt also mindestens zwei Taschen, die die Bindung an Ganglioside vermitteln. Um die Rolle von Gangliosiden als potenzielle Rezeptoren für BoNT/C unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden die Mutanten im MPN Assay an Gangliosid-defizienten Mäusen auf ihre Neurotoxizität analysiert. Diese DKO-Mäuse (Kawai 2001) exprimieren ausschließlich das Gangliosid GM3. An den DKO-Mäusen ist die Neurotoxizität der Mutanten sowohl aus dem WY-Loop als auch der Sia-1 noch stärker reduziert als an Wildtyp Mäusen. Eine solche weitere Reduktion ist in BoNT/B und G-Mutanten nicht zu beobachten, wenn deren einzige Gangliosidbindungstasche inaktiviert ist (Rummel et al. 2007). Wenn BoNT/C nur eine Gangliosidbindungstasche besitzen würde, sollte die Neurotoxizität der Mutanten mit

Zusammenfassung und Diskussion

inaktivierter Gangliosidbindungstasche an Wildtyp und DKO-Mäusen etwa gleich sein, da durch das Ausschalten der Tasche keine Ganglioside mehr gebunden werden können und es somit gleichgültig ist, ob Ganglioside vorliegen (Wildtyp-Maus) oder keine Ganglioside mehr exprimiert werden (DKO-Mäuse). Wenn die Neurotoxizität an den DKO-Mäusen aber noch stärker reduziert ist als an Wildtyp-Mäusen, zeigt dies, dass die Gangliosidbindung an den Wildtyp-Mäusen über noch eine weitere Gangliosidbindungstasche stattgefunden hat. Dies deutet daraufhin, dass BoNT/C auch unter physiologischen Bedingungen mindestens zwei Bindungstaschen besitzt, über die Ganglioside gebunden werden können. Die Sia-1 Tasche interagiert mit Gangliosiden und der WY-Loop scheint an der Gangliosidbindung ebenfalls beteiligt zu sein (Tsukamoto et al. 2008; Rummel et al. 2009; Karalewitz et al. 2010). Aufgrund dieser Resultate lässt sich postulieren, dass die Aufnahme von BoNT/C ausschließlich über Ganglioside vermittelt wird (Tsukamoto et al. 2005). Möglicherweise wird auch in einem späteren Schritt in der Aufnahme des Toxins ein Gangliosid durch ein bisher unbekanntes Glykoprotein ersetzt. Eine Bindung an Syt oder SV2 konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Rummel et al. 2004b; Baldwin und Barbieri 2007; Rummel et al. 2009; Peng et al. 2011). Ob die stimulationsabhängige Aufnahme von BoNT/C (Rummel et al. 2009) alleine über die Bindung an Ganglioside erklärt werden kann, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich über BoNT/C aussagen, dass es zwei strukturell bisher nicht bekannte Bindungsstellen besitzt, die beide die Bindung an Ganglioside vermitteln. BoNT/C ist also einzigartig in der Zellbindung und in seinem Aufnahmemechanismus unter den BoNT und ähnelt damit TeNT hinsichtlich der Existenz von zwei Gangliosidbindungsstellen. Dennoch muss es einen Unterschied im Sortiermechanismus zwischen BoNT/C und TeNT geben, da die beiden Toxine verschiedene Wirkorte besitzen.

Insgesamt konnte für BoNT/D und BoNT/C sowohl die Kristallstruktur ihrer Bindungsdomäne H_C als auch die Co-Kristalle mit Sialinsäure gelöst werden. Die Kernstruktur von H_C D und H_C C sind trotz geringer AS Sequenzidentität sehr ähnlich zueinander und zu der Struktur der anderen BoNT H_C -Fragmente. Anhand dieser Kristallstrukturen und mittels Bindungsstudien konnten völlig neue Bereiche identifiziert werden, die an der Bindung von BoNT/D und C an die neuronale Zelle beteiligt sind. Dabei zeigte sich, dass in BoNT/D zwei Bereiche für die Bindung von BoNT/D an Ganglioside verantwortlich sind: die Sialinsäurebindungsstelle und der Bereich der konservierten Gangliosidbindungsstelle. Die Sialinsäurebindungsstelle in H_C D überlappt zum Teil mit der Proteinrezeptorbindungsstelle in BoNT/B und G (Rummel et al. 2007) und ähnelt sehr der Sialinsäurebindungsstelle in TeNT. Eine weitere, vermutlich

Zusammenfassung und Diskussion

niedrigaffine Bindungsstelle (Loop V1251-S1262) konnte in H_CD im Bereich der konservierten Gangliosidbindungsstelle identifiziert werden. BoNT/D bindet folglich über zwei Kohlenhydratbindungsstellen in einer gangliosidabhängigen Weise an die neuronale Zelle. Falls SV2 und insbesondere SV2B sich wirklich als der Proteinrezeptor für BoNT/D bestätigen sollten, bleibt deren genaue Bindungstasche weiterhin unbekannt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass in einem späteren Schritt in der Aufnahme des Toxins ein Gangliosid durch einen Proteinrezeptor wie SV2 ersetzt wird. Dies bleibt zu untersuchen.

In BoNT/C bindet die Sialinsäure in der Nähe der Sialinsäurebindungsstellen in TeNT und BoNT/D bzw. der Proteinrezeptorbindungsstelle in BoNT/B und G mit einem für BoNT einzigartigen Bindungsmodus. Eine weitere Bindungsstelle stellt der WY-Loop dar, der einen Teil des veränderten Gangliosid-Bindungsmotivs in BoNT/C enthält und trotz seiner hydrophoben Seitenketten aus der Oberfläche von H_CC herausragt und dadurch einzigartig unter den BoNT ist. BoNT/C besitzt folglich zwei Bindungstaschen, über die Ganglioside auf der neuronalen Zelle gebunden werden können. Auch für BoNT/C ist zu vermuten, dass zu einem späteren Zeitpunkt ein bisher unbekanntes Glykoprotein ein Gangliosid ersetzt oder an einer bisher unbekanntenen Stelle bindet.

So binden BoNT/C und D wie die anderen fünf Serotypen und TeNT an Ganglioside auf der neuronalen Zelloberfläche. Die Frage nach der Rolle eines Proteinrezeptors für die Aufnahme von BoNT/C und BoNT/D bleibt offen.

Für die bisher identifizierten Bindungsstellen könnten gezielt Inhibitoren hergestellt werden, die die Bindung des BoNT an die neuronale Membran unterbinden und somit die Aktivität der BoNT hemmen.

Literaturverzeichnis

- Abavare, L. und Abavare, C. (2011). "Wound Botulism Resulting From Heroin Abuse: Can You Recognize It?" J Emerg Nurs.
- Agarwal, R., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D., Binz, T. und Swaminathan, S. (2004). "Structural analysis of botulinum neurotoxin type E catalytic domain and its mutant Glu212-->Gln reveals the pivotal role of the Glu212 carboxylate in the catalytic pathway." Biochemistry **43**(21): 6637-44.
- Agarwal, R., Binz, T. und Swaminathan, S. (2005). "Structural analysis of botulinum neurotoxin serotype F light chain: implications on substrate binding and inhibitor design." Biochemistry **44**(35): 11758-65.
- Agarwal, R. und Swaminathan, S. (2008). "SNAP-25 substrate peptide (residues 180-183) binds to but bypasses cleavage by catalytically active Clostridium botulinum neurotoxin E." J Biol Chem **283**(38): 25944-51.
- Allergan_Inc. (2011). "BOTOX (Botulinum toxin type A) purified neurotoxin complex: prescribing information revised 08/2011 [online]. Available from URL: http://www.allergan.com/assets/pdf/botox_pi.pdf." [Accessed 2011 Dec. 8].
- Aoki, K. R. und Guyer, B. (2001). "Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions." Eur J Neurol **8 Suppl 5**: 21-9.
- Arndt, J. W., Yu, W., Bi, F. und Stevens, R. C. (2005). "Crystal structure of botulinum neurotoxin type G light chain: serotype divergence in substrate recognition." Biochemistry **44**(28): 9574-80.
- Arndt, J. W., Chai, Q., Christian, T. und Stevens, R. C. (2006). "Structure of botulinum neurotoxin type D light chain at 1.65 Å resolution: repercussions for VAMP-2 substrate specificity." Biochemistry **45**(10): 3255-62.
- Arnon, S. S. (1980). "Infant botulism." Annu Rev Med **31**: 541-60.
- 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. und Tonat, K. (2001). "Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management." JAMA **285**(8): 1059-70.
- Aureli, P., Fenicia, L., Pasolini, B., Gianfranceschi, M., McCroskey, L. M. und Hatheway, C. L. (1986). "Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxic Clostridium butyricum in Italy." J Infect Dis **154**(2): 207-11.
- Bakheit, A. M., Ward, C. D. und McLellan, D. L. (1997). "Generalised botulism-like syndrome after intramuscular injections of botulinum toxin type A: a report of two cases." J Neurol

Neurosurg Psychiatry **62**(2): 198.

Baldwin, M. R. und Barbieri, J. T. (2007). "Association of botulinum neurotoxin serotypes a and B with synaptic vesicle protein complexes." Biochemistry **46**(11): 3200-10.

Baldwin, M. R., Tepp, W. H., Przedpelski, A., Pier, C. L., Bradshaw, M., Johnson, E. A. und Barbieri, J. T. (2008). "Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism." Infect Immun **76**(3): 1314-8.

Baumert, M., Maycox, P. R., Navone, F., De Camilli, P. und Jahn, R. (1989). "Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain." Embo J **8**(2): 379-84.

Bekkelund, S. I. und Alstadhaug, K. B. (2011). "Migraine prophylactic drugs - something new under the sun?" Expert Opin Investig Drugs **20**(9): 1201-10.

Bennett, M. K., Calakos, N. und Scheller, R. H. (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." Science **257**(5067): 255-9.

Benson, M. A., Fu, Z., Kim, J. J. und Baldwin, M. R. (2011). "Unique ganglioside recognition strategies for clostridial neurotoxins." J Biol Chem **286**(39): 34015-22.

Bhandari, M., Campbell, K. D., Collins, M. D. und East, A. K. (1997). "Molecular characterization of the clusters of genes encoding the botulinum neurotoxin complex in clostridium botulinum (*Clostridium argentinense*) type G and nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B." Curr Microbiol **35**(4): 207-14.

Bigalke, H. und Habermann, E. (1980). "Blockade by tetanus and botulinum A toxin of postganglionic cholinergic nerve endings in the myenteric plexus." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **312**(3): 255-63.

Bigalke, H., Muller, H. und Dreyer, F. (1986). "Botulinum A neurotoxin unlike tetanus toxin acts via a neuraminidase sensitive structure." Toxicon **24**(11-12): 1065-74.

Bigalke, H. und Rummel, A. (2005). "Medical aspects of toxin weapons." Toxicology **214**(3): 210-20.

Binz, T., Kurazono, H., Wille, M., Frevert, J., Wernars, K. und Niemann, H. (1990). "The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins." J Biol Chem **265**(16): 9153-8.

Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Sudhof, T. C., Jahn, R. und Niemann, H. (1994). "Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulin neurotoxins." J Biol Chem **269**(3): 1617-20.

Binz, T., Bade, S., Rummel, A., Kollwe, A. und Alves, J. (2002). "Arg(362) and Tyr(365) of the botulinum neurotoxin type a light chain are involved in transition state stabilization." Biochemistry **41**(6): 1717-23.

- Binz, T. und Rummel, A. (2009). "Cell entry strategy of clostridial neurotoxins." J Neurochem **109**(6): 1584-95.
- Black, J. D. und Dolly, J. O. (1986). "Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis." J Cell Biol **103**(2): 535-44.
- Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Sudhof, T. C., Niemann, H. und Jahn, R. (1993a). "Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25." Nature **365**(6442): 160-3.
- Blasi, J., Chapman, E. R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H. und Jahn, R. (1993b). "Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin." Embo J **12**(12): 4821-8.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X. und Stockler, W. (1993). "Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'." FEBS Lett **331**(1-2): 134-40.
- Böhnel, H., Schwagerick, B. und Gessler, F. (2001). "Visceral botulism--a new form of bovine Clostridium botulinum toxication." J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **48**(6): 373-83.
- Bozheyeva, G., Kunakbayev, Y. und Yeleukenov, D. (1999). "Former Soviet Biological Weapons Facilities in Kazakhstan: Past, Present, and Future." Center for Nonproliferation Studies, Monterey Institute of International Studies, Monterey, CA; Occasional paper No. 1: 1-20.
- Breidenbach, M. A. und Brunger, A. T. (2004). "Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A." Nature **432**(7019): 925-9.
- Breidenbach, M. A. und Brunger, A. T. (2005). "2.3 A crystal structure of tetanus neurotoxin light chain." Biochemistry **44**(20): 7450-7.
- Brüggemann, H., Baumer, S., Fricke, W. F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martinez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A. und Gottschalk, G. (2003). "The genome sequence of Clostridium tetani, the causative agent of tetanus disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1316-21.
- Brunger, A. T., Breidenbach, M. A., Jin, R., Fischer, A., Santos, J. S. und Montal, M. (2007). "Botulinum neurotoxin heavy chain belt as an intramolecular chaperone for the light chain." PLoS Pathog **3**(9): 1191-4.
- Bullens, R. W., O'Hanlon, G. M., Wagner, E., Molenaar, P. C., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, J. J. und 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 **22**(16): 6876-84.

Literaturverzeichnis

- Burgen, A. S., Dickens, F. und Zatman, L. J. (1949). "The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction." J Physiol **109**(1-2): 10-24.
- Burkard, F., Chen, F., Kuziemko, G. M. und Stevens, R. C. (1997). "Electron density projection map of the botulinum neurotoxin 900-kilodalton complex by electron crystallography." J Struct Biol **120**(1): 78-84.
- Burnett, J. C., Ruthel, G., Stegmann, C. M., Panchal, R. G., Nguyen, T. L., Hermone, A. R., Stafford, R. G., Lane, D. J., Kenny, T. A., McGrath, C. F., Wipf, P., Stahl, A. M., Schmidt, J. J., Gussio, R., Brunger, A. T. und Bavari, S. (2007). "Inhibition of metalloprotease botulinum serotype A from a pseudo-peptide binding mode to a small molecule that is active in primary neurons." J Biol Chem **282**(7): 5004-14.
- Callaway, J. E. (2004). "Botulinum toxin type B (Myobloc): pharmacology and biochemistry." Clin Dermatol **22**(1): 23-8.
- CDC (2011). "Botulism Annual Summary, 2009, Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011."
- Chai, Q., Arndt, J. W., Dong, M., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Chapman, E. R. und Stevens, R. C. (2006). "Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B." Nature **444**(7122): 1096-100.
- Chankrachang, S., Arayawichanont, A., Pongvarin, N., Nidhinandana, S., Boonkongchuen, P., Towanabut, S., Sithinamsuwan, P. und Kongsangdao, S. (2011). "Prophylactic botulinum type A toxin complex (Dysport(R)) for migraine without aura." Headache **51**(1): 52-63.
- Chen, C., Baldwin, M. R. und Barbieri, J. T. (2008). "Molecular basis for tetanus toxin coreceptor interactions." Biochemistry **47**(27): 7179-86.
- Chen, C., Fu, Z., Kim, J. J., Barbieri, J. T. und Baldwin, M. R. (2009). "Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin." J Biol Chem **284**(39): 26569-77.
- Chen, F., Kuziemko, G. M., Amersdorfer, P., Wong, C., Marks, J. D. und Stevens, R. C. (1997). "Antibody mapping to domains of botulinum neurotoxin serotype A in the complexed and uncomplexed forms." Infect Immun **65**(5): 1626-30.
- Cherington, M. (2004). "Botulism: update and review." Semin Neurol **24**(2): 155-63.
- Chertow, D. S., Tan, E. T., Maslanka, S. E., Schulte, J., Bresnitz, E. A., Weisman, R. S., Bernstein, J., Marcus, S. M., Kumar, S., Malecki, J., Sobel, J. und Braden, C. R. (2006). "Botulism in 4 adults following cosmetic injections with an unlicensed, highly concentrated botulinum preparation." Jama **296**(20): 2476-9.
- Coffield, J. A., Bakry, N., Zhang, R. D., Carlson, J., Gomella, L. G. und Simpson, L. L. (1997). "In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches."

- J Pharmacol Exp Ther **280**(3): 1489-98.
- Collins, M. D. und East, A. K. (1998). "Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins." J Appl Microbiol **84**(1): 5-17.
- Comella, C. L., Jankovic, J., Shannon, K. M., Tsui, J., Swenson, M., Leurgans, S. und Fan, W. (2005). "Comparison of botulinum toxin serotypes A and B for the treatment of cervical dystonia." Neurology **65**(9): 1423-9.
- Comella, C. L. (2008). "The treatment of cervical dystonia with botulinum toxins." J Neural Transm **115**(4): 579-83.
- Conraths, F. J., Geue, L., Groschup, M. H., Hänel, I., Henning, K., Köhler, H., Melzer, F., Geue, L., Groschup, M. H., Hänel, I., Henning, K., Köhler, H., Methner, U., Moser, I., Müller, T., Raßbach, A., Sachse, K., Schares, G., Schulz, F., Tackmann, K., Werner, O. und Mettenleiter, T. C. (2004). "Zoonosen der Nutz- und Wildtiere und ihre Bedeutung in Deutschland." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **47**(7): 633-646.
- Critchley, D. R., Habig, W. H. und Fishman, P. H. (1986). "Reevaluation of the role of gangliosides as receptors for tetanus toxin." J Neurochem **47**(1): 213-22.
- Critchley, E. M. (1991). "A comparison of human and animal botulism: a review." J R Soc Med **84**(5): 295-8.
- Crouch, E. R. (2006). "Use of botulinum toxin in strabismus." Curr Opin Ophthalmol **17**(5): 435-40.
- Davletov, B., Bajohrs, M. und Binz, T. (2005). "Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins." Trends Neurosci **28**(8): 446-52.
- Dhaked, R. K., Singh, M. K., Singh, P. und Gupta, P. (2010). "Botulinum toxin: bioweapon & magic drug." Indian J Med Res **132**(5): 489-503.
- Dineen, S. S., Bradshaw, M. und Johnson, E. A. (2003). "Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type A strains: sequence comparison and evolutionary implications." Curr Microbiol **46**(5): 345-52.
- Dolly, J. O., Black, J., Williams, R. S. und Melling, J. (1984). "Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization." Nature **307**(5950): 457-60.
- Dolly, O. (2003). "Synaptic transmission: inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins." Headache **43 Suppl 1**: S16-24.
- Dong, M., Richards, D. A., Goodnough, M. C., Tepp, W. H., Johnson, E. A. und Chapman, E. R. (2003). "Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells." J Cell Biol **162**(7): 1293-303.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R. und Chapman, E. R.

- (2006). "SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A." Science **312**(5773): 592-6.
- Dong, M., Tepp, W. H., Liu, H., Johnson, E. A. und Chapman, E. R. (2007). "Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons." J Cell Biol **179**(7): 1511-22.
- Dong, M., Liu, H., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Janz, R. und Chapman, E. R. (2008). "Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons." Mol Biol Cell **19**(12): 5226-37.
- East, A. K. und Collins, M. D. (1994). "Conserved structure of genes encoding components of botulinum neurotoxin complex M and the sequence of the gene coding for the nontoxic component in nonproteolytic Clostridium botulinum type F." Curr Microbiol **29**(2): 69-77.
- ECDC (2011). "Annual epidemiological report 2011, Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data." Stockholm: ECDC; 2011.
- Eisele, K. H., Fink, K., Vey, M. und Taylor, H. V. (2011). "Studies on the dissociation of botulinum neurotoxin type A complexes." Toxicon **57**(4): 555-65.
- Eleopra, R., Tugnoli, V., Rossetto, O., Montecucco, C. und De Grandis, D. (1997). "Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human." Neurosci Lett **224**(2): 91-4.
- Eleopra, R., Tugnoli, V., Quatrone, R., Rossetto, O. und Montecucco, C. (2004). "Different types of botulinum toxin in humans." Mov Disord **19 Suppl 8**: S53-9.
- Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E. und 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 **275**(12): 8889-94.
- European Parliament (L 325/31). "Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC."
- Figueiredo, D., Turcotte, C., Frankel, G., Li, Y., Dolly, O., Wilkin, G., Marriott, D., Fairweather, N. und Dougan, G. (1995). "Characterization of recombinant tetanus toxin derivatives suitable for vaccine development." Infect Immun **63**(8): 3218-21.
- Fischer, A. und Montal, M. (2007). "Crucial role of the disulfide bridge between botulinum neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes." J Biol Chem **282**(40): 29604-11.
- Fischer, A., Mushrush, D. J., Lacy, D. B. und Montal, M. (2008). "Botulinum neurotoxin devoid of receptor binding domain translocates active protease." PLoS Pathog **4**(12): e1000245.

Literaturverzeichnis

- Foran, P., Lawrence, G. W., Shone, C. C., Foster, K. A. und Dolly, J. O. (1996). "Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release." Biochemistry **35**(8): 2630-6.
- Foran, P. G., Davletov, B. und Meunier, F. A. (2003a). "Getting muscles moving again after botulinum toxin: novel therapeutic challenges." Trends Mol Med **9**(7): 291-9.
- Fotinou, C., Emsley, P., Black, I., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., Sinha, K. A., Fairweather, N. F. und 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 **276**(34): 32274-81.
- Fu, Z., Chen, C., Barbieri, J. T., Kim, J. J. und Baldwin, M. R. (2009). "Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F." Biochemistry **48**(24): 5631-41.
- Fujii, N., Kimura, K., Yokosawa, N., Yashiki, T., Tsuzuki, K. und Oguma, K. (1993). "The complete nucleotide sequence of the gene encoding the nontoxic component of Clostridium botulinum type E progenitor toxin." J Gen Microbiol **139**(1): 79-86.
- Fujii, N. (1995). "[Structure and function of botulinum toxin]." Hokkaido Igaku Zasshi **70**(1): 19-28.
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watarai, S., Sakaguchi, Y., Arimitsu, H., Lee, J. C., Jin, Y., Matsumura, T., Kabumoto, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Nishikawa, A. und Oguma, K. (2004). "Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes." Microbiology **150**(Pt 5): 1529-38.
- Garcia-Rodriguez, C., Geren, I. N., Lou, J., Conrad, F., Forsyth, C., Wen, W., Chakraborti, S., Zao, H., Manzanarez, G., Smith, T. J., Brown, J., Tepp, W. H., Liu, N., Wijesuriya, S., Tomic, M. T., Johnson, E. A., Smith, L. A. und Marks, J. D. (2011). "Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin." Protein Eng Des Sel **24**(3): 321-31.
- Geppert, M., Archer, B. T., 3rd und Sudhof, T. C. (1991). "Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin." J Biol Chem **266**(21): 13548-52.
- Gill, D. M. (1982). "Bacterial toxins: a table of lethal amounts." Microbiol Rev **46**(1): 86-94.
- Ginalski, K., Venclovas, C., Lesyng, B. und 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 **482**(1-2): 119-24.
- Gu, S., Rumpel, S., Zhou, J., Strotmeier, J., Bigalke, H., Perry, K., Shoemaker, C., Rummel, A. und Jin, R. (2012). "Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked

complex." Science. 335(6071):977-81. (24.02.2012)

Hall, J. D., McCroskey, L. M., Pincomb, B. J. und Hatheway, C. L. (1985). " Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces a type F botulinum toxin from an infant with botulism." J. Clin. Microbiol **21**(4): 654-655.

Hanson, M. A. und Stevens, R. C. (2000). "Cocrystal structure of synaptobrevin-II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 Å resolution." Nat Struct Biol **7**(8): 687-92.

Hasegawa, K., Watanabe, T., Suzuki, T., Yamano, A., Oikawa, T., Sato, Y., Kouguchi, H., Yoneyama, T., Niwa, K., Ikeda, T. und Ohyama, T. (2007). "A novel subunit structure of *Clostridium botulinum* serotype D toxin complex with three extended arms." J Biol Chem **282**(34): 24777-83.

Hatheway, C. L. (1990). "Toxigenic clostridia." Clin Microbiol Rev **3**(1): 66-98.

Hauser, D., Eklund, M. W., Boquet, P. und Popoff, M. R. (1994). "Organization of the botulinum neurotoxin C1 gene and its associated non-toxic protein genes in *Clostridium botulinum* C 468." Mol Gen Genet **243**(6): 631-40.

Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Sudhof, T. C. und Niemann, H. (1994). "Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly." Embo J **13**(21): 5051-61.

He, Y., Rush, H. G., Liepman, R. S., Xiang, Z. und Colby, L. A. (2007). "Pathobiology and management of laboratory rodents administered CDC category A agents." Comp Med **57**(1): 18-32.

Heath, S. E., Bell, R. J., Chirino-Trejo, M., Schuh, J. C. und Harland, R. J. (1990). "Feedtrough dirt as a source of *Clostridium botulinum* type C intoxication in a group of farm horses." Can Vet J **31**(1): 13-9.

Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C. und Schiavo, G. (2000a). "Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons." J Neurochem **74**(5): 1941-50.

Herreros, J., Lalli, G. und Schiavo, G. (2000b). "C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor." Biochem J **347 Pt 1**: 199-204.

Herreros, J., Ng, T. und Schiavo, G. (2001). "Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons." Mol Biol Cell **12**(10): 2947-60.

Hill, B. J., Skerry, J. C., Smith, T. J., Arnon, S. S. und Douek, D. C. (2010). "Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes." BMC Microbiol **10**: 267.

Hill, K. K., Smith, T. J., Helma, C. H., Ticknor, L. O., Foley, B. T., Svensson, R. T., Brown, J. L., Johnson, E. A., Smith, L. A., Okinaka, R. T., Jackson, P. J. und Marks, J. D. (2007). "Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains." J Bacteriol

- 189(3):** 818-32.
- Hines, H. B., Lebeda, F., Hale, M. und Brueggemann, E. E. (2005). "Characterization of botulinum progenitor toxins by mass spectrometry." Appl Environ Microbiol **71(8):** 4478-86.
- Hu, J., Huang, X., Ling, C. C., Bundle, D. R. und Cheung, N. K. (2009). "Reducing epitope spread during affinity maturation of an anti-ganglioside GD2 antibody." J Immunol **183(9):** 5748-55.
- Hughes, R. und Whaler, B. C. (1962). "Influence of nerve-ending activity and of drugs on the rate of paralysis of rat diaphragm preparations by Cl. botulinum type A toxin." J Physiol **160:** 221-33.
- Hunt, T. (2007). "Improved botulinum toxin composition. Available from URL: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2007016018&IA=US2006028603&DISPLAY=DESC>." [Accessed 2011 Dec 8] US Patent application 2007/0025019.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., Inoue, K. und Oguma, K. (1996). "Molecular composition of Clostridium botulinum type A progenitor toxins." Infect Immun **64(5):** 1589-94.
- Ito, H., Sagane, Y., Miyata, K., Inui, K., Matsuo, T., Horiuchi, R., Ikeda, T., Suzuki, T., Hasegawa, K., Kouguchi, H., Oguma, K., Niwa, K., Ohyama, T. und Watanabe, T. (2011). "HA-33 facilitates transport of the serotype D botulinum toxin across a rat intestinal epithelial cell monolayer." FEMS Immunol Med Microbiol **61(3):** 323-31.
- Jahn, R. und Scheller, R. H. (2006). "SNAREs--engines for membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **7(9):** 631-43.
- Jankovic, J. (2004). "Botulinum toxin in clinical practice." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75(7):** 951-7.
- Jayaraman, S., Eswaramoorthy, S., Kumaran, D. und Swaminathan, S. (2005). "Common binding site for disialyllactose and tri-peptide in C-fragment of tetanus neurotoxin." Proteins **61(2):** 288-95.
- Jin, R., Rummel, A., Binz, T. und Brunger, A. T. (2006). "Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity." Nature **444(7122):** 1092-5.
- Jin, R., Sikorra, S., Stegmann, C. M., Pich, A., Binz, T. und Brunger, A. T. (2007). "Structural and biochemical studies of botulinum neurotoxin serotype C1 light chain protease: implications for dual substrate specificity." Biochemistry **46(37):** 10685-93.
- Johnson, A. L., McAdams, S. C. und Whitlock, R. H. (2010). "Type A botulism in horses in the United States: a review of the past ten years (1998-2008)." J Vet Diagn Invest **22(2):** 165-73.
- Johnson, E. A. (1999). "Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most

- toxic proteins." Annu Rev Microbiol **53**: 551-75.
- Johnson, E. A. und Bradshaw, M. (2001). "Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective." Toxicon **39**(11): 1703-22.
- Karalewitz, A. P., Kroken, A. R., Fu, Z., Baldwin, M. R., Kim, J. J. und Barbieri, J. T. (2010). "Identification of a unique ganglioside binding loop within botulinum neurotoxins C and D-SA." Biochemistry **49**(37): 8117-26.
- Kawai, H., Allende, M. L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crawley, J. N., Werth, N., Bierfreund, U., Sandhoff, K. und Proia, R. L. (2001). "Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures." J Biol Chem **276**(10): 6885-8.
- Keller, J. E., Cai, F. und Neale, E. A. (2004). "Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons." Biochemistry **43**(2): 526-32.
- Kerner, J. (1817). "Vergiftung durch verdorbene Würste." Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneykunde **3**: 1-25.
- Kerner, J. (1822). "Das Fettgift oder die Fettsäure und ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus, ein Beytrag zur Untersuchung des in verdorbenen Würsten giftig wirkenden Stoffes." Stuttgart, Tübingen: Cotta 681-687.
- Kitamura, M., Iwamori, M. und Nagai, Y. (1980). "Interaction between Clostridium botulinum neurotoxin and gangliosides." Biochim Biophys Acta **628**(3): 328-35.
- Kitamura, M. und Sone, S. (1987). "Binding ability of Clostridium botulinum neurotoxin to the synaptosome upon treatment of various kinds of the enzymes." Biochem Biophys Res Commun **143**(3): 928-33.
- Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., Furukawa, K. und Furukawa, K. (1999). "Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice." Biochim Biophys Acta **1441**(1): 1-3.
- Kitamura, M., Igimi, S., Furukawa, K. und Furukawa, K. (2005). "Different response of the knockout mice lacking b-series gangliosides against botulinum and tetanus toxins." Biochim Biophys Acta **1741**(1-2): 1-3.
- Kitasato, S. (1891). "Experimentelle Untersuchungen über das Tetanusgift." Ztschr. hyg. Infekt.- Krankh. **10**: 267-305.
- Knapp, M., Segelke, B. und Rupp, B. (1998). "The 1.61 Angstrom structure of the tetanus toxin. Ganglioside binding region: solved by MAD and MIR phase combination." Am. Cryst. Abstract Papers **25**: 90.
- Koriazova, L. K. und Montal, M. (2003). "Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel." Nat Struct Biol **10**(1): 13-8.
- Kouguchi, H., Watanabe, T., Sagane, Y., Sunagawa, H. und Ohyama, T. (2002). "In vitro

Literaturverzeichnis

- reconstitution of the Clostridium botulinum type D progenitor toxin." J Biol Chem **277**(4): 2650-6.
- Kroken, A. R., Karalewitz, A. P., Fu, Z., Kim, J. J. und Barbieri, J. T. (2011). "Novel ganglioside-mediated entry of botulinum neurotoxin serotype D into neurons." J Biol Chem **286**(30): 26828-37.
- Kubota, T., Yonekura, N., Hariya, Y., Isogai, E., Isogai, H., Amano, K. und Fujii, N. (1998). "Gene arrangement in the upstream region of Clostridium botulinum type E and Clostridium butyricum BL6340 progenitor toxin genes is different from that of other types." FEMS Microbiol Lett **158**(2): 215-21.
- Kuhn, J., Gerbershagen, K., Schaumann, R., Langenberg, U., Rodloff, A. C., Mueller, W., Hartmann-Klosterkoetter, U. und Bewermeyer, H. (2006). "[Wound botulism in heroin addicts in Germany]." Dtsch Med Wochenschr **131**(18): 1023-8.
- Kumaran, D., Rawat, R., Ahmed, S. A. und Swaminathan, S. (2008). "Substrate binding mode and its implication on drug design for botulinum neurotoxin A." PLoS Pathog **4**(9): e1000165.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Furey, W., Navaza, J., Sax, M. und Swaminathan, S. (2009). "Domain organization in Clostridium botulinum neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation." J Mol Biol **386**(1): 233-45.
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R. und Stevens, R. C. (1998). "Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity." Nat Struct Biol **5**(10): 898-902.
- Lacy, D. B. und Stevens, R. C. (1999). "Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins." J Mol Biol **291**(5): 1091-104.
- Lamanna, C. (1959). "The most poisonous poison." Science **130**: 763-72.
- Lewis, C. (2002). "Botox cosmetic: a look at looking good." FDA Consum **36**(4): 11-3.
- Lin, G., Tepp, W. H., Pier, C. L., Jacobson, M. J. und Johnson, E. A. (2010). "Expression of the Clostridium botulinum A2 neurotoxin gene cluster proteins and characterization of the A2 complex." Appl Environ Microbiol **76**(1): 40-7.
- Lindström, M., Nevas, M., Kurki, J., Sauna-aho, R., Latvala-Kiesila, A., Polonen, I. und Korkeala, H. (2004). "Type C botulism due to toxic feed affecting 52,000 farmed foxes and minks in Finland." J Clin Microbiol **42**(10): 4718-25.
- Lindström, M. und Korkeala, H. (2006). "Laboratory diagnostics of botulism." Clin Microbiol Rev **19**(2): 298-314.
- Long, S. S. (2007). "Infant botulism and treatment with BIG-IV (BabyBIG)." Pediatr Infect Dis J **26**(3): 261-2.
- Louch, H. A., Buczko, E. S., Woody, M. A., Venable, R. M. und Vann, W. F. (2002).

- "Identification of a binding site for ganglioside on the receptor binding domain of tetanus toxin." Biochemistry **41**(46): 13644-52.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B. und Binz, T. (2006). "The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves." FEBS Lett **580**(8): 2011-4.
- Maksymowych, A. B. und Simpson, L. L. (1998). "Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells." J Biol Chem **273**(34): 21950-7.
- Masuyer, G., Thiyagarajan, N., James, P. L., Marks, P. M., Chaddock, J. A. und Acharya, K. R. (2009). "Crystal structure of a catalytically active, non-toxic endopeptidase derivative of Clostridium botulinum toxin A." Biochem Biophys Res Commun **381**(1): 50-3.
- Masuyer, G., Beard, M., Cadd, V. A., Chaddock, J. A. und Acharya, K. R. (2010). "Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin B." J Struct Biol **174**(1): 52-7.
- Mellanby, J. und Green, J. (1981). "How does tetanus toxin act?" Neuroscience **6**(3): 281-300.
- Midura, T. F., Snowden, S., Wood, R. M. und Arnon, S. S. (1979). "Isolation of Clostridium botulinum from Honey." J Clin Microbiol **9**(2): 282-3.
- Montal, M. (2010). "Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design." Annu Rev Biochem **79**: 591-617.
- Montecucco, C. (1986). "How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes?" Trends Biochemical Science **11**(8): 314-317.
- Montecucco, C., Schiavo, G., Gao, Z., Bauerlein, E., Boquet, P. und DasGupta, B. R. (1988). "Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayer surface." Biochem J **251**(2): 379-83.
- Montecucco, C. und Schiavo, G. (1994). "Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins." Mol Microbiol **13**(1): 1-8.
- Moriishi, K., Koura, M., Abe, N., Fujii, N., Fujinaga, Y., Inoue, K. und Ogumad, K. (1996). "Mosaic structures of neurotoxins produced from Clostridium botulinum types C and D organisms." Biochim Biophys Acta **1307**(2): 123-6.
- Muraro, L., Tosatto, S., Motterlini, L., Rossetto, O. und Montecucco, C. (2009). "The N-terminal half of the receptor domain of botulinum neurotoxin A binds to microdomains of the plasma membrane." Biochem Biophys Res Commun **380**(1): 76-80.
- Mutoh, S., Kouguchi, H., Sagane, Y., Suzuki, T., Hasegawa, K., Watanabe, T. und Ohyama, T. (2003). "Complete subunit structure of the Clostridium botulinum type D toxin complex via intermediate assembly with nontoxic components." Biochemistry **42**(37): 10991-7.
- Nakamura, K., Kohda, T., Umeda, K., Yamamoto, H., Mukamoto, M. und Kozaki, S. (2009).

- "Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan." Vet Microbiol **140**(1-2): 147-54.
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M. und Kozaki, S. (1994). "Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes." J Biol Chem **269**(14): 10498-503.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Takahashi, M. und Kozaki, S. (1996a). "The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a." FEBS Lett **378**(3): 253-7.
- Ochanda, J. O., Syuto, B., Ohishi, I., Naiki, M. und Kubo, S. (1986). "Binding of *Clostridium botulinum* neurotoxin to gangliosides." J Biochem **100**(1): 27-33.
- Oguma, K., Yokota, K., Hayashi, S., Takeshi, K., Kumagai, M., Itoh, N., Tachi, N. und Chiba, S. (1990). "Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin." Lancet **336**(8728): 1449-50.
- Oguma, K., Fujinaga, Y. und Inoue, K. (1995). "Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins." Microbiol Immunol **39**(3): 161-8.
- Ohishi, I., Sugii, S. und Sakaguchi, G. (1977). "Oral toxicities of *Clostridium botulinum* toxins in response to molecular size." Infect Immun **16**(1): 107-9.
- Ohishi, I., Hayashi, K., Sakaguchi, G. und Tokuchi, M. (1981). "Toxicities of *Clostridium botulinum* type C toxins of different molecular sizes in geese." Infect Immun **33**(2): 623-4.
- Okada, M., Itoh Mi, M., Haraguchi, M., Okajima, T., Inoue, M., Oishi, H., Matsuda, Y., Iwamoto, T., Kawano, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Furukawa, K., Aizawa, S. und Furukawa, K. (2002). "b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve." J Biol Chem **277**(3): 1633-6.
- Olson, K. B. (1999). "Aum Shinrikyo: once and future threat?" Emerg Infect Dis **5**(4): 513-6.
- Op den Kamp, J. A. (1979). "Lipid asymmetry in membranes." Annu Rev Biochem **48**: 47-71.
- Oyler, G. A., Higgins, G. A., Hart, R. A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F. E. und Wilson, M. C. (1989). "The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations." J Cell Biol **109**(6 Pt 1): 3039-52.
- Pappas, G., Kiriaze, I. J. und Falagas, M. E. (2008). "Insights into infectious disease in the era of Hippocrates." Int J Infect Dis **12**(4): 347-50.
- Passaro, D. J., Werner, S. B., McGee, J., Mac Kenzie, W. R. und Vugia, D. J. (1998). "Wound botulism associated with black tar heroin among injecting drug users." Jama **279**(11): 859-63.

- Patel, A. A. und Rao, S. S. (1966). "Action of tetanus toxin on brain, liver and muscle mitochondria from resistant and susceptible species." Br J Pharmacol Chemother **26**(3): 730-9.
- Peng, L., Tepp, W. H., Johnson, E. A. und Dong, M. (2011). "Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors." PLoS Pathog **7**(3): e1002008.
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. und Sudhof, T. C. (1990). "Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C." Nature **345**(6272): 260-3.
- Pevsner, J., Hsu, S. C., Braun, J. E., Calakos, N., Ting, A. E., Bennett, M. K. und Scheller, R. H. (1994). "Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex." Neuron **13**(2): 353-61.
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Bolognese, P., Shone, C. C. und Montecucco, C. (2011). "Double anchorage to the membrane and intact inter-chain disulfide bond are required for the low pH induced entry of tetanus and botulinum neurotoxins into neurons." Cell Microbiol **13**(11): 1731-43.
- Rao, K. N., Kumaran, D., Binz, T. und Swaminathan, S. (2005). "Structural analysis of the catalytic domain of tetanus neurotoxin." Toxicon **45**(7): 929-39.
- RKI (2009). "Übermittelte Botulismus-Fälle nach Meldekategorie, Deutschland, 2009, <http://www3.rki.de/SurvStat/>."
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H. und Binz, T. (2003). "Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity." J Mol Biol **326**(3): 835-47.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H. und Binz, T. (2004a). "The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction." Mol Microbiol **51**(3): 631-43.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H. und Binz, T. (2004b). "Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G." J Biol Chem **279**(29): 30865-70.
- Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., Sandhoff, K., Proia, R. L., Acharya, K. R., Bigalke, H. und Binz, T. (2007). "Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 359-64.
- Rummel, A., Häfner, K., Mahrhold, S., Darashchonak, N., Holt, M., Jahn, R., Beermann, S., Karnath, T., Bigalke, H. und Binz, T. (2009). "Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor." J

Neurochem **110**(6): 1942-54.

- Sagane, Y., Watanabe, T., Kouguchi, H., Sunagawa, H., Obata, S., Oguma, K. und Ohyama, T. (2002). "Spontaneous nicking in the nontoxic-nonhemagglutinin component of the Clostridium botulinum toxin complex." Biochem Biophys Res Commun **292**(2): 434-40.
- Sanford, D. C., Barnewall, R. E., Vassar, M. L., Niemuth, N., Metcalfe, K., House, R. V., Henderson, I. und Shearer, J. D. (2010). "Inhalational botulism in rhesus macaques exposed to botulinum neurotoxin complex serotypes A1 and B1." Clin Vaccine Immunol **17**(9): 1293-304.
- Schiavo, G., Ferrari, G., Rossetto, O. und Montecucco, C. (1991). "Tetanus toxin receptor. Specific cross-linking of tetanus toxin to a protein of NGF-differentiated PC 12 cells." FEBS Lett **290**(1-2): 227-30.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Santucci, A., DasGupta, B. R. und Montecucco, C. (1992a). "Botulinum neurotoxins are zinc proteins." J Biol Chem **267**(33): 23479-83.
- Schiavo, G., Poulain, B., Rossetto, O., Benfenati, F., Tauc, L. und Montecucco, C. (1992b). "Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc." Embo J **11**(10): 3577-83.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R. und Montecucco, C. (1992c). "Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin." Nature **359**(6398): 832-5.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Catsicas, S., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R., Benfenati, F. und Montecucco, C. (1993a). "Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E." J Biol Chem **268**(32): 23784-7.
- Schiavo, G., Shone, C. C., Rossetto, O., Alexander, F. C. und Montecucco, C. (1993c). "Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin." J Biol Chem **268**(16): 11516-9.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Benfenati, F., Poulain, B. und Montecucco, C. (1994). "Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus." Ann N Y Acad Sci **710**: 65-75.
- Schiavo, G., Shone, C. C., Bennett, M. K., Scheller, R. H. und Montecucco, C. (1995). "Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins." J Biol Chem **270**(18): 10566-70.
- Schiavo, G., Matteoli, M. und Montecucco, C. (2000). "Neurotoxins affecting neuroexocytosis." Physiol Rev **80**(2): 717-66.
- Schmitt, J., Karalewitz, A., Benefield, D. A., Mushrush, D. J., Pruitt, R. N., Spiller, B. W., Barbieri, J. T. und Lacy, D. B. (2010). "Structural analysis of botulinum neurotoxin type G

- receptor binding." Biochemistry **49**(25): 5200-5.
- Scott, A. B. (1981). "Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus." Trans Am Ophthalmol Soc **79**: 734-70.
- Segelke, B., Knapp, M., Kadkhodayan, S., Balhorn, R. und Rupp, B. (2004). "Crystal structure of Clostridium botulinum neurotoxin protease in a product-bound state: Evidence for noncanonical zinc protease activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(18): 6888-93.
- Shuhendler, A. J., Lee, S., Siu, M., Ondovcik, S., Lam, K., Alabdullatif, A., Zhang, X., Machado, M. und Einarson, T. R. (2009). "Efficacy of botulinum toxin type A for the prophylaxis of episodic migraine headaches: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials." Pharmacotherapy **29**(7): 784-91.
- Silvaggi, N. R., Boldt, G. E., Hixon, M. S., Kennedy, J. P., Tzipori, S., Janda, K. D. und Allen, K. N. (2007). "Structures of Clostridium botulinum Neurotoxin Serotype A Light Chain complexed with small-molecule inhibitors highlight active-site flexibility." Chem Biol **14**(5): 533-42.
- Simpson, L. I. (1989). "The binary toxin produced by Clostridium botulinum enters cells by receptor-mediated endocytosis to exert its pharmacologic effects." J Pharmacol Exp Ther **251**(3): 1223-8.
- Simpson, L. L. und Rapport, M. M. (1971a). "Ganglioside inactivation of botulinum toxin." J Neurochem **18**(7): 1341-3.
- Simpson, L. L. und Rapport, M. M. (1971b). "The binding of botulinum toxin to membrane lipids: sphingolipids, steroids and fatty acids." J Neurochem **18**(9): 1751-9.
- Simpson, L. L. (1986). "Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin." Annu Rev Pharmacol Toxicol **26**: 427-53.
- Simpson, L. L. (2004). "Identification of the major steps in botulinum toxin action." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 167-93.
- Smith, T. J., Lou, J., Geren, I. N., Forsyth, C. M., Tsai, R., Laporte, S. L., Tepp, W. H., Bradshaw, M., Johnson, E. A., Smith, L. A. und Marks, J. D. (2005). "Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization." Infect Immun **73**(9): 5450-7.
- Snipe, P. T. und Sommer, H. (1928). "Studies on Botulinus Toxin: 3. Acid Precipitation of Botulinus Toxin." J Infect Dis **43**: 152-160.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. und Rothman, J. E. (1993a). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**(6418): 318-24.
- Sonnabend, O., Sonnabend, W., Heinzle, R., Sigrist, T., Dirnhofer, R. und Krech, U. (1981). "Isolation of Clostridium botulinum type G and identification of type G botulinal toxin in

- humans: report of five sudden unexpected deaths." J Infect Dis **143**(1): 22-7.
- Stein, A., Weber, G., Wahl, M. C. und Jahn, R. (2009). "Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane." Nature **460**(7254): 525-8.
- Stenmark, P., Dupuy, J., Imamura, A., Kiso, M. und Stevens, R. C. (2008). "Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction." PLoS Pathog **4**(8): e1000129.
- Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E. R. und Stevens, R. C. (2010). "Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding." J Mol Biol **397**(5): 1287-97.
- Strotmeier, J., Lee, K., Völker, A. K., Mahrhold, S., Zong, Y., Zeiser, J., Zhou, J., Pich, A., Bigalke, H., Binz, T., Rummel, A. und Jin, R. (2010). "Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner." Biochem J **431**(2): 207-16.
- Strotmeier, J., Gu, S., Jutzi, S., Mahrhold, S., Zhou, J., Pich, A., Eichner, T., Bigalke, H., Rummel, A., Jin, R. und Binz, T. (2011). "The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites." Mol Microbiol **81**(1): 143-56.
- Strotmeier, J., Willjes, G., Binz, T. und Rummel, A. (2012). "Human Synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: Increased therapeutic dosage and immunogenicity." FEBS Lett.; **586**(4):310-3. (17.02.2012)
- Sugii, S. und Sakaguchi, G. (1975). "Molecular construction of Clostridium botulinum type A toxins." Infect Immun **12**(6): 1262-70.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. und Brunger, A. T. (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." Nature **395**(6700): 347-53.
- Swaminathan, S. und Eswaramoorthy, S. (2000a). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of Clostridium botulinum neurotoxin type B." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 8): 1024-6.
- Swaminathan, S. und Eswaramoorthy, S. (2000b). "Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B." Nat Struct Biol **7**(8): 693-9.
- Swaminathan, S. (2011). "Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins." Febs J.
- Terilli, R. R., Moura, H., Woolfitt, A. R., Rees, J., Schieltz, D. M. und Barr, J. R. (2011). "A historical and proteomic analysis of botulinum neurotoxin type/G." BMC Microbiol **11**: 232.
- Thomas, G. L. und Haji-Michael, P. G. (2003). "Wound botulism in an injecting drug abuser." Intensive Care Med **29**(5): 857.

Literaturverzeichnis

- Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M. und Kozaki, S. (2005). "Binding of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins." J Biol Chem **280**(42): 35164-71.
- Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. und Kozaki, S. (2008). "Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D." Microb Pathog **44**(6): 484-93.
- Umland, T. C., Wingert, L. M., Swaminathan, S., Furey, W. F., Schmidt, J. J. und Sax, M. (1997). "Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin." Nat Struct Biol **4**(10): 788-92.
- Uriarte, A., Thibaud, J. L. und Blot, S. (2010). "Botulism in 2 urban dogs." Can Vet J **51**(10): 1139-42.
- Vaidyanathan, V. V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dorries, C., Bade, S., Nauenburg, S., Niemann, H. und Binz, T. (1999). "Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage." J Neurochem **72**(1): 327-37.
- Vallee, B. L. und Auld, D. S. (1990). "Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 220-4.
- van Echten, G. und Sandhoff, K. (1993). "Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation." J Biol Chem **268**(8): 5341-4.
- van Ermengem, E. P. (1897). "Ueber einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus." Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten **26**(1): 1-56.
- Van Heyningen, W. E. und Miller, P. A. (1961). "The fixation of tetanus toxin by ganglioside." J Gen Microbiol **24**: 107-19.
- Watanabe, T., Sagane, Y., Kouguchi, H., Sunagawa, H., Inoue, K., Fujinaga, Y., Oguma, K. und Ohyama, T. (1999). "Molecular composition of progenitor toxin produced by Clostridium botulinum type C strain 6813." J Protein Chem **18**(7): 753-60.
- Wein, L. M. und Liu, Y. (2005). "Analyzing a bioterror attack on the food supply: the case of botulinum toxin in milk." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(28): 9984-9.
- Weingart, O. G., Schreiber, T., Mascher, C., Pauly, D., Dorner, M. B., Berger, T. F., Egger, C., Gessler, F., Loessner, M. J., Avondet, M. A. und Dorner, B. G. (2010). "The case of botulinum toxin in milk: experimental data." Appl Environ Microbiol **76**(10): 3293-300.
- Wenham, T. N. (2008). "Botulism: a rare complication of injecting drug use." Emerg Med J **25**(1): 55-6.
- WHO "<http://www.who.int/immunization/topics/tetanus/en/index.html>."

- Williamson, P. und Schlegel, R. A. (2002). "Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 53-63.
- Willis, B., Eubanks, L. M., Dickerson, T. J. und Janda, K. D. (2008). "The strange case of the botulinum neurotoxin: using chemistry and biology to modulate the most deadly poison." Angew Chem Int Ed Engl **47**(44): 8360-79.
- Woodward, L. A., Arimitsu, H., Hirst, R. und Oguma, K. (2003). "Expression of HC subunits from Clostridium botulinum types C and D and their evaluation as candidate vaccine antigens in mice." Infect Immun **71**(5): 2941-4.
- Yamasaki, S., Baumeister, A., Binz, T., Blasi, J., Link, E., Cornille, F., Roques, B., Fykse, E. M., Sudhof, T. C., Jahn, R. und et al. (1994a). "Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulin neurotoxins and tetanus toxin." J Biol Chem **269**(17): 12764-72.
- Yamasaki, S., Binz, T., Hayashi, T., Szabo, E., Yamasaki, N., Eklund, M., Jahn, R. und Niemann, H. (1994b). "Botulinum neurotoxin type G proteolyzes the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2." Biochem Biophys Res Commun **200**(2): 829-35.
- Yeh, F. L., Dong, M., Yao, J., Tepp, W. H., Lin, G., Johnson, E. A. und Chapman, E. R. (2010). "SV2 mediates entry of tetanus neurotoxin into central neurons." PLoS Pathog **6**(11): e1001207.
- Yoshihara, M. und Montana, E. S. (2004). "The synaptotagmins: calcium sensors for vesicular trafficking." Neuroscientist **10**(6): 566-74.
- Yowler, B. C. und Schengrund, C. L. (2004b). "Glycosphingolipids-sweets for botulinum neurotoxin." Glycoconj J **21**(6): 287-93.
- Zhang, J. C., Sun, L. und Nie, Q. H. (2010a). "Botulism, where are we now?" Clin Toxicol (Phila) **48**(9): 867-79.
- Zhang, Y., Buchko, G. W., Qin, L., Robinson, H. und Varnum, S. M. (2010b). "Structural analysis of the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotype D." Biochem Biophys Res Commun **401**(4): 498-503.
- Zhang, Y., Buchko, G. W., Qin, L., Robinson, H. und Varnum, S. M. (2011a). "Crystal structure of the receptor binding domain of the botulinum C-D mosaic neurotoxin reveals potential roles of lysines 1118 and 1136 in membrane interactions." Biochem Biophys Res Commun **404**(1): 407-12.
- Zhang, Y. und Varnum, S. M. (2011b). "The receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotype C binds phosphoinositides." Biochimie.
- Zilinskas, R. A. (1997). "Iraq's biological weapons. The past as future?" Jama **278**(5): 418-24.

Anhang

Abbildungen - und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Dendrogramm mit den phylogenetischen Positionen von <i>Clostridium botulinum</i> der Gruppen I bis IV.....	2
Abbildung 2: Wirkmechanismus der clostridiellen Neurotoxine TeNT und BoNT.	3
Abbildung 3: Ein an Tetanus erkrankter Soldat.....	4
Abbildung 4: Meilensteine in der Botulismus Forschung (Zhang et al. 2010a).	5
Abbildung 5: Genorganisation des <i>boNT</i> Clusters (Hill et al. 2010).	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der vier Domänenstruktur der CNT (oben) und die Kristallstruktur von BoNT/B mit gebundener Sialyllactose und Synaptotagmin (Syt)-II 7-61 (unten, aus PDB: 1F31 und 2NM1).	13
Abbildung 7: Kristallstruktur des membranverankerten synaptischen cis-SNARE Komplexes, wie er nach Vollzug der Membranfusion vorliegt.....	14
Abbildung 8: Aminosäuresequenzähnlichkeiten zwischen der H _{CC} -Domäne der BoNT und des TeNT.....	16
Abbildung 9: Modell für die Aufnahme von BoNT in Nervenzellen.....	20
Abbildung 10: Chemische Struktur des Polysialogangliosids GT1b (A, Binz und Rummel 2009) und Synthesewege der Ganglioside im Organismus (B, Hu et al. 2009).	21
Abbildung 11: Der H _C B-Syt-II Komplex wird durch mehrere intermolekulare Interaktionen stabilisiert.	26
Abbildung 12: Membrantopologie der BoNT Proteinrezeptoren (Binz und Rummel 2009). ...	27
Tabelle 1: Proteine des Progenitortoxinkomplexes nach Serotyp sortiert (modifiziert nach Hines et al. 2005).	8
Tabelle 2: Die Substrate und die spezifischen Spaltstellen der LC.....	15
Tabelle 3: Übersicht über die Kristallstrukturen der CNT.	18

Liste der Publikationen

Originalpublikationen in „peer reviewed“ Zeitschriften:

- Strotmeier, J., Lee, K., Völker, A. K., Mahrhold, S., Zong, Y., Zeiser, J., Zhou, J., Pich, A., Bigalke, H., Binz, T., Rummel, A. und Jin, R. (2010). "Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons via two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner." Biochem J **431**(2): 207-16.
- Strotmeier, J., Gu, S., Jutzi, S., Mahrhold, S., Zhou, J., Pich, A., Eichner, T., Bigalke, H., Rummel, A., Jin, R. und Binz, T. (2011). "The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites." Mol Microbiol **81**(1): 143-56.
- Strotmeier, J., Willjes, G., Binz, T. und Rummel, A. (2012). "Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: Increased therapeutic dosage and immunogenicity." FEBS Lett.; **586**(4):310-3. (17.02.2012)
- Gu, S., Rumpel, S., Zhou, J., Strotmeier, J., Bigalke, H., Perry, K., Shoemaker, C., Rummel, A. und Jin, R. (2012). "Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex." Science. **335**(6071):977-81. (24.02.2012)

Poster

- Strotmeier, J., Jutzi, S., Pich, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., Rummel, A. und Binz, T. (2009). "Cell entry of botulinum neurotoxin type C is dependent upon interaction with two ganglioside molecules" Nationales Symposium für Zoonoseforschung, Berlin.
- Strotmeier, J., Jutzi, S., Pich, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., Rummel, A. und Binz, T. (2009). "Cell entry of botulinum neurotoxin type C is dependent upon interaction with two ganglioside molecules" 6th ClostPath International Conference, Rome.
- Strotmeier, J., Lee, K., Jutzi, S., Mahrhold, S., Pich, A., Bigalke, H., Rummel, A., Rongsheng, J. und Binz, T. (2010). "Cocrystal structure of Botulinum neurotoxin type C reveals that cell entry is dependent upon interaction with two ganglioside molecules." Nationales Symposium für Zoonoseforschung, Berlin.

Vorträge

Strotmeier, J., Bigalke, H. und Rummel, A. (2010). "Characterisation of the receptors for BoNT/C1 and D and their role in animal specificity." BMBF Verbundtreffen, Bielefeld.

Strotmeier, J., Deppe, J., Mahrhold, S., Binz, T., Bigalke, H. und Rummel, A. (2011). "The Function of the H_{CN}-domain of clostridial neurotoxins." Nationales Symposium für Zoonoseforschung, Berlin.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Jasmin Strotmeier
M. Sc. Genome based Systems Biology
Georgstraße 4
32423 Minden
Geboren am 14.03.1984
In Warendorf
Deutsch

Berufsstand:

10/2008-12/2011: Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover / toxogen GmbH, Hannover

01/2012-jetzt: Wissenschaftliche Mitarbeiterin, toxogen GmbH, Hannover

Weiterbildung:

Disputation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Dissertation: „Die Rolle der H_C-Fragmente der Botulinum Neurotoxine A, B, C und D: Charakterisierung der Bindung an die nicht-toxische nicht-hämagglutinierende Komponente und neuronale Rezeptoren.“

Studium:

10/2008-03/2012: Promotionsstudentin an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

10/2006 – 09/2008: Master of Science in Genome Based Systems Biology, Universität Bielefeld: „Analyse der transkriptionellen Regulation des Fettsäuremetabolismus von *Corynebakterium jeikeium* K411“

10/2003 – 09/2006 Bachelor of Science in Bioinformatik und Genomforschung, Universität Bielefeld: „Alternative Methode zur Antikörperherstellung durch das pSKAN Phagemid Display System am Beispiel des Proteins SodM“

Schulausbildung:

08/1994 – 09/2003: Gymnasium Laurentianum, Warendorf, Abitur, Note 2,5

08/1990 – 07/1994: Everword Grundschule, Freckenhorst

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Ingo Just und meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans Bigalke für die Möglichkeit am Institut für Toxikologie meine Dissertation anfertigen zu dürfen bedanken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Hans Bigalke ebenfalls für die Übernahme des Referats und Prof. Dr. Jürgen Alves für die Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Andreas Rummel, für seine allumfassende, unermüdliche Hilfe, für die allzeitige Unterstützung und die kompetente wissenschaftliche Betreuung. Vielen Dank für deinen Rat und die vielen Anregungen während meiner Arbeit!

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Nadja Krez, Anna Magdalena Krueel und Tino Karnath sowie allen StrucMeds aus der AG Rummel für die gute und unterstützende Zusammenarbeit sowie für die schöne Zeit im Labor bedanken. Ein großer Dank geht auch an Thomas Binz, Stefan Sikorra und besonders Stefan Mahrhold für viele fruchtbare Diskussionen und die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Anne-Katrin Völker und Stefan Jutzi für die geleistete Vorarbeit zu meinem Thema.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Toxikologie für die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank geht an Johannes Zeiser und Prof. Dr. Andreas Pich für die Durchführung der MALDI-TOF-MS Analysen. Den Mitarbeitern der toxogen GmbH und Nadja Krez danke ich für die Vielzahl an präparierten Zwerchfellen und außerdem der toxogen GmbH für die zwischenzeitliche Finanzierung.

Der Arbeitsgruppe um Rongsheng Jin gilt mein Dank für die Kristallisationen.

Auch ein großes Dankeschön an Annika Hausmann, Henning Knoop und Lisa Wagner für ihre Unterstützung während der Dissertation und ihre Ablenkung von der Dissertation.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Patrice für seine Unterstützung, seine Liebe, und besonders auch für sein Verständnis, wenn missglückte Experimente meine Laune trübten.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich in jeder Hinsicht unterstützen. Danke!