



不同血清型肉毒毒素受体结合域研究进展

尹凡铭^{1,2}, 朱晨思², 李涛², 王慧^{1,2*}

1 牡丹江医学院公共卫生学院, 黑龙江 牡丹江 157011

2 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京 100071

尹凡铭, 朱晨思, 李涛, 王慧. 不同血清型肉毒毒素受体结合域研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2172-2193.

YIN Fanming, ZHU Chensi, LI Tao, WANG Hui. Research progress in receptor-binding domains of different serotypes of botulinum neurotoxins[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2172-2193.

摘要: 肉毒毒素(botulinum neurotoxin, BoNT)是人类已知毒性最强的蛋白质之一, 可以引起肌肉松弛麻痹, 严重时可导致死亡。肉毒毒素共分为 7 种血清型(BoNT/A-BoNT/G), 根据氨基酸序列差异可进一步分为 40 多种亚型。肉毒毒素分子结构由 3 个基本结构域组成: 重链羧基端细胞受体结合域、氨基端的易位域和轻链催化域。在运动神经元表面, 受体结合域首先与聚唾液酸神经节苷脂结合, 随后与突触囊泡蛋白 2 或突触囊泡结合蛋白结合形成双受体复合物。每种血清型的受体结合域都必须与其相应受体结合才能发挥作用。肉毒毒素的结构功能及其对宿主的作用一直都是研究热点。近年来, 因受体结合域可以促进肉毒毒素与运动神经元膜特异性结合, 而成为新的研究方向。本综述将概述不同血清型肉毒毒素与受体结合过程中受体结合域结构变化和结合位点差异。通过分析不同血清型及亚型的序列以及受体结合域结构特征, 可以更好地了解细胞受体结合域的序列差异和功能, 并为肉毒毒素的治疗策略提供新思路。

关键词: 肉毒毒素; 受体结合域; 神经节苷脂; 突触囊泡蛋白 2; 突触囊泡结合蛋白

资助项目: 病原微生物生物安全全国重点实验室课题(SKLPBS2223)

This work was supported by the State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity (SKLPBS2223).

*Corresponding author. Tel: +86-10-66948532, E-mail: geno0109@vip.sina.com

Received: 2023-09-25; Accepted: 2024-03-13; Published online: 2024-03-18

Research progress in receptor-binding domains of different serotypes of botulinum neurotoxins

YIN Fanming^{1,2}, ZHU Chensi², LI Tao², WANG Hui^{1,2*}

1 School of Public Health, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Botulinum neurotoxins (BoNTs), a group of the most toxic proteins, can cause muscle paralysis and even lead to death in severe cases. BoNTs can be classified into 7 serotypes (BoNT/A–BoNT/G) and further classified into more than 40 subtypes according to the differences in amino acid sequences. BoNTs consist of three basic domains: the C-terminal receptor-binding domain of the heavy chain, the N-terminal translocation domain, and the light-chain catalytic domain. On the surface of motor neurons, the receptor-binding domain binds first to polysialoganglioside and subsequently to synaptic vesicle protein 2 or synaptotagmin to form a two-receptor complex. The functioning of each serotype relies on the binding of the receptor-binding domain to the corresponding receptor. BoNTs have always been a research hotspot in terms of the structure, function, and effect on the host. The role of the receptor-binding domain in promoting the specific binding of BoNTs to motor neurons has become a new research direction. This review summarizes the structural changes of the receptor-binding domains and the differences in binding sites during the binding of different serotypes of BoNTs to receptors. By analyzing the sequences and structural characteristics of the receptor-binding domains of different serotypes and subtypes, we can fully understand the sequence differences and functions of the receptor-binding domain and give insights into the treatment of BoNTs.

Keywords: botulinum neurotoxin; receptor-binding domain; ganglioside; synaptic vesicle protein 2; synaptotagmin

肉毒毒素由肉毒梭状芽孢杆菌在厌氧条件下产生^[1]。根据细菌之间的表型差异,肉毒梭状芽孢杆菌分类群可分为6组(I–VI)^[2](图1)。I组肉毒梭菌菌株在10–37 °C之间生长,产生高度耐热的孢子。II组菌株是中等耐热性孢子,具有非蛋白水解的特性,在低温3.5 °C下生长。III组在37–40 °C较高温度下生长,主要为引起动物肉毒中毒的C型和D型。产生G型的阿根廷梭菌是第IV组^[3]。此外,其他几种梭状芽孢杆菌菌株虽然不典型,但也具有神经毒性,如巴氏

梭菌菌株产生F型肉毒毒素(F7亚型),一些丁酸梭菌菌株产生E型(E4亚型和E5亚型),属于VI组。肉毒毒素根据中和抗体不同可以分为不同血清型,目前已鉴定出7种血清型(BoNT/A–BoNT/G),以及一种不能被任何已知肉毒毒素抗体中和的新型血清型(BoNT/X)^[4]。通过基因组测序技术发现嵌合型肉毒素BoNT/FA(HA)、BoNT/CD和BoNT/DC^[5–8],以及来自米饭魏斯氏菌的BoNT/Wo^[9–11]、来自肠球菌的BoNT/En^[12–13]和来自双发副梭菌的肉毒毒素样蛋白等^[14]。不同

血清型之间毒性具有很大差异，BoNT/A、BoNT/B、BoNT/E 和 BoNT/F 与人类肉毒中毒相关^[15]。由于氨基酸序列的差异，BoNT 内的每种血清型进一步分为亚型(如 BoNT/A1–BoNT/A8、BoNT/B1–BoNT/B8、BoNT/E1–BoNT/E12、

BoNT/F1–BoNT/F9)^[16] (图 1)。如图 1 所示，使用 MEGA 11 软件对 A–X 型序列进行分析，整体来看 G 型与 B 型序列相似性更高，H 型与 A 型序列相似度较高，E 型与 F 型序列相似性较高，而每种血清型内不同亚型一致性更高。

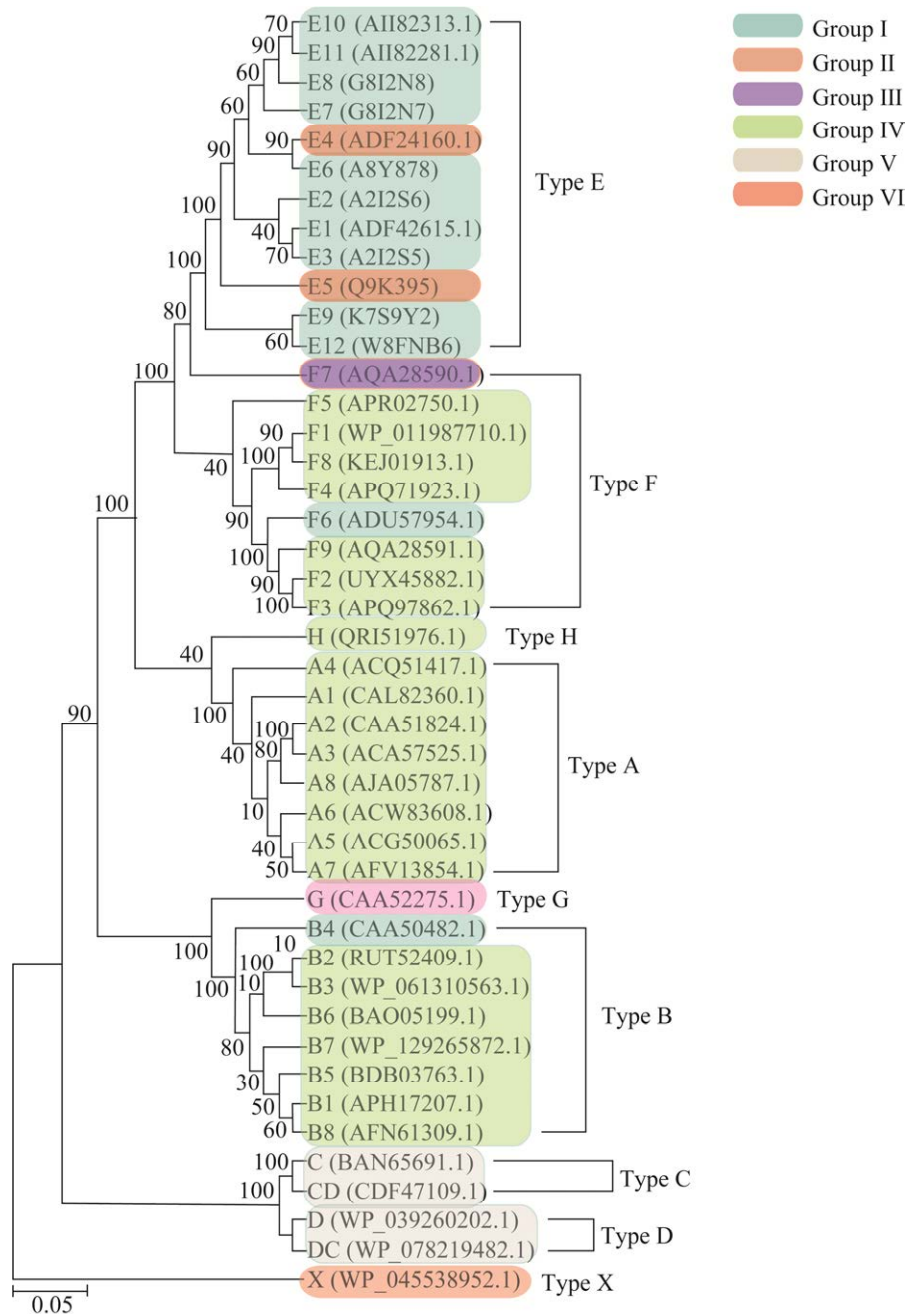


图 1 肉毒毒素 A–X 血清型系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of botulinum toxin A–X serotypes.

BoNT 最初是作为单个可溶性多肽链生产的, 约 150 kDa^[17]。这种蛋白对神经组织无毒性, 但当它被蛋白酶或靶细胞本身产生的蛋白酶切割时, 则具有毒性。前体蛋白被切割产生 2 条多肽链, 它们通过一个二硫键连接。其中一个多肽链为大小 50 kDa 的轻链(light chain, LC), 具有锌内肽酶活性, 因此被称为催化结构域^[18]。目前, 轻链是肉毒中毒抑制剂开发的重要方向, 研究者根据肉毒毒素的结构设计药物或通过高通量筛选不同的小分子文库发现多种针对肉毒中毒的潜在抑制剂^[19-21], 并以先导化合物为基础不断改进及合成类似的化合物以进一步提高药效。

肉毒毒素另一个多肽链为 100 kDa 的重链(heavy chain, HC), 由 2 个结构域组成: N 端易位域(translocation domain, H_N)和 C 端受体结合域(cell-binding domain, H_C)^[22]。受体结合域与神经元表面受体结合, 使 BoNT 进入神经元并发挥毒性作用。BoNT 进入神经元过程如图 2 所示, 第一步, BoNT 的受体结合域与神经元膜上的“第一受体”聚唾液酸神经节苷脂结合, 主要包括 GT1b、GD1a、GD1b 和 GM1b。不同血清型肉毒毒素结合不同神经节苷脂, 如 A 型可以与 GD1a、GT1b 或 GM1b 结合, BoNT/B、BoNT/E

和 BoNT/F 均可与 GD1a 或 GT1b 结合, BoNT/C 与 GT1b 或 GM1b 结合, BoNT/G 只与 GT1b 结合, 目前研究认为 BoNT/D 不依赖于与神经节苷脂结合发挥作用^[23]。第二步, 细胞外 K⁺浓度升高导致细胞膜去极化, 使 Ca²⁺通道开放, Ca²⁺流入细胞内与“第二受体”SV2 或 Syt 结合并发信号。其中 BoNT/A、BoNT/D、BoNT/E 和 BoNT/F 与 SV2 结合, BoNT/B 和 BoNT/G 与 Syt 结合。BoNT 与聚唾液酸神经节苷脂以及 SV2 或 Syt 结合, 共同组成“双受体模型”。BoNT 进入神经元后, 经过进一步作用发挥毒性, 引起机体神经肌肉麻痹。

1 肉毒毒素受体

1.1 神经节苷脂

聚唾液酸神经节苷脂由具有许多唾液酸残基的亲水复合多糖组成, 能够与疏水性神经酰胺尾结合, 但不同神经节苷脂之间单糖单元的数量、组成和位置有所不同(图 3)。这些神经节苷脂可以通过不同形式嵌入细胞膜中, 并且在细胞表面展示各种糖部分。神经元膜上最常见的神经节苷脂包括 GT1b、GD1a、GD1b 和 GM1b^[24]。受体结构域的羧基末端包含肽基序 H...SxWY...G, 它构成神经节苷脂结合位点

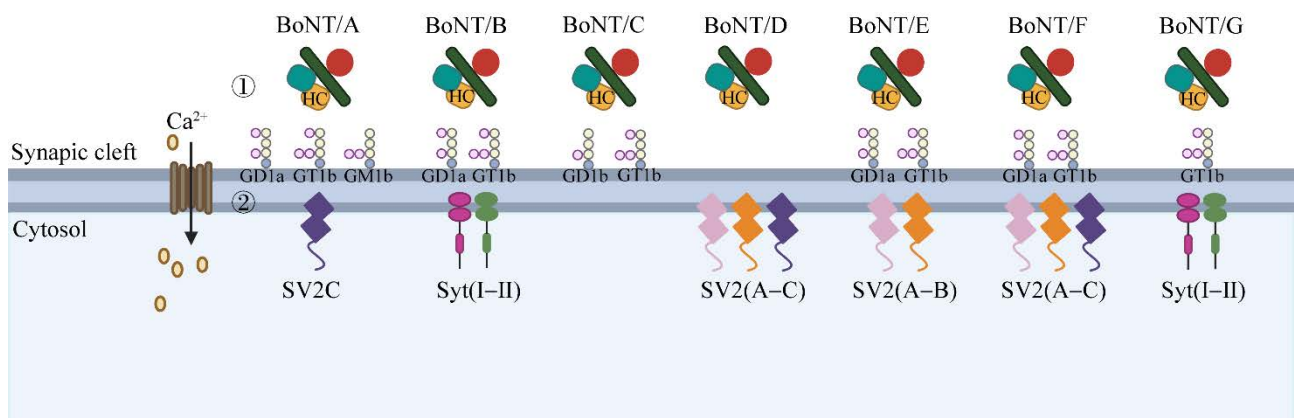


图 2 不同血清型肉毒毒素进入神经元过程

Figure 2 Different serotypes of botulinum toxins enter neuronal processes.

(ganglioside binding site, GBS)的核心。神经节苷脂和神经节苷脂结合位点之间的相互作用,可以根据 H_c 与寡糖结合后的晶体结构确定。

所有血清型毒素(D型除外)均利用神经节苷脂作为辅助受体^[25-26]。其中 GT1b 是对肉毒毒素具有最高亲和力的神经节苷脂,其碳水化合物部分由 7 个单糖组成(图 3)。

1.2 突触囊泡蛋白 2

突触囊泡蛋白 2 (synaptic vesicle protein 2, SV2)是硫酸角质素蛋白聚糖^[27],是神经元和内分泌细胞中存在的蛋白质家族^[28-29]。SV2 具有糖基化位点^[30]以及可被钙离子抑制的突触蛋白结合位点, BoNT/A^[31]、BoNT/D^[32]、BoNT/E^[33]和 BoNT/F^[34]利用 SV2 管腔结构域进入细胞。SV2 家族有 3 个成员: SV2A、SV2B 和 SV2C,它们结构相似但表达位置不同。SV2A 是主要的异构体,普遍存在于所有大脑区域,SV2B 主要存在于皮质和海马体中^[35],SV2C 亚型在大脑区域(如纹状体、黑质、脑桥和延髓)中水平较高。SV2 与其他蛋白的相互作用可以对囊泡胞吐作用产

生影响。

1.3 突触囊泡结合蛋白

Nishiki 等在 20 世纪 90 年代首次发现了同源突触囊泡结合蛋白 synaptotagmin I 和 II (Syt-I 和 Syt-II)可以作为 BoNT/B 的结合受体^[36-37]。后来研究证实, Syt-I 和 Syt-II 是介导 BoNT/B 结合和进入细胞的功能性蛋白受体^[38]。随后 BoNT/G 和 BoNT/DC 也被报道利用 Syt-I 和 Syt-II 作为功能受体^[39-40]。Syt 由含有糖基化位点的小腔内 N 端片段、单个跨膜结构域、参与 SV 融合所需的细胞内钙离子、磷脂和可溶性 N-乙酰亚胺敏感因子连接的蛋白质受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, SNARE)复合物结构域组成。Syt-I 和 Syt-II 在突触囊泡中表达,在神经递质释放中,作为触发胞吐作用的钙离子传感器发挥重要作用,随后在活性区依赖网格蛋白的内吞作用进入^[41]。胞吐作用后,在细胞表面 Syt 的 N 端结构域更容易与肉毒毒素结合^[42]。

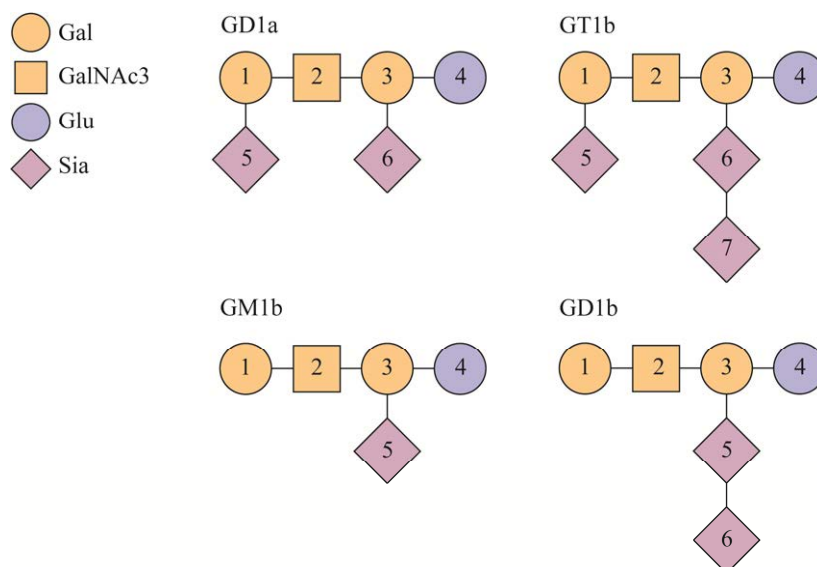


图 3 常见的神经元神经节苷脂

Figure 3 Common neuronal gangliosides. Gangliosides comprise a hydrophobic lipid tail and a hydrophilic sugar moiety (represented by 1–7). The schematic representation is of the most common neuronal gangliosides, GT1b, GD1a, GM1, and GD1b, illustrating the difference in sialic acid composition. 1 and 3: Galactose; 2: N-acetylglucosamine; 4: Glucose; 5–7: Sialic acid.

2 肉毒毒素与受体结合

2.1 A型肉毒毒素

在 BoNT/A 血清型中, 目前有 8 个亚型 (A1–A8), 其氨基酸水平差异在 3%–16%。由于 BoNT/A1 可用于治疗痉挛、肌张力障碍和眉间纹等多种疾病^[43–44], 是目前表征最充分的亚型。

如表 1 所示, 不论是从全长还是 H_C 序列比对来看, 其中 A1 与 A5 相似性最高, 达到 97.15% 以及 93.90%, A1 与 A3 相似性最低。

2.1.1 A型肉毒毒素与神经节苷脂结合

通过神经节苷脂与 H_C 结合后的一些变化, 分析亚型(H_C/A1–H_C/A6)中有 6 个结合残基是保守的(表 2)^[52]。根据每个 H_C/A 亚型对神经节苷

表 1 BoNT/A 亚型全长与 H_C 结构域序列比对

Table 1 Alignment of full-length and H_C domain sequences of serogroup BoNT/A

Subtype	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
A1	–	87.29	86.82	91.55	93.90	90.61	91.78	87.79
A2	89.97	–	98.83	88.47	89.65	90.12	90.35	93.43
A3	84.65	93.13	–	88.24	88.94	89.65	89.88	92.72
A4	89.35	83.35	84.49	–	86.85	88.94	85.92	90.14
A5	97.15	90.35	85.11	87.50	–	95.43	92.72	89.91
A6	95.68	91.67	86.27	87.89	95.83	–	91.08	87.32
A7	93.75	89.74	84.88	86.81	94.37	92.98	–	89.67
A8	93.51	93.52	87.81	89.34	93.59	93.20	91.36	–

Table shows the percentage of full-length and H_C domain sequence alignments for BoNT/A isoforms. For H_C alignment, residues 870–1 296 of the BoNT/A1 sequence were used. The sequence numbers of BoNT/A1–BoNTA8 in NCBI were CAL82360.1^[45], CAA51824.1^[46], ACA57525.1^[47], ACQ51417.1^[47], ACG50065.1^[48], ACW83608.1^[49], AFV13854.1^[50], and AJA05787.1^[51].

表 2 BoNT/A1–BoNT/A6 神经节苷脂结合位点

Table 2 Ganglioside binding site of BoNT subtypes A1–A6

Monosaccharide	H _C /A1: GD1a	H _C /A1: GT1b	H _C /A2: GD1a	H _C /A3: GD1a	H _C /A4: GD1a	H _C /A5: GM1b	H _C /A6: GD1a
Sia ⁶	Trp 1 266 (3.5)	Trp 1 266 (3.1)	Trp 1 266 (3.5)	Unmodelled	Unmodelled	Unmodelled	Unmodelled
		Gln 1 270-H ₂ O (2.6, 2.5)					
		Arg 1 276 (3.1)					
Sia ⁵	Tyr 1 117 (2.9)	Tyr 1 117 (2.8, 3.0)	Tyr 1 267-H ₂ O (2.5)	Tyr 1 263 (2.7)	Tyr 1 123 (2.8)	Tyr 1 117 (2.8)	Tyr 1 267 (2.6)
	Tyr 1 267-H ₂ O (2.5, 3.5)	Ser 1 275 (3.2)	Leu 1 250-H ₂ O (3.1, 2.8)	Gly 1 275 (2.9)	Tyr 1 273 (2.5)	Tyr 1 267 (2.7)	Gly 1 279 (2.9)
	Gly 1 279-H ₂ O (2.6, 2.8)	Arg 1 276-H ₂ O (3.1, 2.7)		Leu 1 250-H ₂ O (2.9, 2.8)	Gly 1 285 (3.1)	Gly 1 279 (3.2)	
	Arg 1 276-H ₂ O (2.8, 2.8)	Gly 1 279-H ₂ O (2.7, 2.7)		Arg 1 282 (3.8)			
Gal ⁴	Glu 1 203 (2.8)	Glu 1 203 (2.7)	Glu 1 203 (2.6)	Glu 1 199 (2.7)	Glu 1 209 (2.4)	Glu 1 203 (2.6)	Glu 1 203 (2.7)
	Phe 1 252 (2.7)	Phe 1 252 (2.6)	Phe 1 252 (2.5)	Phe 1 248 (2.5)	Phe 1 258 (2.8)	Phe 1 252 (2.8)	Phe 1 252 (2.7)
	His 1 253 (2.7)	His 1 253 (2.8)	His 1 253 (2.9)	His 1 249 (3.1)	His 1 259 (2.7)	His 1 253 (3.1)	His 1 253 (3.0)
	Ser 1 264 (2.8)	Gln 1 254-H ₂ O (2.6, 2.5)	Leu 1 254-H ₂ O (2.9, 3.1)	Ser 1 260 (2.7)	Ser 1 270 (2.5)	Ser 1 264 (2.9)	Ser 1 264 (2.7)
		Ser 1 264 (2.7)	Ser 1 264 (2.7)	Leu 1 250-H ₂ O (2.9, 3.0)			
GalNAc ³	Glu 1 203 (2.5)	Glu 1 203 (2.6)	Glu 1 203 (2.7)	Glu 1 199 (2.5)	Glu 1 209 (2.6)		Glu 1 203 (2.5)
		Arg 1 269-H ₂ O (2.9, 3.1)					

Hydrogen bond distances for ganglioside binding in the structure H_C/A1: GD1a, H_C/A1: GT1b, H_C/A2: GD1a, H_C/A3: GD1a, H_C/A4: GD1a, H_C/A5: GM1b, and H_C/A6: GD1a. Water-mediated interactions are indicated in italics as “-H₂O molecules (n1, n2)”, where n1 is the distance between amino acid residues and water and n2 is the distance between water and monosaccharides.

脂的相对亲和力,可以从界面上存在的氢键数量推断出来 $H_C/A1$ 和 $H_C/A2$ 对 GD1a 的亲和力最高(A亚型与 GD1a 亲和力排序为 $A1/A2 > A3/A4 > A6$)。

$H_C/A1$ (PDB: 3BTA)与 $H_C/A1: GD1a$ (PDB: 5TPB)或 $H_C/A1: GT1b$ (PDB: 2VU9) [结合与未结合的分子相比,均方根差(root mean square deviation, RMSD)分别为 0.5 \AA 和 0.3 \AA (对于 $C\alpha$ 原子)]^[51]。GD1a 和 GT1b 仅相差 1 个单糖(图 3),两者均对毒素具有较高亲和力。 $H_C/A2$ 与 $H_C/A1$ 相比,整体结构在结合 GD1a 后 GBS 附近的环(残基 1 269–1 277)具有构象变化(图 4)。在 $H_C/A2$ 中环定位的变化随着 Phe 1 278 向 GBS 旋转,这

一特征在 $H_C/A3: GD1a$ 、 $H_C/A4: GD1a$ 和 $H_C/A5: GM1b$ 结构中也可以观察到^[3,53]。

$H_C/A3: GD1a$ (PDB: 6THY)和 $H_C/A3$ (PDB: 6F0O)的构象非常相似, RMSD 为 1.0 \AA ^[53]。 $H_C/A3$ 在与 GD1a 结合后,除了与神经节苷脂结合后残基的相对位置发生变化外,氢键也有明显的差异,尤其是与 Sia^5 结合的氢键。Tyr 1 263 移动到 Sia^5 附近取代了 1 个水分子,并与 Phe 1 248 进一步相互作用, Asn 126 与 Phe 1 245 形成氢键, His 1 249 接近 GBS 与 Gal4 和几个疏水残基 (Phe 1 113、Val 1 198、Glu 1 199、Tyr 1 250、Trp 1 262)形成 2 个氢键^[54] (图 4)。

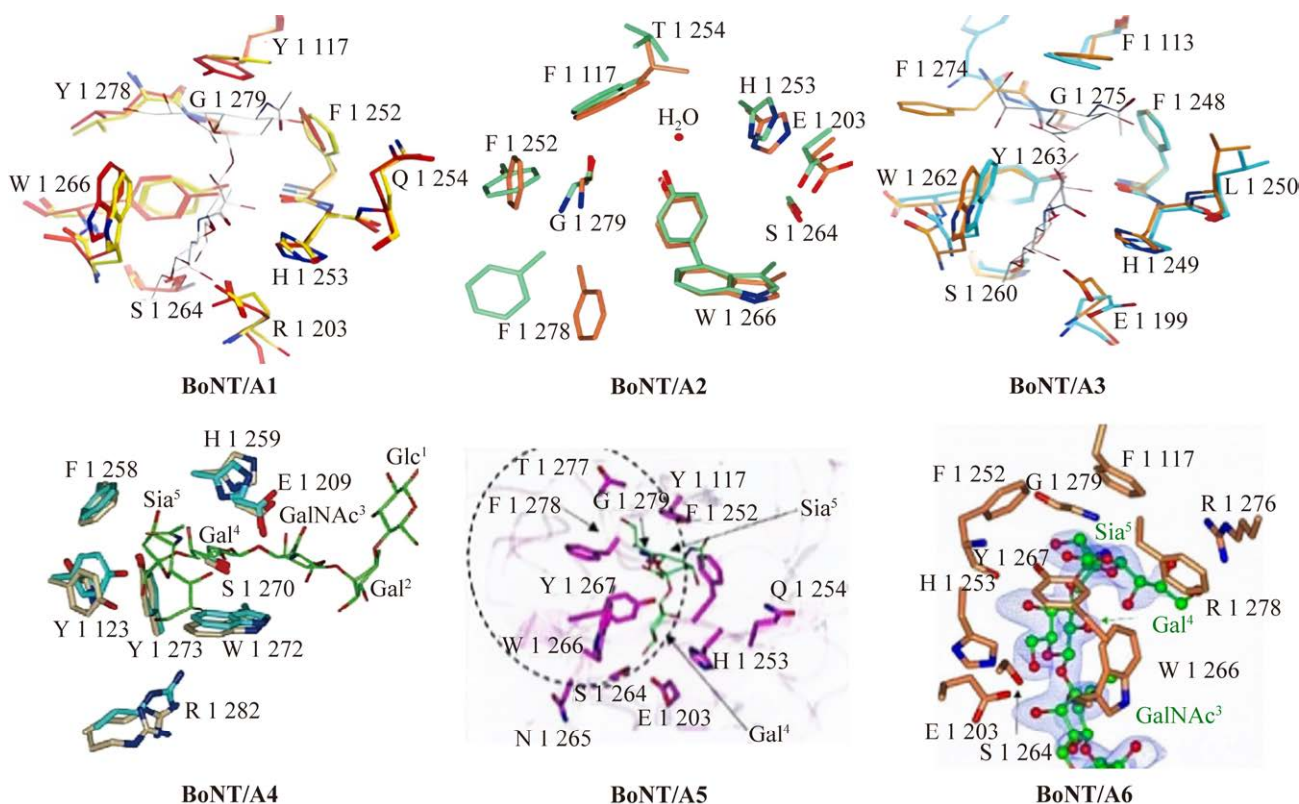


图 4 BoNT/A 亚型结合与未结合神经节苷脂结合位点比较^[55-58] BoNT/A1 和 BoNT/A3 基于文献[57]的图 4A 和图 4C, BoNT/A2 基于文献[58]的图 3B, BoNT/A4 和 BoNT/A5 基于文献[55]的图 2B 和图 4B 进行修改, BoNT/A6 基于文献[56]的图 1C 进行修改

Figure 4 Comparison of BoNT/A serovar isoforms bound and unbound ganglioside binding sites^[55-58]. BoNT/A1 and BoNT/A3 were modified based on figure 4A and 4C of reference [57], BoNT/A2 based on figure 3B of reference [58], BoNT/A4 and BoNT/A5 based on figure 2B and 4B of reference [55], and BoNT/A6 based on figure 1C of reference [56].

H_C/A4 (PDB: 6F0P)在与 GD1a 结合后, Arg 1 282 和 Tyr 1 123 与 Sia⁵ 形成氢键相互作用^[53] (表 2)。此外, H_C/A4 与神经节苷脂无水介导的相互作用, 而 H_C/A1、H_C/A2 和 H_C/A3 都有水介导的相互作用。

H_C/A5: GM1b (PDB: 7QPPU)结构与 H_C/A5 (PDB: 6TWP)结构非常相似, 在与神经节苷脂结合后, H_C/A5: GM1b 结构的 N 端发生了显著的构象变化。Arg 893 和 Tyr 894 的侧链在与 GM1b 结合后向蛋白质结构主体旋转, 导致结构更加紧凑 (图 4)。另一个研究发现, H_C/A5 与 BoNT/A1: GT1b (PDB: 2VU9)的结构相比, 含有神经节苷脂相互作用的残基 1 260–1 280 环采用了不同的排列方式^[55]。认为是因为 S 1 275 和 R 1 276 参与相互作用, 使环的构象发生改变。

H_C/A6 具有两种晶体形式, 晶体 I (PDB: 6TWO)和晶体 II (PDB: 8ALP)之间的晶体结构存在差异 (图 4)。H_C/A6 (晶体形式 I)与神经节苷脂结合后残基 Phe 1 278 向 Sia⁵ 旋转时 1 269–1 277 环变宽 (图 4)。这与 H_C/A2、H_C/A3 和 H_C/A5 中发生的现象一致。H_C/A6 (晶体形式 II)中其铰链旋转约 16.8°, 这是在 BoNT/A 亚型结构中观察到的子结构域最大的铰链运动^[56]。H_C/A6 与 H_C/A5 一样, 蛋白质整体折叠与其他肉毒毒素 H_C 结构高度相似。除了残基 1 117, 它是一个 Phe 而不是一个 Tyr 以外, 神经节苷脂结合位点都与 H_C/A5 相同 (图 4)。虽然缺少羟基会导致 GT1b 的末端唾液酸失去氢键, 但侧链仍然可以继续与碳环相互作用^[57]。

研究证明, 神经节苷脂和不同亚型 H_C 之间相互作用具有差异, 这种差异来自水介导的相互作用以及氢键产生的相互作用^[57]。之前报道 H_C/A3 与 H_C/A1 相比, H_C/A3 与 GD1a 的结合亲和力低于 H_C/A1, 研究者认为 H_C/A3 与 GD1a 的氢键相互作用减少是毒性降低的一个原因^[3]。

而 BoNT/A2 比 BoNT/A1 对神经节苷脂具有更高的亲和力, 这与 BoNT/A2 可以更快进入神经元细胞现象一致^[59–60]。H_C/A4 结构显示出与 GD1a 氢键相互作用的减少, 研究证明其在小鼠中的活性与 BoNT/A1 相比降低很多^[61], 并且 BoNT/A4 进入细胞的效率也较低^[62–63], 这些可以证明细胞结合域与肉毒毒素毒性以及进入神经元细胞的速度等方面息息相关。

2.1.2 A 型肉毒毒素与 SV2 受体结合

与 BoNT/A 受体结合域结合的 SV2 分为 2 部分结合位点。第一部分是蛋白结合位点, 在 H_C/A 亚型中有一些残基并不保守, 如 H_C/A1 和 H_C/A2 中的残基 Thr 1 142、Thr 1 144 和 Thr 1 146^[64] (图 5), 它们容易与 SV2C 的 β 片段堆积产生相互作用。然而这种相互作用只能产生很小结构变化。另一方面, 所有 H_C/A 亚型都有 2 个高度保守的残基, 如 H_C/A1、H_C/A2、H_C/A5 和 H_C/A6 亚型中的 Thr 1 145 和 Thr 1 146, H_C/A3 中的 Thr 1 141 和 Thr 1 142, 以及 H_C/A4 中的 Thr 1 151 和 Thr 1 152 (图 5), 这些保守残基对于 SV2C 与受体结合域结合至关重要^[65]。

H_C/A2 结构域与非糖基化 SV2C-LD4 复合物结合的晶体结构表明, 尽管不同 A 亚型间存在一些残基差异, 但结合模式是相似的。如结构高度相似的 H_C/A5 和 H_C/A6 也可能以相同的方式结合 SV2C。这主要是因为 β-链之间的主干-主干相互作用的性质, 导致大多数 A 亚型与 SV2C 间的相互作用一致。然而, 一个值得注意的变异点是上述 H_C/A3 中的 Thr 1 152 和 H_C/A6 的 Thr 1 156, 它们可以与 SV2C 的 H563 形成亲电相互作用 (图 5)。在 H_C/A1 中的等效位置有一个精氨酸 (图 5), 可以形成阳离子-π 堆叠相互作用, 在 H_C/A2 中的等效位置有一个谷氨酸, 可以与 SV2C 组氨酸形成盐桥。

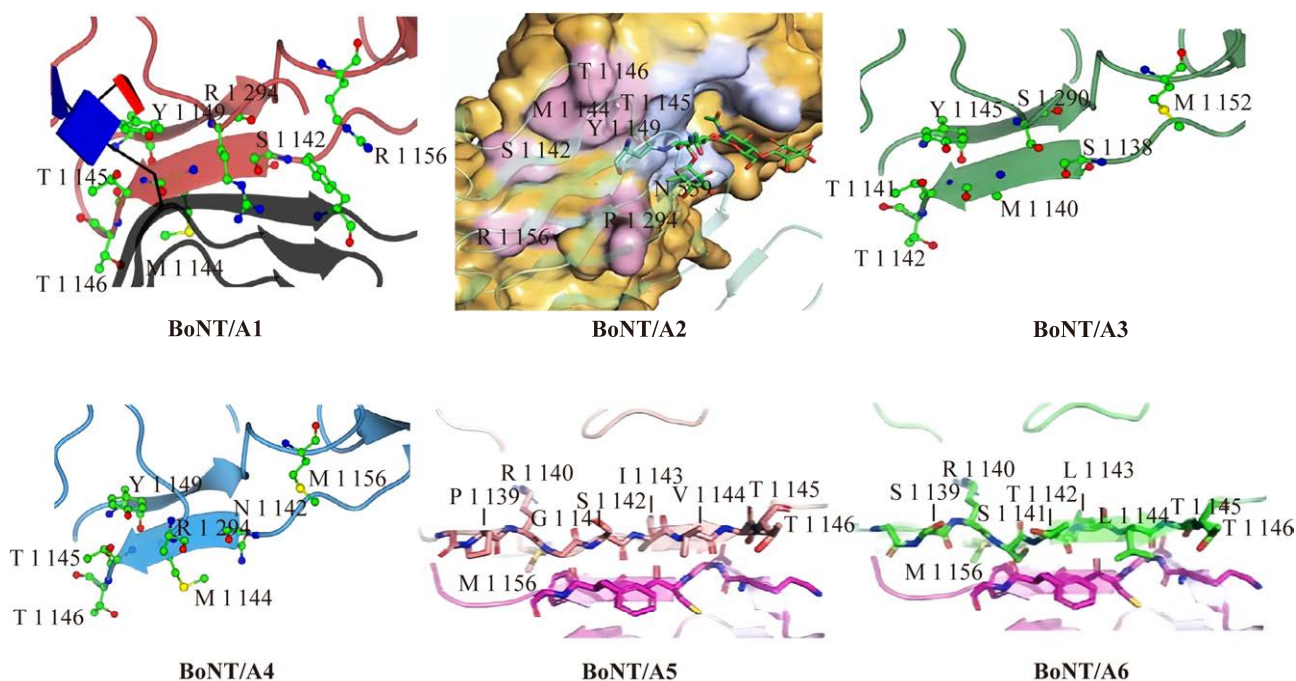


图 5 BoNT/A 亚型与 SV2 蛋白质结合位点比较^[53,57,64] BoNT/A1、BoNT/A3 和 BoNT/A4 基于文献[53]的图 2B–2D, BoNT/A 2 基于文献[64]的图 2C, BoNT/A5 和 BoNT/A6 基于文献[57]的图 3E、3F 进行修改
Figure 5 Comparison of SV2 protein binding sites of the BoNT/A serogroup^[53,57,64]. BoNT/A1, BoNT/A3, and BoNT/A4 in this figure are based on reference [53] figure 2B–2D; BoNT/A 2 is based on reference [64] figure 2C, and BoNT/A5 and BoNT/A6 are modified based on reference [57] figure 3E and 3F.

第二部分聚糖结合位点, 对于 BoNT/A 与 SV2 的高亲和力结合至关重要, 因为只有糖基化的 SV2 才能增强受体结合域与 SV2 结合。BoNT/A1 与人的糖基化 SV2C (H_C/A1: gSV2C) 结合的晶体结构显示, Asn-559 上的 N-连接聚糖与 gSV2C 产生大量相互作用。参与 H_C/A1 聚糖结合的 2 个关键残基是 Phe 953 和 His 1 064 (图 6), 它们与 Asn 559 聚糖的 2 个 GlcNAc 分子形成 π 堆积相互作用。另外 12 个残基与聚糖形成氢键网络通过水介导的相互作用。

研究者检测 SV2C 糖结合位点发现, 残基 Gln106 会阻碍糖的结合, 该残基与 BoNT/A1 中的 His 1 064 相对应, 因此不会使受体结合域与 SV2C 结合的亲和力降低^[64]。然而, 与 BoNT/A1 相比, Gln106 残基在 BoNT/A2、BoNT/A3、

BoNT/A5、BoNT/A6 和 BoNT/A8 中, 与位于 1 060 位的精氨酸残基相对应, 可能阻碍糖的结合, 而导致与 SV2C 亲和力降低^[53] (图 6)。这几种亚型对 SV2C 的亲和力可能低于 BoNT/A1, 然而在体内外实验中发现, BoNT/A2 和 BoNT/A6 均比 BoNT/A1 能够更快地进入神经元细胞^[60]。

2.2 B 型肉毒毒素

目前, BoNT/B 血清型有 8 种亚型(B1–B8), 它们在氨基酸水平上的差异介于 1.5%–7.0% (表 3)^[3]。如表 3 所示, 从全长序列比对来看, 其中 B1–B8 相似性较高, 达到 90%以上; 从受体结合域序列比对来看, B1 与 B6 相似性最高, 与 B4 相似性最低。虽然 BoNT/B 的晶体结构与 BoNT/A 类似^[11], 但 BoNT/B 靶向神经元细胞膜上 Syt-I 或 Syt-II 蛋白受体^[39]。

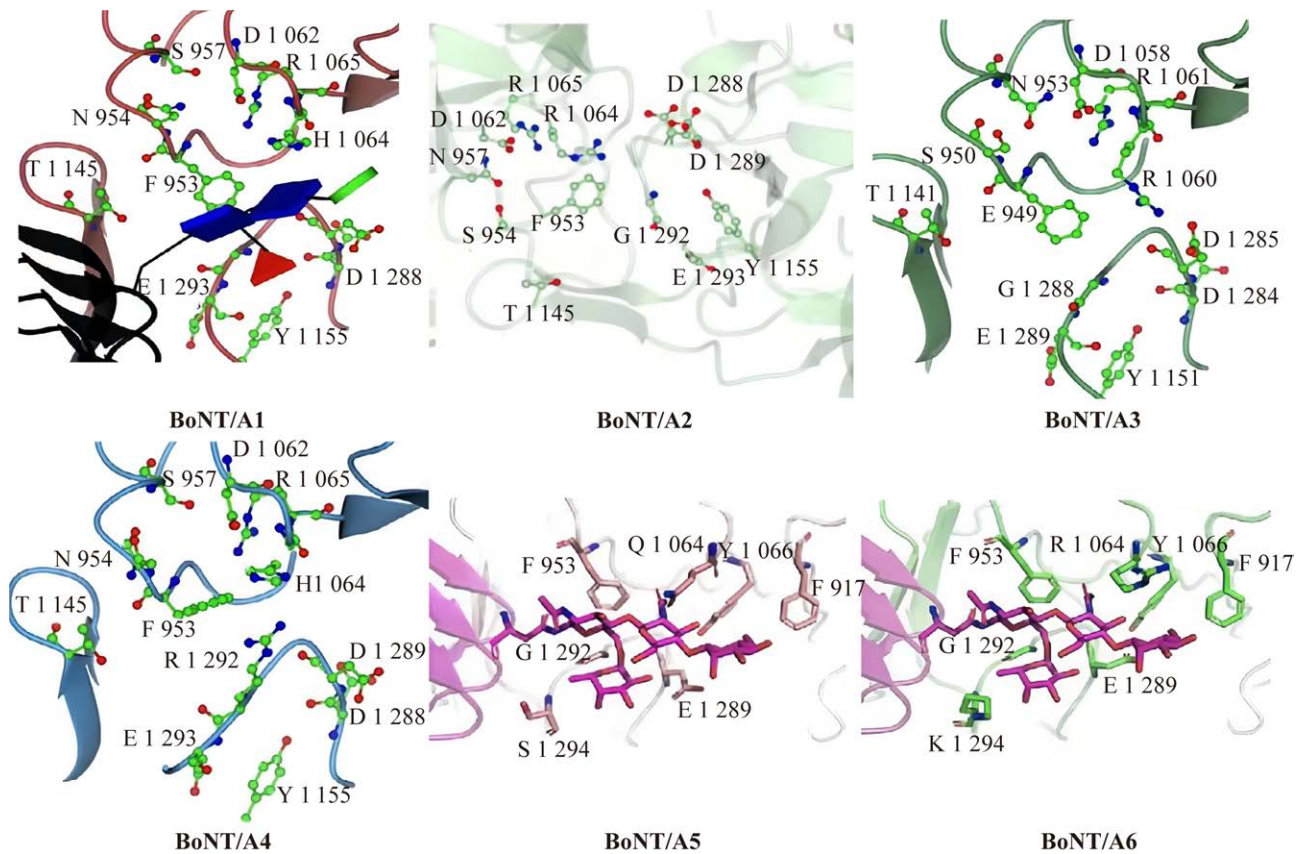


图 6 BoNT/A 亚型与聚糖结合位点比较^[53,57,66] BoNT/A1、BoNT/A3 和 BoNT/A4 基于文献[53]的图 2E–2G, BoNT/A 2 基于文献[66]的图 2B, BoNT/A5 和 BoNT/A6 基于文献[57]的图 3H、3I 进行修改
Figure 6 Comparison of glycan binding sites of BoNT/A isoform^[53,57,66]. BoNT/A1, BoNT/A3, and BoNT/A4 are based on reference [53] figure 2E–2G, BoNT/A 2 is based on reference [66] figure 2B, and BoNT/A5 and BoNT/A6 are modified based on reference [57] figure 3H and 3I.

表 3 BoNT/B 亚型全长与 H_C 结构域序列比对

Table 3 Alignment of full-length and H_C domain sequences of serogroup BoNT/B

Subtype	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
B1	–	91.78	93.15	89.04	94.98	93.82	90.41	92.24
B2	91.78	–	95.78	89.97	91.56	96.56	90.41	93.68
B3	95.97	98.22	–	89.27	92.92	96.34	92.92	93.14
B4	92.80	92.78	92.95	–	88.13	88.79	89.27	87.44
B5	96.20	95.27	95.74	92.41	–	92.91	90.41	91.78
B6	96.20	98.22	98.22	92.49	95.51	–	92.65	93.19
B7	94.81	95.82	95.74	92.72	94.42	91.99	–	90.64
B8	95.51	95.74	95.90	92.18	94.74	92.69	90.64	–

Table shows the percentage of full-length and H_C domain sequence alignments for BoNT/B isoforms. For H_C alignment, residues 862–1 291 of the BoNT/B1 sequence were used. The sequence numbers of BoNT/B1 to /B8 in NCBI were APH17270.1^[67], RUT52409.1^[68], WP_061310563.1^[69], CAA50482.1^[70], BDB03763.1^[71], BAO05199.1^[72], WP_129265872.1^[69], and AFN61309.1^[73].

2.2.1 B型肉毒毒素与神经节苷脂结合

据报道, BoNT/B 通过与神经细胞膜上的 Syt-II 和神经节苷脂 GD1a 或 GT1b 结合而产生毒性。BoNT/B 的毒性与受体结合有关, 但与单独的 GT1b 或 GD1a 无关^[74]。GD1a 的 4 个亚单位与 BoNT/B 的 GBS 结合, 其中 Sia⁵ 与 N 1 273、N 1 105、G 1 277 和 Y 1 263 形成氢键, Gal4 与 I 1 240、H 1 241、S 1 260 和 E 1 190 形成氢键(图 7A)^[75]。GalNAc³ 和 Sia⁶ 分别与 E 1 190 和 W 1 262 形成一个氢键(图 7A)。W 1 262 进一步与 Gal4 形成关键的芳族堆叠相互作用^[76]。

虽然 GD1a 和 GT1b 中存在的 Sia⁵ 和 Sia⁶ 均与 GBS 相互作用, 但 GT1b 结构与 GD1a 相比多一个 Sia⁷ (图 3), 研究者认为其可以加强 BoNT/B 与受体的结合^[76]。

在 Syt-II 和 GD1a 共同结合过程中, BoNT/B1 结合域的晶体结构与 Sia⁵ 片段表现出强烈的相互作用^[76]。虽然 Syt-II 和 GD1a 之间无直接联系, 但有证据表明, 两者均可以影响彼此的结合, 这可能与两者结合位点的空间排列有关^[77]。

2.2.2 B型肉毒毒素与 Syt 结合

BoNT/B 可以与 Syt-I 或 Syt-II 形成一个短螺旋, 与 BoNT/B 结合区域内的疏水凹槽结合^[78] 进入细胞。Chai 等对 BoNT/B1 与 Syt 之间的结合机制研究发现^[79], Syt-I 与 BoNT/B 的亲合力较低。

BoNT/B2 与 BoNT/B1 具有相似的受体结合机制, 但研究发现 B2 比 B1 的毒性低, 认为与 Syt 亲和力有关。BoNT/B1 和 BoNT/B2 之间有 4 个残基差异, 为疏水结合机制的关键残基。由于这 4 个残基与 Syt 的保守残基邻近, 因此被认为与 Syt 亲和力变化相关^[80]。在 BoNT/B1 中, S 1 199 通过芳香族与 F47 的相互作用增加与 Syt 的亲和力; 在 BoNT/B2 中, 这种疏水残基相互作用被 S 1 117 和 N 1 197 与 Syt-I 之间的静电作用所取代(图 7B), 从而导致 B2 和 Syt 之间的疏水相互作用丧失, 从而使亲和力降低^[76]。

另一个研究发现, BoNT/B 与 Syt-II 的亲和力取决于实验是在人还是大鼠的 Syt-II 上进行的。与大鼠和小鼠相比, BoNT/B 与人 Syt-II 的

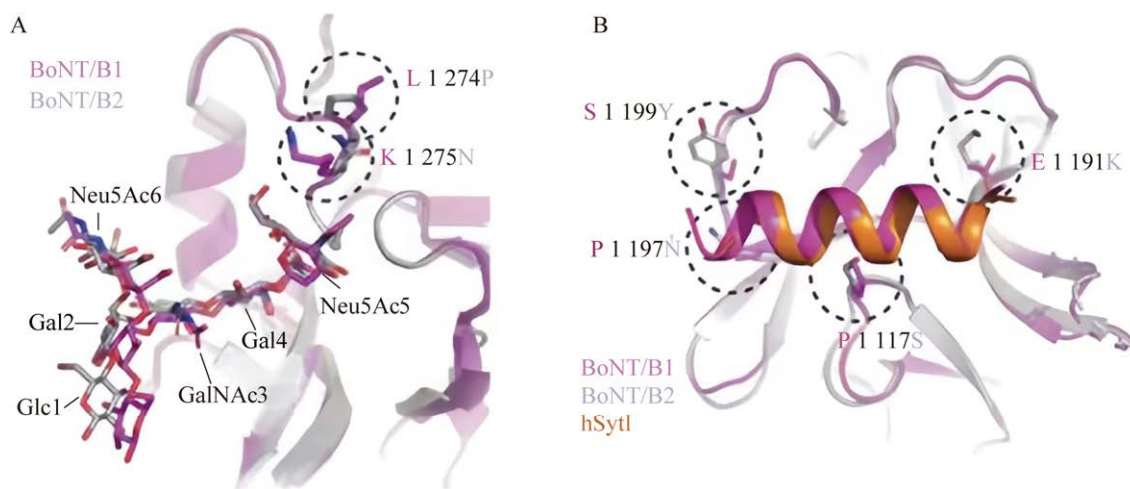


图 7 BoNT/B 亚型与受体结合位点比较^[75] BoNT/B1 和 BoNT/B2 基于文献[75]的图 3D 和图 4G 进行修改

Figure 7 Comparison of BoNT/B serogroup and receptor binding sites^[75]. BoNT/B1 and BoNT/B2 in this figure are modified based on figures 3D and 4G of reference [75].

结合亲和力降低^[81-82]。这种显著的差异是由于 Phe54 氨基酸的差异而产生^[81]。研究者对 Syt-II 的管腔结构域^[83]进行研究发现, 重组人 Syt-II-LD 在小鼠体内对 BoNT/B 中毒具有保护作用。证明重组人 Syt-II 的管腔结构域与神经节苷脂联合可以抑制 BoNT/B 对小鼠的毒性^[84]。正是因为 Syt 受体可以与 BoNT/B 特异性结合的特点, 使 Syt 成为肉毒毒素抑制剂研究新的方向, 后来研究者发现了一种可以中和 Syt-II 受体结合位点的抗体 SC12^[85], 它可以有效地阻止 BoNT/B 与其受体的结合。

2.3 C 型肉毒毒素

BoNT/C 主要与动物肉毒中毒有关^[86-87]。BoNT/C 血清型没有亚型, 截至目前仅鉴定出 2 种不同的蛋白序列, 它们具有 99.9% 的一致性。

一项早期研究发现, BoNT/C 可以与 GD1b 和 GT1b 结合, 实验中发现, 在神经节苷脂缺陷小鼠中 BoNT/C 毒性会降低, 证实了 BoNT/C 利用神经节苷脂进入细胞^[88]。BoNT/C 的受体结构域包含一个 SxWY 不保守基序和一个额外的唾液酸结合位点^[89], 这个结合位点在 BoNT/C 中称为 Sia-1。Sia-1 被发现可以结合含 Sia⁵ 以及 Sia⁷ 的神经节苷脂(GD1b>GT1b)^[90]。后来还发现 BoNT/C 可能含有 2 个神经节苷结合位点, 经研究证实了唾液酸结合位点与任一神经节苷脂结合位点被破坏, 都会阻止 H_C 进入神经元细胞^[88]。

2.4 D 型肉毒毒素

与 BoNT/C 一样, BoNT/D 没有亚型, 有多个相似性超过 96% 的一级序列。

神经节苷脂类是 BoNT/D 进入细胞所必需的。研究发现, BoNT/D 中毒不依赖于神经节苷脂与受体的结合^[23], 其毒性取决于神经节苷脂的表达, β -发夹环是神经节苷脂和神经元结

合所必需的, 被称为神经节苷脂结合环, β -发夹环内的 Asp 1 233 有利于毒性的表达。另外, BoNT/D 进入神经元依赖于多种碳水化合物的相互作用^[91]。

BoNT/D 可以识别 SV2 的 3 种亚型。缺乏 SV2 的细胞与 BoNT/D 结合后不会产生毒性, 但可以通过表达 3 种 SV2 亚型(SV2A、SV2B 和 SV2C)中的任何一种来恢复这种毒性。N-链糖基化位点的突变也对 BoNT/D 进入神经元没有影响, 这表明 BoNT/D 中的 SV2 受体结合域可能与其他 SV2 相互作用的肉毒毒素不同^[89]。

2.5 E 型肉毒毒素

目前已知有 12 种 BoNT/E 亚型(E1-E12), 其氨基酸特征差异高达 12% (表 4)。如表 4 所示, 从全长序列比对来看, 与 E1 比较, E9 序列差异较大, 与 E2 最相似为 99.12%。从受体结合域序列比对来看, E1 与 E3 和 E7 序列完全一致, 而与 E9 序列差异仍然最大, 为 83.17%。

2.5.1 E 型肉毒毒素与神经节苷脂结合

BoNT/E 识别 GD1a 和 GT1b 的亲和力高于 GM1。H_C/E 与 GD1a 结合后, 可以观察到明显的结构变化。特别是在 C 端 β -三叶草形亚结构域可以观察到环 1 228-1 237 发生了构象变化^[18] (图 8)。侧链残基 R 1 230 在这个环中发挥重要作用, 其产生的静电作用可以推动主链和环远离神经节苷脂。这种现象可以通过与侧链相邻的 L 1 092 和 F 1 214 残基的疏水作用进一步稳定 (图 8A)。Gal4 首先与 S 1 222 形成氢键, 而后与 SxWY 基序相互作用, 其次与残基 Y 1 225 相互作用, 最后通过与 W 1 224 的吡啶环堆积而保持结合稳定 (图 8A)。GalNAc3 也与 K 1 215 和 K 1 171 侧链形成强氢键来增强稳定性 (图 8A)。这些残基与神经节苷脂相互作用使 H_C/E 与 GD1a 结合更加稳定。

表 4 BoNT/E 亚型全长与 H_C 结构域序列比对Table 4 Alignment of full-length and H_C domain sequences of serogroup BoNT/E

Subtype	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
E1	–	97.35	100	97.78	92.82	97.28	100	97.28	83.17	95.31	93.58	87.65
E2	99.12	–	97.53	97.28	91.11	96.79	97.53	99.75	84.16	96.54	95.31	88.40
E3	98.24	97.36	–	97.78	92.59	97.28	100	99.75	83.17	95.31	93.58	87.65
E4	97.36	97.12	95.69	–	90.62	99.51	97.78	97.53	82.67	94.81	93.09	86.67
E5	96.88	96.41	95.21	95.05	–	90.84	92.82	91.09	83.91	88.86	89.60	90.84
E6	97.04	96.81	95.93	96.96	94.89	–	97.28	97.04	82.67	93.83	93.09	86.88
E7	97.92	97.12	97.36	96.25	94.81	96.41	–	97.28	83.17	94.57	93.58	87.87
E8	96.25	97.04	95.69	96.17	94.09	96.81	98.32	–	83.91	96.05	95.56	88.37
E9	89.13	89.37	88.73	90.01	89.52	88.25	89.21	89.45	–	83.66	85.15	88.37
E10	95.61	95.93	95.13	95.13	93.16	95.85	96.88	97.84	89.21	–	97.04	87.38
E11	93.37	93.85	92.57	92.73	91.93	93.13	93.45	94.41	89.05	95.29	–	87.62
E12	92.97	93.13	92.57	92.57	93.16	91.13	92.49	92.01	91.52	91.77	91.05	–

Table shows the percentage of full-length and H_C domain sequence alignments for BoNT/E isoforms. For H_C alignment, residues 848–1 252 of the BoNT/E1 sequence were used. The sequence numbers of BoNT/E1 to/E12 in NCBI were E1: ADF42615.1^[92], E4: APF24160.1^[93], E10: AII82313.1^[93], and E11: AII82281.1^[94]. The sequence numbers in Uniprot were E2: A2I2S6^[95], E3: A2I2S5^[95], E5: Q9K395^[96], E6: A8Y878^[97], E7: G8I2N7^[95], E8: G8I2N8^[95], E9: K7S9Y2^[95], and E12: W8FNB6^[98].

2.5.2 E 型肉毒毒素与 SV2 结合

BoNT/E 只能与 SV2A 或 SV2B 结合^[18]。研究表明, BoNT/A 的受体结合域可识别 SV2 管腔结构域四边形 β 螺旋折叠的 C 端、β 链的开放边缘

以及 N-聚糖, 它们一起形成 H/CA 的复合结合位点。然而, BoNT/E 的受体结合域与 SV2 结合位点有 8 个氨基酸缺失(图 8B), 表明 BoNT/E 利用一种独特的机制来识别 SV2A 或 SV2B^[97]。

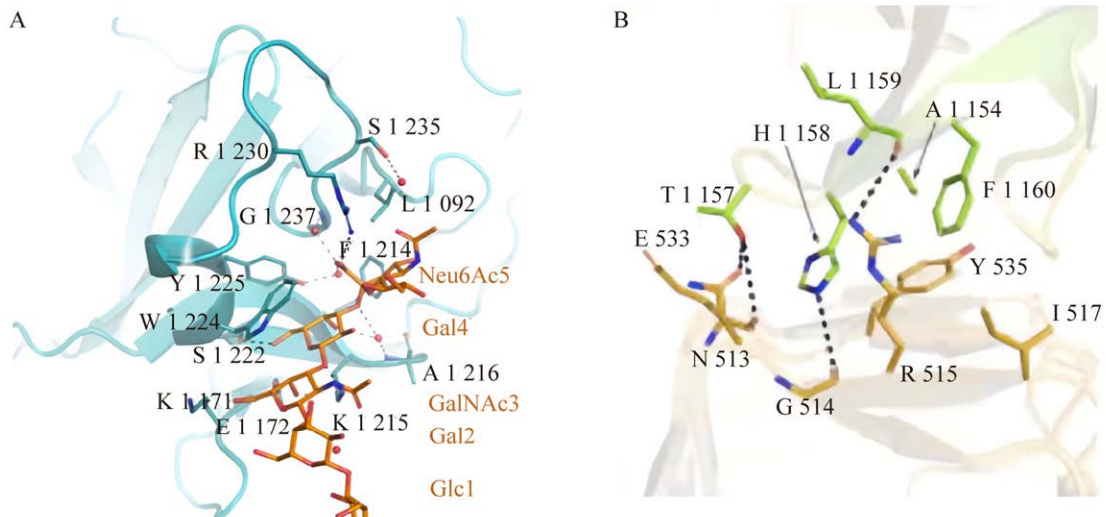
图 8 BoNT/E 与受体结合位点比较^[18,99]

Figure 8 Comparison between BoNT/E and receptor binding sites^[18,99]. Panel A shows the structure of HC/E binding to the ganglioside receptor GD1a. Panel B shows the structure of HC/E bound to the SV2 receptor.

2.6 F 型肉毒毒素

目前 BoNT/F 血清型有 9 种亚型(F1-F9), 它们的序列同一性差异高达 30% (表 5)。如表 5 所示, 从全长序列比对来看, 与 F1 相比, F1 亚型与 F4 亚型序列相似性最高, 为 92.33%; 与 F5 相似性最低, 为 70.31%。从受体结合域序列比较, F1 与 F8 序列相似性最高, 为 98.05%。

2.6.1 F 型肉毒毒素与神经节苷脂结合

BoNT/F1 需要与 GT1b 或 GD1a 中含有 α 2,3-链唾液酸的神经节苷脂结合^[78]。GT1b 和 GD1a 对 BoNT/F1 表现出较高的亲和力。BoNT/F1 的 H_C 结构域表面含有大量的阳离子, 由于 GT1b 神经节苷脂带负电荷的唾液酸, 因此 H_C 可以与 GT1b 神经节苷脂表面的阴离子相互作用。在 GBS 区域, BoNT/F1 主要通过其芳香族残基 H 1 241 和 W 1 250 与神经节苷脂相互作用。在 GBS 区域之外, 研究者发现氨基酸 N 1 121、N 1 119、R 1 179、R 1 202、K 1 199、S 1 190、K 1 193 和 Y 1 183 也通过氢键与神经节苷脂相互作用^[106]。

2.6.2 F 型肉毒毒素与 SV 结合

据报道, BoNT/F1 的蛋白受体是否是糖基化的 SV2 仍有待最终确定。因为模拟预测 BoNT/F1 与 SV2A 的蛋白质部分之间不存在结

合, 因为在 BoNT/F1 序列的 1 135 位处存在脯氨酸, 其占据与 BoNT/A 结构中残基 T 1 146 相同的位置^[106]。然而, T 1 146 是一个通过与 SV2 形成氢键来介导受体相互作用关键残基^[93]。

2.7 G 型肉毒毒素

目前已知的 BoNT/G 蛋白序列只有 2 个, 它们具有 99.9% 的一级序列同源性。

BoNT/G 具有保守的 SxWY 基序, 并优先结合 GT1b^[107]。其亲和力顺序(GT1b>GD1a>GD1b)与 BoNT/A、BoNT/B 和 BoNT/F 相似^[108]。除了双受体相互作用外, BoNT/G 还含有与 BoNT/B 类似的脂质结合环, 该环可直接与细胞膜相互作用增强亲和力, 去掉该环可显著降低神经毒性^[109-110]。

据报道, BoNT/G 和 BoNT/B 的蛋白受体是 Syt-I 或 Syt-II。BoNT/B 和 BoNT/G 对 Syt-I 和 Syt-II 的管腔结构域的亲合力按照 B-Syt-II>G-Syt-I>G-Syt-II>B-Syt-I 的顺序递减。Syt-I 和 Syt-II 之间有 3 个相互作用氨基酸不同, 即 A38 与 M 46、M 47 与 F 55、L 50 与 I 58。与 H_C/B-Syt-II 类似, 野生型 H_C/G 的 Y 1 186 和 L 1 191 侧链与 Syt-II 的 M 46、F 55 和 I 58 相比, 分别更好地与 Syt-I 的 A 38、M 47 和 L 50 结合, 因此 H_C/G 对 Syt-I 的亲和力高于 Syt-II^[108,111]。

表 5 BoNT/F 亚型全长与 H_C 结构域序列比对

Table 5 Alignment of full-length and H_C domain sequences of serogroup BoNT/F

Subtype	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
F1	–	82.97	84.63	89.29	83.94	82.51	79.56	98.05	84.71
F2	83.71	–	96.37	81.51	92.03	93.89	72.02	83.70	90.34
F3	84.25	97.19	–	82.44	93.46	93.64	73.17	84.39	92.49
F4	92.33	83.71	84.09	–	82.00	81.03	76.40	88.56	83.45
F5	70.31	74.37	74.35	69.84	–	90.22	73.48	84.18	92.03
F6	88.05	90.02	90.04	87.42	74.11	–	72.17	82.27	88.75
F7	74.43	69.53	69.91	72.77	64.45	70.84	–	79.32	73.48
F8	96.24	83.71	84.17	93.19	69.84	87.81	73.01	–	84.67
F9	84.27	89.92	81.63	84.03	73.75	87.37	69.85	84.18	–

Table shows the percentage of full-length and H_C domain sequence alignments for BoNT/F isoforms. For H_C alignment, residues 866–12 778 of the BoNT/F1 sequence were used. The sequence numbers of BoNT/F1–BoNT/F9 in NCBI were F1: WP_011987710.1^[69], F2: UYX45882.1^[100], F3: APQ97862.1^[100], F4: APQ71923.1^[101], F5: APR02750.1^[101], F6: ADU57954.1^[102], F7: AQA28590.1^[103], F8: KEJ01913.1^[104], and F9: AQA28591.1^[105].

2.8 HA (FA)型肉毒毒素

BoNT/HA 是 2014 年在一例婴儿肉毒杆菌中毒中被发现的^[112-113]。由于其不可中和的抗原性，它被称为 BoNT/H (BoNT/HA)，根据序列分析将该基因置于与其他血清型不同的谱系中^[113]。随后确定该分子为一种花叶毒素，由与 BoNT/F5 相似的 LC、与 BoNT/F1 相似的 H_N 结构域和与 BoNT/A1 相似的受体结构域组成^[6]。已经证实糖基化的 SV2C-LD4 与 BoNT/FA 的受体结构域可以直接结合^[114]，但是该结合结构域的晶体结构与 BoNT/A1 有一些细微的差异^[115]。神经节苷脂结合位点能够保持与 BoNT/A1 相同的折叠，但尚未存在神经节苷脂结合结构，因此确切的相互作用仍不确定^[116]。BoNT/FA 序列包含 BoNT/A1 的突变，研究者通过对未糖基化的 SV2C 的下拉试验确定 BoNT/A1 对 SV2 蛋白骨架的亲和力降低，而参与聚糖结合的等效残基保持不变^[114]。这些突变对 SV2 不同亚型的影响还有待进一步研究。

2.9 DC 型肉毒毒素

BoNT/DC 是一种自然存在的嵌合毒素，与 BoNT/C 和 BoNT/D 进化相关。它的 LC 和 H_N 几乎与 BoNT/D 相同，而它的 H_C 与 C 型的相似性约为 77%^[117]。SxWY 基序在 H_C/DC 中不保守。在所有 BoNT 中，BoNT/DC 的独特之处是：在缺乏神经节苷的培养神经元中，BoNT/DC 与受体的结合及进入细胞不受影响，H_C/DC 与神经节苷脂晶体结构表明，H_C/DC 仅识别唾液酸部分，不与碳水化合物主链相互作用。因此，BoNT/DC 能够利用含唾液酸的分子作为受体进入细胞。

3 总结与展望

BoNT 除致病外也可用于美容^[116]和疾病治疗(如治疗帕金森病^[118]、膀胱炎^[119]和偏头痛等^[120])。

近年来，受体复合物的晶体结构为点突变奠定了基础，也为肉毒毒素的治疗提供新的方向。有研究者通过在 BoNT 重链上进行点突变，发现这种突变可以提高毒素活性。例如 Yin 等对 H_C/A 和 H_C/B 进行了点突变，发现可以增强它们受体结合域与神经节苷脂和蛋白质受体的结合，从而提高毒素靶向进入神经元的能力^[121]。Burns 等对 BoNT/A 的神经节苷脂结合位点进行突变，增强了其与神经节苷脂之间的相互作用，从而增强了 BoNT/A 的靶向效力^[122]。这种受体结合域的点突变，为肉毒毒素在治疗方面的研究提供更多可能。

目前，受体结合域研究存在局限性，大多仅限于 1 种或 2 种血清型，很多血清型受体结合域与受体结合机制尚不清楚。如上述中提到，BoNT/E 的受体结合域与 SV2 结合位点有 8 个氨基酸缺失，但仍以未知作用机制与受体结合并发挥毒理作用。BoNT/D 引起中毒不依赖于与神经节苷脂的结合^[23]，其毒性取决于神经节苷脂的表达。然而嵌合型 BoNT/DC 虽然与 BoNT/D 和 BoNT/C 在结构上有高度相似性，但其进入神经元可以不需要与神经节苷脂结合直接进入。此外，人和动物中受体结构不同，也可以导致一些血清型只会引起动物中毒，而不会引起人中毒。

另一方面，尽管 BoNT 亚型之间的序列同一性很高，但它们的中毒特性仍存在显著差异，例如它们的发作症状和作用持续时间。如前面所述 BoNT/A2 在神经元细胞中比 BoNT/A1 更有效并且可以更快地进入细胞，BoNT/A1 的效力为 BoNT/A4 的 1 000 倍，A3 尾静脉注射发现与 A1 症状不同等。目前大多数研究认为这些是由 LC 决定的，但根据目前对于重链的研究，认为这很可能是 3 种结构域共同作用的结果，而不单是某一个单独结构域作用的结果。

参考文献

- [1] ROSSETTO O, PIRAZZINI M, MONTECUCCO C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12: 535-549.
- [2] PECK MW, STRINGER SC, CARTER AT. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(2): 183-191.
- [3] GREGORY KS, LIU SM, ACHARYA KR. Crystal structure of botulinum neurotoxin subtype A3 cell binding domain in complex with GD1a co-receptor ganglioside[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(3): 298-305.
- [4] MASUYER G, CHADDOCK JA, FOSTER KA, ACHARYA KR. Engineered botulinum neurotoxins as new therapeutics[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2014, 54: 27-51.
- [5] FAN YF, BARASH JR, CONRAD F, LOU JL, TAM C, CHENG LW, ARNON SS, MARKS JD. The novel clostridial neurotoxin produced by strain IBCA10-7060 is immunologically equivalent to BoNT/HA[J]. *Toxins*, 2019, 12(1): 9.
- [6] GONZALEZ-ESCALONA N, THIRUNAVUKKARASU N, SINGH A, TORO M, BROWN EW, ZINK D, RUMMEL A, SHARMA SK. Draft genome sequence of bivalent *Clostridium botulinum* strain IBCA10-7060, encoding botulinum neurotoxin B and a new FA mosaic type[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01275-14.
- [7] NAKAMURA K, KOHDA T, SETO Y, MUKAMOTO M, KOZAKI S. Improved detection methods by genetic and immunological techniques for botulinum C/D and D/C mosaic neurotoxins[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/3/4): 881-890.
- [8] NAKAMURA K, KOHDA T, UMEDA K, YAMAMOTO H, MUKAMOTO M, KOZAKI S. Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1/2): 147-154.
- [9] KOŠENINA S, MASUYER G, ZHANG SC, DONG M, STENMARK P. Crystal structure of the catalytic domain of the *Weissella oryzae* botulinum-like toxin[J]. *FEBS Letters*, 2019, 593(12): 1403-1410.
- [10] TANIZAWA Y, FUJISAWA T, MOCHIZUKI T, KAMINUMA E, SUZUKI Y, NAKAMURA Y, TOHNO M. Draft genome sequence of *Weissella oryzae* SG25T, isolated from fermented rice grains[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(4): e00667-14.
- [11] ZORNETTA I, AZARNIA TEHRAN D, ARRIGONI G, ANNIBALLI F, BANO L, LEKA O, ZANOTTI G, BINZ T, MONTECUCCO C. The first non *Clostridial botulinum*-like toxin cleaves VAMP within the juxtamembrane domain[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30257.
- [12] BRUNT J, CARTER AT, STRINGER SC, PECK MW. Identification of a novel botulinum neurotoxin gene cluster in *Enterococcus*[J]. *FEBS Letters*, 2018, 592(3): 310-317.
- [13] ZHANG SC, LEBRETON F, MANSFIELD MJ, MIYASHITA SI, ZHANG J, SCHWARTZMAN JA, TAO L, MASUYER G, MARTÍNEZ-CARRANZA M, STENMARK P, GILMORE MS, DOXEY AC, DONG M. Identification of a botulinum neurotoxin-like toxin in a commensal strain of *Enterococcus faecium*[J]. *Cell Host and Microbe*, 2018, 23(2): 169-176.e6.
- [14] CONTRERAS E, MASUYER G, QURESHI N, CHAWLA S, DHILLON HS, LEE HL, CHEN JW, STENMARK P, GILL SS. A neurotoxin that specifically targets *Anopheles* mosquitoes[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2869.
- [15] CHEN ZP, MORRIS JG Jr, RODRIGUEZ RL, SHUKLA AW, TAPIA-NÚÑEZ J, OKUN MS. Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins[J]. *Toxins*, 2012, 4(11): 1196-1222.
- [16] HILL KK, XIE G, FOLEY BT, SMITH TJ. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins[J]. *Toxicon*, 2015, 107: 2-8.
- [17] 谭玲, 王建新, 王慧. 肉毒神经毒素抑制剂的研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1270-1285.
- TAN L, WANG JX, WANG H. Research advances in inhibitors of botulinum neurotoxins[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1270-1285 (in Chinese).
- [18] MASUYER G, DAVIES JR, STENMARK P. Mechanism of ganglioside receptor recognition by botulinum neurotoxin serotype E[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 8315.
- [19] WANG JX, WU YL, LUO DY, ZHUANG CL, NING NZ, ZHANG YM, HE ZL, GAO J, HONG ZY, XV X, ZHANG WN, LI T, MIAO ZY, WANG H. Discovery of a potent botulinum neurotoxin A inhibitor ZM299 with effective protections in botulism mice[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2022, 40(3): 357-364.
- [20] 罗森, 丁朋晓, 李涛, 王琴, 王慧. 基于 FRET 技术构建破伤风毒素和 B 型肉毒毒素酶类抑制剂高通量体外筛选方法[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5):

- 739-745.
- LUO S, DING PX, LI T, WANG Q, WANG H. High throughput *in vitro* screening method for tetanus toxin and botulinum neurotoxin type B inhibitors based on FRET technology[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2018, 53(5): 739-745 (in Chinese).
- [21] 杨秀清, 王慧, 史晶, 蔡昆, 侯晓军, 包士中, 荫俊. 鼠源抗 B 型肉毒毒素单链抗体噬菌体文库的构建筛选及抗体免疫学活性的初步研究[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(6): 1037-1041.
- YANG XQ, WANG H, SHI J, CAI K, HOU XJ, BAO SZ, YIN J. Construction and screening of a phage display library of repertoire single chain fv antibody from mouse immunized with BoNTB/hc[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(6): 1037-1041 (in Chinese).
- [22] TIAN RM, WIDEL M, IMANIAN B. The light chain domain and especially the C-terminus of receptor-binding domain of the botulinum neurotoxin (BoNT) are the hotspots for amino acid variability and toxin type diversity[J]. *Genes*, 2022, 13(10): 1915.
- [23] KROKEN AR, KARALEWITZ APA, FU ZJ, BALDWIN MR, KIM JJP, BARBIERI JT. Unique ganglioside binding by botulinum neurotoxins C and D-SA[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(23): 4486-4496.
- [24] DAVIES JR, LIU SM, ACHARYA KR. Variations in the botulinum neurotoxin binding domain and the potential for novel therapeutics[J]. *Toxins*, 2018, 10(10): 421.
- [25] TSUKAMOTO K, KOHDA T, MUKAMOTO M, TAKEUCHI K, IHARA H, SAITO M, KOZAKI S. Binding of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(42): 35164-35171.
- [26] YOWLER BC, SCHENGRUND CL. Glycosphingolipids: sweets for botulinum neurotoxin[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2004, 21(6): 287-293.
- [27] GILLARD M, CHATELAIN P, FUKS B. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 536(1/2): 102-108.
- [28] GOWER AJ, NOYER M, VERLOES R, GOBERT J, WÜLFERT E. Ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals[J]. *European Journal of Pharmacology*, 1993, 230(3): 389.
- [29] GOUTAL S, GUILLERMIER M, BECKER G, GAUDIN M, BRAMOULLÉ Y, LUXEN A, LEMAIRE C, PLENEVAUX A, SALMON E, HANTRAYE P, BARRET O, van CAMP N. The pharmacokinetics of [¹⁸F]UCB-H revisited in the healthy non-human primate brain[J]. *EJNMMI Research*, 2021, 11(1): 36.
- [30] GROVES PM, LINDER JC, YOUNG SJ. 5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum[J]. *Neuroscience*, 1994, 58(3): 593-604.
- [31] DONG M, YEH F, TEPP WH, DEAN CM, JOHNSON EA, JANZ R, CHAPMAN ER. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A[J]. *Science*, 2006, 312(5773): 592-596.
- [32] KROKEN AR, KARALEWITZ APA, FU ZJ, KIM JJ P, BARBIERI JT. Novel ganglioside-mediated entry of botulinum neurotoxin serotype D into neurons[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(30): 26828-26837.
- [33] DONG M, LIU HS, TEPP WH, JOHNSON EA, JANZ R, CHAPMAN ER. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(12): 5226-5237.
- [34] FU ZJ, CHEN C, BARBIERI JT, KIM JJ P, BALDWIN MR. Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(24): 5631-5641.
- [35] BINDRA PS, KNOWLES R, BUCKLEY KM. Conservation of the amino acid sequence of SV2, a transmembrane transporter in synaptic vesicles and endocrine cells[J]. *Gene*, 1993, 137(2): 299-302.
- [36] NISHIKI T, KAMATA Y, NEMOTO Y, OMORI A, ITO T, TAKAHASHI M, KOZAKI S. Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(14): 10498-10503.
- [37] NISHIKI TI, TOKUYAMA Y, KAMATA Y, NEMOTO Y, YOSHIDA A, SATO K, SEKIGUCHI M, TAKAHASHI M, KOZAKI S. The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G_{T1b}/G_{D1a}[J]. *FEBS Letters*, 1996, 378(3): 253-257.
- [38] DONG M, RICHARDS DA, GOODNOUGH MC, TEPP WH, JOHNSON EA, CHAPMAN ER.

- Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 162(7): 1293-1303.
- [39] DONG M, TEPP WH, LIU HS, JOHNSON EA, CHAPMAN ER. Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2007, 179(7): 1511-1522.
- [40] PENG LS, BERNTSSON RPA, TEPP WH, PITKIN RM, JOHNSON EA, STENMARK P, DONG M. Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I and II as receptors, and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C and G toxins[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(Pt 13): 3233-3242.
- [41] MATSUNAGA H, HALDER SK, UEDA H. Involvement of SNARE protein interaction for non-classical release of DAMPs/alarmins proteins, prothymosin alpha and S100A13[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2021, 41(8): 1817-1828.
- [42] MARTÍNEZ-CARRANZA M, BLASCO P, GUSTAFSSON R, DONG M, BERNTSSON RPA, WIDMALM G, STENMARK P. Synaptotagmin binding to botulinum neurotoxins[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(4): 491-498.
- [43] JOHNSON EA. Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1999, 53: 551-575.
- [44] MONTECUCCO C, MOLGÓ J. Botulinum neurotoxins: revival of an old killer[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, 5(3): 274-279.
- [45] SEBAIHIA M, PECK MW, MINTON NP, THOMSON NR, HOLDEN MTG, MITCHELL WJ, CARTER AT, BENTLEY SD, MASON DR, CROSSMAN L, PAUL CJ, IVENS A, WELLS-BENNIK MHJ, DAVIS IJ, CERDEÑO-TÁRRAGA AM, CHURCHER C, QUAIL MA, CHILLINGWORTH T, FELTWELL T, FRASER A, et al. Genome sequence of a proteolytic (group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes[J]. *Genome Research*, 2007, 17(7): 1082-1092.
- [46] WILLEMS A, EAST AK, LAWSON PA, COLLINS MD. Sequence of the gene coding for the neurotoxin of *Clostridium botulinum* type A associated with infant botulism: comparison with other clostridial neurotoxins[J]. *Research in Microbiology*, 1993, 144(7): 547-556.
- [47] SMITH TJ, HILL KK, FOLEY BT, DETTER JC, MUNK AC, BRUCE DC, DOGGETT NA, SMITH LA, MARKS JD, XIE G, BRETTIN TS. Analysis of the neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* A1–A4 and B1 strains: BoNT/A3, Ba4 and B1 clusters are located within plasmids[J]. *PLoS One*, 2007, 2(12): e1271.
- [48] CARTER AT, PAUL CJ, MASON DR, TWINE SM, ALSTON MJ, LOGAN SM, AUSTIN JW, PECK MW. Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 115.
- [49] LÚQUEZ C, RAPHAEL BH, MASLANKA SE. Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type Ab strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 6094-6101.
- [50] MAZUET C, EZAN E, VOLLAND H, POPOFF MR, BECHER F. Toxin detection in patients' sera by mass spectrometry during two outbreaks of type A botulism in France[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(12): 4091-4094.
- [51] KULL S, SCHULZ KM, WEISEMANN J, KIRCHNER S, SCHREIBER T, BOLLENBACH A, DABROWSKI PW, NITSCHKE A, KALB SR, DORNER MB, BARR JR, RUMMEL A, DORNER BG. Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116381.
- [52] BENOIT RM, SCHÄRER MA, WIESER MM, LI XD, FREY D, KAMMERER RA. Crystal structure of the BoNT/A2 receptor-binding domain in complex with the luminal domain of its neuronal receptor SV2C[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43588.
- [53] DAVIES JR, REES J, LIU SM, ACHARYA KR. High resolution crystal structures of *Clostridium botulinum* neurotoxin A3 and A4 binding domains[J]. *Journal of Structural Biology*, 2018, 202(2): 113-117.
- [54] LEKA O, WU YF, LI XD, KAMMERER RA. Crystal structure of the catalytic domain of botulinum neurotoxin subtype A3[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100684.
- [55] GREGORY KS, MOJANAGA OO, LIU SM, ACHARYA KR. Crystal structures of botulinum neurotoxin subtypes A4 and A5 cell binding domains in complex with receptor ganglioside[J]. *Toxins*, 2022, 14(2): 129.
- [56] GREGORY KS, NEWELL AR, MOJANAGA OO, LIU SM, ACHARYA KR. Crystal structures of the *Clostridium botulinum* neurotoxin A6 cell binding domain alone and in complex with GD1a reveal significant conformational flexibility[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9620.

- [57] DAVIES JR, BRITTON A, LIU SM, ACHARYA KR. High-resolution crystal structures of the botulinum neurotoxin binding domains from subtypes A5 and A6[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(8): 1474-1481.
- [58] GREGORY KS, MAHADEVA TB, LIU SM, ACHARYA KR. Structural features of *Clostridium botulinum* neurotoxin subtype A2 cell binding domain[J]. *Toxins*, 2022, 14(5): 356.
- [59] KROKEN AR, BLUM FC, ZUVERINK M, BARBIERI JT. Entry of botulinum neurotoxin subtypes A1 and A2 into neurons[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(1): e00795-e00716.
- [60] PELLETT S, BRADSHAW M, TEPP WH, PIER CL, WHITEMARSH RCM, CHEN C, BARBIERI JT, JOHNSON EA. The light chain defines the duration of action of botulinum toxin serotype A subtypes[J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00089-18.
- [61] TEPP WH, BRADSHAW M, GARDNER AP, KAUFMAN RL, BARBIERI JT, PELLETT S. Botulinum neurotoxin A4 has a 1 000-fold reduced potency due to three single amino acid alterations in the protein receptor binding domain[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(6): 5690.
- [62] HENKEL JS, JACOBSON M, TEPP W, PIER C, JOHNSON EA, BARBIERI JT. Catalytic properties of botulinum neurotoxin subtypes A3 and A4[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(11): 2522-2528.
- [63] ARNDT JW, JACOBSON MJ, ABOLA EE, FORSYTH CM, TEPP WH, MARKS JD, JOHNSON EA, STEVENS RC. A structural perspective of the sequence variability within botulinum neurotoxin subtypes A1–A4[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 362(4): 733-742.
- [64] YAO GR, ZHANG SC, MAHRHOLD S, LAM KH, STERN D, BAGRAMYAN K, PERRY K, KALKUM M, RUMMEL A, DONG M, JIN RS. N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23: 656-662.
- [65] BENOIT RM, FREY D, HILBERT M, KEVENAAR JT, WIESER MM, STIRNIMANN CU, McMILLAN D, CESKA T, LEBON F, JAUSSE R, STEINMETZ MO, SCHERTLER GFX, HOOGENRAAD CC, CAPITANI G, KAMMERER RA. Structural basis for recognition of synaptic vesicle protein 2C by botulinum neurotoxin A[J]. *Nature*, 2014, 505: 108-111.
- [66] GREGORY KS, ACHARYA KR. A comprehensive structural analysis of *Clostridium botulinum* neurotoxin A cell-binding domain from different subtypes[J]. *Toxins*, 2023, 15(2): 92.
- [67] WHELAN SM, ELMORE MJ, BODSWORTH NJ, BREHM JK, ATKINSON T, MINTON NP. Molecular cloning of the *Clostridium botulinum* structural gene encoding the type B neurotoxin and determination of its entire nucleotide sequence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(8): 2345-2354.
- [68] HILL KK, SMITH TJ, HELMA CH, TICKNOR LO, FOLEY BT, SVENSSON RT, BROWN JL, JOHNSON EA, SMITH LA, OKINAKA RT, JACKSON PJ, MARKS JD. Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(3): 818-832.
- [69] PECK MW, SMITH TJ, ANNIBALLI F, AUSTIN JW, BANO L, BRADSHAW M, CUERVO P, CHENG LW, DERMAN Y, DORNER BG, FISHER A, HILL KK, KALB SR, KORKEALA H, LINDSTRÖM M, LISTA F, LÚQUEZ C, MAZUET C, PIRAZZINI M, POPOFF MR, et al. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature[J]. *Toxins*, 2017, 9(1): 38.
- [70] HUTSON RA, COLLINS MD, EAST AK, THOMPSON DE. Nucleotide sequence of the gene coding for non-proteolytic *Clostridium botulinum* type B neurotoxin: comparison with other clostridial neurotoxins[J]. *Current Microbiology*, 1994, 28(2): 101-110.
- [71] UMEDA K, HIRAI Y, NAKAMURA H, AMO K. Comparative whole-genome sequence analysis of a BoNT/B5-producing *Clostridium botulinum* isolate from an infant botulism case of unknown source in Osaka, Japan[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2022, 369(1): fnac069.
- [72] SAKAGUCHI Y, HOSOMI K, UCHIYAMA J, OGURA Y, UMEDA K, SAKAGUCHI M, KOHDA T, MUKAMOTO M, MISAWA N, MATSUZAKI S, HAYASHI T, KOZAKI S. Draft genome sequence of *Clostridium botulinum* type B strain Osaka05, isolated from an infant patient with botulism in Japan[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(1): e01010-e01013.
- [73] WANGROONGSARB P, KOHDA T, JITTAPRASARTSIN C, SUTHIVARAKOM K, KAMTHALANG T, UMEDA K, SAWANPANYALERT P, KOZAKI S, IKUTA K. Molecular characterization of *Clostridium botulinum* isolates from foodborne outbreaks in Thailand, 2010[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e77792.

- [74] TAO L, PENG LS, BERTSSON RPA, LIU SM, PARK S, YU FF, BOONE C, PALAN S, BEARD M, CHABRIER PE, STENMARK P, KRUPP J, DONG M. Engineered botulinum neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 53.
- [75] DAVIES JR, MASUYER G, STENMARK P. Structural and biochemical characterization of botulinum neurotoxin subtype B2 binding to its receptors[J]. *Toxins*, 2020, 12(9): 603.
- [76] BERTSSON RPA, PENG LS, DONG M, STENMARK P. Structure of dual receptor binding to botulinum neurotoxin B[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2058.
- [77] ATASSI MZ, TARUISHI M, NAQVI M, STEWARD LE, AOKI KR. Synaptotagmin II and gangliosides bind independently with botulinum neurotoxin B but each restrains the other[J]. *The Protein Journal*, 2014, 33(3): 278-288.
- [78] KOŠENINA S, MARTÍNEZ-CARRANZA M, DAVIES JR, MASUYER G, STENMARK P. Structural analysis of botulinum neurotoxins type B and E by cryo-EM[J]. *Toxins*, 2021, 14(1): 14.
- [79] CHAI Q, ARNDT JW, DONG M, TEPP WH, JOHNSON EA, CHAPMAN ER, STEVENS RC. Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B[J]. *Nature*, 2006, 444: 1096-1100.
- [80] RUMMEL A. Two feet on the membrane: uptake of clostridial neurotoxins[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 406: 1-37.
- [81] CHEN CC, WANG SH, WANG HJ, MAO XY, ZHANG TC, JI GH, SHI X, XIA T, LU WJ, ZHANG DP, DAI JX, GUO YJ. Potent neutralization of botulinum neurotoxin/B by synergistic action of antibodies recognizing protein and ganglioside receptor binding domain[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43845.
- [82] MARUTA T, DOLIMBEK BZ, AOKI KR, STEWARD LE, ATASSI MZ. Mapping of the synaptosome-binding regions on the heavy chain of botulinum neurotoxin A by synthetic overlapping peptides encompassing the entire chain[J]. *The Protein Journal*, 2004, 23(8): 539-552.
- [83] SHI J, BAO SZ, YIN J, CAI K, HOU XJ, XIAO L, TU W, WANG Q, WANG H. Dominant antigenic peptides located at the heavy chain terminal of botulinum neurotoxin B contain receptor-binding sites for synaptotagmin II[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374(2): 331-335.
- [84] SHI J, LI T, HOU XJ, CAI K, BAO SZ, LIU H, GAO X, XIAO L, TU W, WANG Q, YIN J, WANG H. Recombinant luminal domain of human synaptotagmin II in combination with gangliosides inhibits the toxicity of botulinum neurotoxins in mice[J]. *Microbes and Infection*, 2010, 12(4): 319-323.
- [85] WANG H, LI T, SHI J, CAI K, HOU XJ, WANG Q, XIAO L, TU W, LIU H, GAO X. A new neutralizing antibody against botulinum neurotoxin B recognizes the protein receptor binding sites for synaptotagmin II[J]. *Microbes and Infection*, 2010, 12(12/13): 1012-1018.
- [86] MIYASHITA SI, KARATSU S, FUJIISHI M, HUANG IH, NAGASHIMA Y, MOROBISHI T, HOSOYA K, HATA T, DONG M, SAGANE Y. Characterization of serotype CD mosaic botulinum neurotoxin in comparison with serotype C and A[J]. *Toxins*, 2023, 15(2): 123.
- [87] LINDSTRÖM M, NEVAS M, KURKI J, SAUNA-AHO R, LATVALA-KIESILÄ A, PÖLÖNEN I, KORKEALA H. Type C botulism due to toxic feed affecting 52 000 farmed foxes and minks in Finland[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(10): 4718-4725.
- [88] STROTMEIER J, GU SY, JUTZI S, MAHRHOLD S, ZHOU J, PICH A, EICHNER T, BIGALKE H, RUMMEL A, JIN RS, BINZ T. The biological activity of botulinum neurotoxin type C is dependent upon novel types of ganglioside binding sites[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(1): 143-156.
- [89] PENG LS, TEPP WH, JOHNSON EA, DONG M. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(3): e1002008.
- [90] NAKAMURA K, KOHDA T, SHIBATA Y, TSUKAMOTO K, ARIMITSU H, HAYASHI M, MUKAMOTO M, SASAKAWA N, KOZAKI S. Unique biological activity of botulinum D/C mosaic neurotoxin in murine species[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(8): 2886-2893.
- [91] STROTMEIER J, LEE K, VÖLKER AK, MAHRHOLD S, ZONG YN, ZEISER J, ZHOU J, PICH A, BIGALKE H, BINZ T, RUMMEL A, JIN RS. Botulinum neurotoxin serotype D attacks neurons *via* two carbohydrate-binding sites in a ganglioside-dependent manner[J]. *The Biochemical Journal*, 2010, 431(2): 207-216.

- [92] RAPHAEL BH, JOSEPH LA, McCROSKEY LM, LÚQUEZ C, MASLANKA SE. Detection and differentiation of *Clostridium botulinum* type A strains using a focused DNA microarray[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, 24(3): 146-153.
- [93] HALPIN JL, HILL K, JOHNSON SL, BRUCE DC, SHIREY TB, DYKES JK, LÚQUEZ C. Finished whole-genome sequences of *Clostridium butyricum* toxin subtype E4 and *Clostridium baratii* toxin subtype F7 strains[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(29): e00375-17.
- [94] WEEDMARK KA, LAMBERT DL, MABON P, HAYDEN KL, URFANO CJ, LECLAIR D, van DOMSELAAR G, AUSTIN JW, CORBETT CR. Two novel toxin variants revealed by whole-genome sequencing of 175 *Clostridium botulinum* type E strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(20): 6334-6345.
- [95] RAPHAEL BH, LAUTENSCHLAGER M, KALB SR, de JONG LIT, FRACE M, LÚQUEZ C, BARR JR, FERNÁNDEZ RA, MASLANKA SE. Analysis of a unique *Clostridium botulinum* strain from the southern hemisphere producing a novel type E botulinum neurotoxin subtype[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 245.
- [96] WANG X, MAEGAWA T, KARASAWA T, KOZAKI S, TSUKAMOTO K, GYOBU Y, YAMAKAWA K, OGUMA K, SAKAGUCHI Y, NAKAMURA S. Genetic analysis of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4992-4997.
- [97] CHEN Y, KORKEALA H, AARNIKUNNAS J, LINDSTRÖM M. Sequencing the botulinum neurotoxin gene and related genes in *Clostridium botulinum* type E strains reveals orfx3 and a novel type E neurotoxin subtype[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8643-8650.
- [98] MAZUET C, SAUTEREAU J, LEGEAY C, BOUCHIER C, BOUVET P, POPOFF MR. An atypical outbreak of food-borne botulism due to *Clostridium botulinum* types B and E from ham[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(2): 722-726.
- [99] LIU Z, LEE PG, KREZ N, LAM KH, LIU H, PRZYKOPANSKI A, CHEN P, YAO GR, ZHANG SC, TREMBLAY JM, PERRY K, SHOEMAKER CB, RUMMEL A, DONG M, JIN RS. Structural basis for botulinum neurotoxin E recognition of synaptic vesicle protein 2[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 2338.
- [100] RAPHAEL BH, CHOUDOIR MJ, LÚQUEZ C, FERNÁNDEZ R, MASLANKA SE. Sequence diversity of genes encoding botulinum neurotoxin type F[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4805-4812.
- [101] SMITH TJ, XIE G, WILLIAMSON CHD, HILL KK, FERNÁNDEZ RA, SAHL JW, KEIM P, JOHNSON SL. Genomic characterization of newly completed genomes of botulinum neurotoxin-producing species from Argentina, Australia, and Africa[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2020, 12(3): 229-242.
- [102] DOVER N, BARASH JR, HILL KK, DETTER JC, ARNON SS. Novel structural elements within the nonproteolytic clostridium botulinum type F toxin gene cluster[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1904-1906.
- [103] LAFUENTE S, NOLLA J, VALDEZATE S, TORTAJADA C, VARGAS-LEGUAS H, PARRON I, SÁEZ-NIETO JA, PORTAÑA S, CARRASCO G, MOGUEL E, SABATE S, ARGELICH R, CAYLÀ JA. Two simultaneous botulism outbreaks in Barcelona: *Clostridium baratii* and *Clostridium botulinum*[J]. *Epidemiology and Infection*, 2013, 141(9): 1993-1995.
- [104] GIORDANI F, FILLO S, ANSELMO A, PALOZZI AM, FORTUNATO A, GENTILE B, AZARNIA TEHRAN D, CIAMMARUCONI A, SPAGNOLO F, PITTIGLIO V, ANNIBALLI F, AURICCHIO B, de MEDICI D, LISTA F. Genomic characterization of Italian *Clostridium botulinum* group I strains[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 36: 62-71.
- [105] SIKORRA S, SKIBA M, DORNER MB, WEISEMANN J, WEIL M, VALDEZATE S, DAVLETOV B, RUMMEL A, DORNER BG, BINZ T. Botulinum neurotoxin F subtypes cleaving the VAMP-2 Q⁵⁸-K⁵⁹ peptide bond exhibit unique catalytic properties and substrate specificities[J]. *Toxins*, 2018, 10(8): 311.
- [106] SHI DY, LU JS, MAO YY, LIU FJ, WANG R, DU P, YU S, YU YZ, YANG ZX. Characterization of a novel tetravalent botulism antitoxin based on receptor-binding domain of BoNTs[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(10): 3205-3216.
- [107] SCHMITT J, KARALEWITZ A, BENEFIELD DA, MUSHRUSH DJ, PRUITT RN, SPILLER BW, BARBIERI JT, LACY DB. Structural analysis of botulinum neurotoxin type G receptor binding[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(25): 5200-5205.

- [108] WILLJES G, MAHRHOLD S, STROTMEIER J, EICHNER T, RUMMEL A, BINZ T. Botulinum neurotoxin G binds synaptotagmin-II in a mode similar to that of serotype B: tyrosine 1 186 and lysine 1 191 cause its lower affinity[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(22): 3930-3938.
- [109] STENMARK P, DONG M, DUPUY J, CHAPMAN ER, STEVENS RC. Crystal structure of the botulinum neurotoxin type G binding domain: insight into cell surface binding[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(5): 1287-1297.
- [110] STERN D, WEISEMANN J, Le BLANC A, von BERG L, MAHRHOLD S, PIESKER J, LAUE M, LUPPA PB, DORNER MB, DORNER BG, RUMMEL A. A lipid-binding loop of botulinum neurotoxin serotypes B, DC and G is an essential feature to confer their exquisite potency[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(5): e1007048
- [111] STROTMEIER J, WILLJES G, BINZ T, RUMMEL A. Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: increased therapeutic dosage and immunogenicity[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(4): 310-313.
- [112] BARASH JR, ARNON SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(2): 183-191.
- [113] DOVER N, BARASH JR, HILL KK, XIE G, ARNON SS. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(2): 192-202.
- [114] YAO GR, LAM KH, PERRY K, WEISEMANN J, RUMMEL A, JIN RS. Crystal structure of the receptor-binding domain of botulinum neurotoxin type HA, also known as type FA or H[J]. *Toxins*, 2017, 9(3): 93.
- [115] DAVIES JR, HACKETT GS, LIU SM, ACHARYA KR. High resolution crystal structures of the receptor-binding domain of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotypes A and FA[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4552.
- [116] DOVER JS, SOLISH N, GROSS TM, GALLAGHER CJ, BROWN J. Bridging the gap: sustained treatment effect of glabellar lines with twice-a-year treatment with daxibotulinumtoxin A[J]. *Dermatologic Surgery*, 2023, 49(9): 862-864.
- [117] GARCIA-RODRIGUEZ C, YAN SD, GEREN IN, KNOPP KA, DONG JB, SUN ZD, LOU JL, CONRAD F, WEN WH, FARR-JONES S, SMITH TJ, BROWN JL, SKERRY JC, SMITH LA, MARKS JD. A four-monoclonal antibody combination potently neutralizes multiple botulinum neurotoxin serotypes C and D[J]. *Toxins*, 2021, 13(9): 641.
- [118] GRIPPE T, CHEN R. Botulinum toxin in the management of parkinsonian disorders[J]. *Toxicon*, 2023, 232: 107209.
- [119] JIANG YH, JHANG JF, KUO HC. The clinical application of intravesical botulinum toxin A injection in patients with overactive bladder and interstitial cystitis[J]. *Tzu Chi Medical Journal*, 2022, 35(1): 31-37.
- [120] KARA M, RICCI V, PIRRI C, SEKIZKARDEŞ M, COCCO G, STECCO C, KAYMAK B, ÖZÇAKAR L. Sonographic guide for botulinum toxin injections for chronic migraine headache: EURO-MUSCULUS/USPRM approach[J]. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2023, 232: 107883.
- [121] YIN LX, MASUYER G, ZHANG SC, ZHANG J, MIYASHITA SI, BURGİN D, LOVELOCK L, COKER SF, FU TM, STENMARK P, DONG M. Characterization of a membrane binding loop leads to engineering botulinum neurotoxin B with improved therapeutic efficacy[J]. *PLoS Biology*, 2020, 18(3): e3000618.
- [122] BURNS JR, LAMBERT GS, BALDWIN MR. Insights into the mechanisms by which clostridial neurotoxins discriminate between gangliosides[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(20): 2571-2583.