UPPSALA
UNIVERSITET

Kan vi utvidga botulinumneurotoxinets kliniska användningsområden med hjälp av proteinteknik?

Stefan Gunnarsson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Kan vi utvidga botulinumneurotoxinets kliniska användningsområden med hjälp av proteinteknik?

Stefan Gunnarsson

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Botulinumneurotoxin (BoNT) produceras av bakterien *Clostridium botulinum,* och är det mest potenta giftet vi känner till. Den största risken för oss människor att komma i kontakt med bakterien och dess toxin är vid intag av sporer som överlevt otillräcklig behandling före konservering av mat, bland annat vid hemmagjord konservering av honung. Trots sin höga toxicitet är BoNT ett toxin med en beytdelsefull roll inom medicin. Användningen av toxinet har varit revolutionerande inom en rad olika medicinska områden, till exempel oftalmologi, urologi och som hjälp vid rehabilitering i samband med sjukdomar som orsakar muskelspasmer. Det har även fått en viktig roll inom skönhetsindustrin där det ofta används för att släta ut huden i ansiktet.
Det upptäcktes att toxinet vid låga doser endast skapar en lokal paralys. Det innebär att sjukdomar som orsakar symtom i form av muskelspasmer eller andra muskelrelaterade problem kan motverkas genom injicering lokalt i vävnaden som orsakar problem. Egenskaper som bidragit till toxinets framgång är den starka specificitet det har för kolinerga neuroner och den långvariga effekt som ett områden kan utsättas för utan risk att drabbas av permanenta skador. En annan faktor är hur toxinet vid kontrollerade doser verkar väldigt lokalt och sällan orsakar några bieffekter.

Toxinet är ett cirka 150kDa stort protein som binder specifikt till kolinerga neuroner. Det består av en större och en mindre kedja sammanbundna med en disulfidbrygga. Det finns sju naturligt förekommande serotyper av botulinumtoxin som var och en klyver vid olika sekvenser på SNARE-proteiner. SNARE-protein är en grupp proteiner som binder till varandra och bildar ett komplex som initierar membranfusion av vesiklar. Dess förmåga att hindra vesikelfusion gör frisläppandet av neurotransmittorer omöjlig, och leder till paralys av postsynaptisk muskelvävnad. Toxinet är ett clostridiumneurotoxin som innehåller tre funktionella domäner, där en domän binder till en specifik celltyp beroende på typen av gangliosider på cellmembranets yta. En andra domän bildar en por för att transportera in den mindre kedjan som är ett endonukleas. Poren tillåter införsel av den mindre kedjan som klyver vid specifika sekvenser på SNARE-komplexet.

Forskning på proteinet har länge kretsat kring metoder för att utnyttja de naturligt förekommande toxinerna i diverse mer eller mindre kreativa behandlingar som involverar överanvändning av muskelvävnad. En annan stor del av forskningen kring toxinet har varit mekanismerna bakom förmågan att bilda porer för införandet av den toxiskt aktiva delen av proteinet i målcellen. På senare år har forskningens fokus börjat riktas om mot modifiering av existerande toxiner där syftet är att ändra vilken typ av cell som toxinet binder till samt ändra vilken aminosyrasekvens det klyver vid. BoNT är ett stort protein som innehåller tre domäner med specifika roller. Dessutom är proteinet väldigt modulärt uppbyggt med de funktionella delarna i egna regioner, vilket gör det möjligt att ändra en funktion utan att påverka en annan. BoNTs egenskaper gör den därför till en utmärkt molekyl att försöka utveckla genom proteinteknik. Tillvägagångssätten för att förändra molekylen har bland annat varit att låta genen som kodar för proteinet att få enstaka mutationer där den kodar för någon av de funktionella domänerna, vilket lett till bland annat att ändra klyvningssitet för den endonukleasa domänen.

Förkortningar

CNT - clostridiumneurotoxin
LD50 - lethal dose 50
BoNT - botulinumneurotoxin
TeNT - tetanusneurotoxin
β-PBT - β-porbildande toxin
VS - Vestibular schwannoma
CNS - Centrala nervsystemet
PNS - Perifera nervsystemet
SNARE – soluble NSF attachment protein receptor

Inledning

Botulinumneurotoxin är det giftigaste toxin vi känner till och är orsaken till botulism, en sjukdom som först beskrevs i slutet av 1700-talet (Erbguth 1999). BoNT är ett cirka 150kDa stort protein med en större och en mindre kedja sammanbundna med en disulfidbrygga. BoNT produceras av bakterien *Clostridium botulinum* som tillhör släktet *Clostridium*. Faran med toxinet är dess förmåga att inhibera kolinerga nervterminaler. Denna inhibering leder till paralys i all form av muskelvävnad där synapserna kommit i kontakt med toxinet. Denna mekanism utnyttjas även inom medicin där toxinets förmåga att inhibera neurotransmission samt förmåga att verka över en lång tid kan användas För olika behandlingar. Vid rening av toxinet och genom noggrann reglering av dosen går det att dämpa symton orsakade av överaktiva muskler. BoNT används även inom skönhetsindustrin, ofta för att lokalt förlama områden i ansiktet för att undvika eller släta ut rynkor orsakade av överanvändning av ansiktsmuskulaturen.

Dosen som krävs för att döda en genomsnittlig människa går att räkna i nanogram. Denna höga toxicitet har gett toxinerna "category A" klassificering hos Centers for Disease Control and Prevention tillsammans med andra dödliga ämnen som potentiellt kan utnyttjas förr till exempel bioterrorism (Arnon 2001). Det är därför viktigt att bättre förstå organismen och eventuella problem som kan uppstå vid kontakt med de olika neurotoxiner de olika arterna kan producera, samt om det finns någon ytterligare betydelsefull användning inom medicin eller industri.
Idag kan vi, tack vare forskning som pågått sen slutet av artonhundratalet använda botulinumtoxin i terapeutiskt syfte. Dessutom har vi fått ökad förståelse för mekanismerna inblandade i vesikelfusion och porformation på cellmembranet (Alouf 2003).

I detta arbete kommer jag redogöra för hur toxinerna som utsöndras av *Clostridium botulinum* har gått från matburet hot till att ha en viktig roll inom medicin. Först gör jag en genomgång av arten, dess morfologiska egenskaper, toxinets struktur och verkningsmekanismer, sedan tar jag upp historien bakom hur toxinet upptäcktes och hur den kliniska utvecklingen fortgått. Jag kommer sedan att gå igenom hur BoNT:s potential kan ändras genom proteinteknik, vilken skapa nya kliniska användningsområden. Vid användning av botulinumtoxin används idag endast de naturligt förekommande toxinerna. Forskning görs på huruvida det går att, med utgångspunkt från botuliumtoxin utveckla nya toxiner genom proteinteknik. Fokus riktas mest mot att utveckla toxiner specifika för en annan typ av neuron, vid vilken aminosyrasekvens som ska klyvas eller effektens varaktighet (Aokli 2007).

Släktet

Släktet *Clostridium* består av över 100 arter, såväl icke-patogener, som ett stort antal viktiga patogener vilket inkluderar *Clostridium botulinum* och *Clostridium tetani*, vars gift orsakar botulism respektive stelkramp (Stackenbrandt och Rainey 1997). De är obligat anaeroba och karaktäriseras av dess stavformade cellmorfologi förmåga att bilda endosporer och en cellvägg som gör att de klassificeras som gram.positiv. Bakterien hittas i både jord, marina system och i

sötvatten. Vissa arter är dessutom viktiga ur ett bioteknologiskt perspektiv, t.ex *Clostridium acetobutylum* som kan användas vid aceton och butanolframställning (Durre 2007). Arterna är oftast namngivna efter det mest utmärkande giftet det kan utsöndra, t.ex *C.botulinum* som utsöndrar botulinumtoxin.

Skillnader mellan arterna

Clostridium botulinum är en samling arter som definieras av förmågan att producera botulinum-toxin. Arten delas upp i serotyper. Vilket är ett vanligt sätt att urskilja mikroorganismer. Det innebär att underarter klassas efter serotypspecifika antigen som visas på en viss bakterie. Toxinet delas också in i serotyper som baseras på epitop som skiljer sig mellan dem. Det finns sju serotyper av botulinumtoxin (A-G). olika serotyperna produceras av ett antal bakterier som är heterogena i sina karaktärsdrag. Ett flertal av serotyperna kan dessutom utsöndras av ett flertal olika arter inom släktet clostridium. Namngivningen av bakterien sker i samband med upptäckten av nya serotyper av toxinet, där BoNT/A är det först funna botulinumtoxinet som då blir serotyp ”A” av bakterien, följt i kronologisk ordning av BoNT/B. Generna för BoNT/A, B, E och F finns lagrat i bakteriens kromosom medan genen för BoNT/G finns lagrad i en plasmid hos bakterier av G-serotyp. Hos bakterier som producerar BoNT/C och BoNT/D finns genen lagrad i ett integrerat fag-genom. Tetanustoxin (TeNT) produceras av *Clostridium tetani* som är en annan viktig bakterie inom släktet, och till skillnad från de botlinumtoxinproducerande bakterierna är detta en en mycket homogen grupp.

Giftet

C. Tetani och *C. botulinum* producerar de mest utmärkande toxinerna som ofta nämns som clostridiumneurotoxiner (CNT). Toxinerna de utsöndrar har liknande struktur och funktion. Botulinumneurotoxin (BoNT) binder till kolinerga presynapser och orsakar paralys genom att hämma frisläppandet av acetylkolin i motorneuroner (PNS). BoNT klyver vid ett antal olika sekvenser i SNARE-proteinkomplexet (Tabell 1). Tetanusneurotoxin (TeNT) binder till presynapsen hos inhiberande neuron där det hämmar frisläppandet av GABA, som är den vanligast förekommande inhiberande molekylen i centrala nervsystemet (CNS). TeNT klyver synaptobrevin (schiavo G *et al.* 1992), ett målprotein som delas med ett flertal BoNT-toxiner. Dock har TeNT en helt annan effekt då det binder specifikt till neuroner som har en toniskt inhiberande effekt på muskelvävnad.

Tabell 1. De olika BoNT-serotyperna och deras målproteiner

Serotyp	Målprotein
BoNT/A	SNAP-25
BoNT/B	Synaptobrevin
BoNT/C	SNAP25 och Syntaxin
BoNT/D	Synaptobrevin
BoNT/E	SNAP-25
BoNT/F	Synaptobrevin
BoNT/G	Synaptobrevin

Information från (Aoki och Guyer 2001).

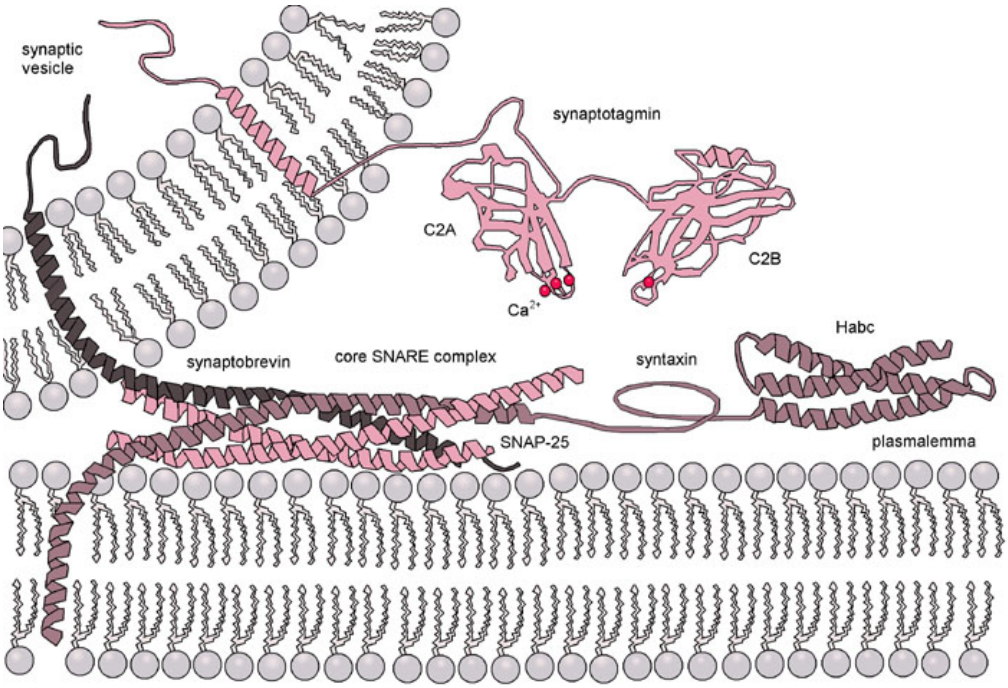
Clostridiumneurotoxinets struktur

För att förstå toxinernas mekanismer behövs en viss bakgrund om hur Clostridium neurotoxinet (CNT) är uppbyggt i ett antal sub-enheter som var och en har olika funktion. CNT är en familj neurotoxin som tillverkas av clostridium botulinum och clostridium tetani. CNTs består av polypeptider i storleksordningen ~150kDa som sedan klyvs för att skapa två polypeptidkedjor som hålls samman med en disulfidbrygga, en kortare som är cirka 50kDa lång och en längre runt

100kDa (Turton *et al.* 2002). Den kortare polypeptiden är ett zink-beroende endopeptidas och är den aktiva domänen vid klyvning av SNARE-proteiner som är den huvudsakliga toxiska funktionen. *Clostridium tetani* producerar giftet tetanus neurotoxin (TeNT)som är strukturellt homologt till BoNT (cirka 35% sekvensoverlap (Lacy och Stevens, 1999)) och orsakar stelkramp. Den långa polypeptiden har två aktiva domäner som tar upp cirka 50% av polypeptiden var, en som består av halvan med N-terminalen och en som består av halvan med C-terminalen. Domänen som innehåller C-terminalen har ett gangliosidbindande site som har en viktig roll vid bindandet till membranet av en neuron. Denna domän hjälper även till vid införandet av toxinet i neuronen.

Botulinumneurotoxinets mekanismer

BoNT verkar på olika SNARE-protein. SNARE-protein är en grupp protein vars roll är att skapa komplex som initierar vesikelfusion. Till dessa hör synaptobrevin, syntaxin och SNAP-25 (figur 1).



Figur 1. Illustration av hur de mest förekommande proteinen i SNARE-komplexet är placerade och hur de är involverade i vesikelfusionen. Synaptobrevin, syntaxin och SNAP-25 är potentiella mål för olika BoNT-serotyper.

Porformation

Förmågan att bilda porer i målcellens membran är en egenskap som är vanlig bland biologiska toxiner. Toxinerna grupperas då ofta som ”membranförstörande toxiner”. Membranförstörande toxiner kännetecknas av en domän som kan öppna en transportväg genom eukaryota membran. förmågan att bilda porer är en egenskap som mer än en tredjedel av alla bakteriella toxiner har gemensamt (Alouf 2003). De flesta porbildande toxiner som utsöndras av clostridiumbakterier tillhör gruppen β-porbildande toxiner (β-PBT). Den delen av toxinet som står för porformeringen är rikt i β-strängar som binder till specifika receptorer i membranet. När toxinet binder till receptorn ändrar det konformation där en sk ”β-barrel” bildas som kan penetrera membranet. Porernas funktion kan variera. Förutom att bilda en

intransport för endopeptidas-domänen hos CNT:s finns andra toxiner som öppnar för fri transport av joner och rubbar jonbalansen eller orsakar signalkaskader (Alouf 2003, Gonzalez *et al* 2008, Parker 2005).

De olika toxinerna i gruppen clostridiumneurotoxiner är väldigt lika i struktur och mekanism. Den större sub-enheten har en domän som hjälper till att binda till och penetrera specifika celler. Den mindre sub-enheten klyvs av efter att den har blivit införd i cellen och kan börja verka på sitt mål. Processen för giftet att komma in i cellen och klyva en sekvens sker i flera steg. CNT:t binder till den typen av synaps den är specifik för, som i BoNT:s fall är de kolinerga nervterminalerna. Den långa C-domänen på BoT binder till nervterminalen och inducerar endocytos. Hur endocytosen sker är inte helt klarlagd men det tyder på att en viss närvaro av gangliosider krävs. Det har gjorts experiment där framför allt GD1b, GT1b och GQ1b visar sig vara viktiga för porbildning i membranet (Montecucco, 1986). Det behövs dock något mer än gangliosider för BoT att binda, Någon form av receptorbindning krävs också före proteinet kan komma in i cellen (C. Montecucco). Vilken receptor som toxinet måste binda till är inte kartlagt för alla toxiner men synaptotagmin har en roll vid införandet av serotyp A, B och E (Li och Singh, 1998, Nishiki et al 1996).

Olika serotypers klyvningssite
Sju serotyver av BoNT har upptäckts i dagsläget (A-G). Varje serotyp har väldigt specifika sekvenser som den klyver, men alla serotyper klyver proteiner inom SNARE-komplexet och hindrar frisäppning av aceytolkolin. BoNT-B, -D. -F och G klyver var och en vid olika sekvenser i synaptobrevin (schiavo et al, 1992, Schiavo et al 1993a, Schiavo et al 1993b, Schiavo et al 1994, Yamasaki et al 1994a, Yamasaki et al 1994b och Yamasaki et al 1994c) BoNT-A och -E klyver SNAP-25 och BoT-C klyver sekvenser i både SNAP-25 och syntaxin (Blasi et al, 1993a, Blasi et al, 1993b, Schiavo et al, 1995, Schiavo et al 1993b, Binz et al 1994, Schiavo och montecucco 1995, Foran et al 1996, Osen Sand et al, 1996 och Williamson et al 1996).

Tetanusneurotoxin (TeNT) som är ett annat clostridiumneurotoxin (CNT) har verkningsmekanism snarlik den hos BoNT, men det blockerar istället frisläppandet av de inhiberande neurotransmittorerna GABA och glycin, vilket orsakar starka kramper i motsats till paralyseringen som sker av BoNT förgiftning. Resultatet av att bli utsatt för CNTs är alltså olika ur klinisk synpunkt, men verkningsmekanismen på cellnivå är densamma, proteiner i SNARE-komplexet klyvs och exocytos av neurotransmittorerna inhiberas.

Exponering och behandling

Förgiftningen sker genom intag av kontaminerad föda när bakterien överlevt olika processer vid till exempel konservering. En av de största farorna med bakterien är dess förmåga att bilda endosporer. Endosporerna är väldigt resistenta och gör att de till viss grad kan överleva värmebehandling av mat. Vid bristande värmebehandling kan sporerna överlevt medan all konkurrens är borta och bakterien kan således växa fritt. För att förstöra sporerna krävs en upphettning vid 120 ºC i cirka 30 minuter. Förgiftning kan även ske efter direkt kontakt med bakterien eller sporer som kan hittas i både jord, marina och icke-marina sediment. Toxinet i sig behöver bara kokas i 10 minuter eller upphettas vid 80 ºC i cirka 30 minuter för att denatureras.

Det går att motverka toxinets effekter med hjälp av antiserum. dock måste man behandlas innan toxinet hunnit föras in i neuronen, då går det inte längre att förhindra effekterna genom externa metoder. Den mängd som kommit in i neuronen kommer inte att påverkas av antiserumet och måste då utsöndras på naturlig väg. Någon som exponerats för botulinumtoxin måste genast uppsöka vård då andningssvårigheter snabbt kan utvecklas och respirator måste finnas till hand

om toxinets effekter når lungorna. Botulinumtoxin, speciellt serotyp A har en lång halveringstid och kommer utsöndras i långsam takt. lyckligtvis är inte hjärtat påverkat av toxinet på samma sätt som andningssystemet då det inte styrs av kolinerga neuroner så dödligheten i närvaro av respirator är relativt låg och full återhämtning kommer ske efter ett antal månader.

Sjukdomens historia

Ordet ”botulism” kommer från det latinska ordet ”botulus” som betyder korv. Det började användas i Centraleuropa under 1700-talet för att beskriva den paralyserande sjukdom som ofta kunde kopplas till intag av blodkorv. De symtom som uppstår efter intag av infekterad mat har varit av intresse hos toxikologer sedan åtminstone ett århundrade tillbaka. En utredning gjordes 1895 i Ellezelles, en by i Henegau där ett utbrott bland medlemmarna i en musikklubb skett. Orsaken till åkomman tros vara en okokt skinka, då endast ett fåtal av klubbmedlemmarna som inte ätit av skinkan visade några symtom (Van Ermengem 1897). Symtom uppvisades först 24 till 36 timmar efter måltiden och många av dem kunde kopplas till förslust av muskelfunktion. Ungdomarna tappade bland annat förmågan att fokusera med ögonen på nära håll, pupillerna var i konstant utvidgat läge, svårt att svälja och talet lät som om de hade halvt paralyserad tunga. (Van Ermengem 1897). Bland de som överlevde förgiftningen var återhämtningen utdragen och först, efter cirka två till tre veckor fick de tillbaks normal funktion i pupiller och ögonlock, men en lång tid i ramen sex till åtta månader för helt återställd syn och kontroll av svalg.

Bakgrund om dess roll inom medicin

Släktet Clostridium producerar som redan nämnts en mängd olika toxiner som spelat en viktig roll inom medicin och utvecklingen av olika behandlingar. Till en början sågs endast nackdelarna med det högpotenta giftet, men allteftersom forskningen om toxinet fortgick så ökade förståelsen om dess mekanismer och ett terapeutiskt värde började ses inom flera medicinska områden. Främst inom forskning runt muskelrelaterade sjukdomar sågs möjligheter med dess specificitet mot neuromuskulära presynapser och långvariga, men helt reversibla effekt. De mest långvariga clostridiumneurotoxinerna uppvisar en effekt som kan sträcka sig över flera månader (Flynn 2012). Det mest kända toxinet som används inom medicin är botulinumtoxinet BoNT/A som bildas av *Clostridium botulinum.* Vi vet att alla BoNT har paralyserande effekt på neuromuskulära synapser genom inhibering av acetylkolin från motorneuronet. Effekten syns både på skelettmuskulatur och glatt muskulatur. De mest utmärkande egenskaperna är den låga dosen som behövs och den dramatiska effekten som toxinet kan ha på vissa medicinska tillstånd där vanliga farmakologiska behandlingar inte har gett någon respons. Till exempel vid muskelspasmer och olika former av dystoni. Det har även blivit allt vanligare att använda botulinumtoxinet BoNT/A inom kosmetika, och för detta endamål marknadsförs toxinet under namnet Botox. Rynkor i ansiktet orsakas ofta av spänningar av ansiktsmuskulaturen, och kan därför behandlas genom att tvinga fram avslappning genom lokalparalys av muskulaturen. Att lokalt paralysera ett område för att minska muskelstimuli är det vanligaste tillvägagångssättet även vid andra typer av behandlingar med BoNT.

Dagens forskning och användningsområden

Det har gjorts studier på mer omfattande och svårbehandlade sjukdomar som cerebral pares för att utvidga toxinets användningsområdena. En sådan studie gjordes där patienter med cerebral pares fått BoNT/A injicerat i muskeln gastrocnemius. Resultatet var en signifikant

minskad spasticitet (Bjornson K *et al.* 2007). Att minska muskelaktiviteten kan vara en önskvärd effekt även i andra mer generella sammanhang. Möjligheten att med botulinumtoxinets hjälp få musklerna att slappna av, kan göra att patienter lättare kan gå igenom fysisk terapi utan oönskade muskelkontraktioner som kan hämma återhämtningen eller inlärningen av korrekta rörelser.

På senare år har bevisen för att det kan finnas fler egenskaper hos BoNT/A. Bland annat kan BoNT/A vid tillräckligt höga doser. Förutom att blockera de kolinerga motorneuronerna, även påverka afferenta neuroner i form av smärtreceptorer och således ha en potentiellt bedövande effekt. BoNT/A har visat sig ha en viss effekt vid frisläppandet av neurotransmittorer som glutamat, substans P och ATP i smärtmedierande neuron (Meng 2007).

Säkerhet och hantering av BoNT
Vid en standardbehandling för problem med till exempel urinblåsan överskrids inte dosen 300U. Dosen som krävs för att döda en genomsnittlig man på 75kg är cirka 3000U eller 75ng. BTX-A som injiceras lokalt till organet i fråga kommer inte att kunna spridas i nämnvärda mängder och vid urologiska ingrepp är det mycket ovanligt med några bieffekter. Den ringa mängden kommer heller inte att orsaka paralys av intilliggande vävnad i någon större utsträckning. Endast mildare nedsättning av styrka, främst i överkropp har rapporterats, och denna effekt har försvunnit inom 2 till 12veckor (Wyndaele och Van Dromme 2002).

För att få en optimal verkan på vävnaden har det visat sig att en mer utspädd lösning är att föredra (Kim *et al.* 2003). Den lokalt paralytiska effekten maximeras vid en högre utspädning, men det ökar också risken för absorption i övriga vävnader vilket kan leda till en högre grad av bieffekter i form av svaghet hos vissa patienter i samband med den större injektionen. Behandling med BoNT ska undvikas hos patienter med någon form av neuropatiska tillstånd som påverkar motorneuroner, som till exempel lateral skleros eller muskelsjukdomar som gjort att patienten har en allmänt svagare muskulatur. I sådana fall kan resultatet bli respirationsfel eller problem att svälja (Smith *et al.*2004).

Exempel på klinisk användning idag

Vestibular schwannoma (VS) är en benign tumör som sitter på åttonde kranialnerven. Trots sin godartade natur måste ofta ingrepp göras på grund av risken att den växer sig större eller redan anses vara så stor att den klassas som en risk för kranialnerven. fter operation finns risken att patienten lider av komplikationer i form av Lagophthalmos, vilket är ett tillstånd där ögonlocket inte går att stänga helt. Detta tillstånd gör att hornhinnan kan börja ta skada från uttorkning och de långtgående konsekvenserna kan vara partiell eller fullkomlig blindhet. Flera behandlingsformer kan användas för att bevara fuktigheten i ögonen. Det första steget i behandlingen är ofta ögondroppar och återfuktande oljor. Behandlingar specifikt för lagophthalmos har inkluderat olika former av tillägg av motvikter till muskeln levator palpebrae som hjälper till att sluta ögonlocken (Schrom 2007). Mer drastiska alternativ är tarsorrhaphy, som innebär att ögonlocket till viss del sys ihop, eller att utföra transplantation av muskelvävnad och/eller nerven i fråga (samii och Matthies 1997).

Idag är sannolikheten för allvarligare ansiktsförlamningar till följd av operation låg och permanent påverkande ingrepp kan oftast undvikas. Dock är bästa möjliga skydd av hornhinnan att föredra i de fall där komplikationer sker. Dessutom kan det vara nödvändigt att få optimala återhämtningsförhållanden om det finns tidspress för att kunna återfå full funktionalitet utan några permanenta synnedsättningar.

De första månaderna efter kirurgiskt avlägsnande av VS är de svåraste. Ansiktsförlamning är oftast allvarligast under de två första veckorna efter operation och förbättring sker gradvis över kommande veckor eller månader. Storleken på tumören har ofta en stor roll i hur grava komplikationer som uppstår. Således är många patienter med stora eller väldigt stora tumörer de som främst blir lidande av ansiktsförlamning med otillräcklig ögonslutning som följd (Briggs *et al.* 2000, Jung S *et al.* 2000, Staecker *et al.* 2000, Wiet, Mamikoglu, Odom, Hoistad 2001). Framgångsrika försök att använda botulinumtoxin har gjorts genom att injicera det i muskeln levator palpebrae, där nästan fullständigt skydd av hornhinnan kunnat nås i fall där skador skett i samband med invasiva ingrepp (Gusek-Schneider och erbguth 1998, Magoon 1985, merté och Lanz 2007, Smyth 1995). Senare studier av Prell *et al.* (2011) har gjorts med lite större fokus på säkerhet i användandet av BoNT. De kom fram till att användande av BoNT var en säker och tillförlitlig metod för att motverka lagophthalmos. Det gör BoNT till ett potentiellt alternativ till de tidigare typerna av invasinva ingrepp som är relativt otympliga och med osäker utgång.

Potentiella antiinflammatoriska egenskaper

Ett nytt fält inom behandling med botulinumtoxin är upptäkten av vissa antiinflammatoriska egenskaper som uppnås genom lokal paralys av vävnaden runt sår. Synliga ärr kan bland annat innebära en risk för psykologisk ohälsa.Att minimera ärrbildningen är därför av hög prioritet vid kirurgiska ingrepp. En viktig faktor för hur estetiskt resultatet blir efter ett ingrepp är hur mycket påfrestning såret utsätts för från omkringliggande muskelvävnad. Muskelaktivitet runt såret orsakar bland annat inflammatorisk respons, ökar metabolisk aktivitet och bildar en större mängd kollagen och glykoaminoglykaner till följd av upprepade mikrotrauman i snittet (McCarthy 1990).

En studie med ärrbildning i fokus gjordes mellan februari 2002 och januari 2004 av Gassner *et al* (2006). Studien tog upp hur botulinumtoxinet påverkar läkningsförmågan på sår i ansiktet, om det kan minska läkningstiden samt om det kan resultera i reducerad ärrbildning. Av 42 testpersoner behandlades 22 med botulinumtoxin och 20 patienter behandlades med en kontrollinjektion. 16 patienter behandlade med botulinumtoxin slutförde undersökningen. i kontrollgruppen slutförde 15 patienter studien. Personerna som inte slutförde studien gjorde det antingen i brist på fotografier på läkningsförloppet eller missade av någon anledning en eller flera sessioner hos läkarna. Ärrbildning går inte att mäta i en fullständigt objektiv skala, utan mäts enligt VAS (visual analogue scale) som innebär att läkare med lång erfarenhet inom fältet ger sin subjektiva bedömning av resultatet, i detta fall i en skala från 1 till 10, där 10 är fullständig frånvaro av ärr. För ett signifikant resultat krävs minst en skillnad på 1.5 på skalan.

Det genomsnittliga bedömningen för de BoNT-behandlade patienterna var 8,9 på skalan. För placebo-gruppen var genomsnittliga bedömningen 7,2 på skalan. Resultatet testades i ett Wilcoxon rank sum test som visade sig signifikant (P=0,003). BoNT har alltså enligt denna studie en positiv inverkan på patientens läkningsförmåga. Att använda subjektiv bedömning är givetvis en begränsning, men genom att basera studien på uttalanden från två dermatologer vid varje bedömning av ärrbildningen ökar studiens trovärdigheten och en viss felmarginal tas även hänsyn till i klassificerings-systemet som VAS grundar sig på. Utöver signifikanta resultat visar inte behandlingarna tecken på märkbara bieffekter. Precis som andra behandlingar i ansiktet som innefattar BoNT så anses denna säker så länge erfarna läkare eller kirurger hanterar doseringen.

Studier på smärtstillande egenskaper
Det har genomförts ett antal studier där eventuella antinociceptiska egenskaper hos BoNT/A har studerats (Aoki 2011). BoNT ses för det mesta som ett toxin som endast hämmar frisläppandet av acetylkolin, men patienter har rapporterat att förutom en förbättring av de muskelrelaterade symtomen så har vissa också känt mindre smärta i området runt injektionen (Brin *et al.* 1987). Anledningen till den smärtstillande effekt som patienterna upplevde troddes bero på den minskade muskelaktiviteten i områden och sågs inte som något märkvärdigt i det fallet. Lite senare visar det sig att patienter med migrän upplever minskad smärta från huvudvärken med hjälp av BoNT/A injektioner vid olika placeringar runt ansikte eller området runt tinningen (Binder *et al.* 2000). Denna upptäckten ledde till att nya hypoteser behövdes för att kunna förklara hur en smärtstillande effekt kan uppnås vid huvudvärk, som borde vara orelaterad till kolinerga neuroner och om smärtreceptorer omkring områden där injektion skett kan påverkas.

Shimizu *et al.* (2012) publicerade en artikel där de testat om BoNT kan påverka den smärtmedierande receptorn TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1). TRPV1 är en katjonkanal som leder signaler genom trillingnerven (kranialnerv nummer fem). Trillingnerven är en nerv som kommunicerar med strukturer i ansiktet, i och runt ögonhålan. Den sänder både motoriska och sensoriska signaler. Studien visade att injektion av BoNT i det område som trillignerven innerverar kan minska smärtsignalering genom klyvning av SNAP-25, vilket hindrar TRPV1-proteinet från att uttryckas i neuronets cellmembran. BoNT visade sig också ha en viss specificitet för TRPV1-medierad smärta, då den $P2X_3$-medierade smärtan förblev opåverkad.

Framtida möjligheter
Botulinumtoxin är i sin naturligt förekommande form specifik för kolinerga neuroner. Mekanismen för att utsöndra substanser eller neurotransmittorer är dock universell för eukaryota celler, samtliga använder sig av exocytos med hjälp av ett SNARE-komplex (Südhof och Rothman 2009). Botulinumtoxin som är ett protein som klyver de olika peptiderna i SNARE-komplexet är därför en bra bas om det är möjligt att ändra proteinets struktur. Om det går att ändra toxinets målcell skulle det gå att förhindra exocytos av ämnen i ickeneurona celler. Tiden som toxinet verkar på en cell eller vävnad skulle också vara möjlig att manipulera med tillräcklig kunskap i proteinteknik. En till möjlighet är att byta ut en hel sub-domän av BoNT och ersätta den med något som redan har en känd funktion. Det skulle då vara möjligt att göra en BoNT-analog specifik för till exempel smärtmedierande afferenta neuroner (Duggan *et al.* 2002, Chaddock et al. 2004).

Lyckade försök att skapa BoNT-derivat har gjorts av bland annat Chen och Barbieris (2009). De designade ett BoNT-derivat som kunde klyva både SNAP-25 och SNAP-23. SNAP-23 är ett ickeneuront SNARE-protein som är involverat i sekretion av slem, antikroppar och hormoner (Jahn *et al.* 2006). Det nya proteinet testades på mänskliga cellkulturer (epitelceller) där sekretionen av mucin och interleukin-8 inhiberats, vilket tyder på potential till utveckling av protein med funktioner som kan användas inom medicinska fält även utanför neuro- och muskelterapi.

Diskussion

Fördelar med botulinumneurotoxin är främst att det är väldigt specifikt och inte orsakar permanenta skador på vävnader. Olika styrka på effekten kan också nås genom att variera den givna dosen. Patienten drabbas sällan av allvarliga bieffekter och i de flesta fall skulle behandling med BoNT vara att föredra gentemot farmakologiska preparat. Eventuella bieffekter är övergående. En vanlig dos för problem med urinblåsan ligger som högst på 300U medan dosen som krävs för att döda en genomsnittlig man är cirka 3000U. Vid en så låg dos är det låg sannolikhet att påverkas av några bieffekter ens i närliggande vävnad (Wyndaele och Van Dromme 2002). Nackdelen BoNT har mot konventionella droger är hur länge effekten håller i. Intaget och effekten av en drog går att reglera från dag till dag, effekter orsakade av BoNT kan sträcka sig över månader. Detta är bara en nackdel i vissa fall, då den långa verkningstiden hos BoNT är en stor fördel vid kroniska sjukdomar eller behandlingar med lång återhämtningstid där området som behandlats inte väntas återfå full funktionalitet inom en snar framtid.

Forskning och användning idag

Omfattande forskning har gjorts på toxinet och dess mekanismer. Idag kan botulinumtoxin användas för att lindra symtom från en mängd olika åkommor och även användas inom skönhetsindustrin. De flesta behandlingarna är relativt generella, som att minska spasmerna vid sjukdomar som cerebral pares eller som behandling för dystoni. Det är rimligt att anta att de mer generella områdena där BoNT har någon användning är mer eller mindre helt utforskade. Metoderna som behandlats i texten har mest fokuserats på de mer kreativa användningsområdena, till exempel paralys av levator palpebrae för att hjälpa vid slutning av ögonlocken. Trots att det fortfarande kan finnas oupptäckta användningar för BoNT vid specifika situationer så kommer takten för nya upptäckter bli lägre allteftersom.

Smärtstillande effekt från användning av BoNT

Aoki och Francis gjorde 2011 en översiktsartikel där de gick igenom studier som visat tecken på smärtstillande effekt som visat sig efter att BoNT injicerats. Det är enöversiktsartikel och de har inget klart svar för vad som dämpar smärtan vid migrän, som inte är relaterat till kolinerga neuroner. Studien som publicerades av Schimizu *et al.*gick lite närmre det som klassas som allmän smärta, då TRPV1-receptorerna blev påverkade. Den studiens resultat baseras på ett specifikt fall där injektion gjorts vid en av kranialnerverna i ansiktet. Det ger dock positiva tecken för att användning för att lindra smärta skulle vara möjlig även i andra fall där smärtan innerveras av TRPV1. Det skulle också kunna förklara hur injektioner av BoNT kan lindra migrän om det är TRPV1-medierade signaler som hämmas.

Utveckling av framtida BoNT-derivat

Utvecklingen av behandlingar med botulinumtoxin i de naturligt förekommande serotyperna kommer troligtvis inte ske i någon större utsträckning. Framtiden inom botulinumanvändning kommer istället vara framställning av BoNT-derivat genom proteinteknik. Vid försöket som utfördes av Chen och Barbieris (2009), lyckades de med framgång skapa ett BoNT-derivat med annorlunda klyvningssekvens. Det visar att utveckling av toxiner där den mindre kedjan klyver sekvenser som inte är specifika för kolinerga neuroner är möjlig.

Det största hindret vid utveckling av artificiella BoNT-serotyper kommer förmodligen vara att igenkännandet av ytproteiner och gangliosider fortfarande är ett väldigt outforskat område. Proteinets struktur liknar TeNT som också är ett CNT uppdelat i domäner med funktioner likt BoNT. TeNT är specifikt för neuroner i CNS vilket tyder på att framställning av protein specifika för andra typer av cellytor är möjlig, det kommer dock bli en utmaning att skapa ett

CNT som är nästan helt homologt med BoNT. Det troligaste är att den mindre domänen kommer användas och modifieras för att fortfarande klyva SNARE-proteiner. Den större kedjan skulle troligtvis vara lättare att byta ut mot ett annat porbildande toxin som får föra in den mindre kedjan.

Tack

Tack till min handledare Stefan Bertilsson för feedback och tipsen han gett mig för att strukturera uppsatsen. Även ett stort tack till alla medstudenter som opponerat på min uppsats för deras konstruktiva kritik och idéer till förbättring.

Referenser

Alouf JE. 2003. Molecular features of the cytolytic poreforming bacterial protein toxins. Folia Microbiologica. **48:** 5-16.

Aoki KR, Guyer B. 2001. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. European Journal of Neurology **8**: 21–29.

Aoki KR. 2007. Future aspects of botulinum neurotoxins. Journal of Neural Transmission **115**: 567–573.

Aoki KR., Francis J. 2011. Updates on the antinociceptive mechanism hypothesis of botulinum toxin A. Parkinsonism & Related Disorders, Practical Management of Botulinum Toxin Therapy 17, Supplement **1**: S28–S33.

Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, et al. 2001. Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. JAMA **285**: 1059–1070.

Binder WJ, Brin MF, Blitzer A, Schoenrock LD, Pogoda JM.. 2000. Botulinum toxin type A (BOTOX) for treatment of migraine headaches: An open-label study. Otolaryngology Head and Neck Surgery. **123**: 669–676

Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister A, Link E, Sudhof TC, Jahn R, Niemann H. 1994. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinal neurotoxins. Journal of biological chemistry. **269:** 1617-1620.

Bjornson K, Hays R, Graubert C, Price R, Won F, McLaughlin JF, Cohen M. 2007. Botulinum Toxin for Spasticity in Children With Cerebral Palsy: A Comprehensive Evaluation. Pediatrics **120**: 49–58.

(a)Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, Camilli PD, Südhof TC, Niemann H, Jahn R. 1993. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. Nature **365:** 160–163

(b)Blasi J, Chapman ER, yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R. 1993. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. EMBO journal **12:** 4821-4828.

Briggs RJS, Fabinyi G, Kaye AH, 2000. Current management of acoustic neuromas: review of surgical approaches and outcomes. Journal of clinical Neuroscience. **7**: 521–526.

Brin MF, Fahn S, Moskowitz C, Friedman A, Shale HM, Greene PE, Blitzer A, List T, Lange D, Lovelace RE, McMahon D. 1987. Localized injections of botulinum toxin for the treatment of focal dystonia and hemifacial spasm. Movement Disorders. **2**: 237–254.

Chaddock JA, Purkiss JR, Alexander FCG, Doward S, Fooks SJ, Friis LM, Hall YHJ, Kirby ER, Leeds N, Moulsdale HJ, Dickenso, A, Green GM, Rahman W, Suzuki R, Duggan MJ, Quinn CP, Shone CC, Foster KA. 2004. Retargeted clostridial endopeptidases: inhibition of nociceptive neurotransmitter release in vitro, and antinociceptive activity in in vivo

models of pain. Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society. **8**: S42–47.
Chen S, Barbieri JT, 2009. Engineering botulinum neurotoxin to extend therapeutic intervention. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. **106**: 9180–9184.
Duggan MJ, Quinn CP, Chaddock JA, Purkiss JR, Alexander FCG, Doward S, Fooks SJ, Friis LM, Hall YHJ, Kirby ER, Leeds N, Moulsdale HJ, Dickenson A, Green GM, Rahman W, Suzuki R, Shone CC, Foster KA. 2002. Inhibition of release of neurotransmitters from rat dorsal root ganglia by a novel conjugate of a Clostridium botulinum toxin A endopeptidase fragment and Erythrina cristagalli lectin. The Journal of Biological Chemistry. **277**: 34846–34852.
Durre P. 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. Biotechnology Journal. **2:** 1525–1534.
Erbguth FJ, Naumann M. 1999. Historical aspects of botulinum toxin - Justinus Kerner (1786-1862) and the "sausage poison." Neurology **53**: 1850–1853.
Ermengem E. 1897. Classics in infectious disease: a new anaerobic bacillus and its relationship to botulism (translation of original 1897 article). Reviews of Infectious Diseases. **1**: 701–719.
Flynn DTC. 2012. Botulinum Toxin. American Journal of Clinical Dermatology. **11**: 183–199.
Foran P, Lawrence GW, Shone CC, Foster KA, Dolly JO. 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.
Gassner HG, Brissett AE, Otley CC, Boahene DK, Boggust AJ, Weaver AL, Sherris DA, 2006. Botulinum toxin to improve facial wound healing: A prospective, blinded, placebo-controlled study. Mayo Clinic Proceedings. **81**: 1023–1028.
Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, van der Goot FG, Freche B. 2008. Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? Cellular and molecular life sciences. **65**: 493-507.
Gusek-Schneider GC, Erbguth F, 1998. Botulinum toxin A-induced protective ptosis in indolent corneal ulcers or erosions. Klinische Monatsblatter fur. Augenheilkunde **213**: 15–22. (tyska, ej helt säkert)
Jahn R, Scheller RH. 2006. SNAREs - engines for membrane fusion. Nature Reviews Molecular Cell Biology. **7**: 631–643.
Jung S, Kang SS, Kim TS, Kim HJ, Jeong SK, Kim SC, Lee JK, Kim JH, Kim SH, Lee JH, 2000. Current surgical results of retrosigmoid approach in extralarge vestibular schwannomas. Surgical Neurology. **53**: 370–377.
Kim HS, Hwang JH, Jeong ST, Lee YT, Lee PKW, Suh YL, Shim JS. 2003. Effect of muscle activity and botulinum toxin dilution volume on muscle paralysis. Dev. Med. Child Neurol. **45**: 200–206.
Lacy DB, Stevens RC. 1999. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. Journal of Molecular Biology. **291:** 1091-1104
Magoon E. 1985. Botulinum Chemodenervation for Strabismus and Other Disorders. International Ophthalmology Clinics. **25**: 149–159.
McCarthy JG. Introduction to plastic surgery In: McCarthy JG, ed. 1990. Plastic Surgery. **1**: 43-44.
Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO. 2007. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. Journal of Cell Science. **120**: 2864–2874.
Montecucco C, Molgo J. 2005. Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. Current Opinion in Pharmacology. **5:**274-279.
Montecucco C. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? Trends Biochem. Sci., 11 (1986), **11**: 314–317

Osen A, Staple JK, Naldi E, Schiavo G, Rosetto O, Petitpierre S, Malgaroli A, Montecucco C, Catsicas S. 1996. Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. Journal of Comparative Neurology. **367:** 22-243.

Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. Progress in Biophysics and Molecular Biology **88**: 91–142.

Prell J, Rampp S, Rachinger J, Scheller C, Alfieri A, Marquardt L, Strauss C, Bau V. 2011. Botulinum toxin for temporary corneal protection after surgery for vestibular schwannoma Clinical article. Journal of Neurosurgery. **114**: 426–431

Samii M. Matthies C, 1997. Management of 1000 vestibular schwannomas (acoustic neuromas): The facial nerve - Preservation and restitution of function. Neurosurgery **40**: 684–694.

Schrom T. 2007. Lidloading in facial palsy. Laryngorhinootologie. **86**:634–638 2007

Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, de Laureto PP, DasGupta BR, Montecucco C. 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature **359:** 832–835

(a)Schiavo G, Rosetto O, Catsicas S, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Benfenati F, Montecucco C. 1993. Identification of the nerve terminal targets of neurotoxin serotypes A. D, and E. Journal of biological chemistry. **268:** 23784-23787.

(b)Schiavo G, Santucci A, DasGupta BR, Mehta PP, Jontes J, Benfenati F, Wilson MC, Monteucco C. 1993. Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. FEBS Letters. **335:** 99–103.

Schiavo G, Malizio C, Trimble WS, Polverino de Laureto P, Milan G, Sugiyama H, Johnson EA, Montecucco C. 1994. Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala–Ala peptide bond. Journal of biological chemistry. **269:** 20213-20216.

Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C. 1995. Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys–Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. Journal of biological chemistry **270:** 10566-10570.

Schiavo G, Montecucco C. 1995. Tetanus and botulism neurotoxins: isolation and assay. Methods in Enzymology. **248:** 643-652.

Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Iwashita T, Funakubo M, Sato H, Kuroi T, Ebine T, Koizumi K, Suzuki N. 2012. Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A. Neurobiology of Disease **48**: 367–378.

Smith CP, Chancellor MB. 2004. Emerging role of botulinum toxin in the management of voiding dysfunction. Journal of Urology. **171**: 2128–2137.

Smyth A, 1995. Protective Ptosis After Parotid Surgery Induced with Botulinum Toxin. British Journal of Oral Maxillofacial Surgery. **33**: 107–109.

Stackenbrandt E, Rainey FA. 1997. The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. Academic Press London, UK. **år?:** 3-19

Staecker H, Nadol JB, Ojeman R, Ronner S, McKenna MJ, 2000. Hearing preservation in acoustic neuroma surgery: Middle fossa versus retrosigmoid approach. American Journal of Otology. **21**: 399–404.

Südhof TC, Rothman JE, 2009. Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. Science. **323**: 474–477.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. 2002. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends in Biochemical Sciences **27**: 552–558.

Wiet RJ, Mamikoglu B, Odom L, Hoistad DL, 2001. Long-term results of the first 500 cases of acoustic neuroma surgery. Otolaryngoly - Head and Neck Surgery. **124**: 645–651.

Williamson LC, Neale EA. 1996. Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. Journal of Neurochemistry **63:** 2342-2345.

Wyndaele JJ, Van Dromme SA. 2002. Muscular weakness as side effect of botulinum toxin injection for neurogenic detrusor overactivity. Spinal Cord **40**: 599–600.

(a)Yamasaki S, Baumeister A, Binz T, Blasi J, Link E, Cornille F, Roques B, Fykse EM, Sudhof TC, Jahn R, Niemann H. 1994. Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinal neurotoxins and tetanus toxin. Journal of biological chemistry. **269:** 12764-12772.

(b)Yamasaki S, Binz T, Hayashi T, szabo E, Yamasaki N, Eklund M, Jahn R, Niemann H. 1994. Botulinum neurotoxin type G proteolyses the Ala81–Ala82 bond of rat synaptobrevin 2. Biochemical and Biophysical Research Communications. **200:** 829.835.

(c)Yamasaki S, Hu Y, Binz T, Kalkuhl A, Kurazono H, Tamura T, Jahn R, Kandel E, Niemann H. 1994. Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of Aplysia californica: structure and proteolysis by tetanus toxin and botulinal neurotoxins type D and F. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **91:** 4688-4691.