

**Untersuchung des  
Translokationsmechanismus  
clostridieller Neurotoxine und ihrer  
potentiellen Nutzung als  
Proteintransporter**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Chem. Steffen Bade,  
geboren am 2. Mai 1973 in Hannover

Hannover, im November 2002

Referent: Prof. Dr. T. Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. H. Bigalke  
Institut für Toxikologie  
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 01.November 2002

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, und diese Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, 2002

## **Danksagung**

Für die Bereitstellung des Themas bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Niemann und bei Herrn Prof. Dr. T. Scheper, der nach dem Tod von Herrn Prof. Dr. H. Niemann die Funktion meines Doktorvaters übernommen und diese Arbeit betreut hat.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. T. Binz, der mich durch ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft tatkräftig unterstützte.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. H. Bigalke nicht nur für die Übernahme des Korreferates, sondern vor allem für seine großartige Unterstützung der Experimente und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Auch meinen Kooperationspartnern, Herrn Prof. Dr. J. Alves vom Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, Frau Prof.'in Dr. G. Ahnert-Hilger und Herrn cand. med. Clemens Reisinger vom Institut für Anatomie der Humboldt Universität (Charité) in Berlin und Herrn Dr. T. Schmidt vom Institut für Bioanalytik (IBA) GmbH in Göttingen danke ich an dieser Stelle für die gute und freundliche Zusammenarbeit, sowie auch für die materielle Unterstützung.

Dank gebührt vor allem auch meinen Kollegen und ehemaligen KollegInnen der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. T. Binz, die stets für eine aufgeschlossene, freundliche und fröhliche Arbeitsatmosphäre sorgten. Für die projektbezogene Zusammenarbeit möchte ich besonders Andreas Rummel danken.

Herrn Dr. R. Bauerfeind und Frau PD'in Dr. B. Sodeik danke ich für viele anregende Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft.

Speziell bedanken möchte ich mich bei Martina Enge, Stefanie Feldhege, Ulrike Fuhrmann, Karsten Heidrich, Beate Laske und Tina Schaper für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Meiner Frau Steffi und meiner Tochter Luisa danke ich für ihre Liebe, Motivation, Geduld, Aufmunterung und für viel Abwechslung und Spaß außerhalb des Labors.

Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für ihre Unterstützung, und dass sie mir in allen Dingen stets hilfreich zur Seite standen.



## Zusammenfassung

Die clostridiellen Neurotoxine **T**etanus Neurotoxin (TeNT) und **B**otulinum Neurotoxin Serotyp A-G (BoNT/A-G) zählen zu den giftigsten bekannten Substanzen. Die Neurotoxine penetrieren spezifisch Nervenzellen und blockieren deren Neurotransmitterausschüttung. Sie bestehen aus einer ~100 kDa großen schweren und einer ~50 kDa großen leichten Kette, die über eine Disulfidbrücke und nicht kovalente Interaktionen verbunden sind. Die schwere Kette lässt sich in zwei ~50 kDa große Abschnitte, H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub>, unterteilen. Während die H<sub>C</sub>-Domäne die Neuroselektivität der Toxine vermittelt, ist die H<sub>N</sub>-Domäne nach bisherigen Erkenntnissen für die durch eine Absenkung des pH-Wertes induzierte Translokation der leichten Kette ins Zytoplasma verantwortlich. Die leichten Ketten der verschiedenen Serotypen agieren als Zink-Endoproteasen und hydrolysieren selektiv bestimmte Proteine, die essentiell für die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran sind. Aufgrund der nicht zytotoxischen aber neuroselektiven Wirkung werden die Neurotoxine in vielen Bereichen der Medizin u.a. zur Behandlung von spastischen Erkrankungen eingesetzt. Ziel dieser Arbeit war es, den noch nicht aufgeklärten Translokationsmechanismus zu charakterisieren und zu untersuchen, ob gentechnisch veränderte clostridielle Neurotoxine als Proteintransporter einsetzbar sind.

Durch Deletionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass ohne die H<sub>N</sub>-Domäne tatsächlich ein nicht-toxisches Protein entsteht. Weiterhin erwies sich der sich gürtelartig um die L-Kette schlingende Bereich der H<sub>N</sub>-Domäne als wichtig für die Translokation, ebenso wie jeder einzelne  $\alpha$ -helicale Abschnitt der H<sub>N</sub>-Domäne unverzichtbar für die Translokation der leichten Kette war. Durch Mutagenese eines der beiden Cysteine, die für die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette verantwortlich sind, konnte eine seit langem kontrovers diskutierte Funktion der Disulfidbrücke für den Translokationsprozess von BoNT/D zweifelsfrei ausgeschlossen werden.

Als in der Struktur verankerter „pH-Schalter“, der die pH-induzierte Konformationsänderung auslösen kann, wurden die Aminosäuren D618, K619 und D622 sowie K613, K614 und D615 identifiziert, die in hochkonservierten amphipatischen Regionen der H<sub>N</sub>-Domäne lokalisiert sind. Die Mutation der Aminosäuren D618, K619 und D622 resultierte in einer Reduktion der Wechselwirkungen zwischen der H<sub>C</sub>- und H<sub>N</sub>-Domäne, die Mutation von K613, K614 und D615 in einer Verlangsamung der pH-induzierten Umfaltung erzeugt durch fehlende Interaktionen innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne. Beides führte zu drastischen Einbußen in der Translokationseffizienz. Interaktionen zwischen der H<sub>C</sub>- und H<sub>N</sub>-Domäne und innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne sind demzufolge wichtig für die Translokation der leichten Kette.

Durch Substitution der H<sub>C</sub>-Domäne durch die Bindungsdomäne von Diphtherietoxin konnte ein chimäres Protein erzeugt werden, welches in nicht-neuronale Zellen eindringen kann. Der Aufnahmeweg entsprach dabei dem von Diphtherietoxin. In Immunfluoreszenzanalysen

mit *Strep*-tag<sup>®</sup> Antiserum und nach subzellulärer Fraktionierung konnte im Western Blot eine Trennung der chimären schweren Kette von der GFP-markierten leichten Kette nachgewiesen werden.

Die clostridiellen Neurotoxine lassen sich durch einzelne Punktmutationen innerhalb der leichten Kette auf einfache Art und Weise inaktivieren. In dieser modifizierten Form wirken sie nicht mehr toxisch und stellen daher ideale Transportermoleküle dar, um wirksame Substanzen in Nervenzellen zu transportieren. Durch N-terminale Fusion von BoNT/D mit Dihydrofolatreduktase (DHFR), dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), Bcl-2, der leichten Kette von BoNT/A (LC/A) oder Luziferase (Luc) konnte nachgewiesen werden, dass clostridielle Neurotoxine in der Lage sind, Proteine verschiedener Größe und Struktur im „Huckepack-Verfahren“ zusammen mit der leichten Kette in das Zytosol zu translozieren. Durch Immunfluoreszenzanalysen mit Zellkompartiment-spezifischen Markern und Kolokalisationsexperimente mit Endozytomarkern konnte gezeigt werden, dass der Aufnahmeweg der Fusionsproteine dem des nativen Neurotoxins entsprach. Die angehängten Proteine behielten ihre enzymatischen Aktivitäten im Zytosol bei, was anhand von LC/A-BoNT/D und Luc-BoNT/D belegt werden konnte.

Durch Stabilisierung der Konformation der Dihydrofolatreduktase des DHFR-BoNT/D Fusionsproteins mit Methotrexat konnte bewiesen werden, dass eine Entfaltung der angehängten Moleküle für eine effiziente Translokation essentiell ist. Die isolierte schwere Kette von BoNT/D besaß auch die Fähigkeit, „Passagierproteine“ zu translozieren, wie anhand der leichten Kette von BoNT/A gezeigt werden konnte. Die Translokationseffizienz von derartigen Chimären, bestehend aus schwerer Kette und verschiedenen „Frachtproteinen“ erwies sich jedoch als geringer. Demzufolge eignen sich als neuroselektive Transporter besonders Fusionsproteine bestehend aus enzymatisch inaktiven kompletten Neurotoxinen und effizient entfaltbaren „Passagierproteinen“.

Diese Arbeit zeigt, dass clostridielle Neurotoxine ein enormes pharmakologisches Potential besitzen, indem sie als neuroselektive Proteintransporter zur Einschleusung bestimmter Enzyme oder Regulatoren ins Nervensystem einsetzbar sind. Mit einem solchen Ansatz könnten bestimmte neuronale Erkrankungen, die durch angeborene Stoffwechselstörungen hervorgerufen werden und Krankheiten wie amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die neuronale Form von *Morbus Pompe* oder *Morbus Gaucher* auslösen, behandelt werden.

**Stichworte:** Clostridielle Neurotoxine, Translokation, Proteintransporter, Fusionsprotein

## Abstract

The clostridial neurotoxins (CNTs), tetanus neurotoxin (TeNT) and the seven serologically distinct serotypes of botulinum toxin type A-G (BoNT), are produced in *Clostridium tetani* or *botulinum*, respectively. They are expressed as 150 kDa proteins consisting of a heavy chain (HC) of ~100 kDa and a ~50 kDa catalytically active light chain (LC). The chains are connected by a single disulfide bridge, non-covalent interactions and a peptide region derived from the amino-terminal part of the HC, designated the belt-region, wrapping around the LC. The ~50 kDa carboxyl-terminal part of HC, the H<sub>C</sub>-fragment, is responsible for selective binding to neuronal cells, whereas the amino-terminal half, the H<sub>N</sub>-fragment, enables the pH-induced translocation of the LC into the cytosol of nerve cells. The LC is a zinc metalloprotease, able to cleave depending on the serotype one of the SNARE proteins (soluble NSF attachment protein receptor) SNAP-25, synaptobrevin 2 or syntaxin Ia. Because of their neuroselective action, CNTs are used as therapeutic agents to treat a number of spastic disorders. Aims of this work were to investigate the translocation process and to explore whether modified CNTs could be applicable as neuroselective carriers for foreign proteins.

Deletion of the H<sub>N</sub>-fragment resulted in a non-toxic protein. Furthermore the belt-region and each part of the 105 Å kinked  $\alpha$ -helices were demonstrated to be indispensable for the translocation of the LC. Mutation of C453, one of the two cysteins forming the interchain disulfide bridge, unequivocally excluded a for years controversially discussed function of the disulfide bridge in the translocation process.

The amino acids D618, K619, D622 and K613, K614 and D615, positioned in highly conserved amphiphatic regions of the H<sub>N</sub>-fragment, were identified as critical residues that possibly act as “pH-sensors” to trigger a conformational change upon acidification. Mutation of these amino acids resulted in a dramatic loss of translocation efficiency, provoked by impairment of interactions between the H<sub>C</sub>- and the H<sub>N</sub>-fragment and a slower exposition of hydrophobic parts of the H<sub>N</sub>-fragment. Interactions between the binding and the translocation domain and within the H<sub>N</sub>-fragment seem to be important for the translocation of the catalytic subunit.

By substitution of the H<sub>C</sub>-fragment by the cell binding domain of diphtheria toxin, a chimera was generated that was able to penetrate non-neuronal cells. The uptake route was not altered compared to diphtheria toxin as demonstrated by immunofluorescence and colocalisation experiments. Furthermore, immunofluorescence and subcellular fractionation experiments combined with Western blotting established separation of the chimeric HC and the GFP-tagged light chain upon receptor mediated endocytosis.

Mutation of single amino acids within the active zone of the LCs of CNTs generates translocation competent nontoxic neurotoxins. This is a prerequisite for using the CNTs as neuroselective carrier molecules. The fusion of BoNT/D with dihydrofolate reductase (DHFR), green fluorescent protein (GFP), Bcl-2, the light chain of BoNT/A (LC/A) or luciferase (Luc) proved that CNTs are able to deliver N-terminally attached proteins of different size and structure into the cytosol of neuronal tissue. Moreover, immunofluorescence and colocalisation studies with endocytotic and compartment specific markers demonstrated an unaltered uptake route compared to native BoNT/D. The appended proteins retained their enzymatic activities upon translocation, as evidenced by LC/A-BoNT/D and Luc-BoNT/D.

A comparison of the toxicities of DHFR-BoNT/D and DHFR-BoNT/D following Methotrexat treatment that stabilizes the native conformation of DHFR, revealed unfolding of the cargo proteins as being an essential prerequisite for efficient translocation. Furthermore, the isolated heavy chain was able to deliver the heterologous LC/A into the cytosol. Nevertheless such carrier molecules based just on the HCs of CNTs are indicated to have a smaller chance for equivalent delivery of cargo molecules. Therefore the full length CNTs fused to molecules capable of unfolding probably are the better choice for neuronal delivery of macromolecules.

The results of this work demonstrate that CNTs exhibit an enormous pharmacological potential for an application as neuroselective protein transporters for the delivery of enzymes or regulators into the nervous system. This approach could be applied to treat certain diseases of nerve tissue that are caused by inborn errors of metabolism, resulting in diseases such as amyotroph lateral sclerosis (ALS), the neuronal forms of *morbus pompe* or *morbus gaucher*.

**Key words:** clostridial neurotoxins, translocation, protein transporter, fusion proteins

# Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABSTRACT .....	III
INHALTSVERZEICHNIS .....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	IX
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Tetanus und Botulismus.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Struktur clostridieller Neurotoxine.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Wirkungsweise clostridieller Neurotoxine.....</b>	<b>7</b>
1.3.1. Bindung an Nervenzellen .....	7
1.3.2. Enzymatische Aktivität der L-Ketten .....	7
1.3.3. Internalisierung und Translokation.....	9
<b>1.4. Nutzung von clostridiellen Neurotoxinen .....</b>	<b>11</b>
1.4.1. Die L-Ketten als Werkzeuge zur Untersuchung von Exozytose und intrazellulärem Transport .....	11
1.4.2. Medizinische Nutzung der nativen Neurotoxine .....	12
<b>1.5. Nutzung von AB-Toxinen als Proteintransporter.....</b>	<b>13</b>
<b>2. AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Arbeiten mit DNA.....</b>	<b>16</b>
3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion.....	16
3.1.2. Restriktionsspaltung .....	17
3.1.3. Dephosphorylierung eines Vektors.....	17
3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese .....	18
3.1.5. Reinigung von DNA.....	19
3.1.5.1. Reinigung von PCR-Produkten .....	19
3.1.5.2. Reinigung der Spaltprodukte nach einem Restriktionsschnitt .....	19
3.1.6. Ligation.....	19
3.1.7. Transformation .....	20
3.1.7.1. Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen.....	20
3.1.7.2. Herstellung kompetenter, tiefrierbarer Bakterien-Zellen.....	20
3.1.7.3. Transformation von <i>E. coli</i> .....	21
3.1.8. Plasmid-Präparation.....	21
3.1.8.1. Plasmid-Mini-Präparation.....	21
3.1.8.2. Plasmid-Midi-Präparation.....	21
3.1.8.3. Bestimmung der DNA-Konzentration .....	22
3.1.9. Klonierung von BoNT/D und Derivaten .....	22
3.1.10. Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	24

<b>3.2. Produktion und Nachweis von Proteinen .....</b>	<b>25</b>
3.2.1. Produktion von Proteinen mit <i>Strep-tag</i> <sup>®</sup> II in <i>E. coli</i> .....	25
3.2.1.1. Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i> .....	26
3.2.1.2. Ultraschallaufschluß .....	26
3.2.1.3. Aufreinigung durch Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen .....	26
3.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	27
3.2.2.1. SDS-Polyacrylamidgel .....	27
3.2.2.2. Probenvorbereitung .....	28
3.2.3. Elektrophorese .....	28
3.2.4. Coomassiefärbung .....	29
3.2.5. Proteinkonzentrationsbestimmung .....	29
3.2.6. Bestimmung des Proteingehaltes nach Biorad .....	30
3.2.7. Westernblot .....	30
3.2.7.1. Transfer auf eine Blot-Membran .....	30
3.2.7.2. Immunologische Identifizierung von Proteinen auf der Westernblot-Membran .....	31
3.2.7.2.1. Durchführung des immunchemischen Nachweises von Proteinen .....	31
3.2.7.2.2. Detektion der Proteine .....	32
3.2.8. Proteinreinigung per HPLC .....	32
<b>3.3. Präparation neuronaler Zellen .....</b>	<b>33</b>
3.3.1. Präparation hippocampaler neuronaler Zellen .....	33
3.3.2. Präparation von Rattenhirn Synaptosomen .....	33
3.3.3. Präparation von Rückenmarksneuronen .....	34
<b>3.4. Arbeiten mit adhärenenten Zellen .....</b>	<b>35</b>
3.4.1. Passagieren adhärenenten Zellen .....	35
3.4.2. Auftauen und Einfrieren von Eukaryontenzellen .....	36
3.4.3. Transiente Transfektion von Vero-Zellen .....	36
<b>3.5. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>36</b>
3.5.1. Fluoreszenzfärbung .....	36
<b>3.6. Subzelluläre Fraktionierung .....</b>	<b>38</b>
3.6.1. Inkubation von Zellen vor der Fraktionierung .....	38
3.6.2. Durchführung der subzellulären Fraktionierung .....	38
3.6.3. TCA-Fällung .....	39
<b>3.7. Analyse von BoNT/D und Derivaten .....</b>	<b>39</b>
3.7.1. Trypsinaktivierung von clostridiellen Neurotoxinen .....	39
3.7.2. <i>In vitro</i> Toxizitätsbestimmung von clostridiellen Neurotoxinen am <i>Nervus phrenicus</i> der Maus .....	39
3.7.3. Spaltung von rekombinantem Synaptobrevin 2 .....	40
3.7.4. Bindung an Synaptosomen .....	41
3.7.5. Substratsspaltung in Synaptosomen .....	41
3.7.6. Detektion von Luziferase Aktivität .....	42
3.7.6.1. Inkubation von Synaptosomen .....	42
3.7.6.2. Durchführung des Enzymnachweises .....	42
3.7.7. Nachweis von Disulfidbrücken mit Ellman-Reagenz .....	43
3.7.8. Aufnahme von TNS-Bindungskinetiken .....	43
<b>3.8. Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie .....</b>	<b>44</b>
<b>4. STRUKTURANALYSE UND ANSÄTZE .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Berechnung der Struktur von H<sub>N</sub>-BoNT/D .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Identifizierung potentieller Transmembranregionen .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3. Deletionsmutanten .....</b>	<b>47</b>

<b>4.4. Punktmutanten .....</b>	<b>48</b>
4.4.1. Mutation von Aminosäuren, die mögliche Schlüsselpositionen für pH- induzierte Konformationsänderungen darstellen .....	48
4.4.2. Mutation oberflächenexponierter Aminosäuren, die möglicherweise pH-induzierte Konformationsänderungen auslösen können .....	49
4.4.3. Cystein-Mutanten .....	50
<b>4.5. Chimäre Proteine.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6. Fusionsproteine .....</b>	<b>53</b>
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Produktion von rekombinantem BoNT/D, Mutanten und Fusionsproteinen .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2. Funktionelle Analysen von H<sub>N</sub>-Domäne Mutanten.....</b>	<b>60</b>
<b>5.3. Strukturelle Charakterisierungen von H<sub>N</sub>-Domäne Mutanten .....</b>	<b>66</b>
5.3.1. Erhöhte Trypsinsensitivität von HC einzelner Punktmutanten .....	66
5.3.2. Strukturanalyse durch Circular Dichroismus Spektroskopie .....	67
5.3.3. Messung des Umfaltungsprozesses durch Bindung von TNS .....	70
<b>5.4. Funktionelle Analysen von Fusionsproteinen und Chimären.....</b>	<b>71</b>
5.4.1. Analyse der Fusionsproteine.....	71
5.4.1.1. Substratspaltung in hippocampalen Neuronen.....	73
5.4.1.2. Aufnahme von GFP-BoNT/D in neuronalen Rückenmarkszellen.....	76
5.4.1.3. Nachweis von Luziferase Aktivität.....	77
5.4.2. Analyse der chimären Proteine .....	79
5.4.2.1. Funktionelle Analyse von LC/A-HC/D .....	79
5.4.2.2. Aufnahme von GFP- LH <sub>N</sub> /D-H <sub>C</sub> /DT in Vero Zellen .....	81
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
<b>6.1. Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Struktur innerhalb der Familie der clostridiellen Neurotoxine.....</b>	<b>85</b>
<b>6.2. Funktion einzelner Segmente der H<sub>N</sub>-Domäne im Translokationsmechanismus.....</b>	<b>87</b>
<b>6.3. Clostridielle Neurotoxine als Proteintransporter .....</b>	<b>94</b>
<b>7. AUSBLICK.....</b>	<b>100</b>
<b>8. LITERATUR.....</b>	<b>102</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>114</b>
<b>9.1. Material.....</b>	<b>114</b>
9.1.1. Chemikalien.....	114
9.1.2. Standards .....	116
9.1.3. Enzyme .....	116
9.1.4. Häufig verwendete Puffer und Medien.....	117
9.1.5. Antikörper.....	117
9.1.6. Bakterienstämme .....	118
9.1.6.1. <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	118
9.1.6.2. <i>E. coli</i> TG1: .....	118
9.1.7. Plasmide .....	119

9.1.7.1.	pQE-3: .....	119
9.1.7.1.1.	pBN 31: .....	119
9.1.7.1.2.	pBPCLuc0: .....	119
9.1.7.1.3.	pBN 3: .....	119
9.1.7.1.4.	pGFP-BoNT/D <sub>VA</sub> Strep.....	119
9.1.7.2.	pASK-IBA3: .....	120
9.1.7.2.1.	pBoNT/D E230A: .....	120
9.1.7.3.	pET15bΔ <i>Bgl</i> II- <i>Sph</i> ΨWT DT: .....	120
9.1.7.4.	pDHFR in pCR2.1-TOPO .....	120
9.1.7.5.	pBcl-2 in pBlueskript SK+ .....	120
9.1.8.	Oligonukleotide: .....	121
9.1.9.	Weitere Materialien .....	127
9.1.10.	Lösungen und Medien zur Präparation von Rückenmarksneuronen .....	127
9.1.11.	Firmen.....	128



# Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
λ	Lambda
μ	Mikro
A	Ampere
Å	Angström
A, Ala	Alanin
Abb	Abbildung
abs.	absolut
AcCh	Acetylcholin
AMP	Ampicillin, Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
As	Aminosäure(n)
aTc	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheit
BABIM	Bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)methan
Baf., BafA1	BafilomycinA1
BoNT/A-G	Botulinum Neurotoxin Serotyp A-G
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
c	Centi
C, Cys	Cystein
Ca	Calcium
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cal	Kalorie(n)
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CD	Cirkular Dichroismus
cHC	chimäre schwere Kette
CNT	Clostridielle Neurotoxine
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C-terminal	carboxyterminal
D, Asp	Aspartat
d.h.	das heißt
ddNTP	3', 5'-Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DFP	Diisopropyl-fluorophosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIV	<i>days in vitro</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherietoxin
DTT	Dithiotreitol
E, Glu	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Erythrina cristagalli lectin, enhanced chemiluminescence</i>
Ed(s)	Editor(en)

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
f	Femto
F, Phe	Phenylalanin
f.c.	Endkonzentration ( <i>final concentration</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calve serum</i> )
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FUDR	(+)-5-Fluor-2-Desoxyuridin
g	Gramm, Gravitation
G, Gly	Glycin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GSH	reduziertes Glutathion
h	Stunde(n), human
H, His	Histidin
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion
HABA	2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure
HC	schwere Kette
H <sub>C</sub>	carboxyterminale Hälfte der schweren Kette (HC), Bindungsfragment
H <sub>CC</sub>	carboxyterminale Hälfte der H <sub>C</sub> -Domäne
HCl	Salzsäure
H <sub>CN</sub>	aminoternale Hälfte der H <sub>C</sub> -Domäne
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hex-A	Lysosomale $\beta$ -hexosaminidase A
H <sub>N</sub>	aminoternale Hälfte der schweren Kette (HC), Translokationsdomäne
h $\nu$	Energie eines Lichtquanten (h, Plancksches Wirkungsquantum; $\nu$ , Frequenz)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hz	Hertz
I, Ile	Isoleucin
IE	Insulineinheiten
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
J	Joule
k	Kilo
K, Lys	Lysin
k.A.	keine Angabe möglich
Kap	Kapitel
Da	Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
lacZ	$\beta$ -Galaktosidase
LASER	<i>Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation</i>
lat	lateinisch
LC	leichte Kette
LH <sub>N</sub>	leichte Kette plus Translokationsdomäne der CNT
LMW	<i>Low Molecular Weight Marker</i> (Molekülmassenstandard)
Lsg	Lösung
Luc	Luziferase
m	Milli, Meter
M	Molar, Methionin
Max	Maximum
MBP	Maltose Bindungsprotein ( <i>maltose binding protein</i> )
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i> -Zellen

Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MH	Medizinische Hochschule
min	Minute(n)
MM	Molekülmassen
mol	Mol
Mtx	Methotrexat
N	Stickstoff
n	Nativ, nano
N, Asn	Asparagin
n.d.	nicht detektierbar
n.e.	nicht ermittelt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NGF	Nervenwachstumsfaktor ( <i>nerve growth factor</i> )
N-terminal	aminoterminal
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
p	Pico
P, Pro	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration ( <i>potentia hydrogenii</i> )
pKa	Maß für die Dissoziationsstärke einer Säure (pKa = -lg Ka)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
R, Arg	Arginin
Rhod	Rhodamin
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> (HPLC)
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg- Einheit
s	Sekunde, siehe
S, Ser	Serin
sc	<i>single chain</i>
SC	Rückenmark ( <i>spinal cord</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SH	Sulfhydryl-
Smp	Schmelzpunkt
SNAP-25	<i>Synaptosome-associated Protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
T, Thr	Threonin
Tab	Tabelle
TCDD	2, 3, 7, 8-Tetrachordibenzodioxin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TeNT	Tetanus Neurotoxin
TM	Transmembranregion, Tetramethyl-

TNS	2-(p-Toluidino)naphtalin-6-sulfonsäure
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V, Val	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
VAMP	Vesikel assoziiertes Membranprotein
W, Trp	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
WGA	Weizenkeimagglutinin ( <i>wheat germ agglutinin</i> )
wt	Wildtyp ( <i>wild type</i> )
Y, Tyr	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem

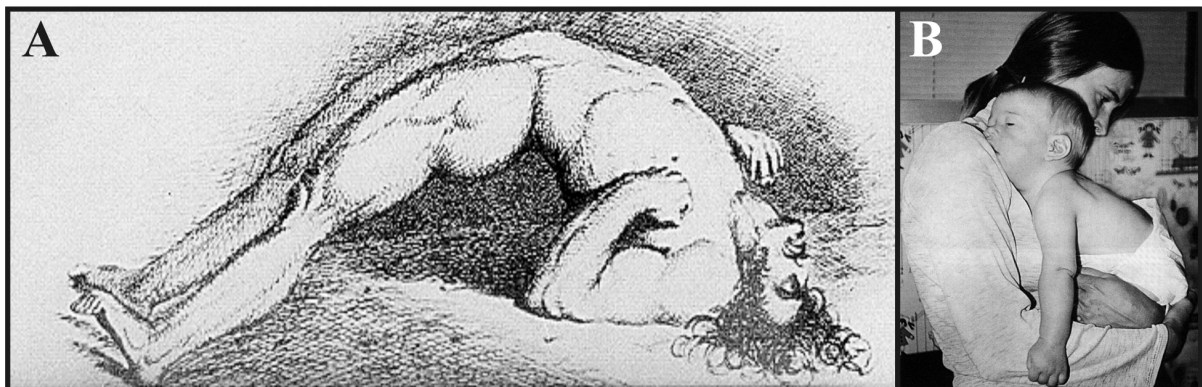
# 1. Einleitung

Eine große Anzahl von Proteinen, produziert von Pflanzen oder Bakterien, wirken extrem toxisch auf Säugerzellen aufgrund ihrer Fähigkeit, das Zytoplasma zu erreichen und bestimmte Substrate zu attackieren (Alouf & Freer (eds), „The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Toxins“, 1999). Begründet in dem strukturellen Aufbau dieser Toxine, wird die Mehrheit der Klasse der sogenannten AB- oder AB<sub>5</sub>-Toxine zugeordnet. Die A-Untereinheit enthält dabei immer die katalytisch aktive Domäne, die nach Eintritt in das Zytoplasma ihr zelluläres „Target“ modifiziert, was zum Zelltod oder einer Veränderung der zellulären Physiologie führt. Die B-Untereinheit, bestehend aus einer oder mehreren Einheiten, ist für die Bindung der Proteine an bestimmte, an der Oberfläche der Zelle exponierte Rezeptoren zuständig und kann außerdem die Translokation der katalytischen Untereinheit in das Zytosol vermitteln. Das fundamentalste biologische Problem ist dabei, wie die lösliche, hydrophile A-Untereinheit die hydrophobe Membranbarriere überwindet, um ins Zytoplasma zu gelangen. Die AB-Toxine oder AB<sub>5</sub>-Toxine haben dabei unterschiedliche Lösungsstrategien entwickelt. Einige tragen die nötige Maschinerie mit sich, andere sind abhängig von zellulären Komponenten. Auch die clostridiellen Neurotoxine, Tetanus Neurotoxin (TeNT) und die sieben serologisch unterscheidbaren Botulinum Neurotoxine (BoNT/A-G), gehören aufgrund ihrer Architektur zu der Gruppe der AB-Toxine.

## 1.1. Tetanus und Botulismus

Die Symptomatik, die durch TeNT verursacht wird, wurde erstmals vor 25 Jahrhunderten von Hippokrates beschrieben. Er berichtete von einem paralysierten Patienten mit einer hyperkontrahierten Skelettmuskulatur (Major (ed), „Classic Descriptions of Disease“, 1945) und benannte daraufhin diese Symptome als Tetanus (*tetanos*, griech. = sich kontrahieren). Tetanus äußert sich oft in einem fatalen Verlauf, der mit dem Tod durch Atem- oder Herzstillstand endet (Bleck, 1989; Abb. 1A). Zunächst ging man von einer neuronalen Erkrankung aus, bis die Ursache einem Bakterium zugeschrieben wurde (Carle & Rattone, 1884), welches von Kitasato (1891) isoliert, charakterisiert und als *Clostridium tetani* benannt wurde. Die Form des Bakteriums, die einem Trommelstock (lat. *Clostridium*) gleicht, beeinflusste die Namensgebung maßgeblich. *Clostridium tetani*, ein gram-positiver obligater Anaerobier, bildet Sporen, die weltweit im Erdboden vorkommen. Vergiftungen treten meist durch Wundinfektionen auf, die nach Verschluss optimale anaerobe Wachstumsbedingungen bieten. Das dabei produzierte TeNT ist verantwortlich für die auftretenden Symptome. Obwohl ein Großteil der Menschheit gegen Tetanus immunisiert ist, treten jährlich mehrere tausend Todesfälle auf, hauptsächlich in Entwicklungsländern, in denen die Immunisierung längst nicht so weit verbreitet ist (Galazka & Gasse, 1989).

Akuter Botulismus wurde erstmals im 19. Jahrhundert beschrieben (Kerner, 1817). Diese späte Entdeckung dieser Krankheit ist wahrscheinlich auf die, verglichen mit denen bei Tetanus auftretenden, relativ unspektakulären Symptome zurückzuführen. Botulismus äußert sich in generalisierter Muskeler schlaffung, die, bei Augen und Rachenmuskulatur beginnend, sich auf die gesamte Skelettmuskulatur ausweitet (Hatheway, 1995; Abb. 1B). Wahrscheinlich ist die Dunkelziffer der auftretenden Botulismusfälle ungleich höher verglichen mit denen von Tetanus, da oftmals die Symptomatik mit allgemeinen Krankheiten verwechselt und nicht als Botulismus erkannt wird. Auch beim Botulismus tritt bei Nichterkennung der Tod in 90 % der Fälle durch Atemlähmung ein (Bachmann *et al.*, 1984). Die Vergiftung wird durch eines von sieben serologisch unterscheidbaren Botulinum Neurotoxinen (BoNT/A-G) hervorgerufen, die von den sporenbildenden, gram-positiven obligaten Anaerobiern *Clostridium botulinum* (Van Ermengem, 1897), *Clostridium barati* und *Clostridium butyricum* (Aureli *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 1985) produziert werden können. Auch diese treten in Form von Sporen ubiquitär im Erdreich auf. Die Infektionen werden jedoch weniger durch Wunden, sondern vielmehr durch Ingestion fehlerhaft produzierter Nahrungsmittelkonserven (*botulus*, lat. = Wurst), die optimale Bedingungen zum Auskeimen der Sporen bieten, vermittelt.



**Abbildung 1: Symptomatik von Tetanus und Botulismus.** A zeigt eine Zeichnung des englischen Physiologen Sir Charles Bell eines an Tetanus erkrankten Soldaten, der im spanisch-französischen Krieg (1808-1814) verwundet wurde. Die charakteristischen Symptome, *Ophistotonus* und *risus sardonicus*, sind künstlerisch dargestellt (Aus: Marquardt, Schäfer (eds), „Lehrbuch der Toxikologie“, 1997). In B ist eine Fotografie eines an infantilem Botulismus erkrankten Säuglings zu sehen. Auch hier sind charakteristische Symptome wie ausdrucksloses Gesicht, Ptosis der Augen, Unfähigkeit den Kopf aufrecht zu halten und völliger Verlust des Muskeltonus an allen Extremitäten erkennbar (Aus: Rood *et al.* (eds), „The Clostridia“, 1997).

TeNT und BoNT/A-G sind wie die meisten Proteine empfindlich gegenüber proteolytischen und denaturierenden Bedingungen. Botulinumtoxine werden jedoch, im Gegensatz zu TeNT, in Form eines Proteinkomplexes produziert, der den Toxinen ermöglicht, unbeschadet bis in den Darmtrakt zu gelangen. Hier wird, wahrscheinlich durch die leicht alkalischen Bedingungen, der umgebende Komplex abgelöst, und das Neurotoxin erreicht durch einen Transzytoseprozess den Blutkreislauf (Maksymowych & Simpson, 1998). Durch diesen Transzytoseprozess begründet sich für einige Serotypen die geringere humane Suszeptibilität

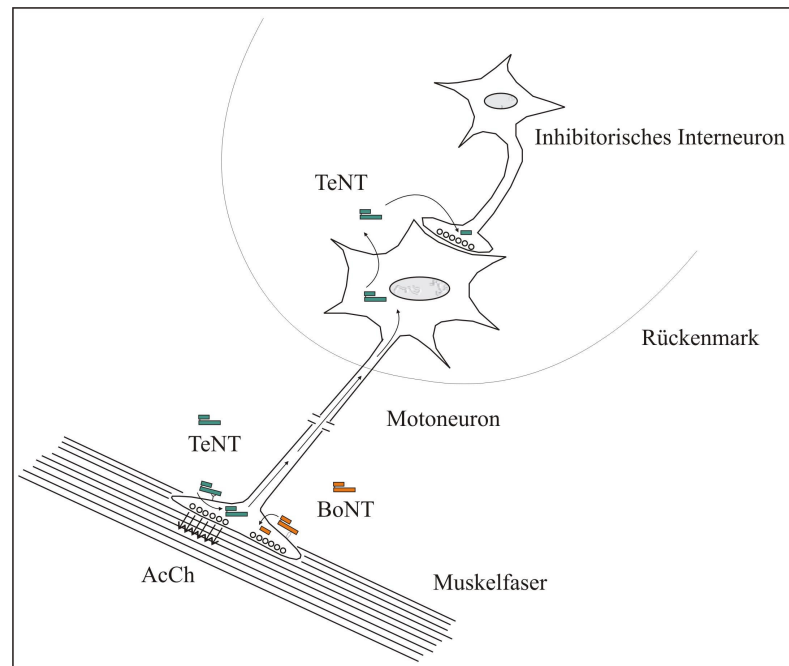
(Maksymowych & Simpson, 1998). Während Tiere vornehmlich durch BoNT/C<sub>1</sub> und D bedroht sind (Popoff, 1995), erkrankt der Mensch meist an BoNT/A oder /B. 10 % der Fälle entstehen durch Typ E (MacDonald *et al.*, 1985). Die Maus LD<sub>50</sub> liegt für die clostridiellen Neurotoxine abhängig vom Serotyp zwischen 30 µg und 1 ng/kg Körpergewicht. Sie zählen damit zu den giftigsten bekannten Substanzen (Tab. 1).

**Tabelle 1: Akute Toxizität (minimaltödliche Dosen bei einmaliger oraler Aufnahme, bezogen auf Körpergewicht) abgeschätzt für den Menschen und Molekülmassen (MM) einiger wichtiger organischer Stoffe. Viele Naturstoffe weisen viel höhere Wirksamkeiten auf als Syntheseprodukte !**

Bezeichnung	Toxizität (µg/kg)	MM
BoNT/A	0,00003	900000
TeNT	0,0001	150000
Ricin	0,02	66000
Diphtherietoxin	0,3	72000
Crotoxin	0,2	30000
TCDD	1	320
Tetrodotoxin	10	319
Aflatoxin B <sub>1</sub>	10	312
Curarin	500	696
Strychnin	500	334
Nicotin	1000	162
DFP	3000	184
Natriumcyanid	10000	49
Phenobarbital	100000	232

(Aus: Forth *et al.* (eds), „Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, 1998)

Die Grundlage für diese immense Toxizität bildet jedoch nicht allein die Dosis, sondern die absolute Neurospezifität und ihre katalytische Aktivität. Sind die Neurotoxine erst einmal in den Blutkreislauf eingetreten, werden sie über die Lymphbahnen verteilt und binden spezifisch an die präsynaptische Membran von motoneuronalen Nervenendigungen der quergestreiften Muskulatur (Kap. 1.3.1.). Nach Bindung werden die Botulinumtoxine internalisiert (Abb. 2), und die leichte Kette wird in das Zytosol transloziert (Kap. 1.3.3.). Dort führt ihre katalytische Aktivität zu einer Inhibition der Acetylcholinfreisetzung (Kap. 1.3.2.), was zu den charakteristischen Symptomen des Botulismus führt. TeNT hingegen wirkt nicht peripher, es sein denn die Dosis ist extrem hoch (Matsuda *et al.*, 1982), sondern wird retrograd axonal in das Rückenmark transportiert (Abb. 2). Dort verlässt es die Dendriten der peripheren Motoneuronen und wird von den inhibitorischen Interneuronen aufgenommen (Schwab & Thoenen, 1976), in denen es die Freisetzung von inhibitorischen Neurotransmittern, nach Translokation der katalytischen Untereinheit, hemmt (Brooks *et al.*, 1955). Daraus folgend wird die motoneuronale Neurotransmitterfreisetzung nicht mehr inhibiert, was in einer dauerhaften Muskelanspannung resultiert. Der unterschiedliche Wirkort der clostridiellen Neurotoxine spiegelt sich demzufolge in den deutlich verschiedenen Krankheitsbildern wieder.



**Abbildung 2: Aufnahme und Wirkort clostridieller Neurotoxine.** Schematische Darstellung der Aufnahme von Botulinumtoxinen (orange) und des retrograden Transportes von Tetanustoxin (grün).

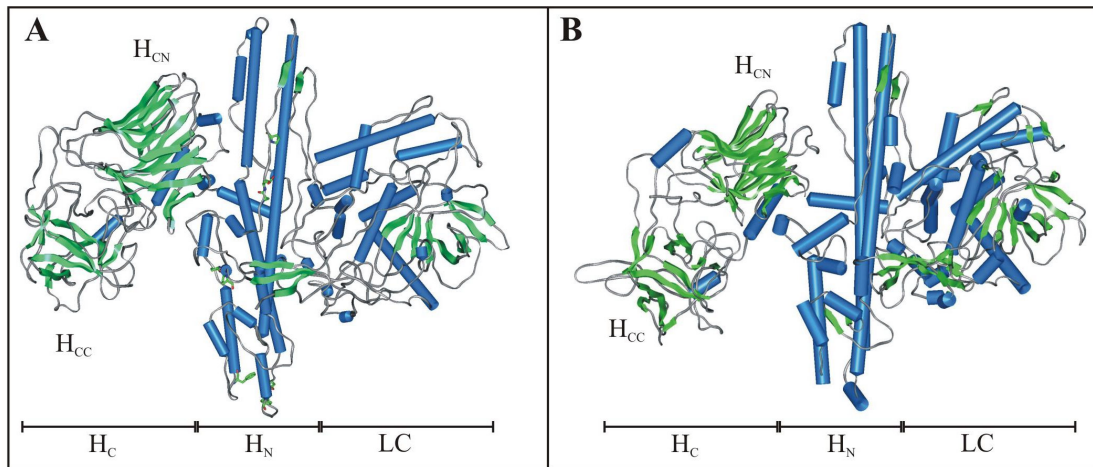
## 1.2. Struktur clostridieller Neurotoxine

Die Botulinumtoxine, aber nicht Tetanustoxin, werden in Form eines multimeren Proteinkomplexes produziert. Den Bestandteilen werden teilweise nichttoxische oder haemagglutinierende Eigenschaften zugeschrieben. Drei Formen dieses Komplexes wurden abhängig von ihrer Größe charakterisiert: die Größen belaufen sich auf ~900 kDa, ein 19S Komplex, ~500 kDa, ein 16S Komplex, und ~300 kDa, ein 12S Komplex (Sakaguchi, 1983). Die Funktionen dieser Komplexe sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich ist die Hauptfunktion jedoch die Stabilisierung des Proteintoxins und Abschirmung gegenüber den harschen Konditionen des Verdauungstraktes - azider pH, Proteolyse oder Denaturierung (Chen *et al.*, 1998; Sakaguchi, 1983).

Die reinen Neurotoxine, TeNT und BoNT/A-G, sind ~150 kDa groß und bestehen aus zwei Ketten, einer schweren Kette mit ~100 kDa und einer leichten Kette von ~50 kDa. Beide Ketten sind durch eine sehr exponierte Schleife verbunden, die zwei konservierte Cysteine enthält, welche eine Disulfidbrücke ausbilden (Niemann, 1991; Montecucco & Schiavo, 1994). Die leichte Kette, die katalytische Untereinheit des Toxins, enthält ein konserviertes HExxH Motiv, welches als aktive Zone bezeichnet wird und ein typisches Zinkbindungsmotiv vieler Zink-Endopeptidasen darstellt (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco & Schiavo, 1995). Die ~100 kDa große schwere Kette kann in zwei ~50 kDa große Fragmente untergliedert werden. Der N-terminale Teil, die sogenannte Translokations- oder H<sub>N</sub>-Domäne, ist wichtig für die Translokation der leichten Kette in das Zytoplasma (Kap.

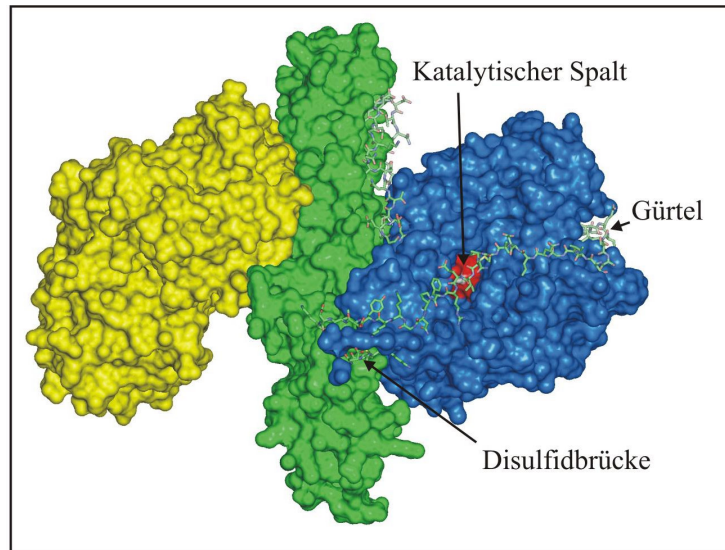


1.3.3.). Der C-terminale Teil, die Bindungs- oder H<sub>C</sub>-Domäne, hingegen vermittelt Erkennung und Bindung an neuronale Zellen (Kap. 1.3.1.).



**Abbildung 3: Vergleich der Kristallstrukturen von BoNT/A und /B.** A zeigt die Kristallstruktur von BoNT/A (3BTA), B die Kristallstruktur von BoNT/B (1EPW). Dargestellt sind Sekundärstrukturmerkmale ( $\alpha$ -Helix=blau;  $\beta$ -Faltblatt=grün; Turns, Random-coil=grau).

Seit die Strukturen von BoNT/A, TeNT H<sub>C</sub>-fragment und BoNT/B (Lacy *et al.*, 1998; Umland *et al.*, 1997; Swaminathan & Eswaremoorthy, 2000) kristallographisch aufgeklärt wurden, konnten neue Einsichten in die einzelnen Domänen genommen werden. Die Abgrenzung der drei funktionell eigenständigen Domänen der Proteintoxine sind in den Strukturen von BoNT/A und B gut erkennbar (Abb. 3). Die H<sub>C</sub>-Domäne enthält als Sekundärstrukturmerkmal hauptsächlich  $\beta$ -Faltblätter und kann strukturell weiter unterteilt werden in H<sub>CC</sub> und H<sub>CN</sub>. Die Diversität innerhalb der Sequenz der H<sub>CC</sub>-Domäne könnte einen Hinweis auf unterschiedliche Rezeptoren der clostridiellen Neurotoxine liefern. Die H<sub>N</sub>-Domäne hingegen ist unter den einzelnen Serotypen sehr konserviert (Tab. 2), und auch die berechneten Sekundärstrukturmerkmale zeigen sehr hohe Übereinstimmung (Lacy & Stevens, 1999; Lebeda & Olson, 1995). Das auffälligste Merkmal dieser Domäne sind die beiden sich kreuzenden 105 Å langen  $\alpha$ -Helices, welche denen von Colicin Ia ähneln (Wiener *et al.*, 1997). Ein anderer bemerkenswerter Teil der H<sub>N</sub>-Domäne ist der N-terminale unstrukturierte Bereich, der sich wie ein Gürtel um die leichte Kette schlingt, was zu dessen Namen führte.



**Abbildung 4: Strukturelle Besonderheiten der clostridiellen Neurotoxine.** Gezeigt sind die drei Domänen der CNT ( $H_C$ =gelb,  $H_N$ =grün, LC=blau) als Oberflächendarstellung, sowie der N-terminale Bereich der  $H_N$ -Domäne, der sogenannte Gürtel (in „stick“-Darstellung), und die exponierte, die Disulfidbrücke enthaltende Schleife, sowie das aktive Zentrum im katalytischen Spalt (weiß = Zink-Ion, rot = „HExxH-Motiv“).

Dieser Bereich verdeckt im Fall von BoNT/A, aber nicht in BoNT/B, große Teile des aktiven Spaltes (Abb. 4), welcher die aktive Zone und das davon koordinierte Zink-Ion enthält (Lacy *et al.*, 1998; Swaminathan & Eswaramoorthy 2000). Ebenfalls sehr gut in den Kristallstrukturen von BoNT/A und /B zu erkennen ist die Schleife, die die Disulfidbrücke enthält, welche leichte und schwere Kette verbindet. In beiden Strukturen ist dieser Teil klar exponiert, was eine intrazelluläre Hydrolyse zwischen schwerer und leichter Kette sowie Reduktion der Disulfidbrücke vereinfachen sollte. Die leichte Kette mit einer Größe von  $55 \text{ \AA} \times 55 \text{ \AA} \times 62 \text{ \AA}$  (3BTA), welche in das Zytosol neuronaler Zellen transloziert werden muss, besteht zu gleichen Anteilen aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Das Zink-Ion, beteiligt an der katalytischen Spaltung des Substrates, ist tief in dem sogenannten katalytischen Spalt gebunden, wo es von den Imidazolringen der zwei Histidine des HExxH-Motivs, der Carboxylgruppe eines ungefähr 35 Aminosäuren weiter stromabwärts liegenden Glutamates und einem Wassermolekül, gebunden an das Glutamat des HExxH-Motivs, koordiniert wird (Lacy *et al.*, 1998; Abb. 6). Die L-Ketten weisen hohe Substratspezifität auf. Während BoNT/A, /B und /D-G eines der Substrate der clostridiellen Neurotoxine spalten können, ist BoNT/C in der Lage, zwei Substrate zu spalten (Abb. 5; Niemann *et al.*, 1994; Williamson *et al.*, 1996). Verglichen mit anderen Zink-Endopeptidasen weisen die katalytischen Domänen von BoNT/A und /B keine nennenswerte Ähnlichkeit auf (Lacy & Stevens 1999; Holmes & Matthews, 1982).

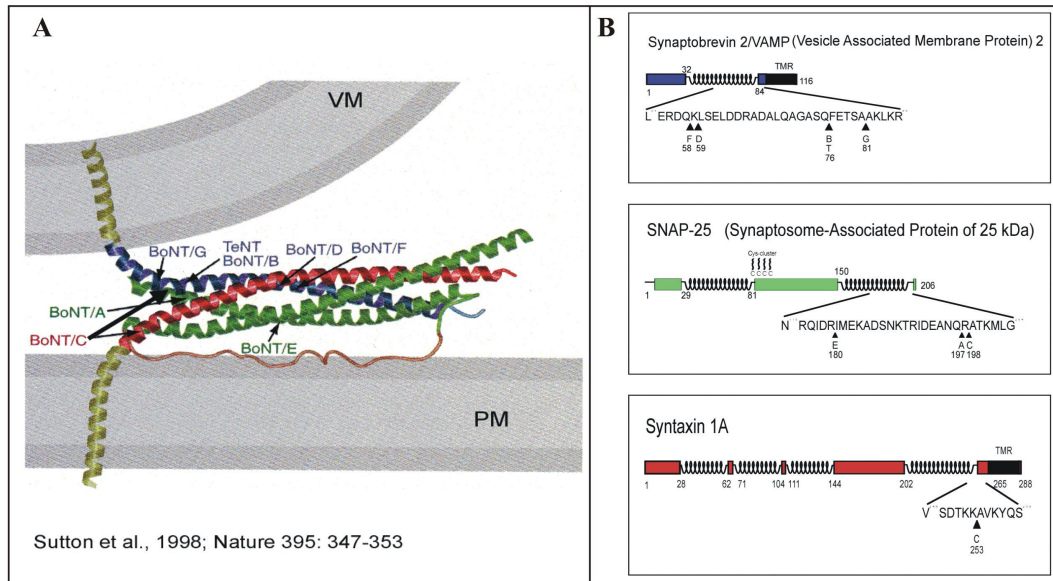
## 1.3. Wirkungsweise clostridieller Neurotoxine

### 1.3.1. Bindung an Nervenzellen

Durch die schwere Kette erlangen die clostridiellen Neurotoxine ihre Spezifität für neuronales Gewebe sowie die Fähigkeit, ihre katalytische Untereinheit in das Zytosol neuronaler Zellen zu befördern. Die C-terminale H<sub>C</sub>-Domäne der schweren Kette vermittelt dabei gangliosidspezifisch die neuronale Bindung der Toxine an die präsynaptische Membran (Schiavo *et al.*, 2001; Abb. 7). Für den Bindungsmechanismus ist ein duales Rezeptormodell als wahrscheinlich anzusehen, bei dem das Toxin durch Polysialoganglioside, die in „Lipid-Flößen“ der Membran gehäuft auftreten (Herrerros & Schiavo, 2002), an der Oberfläche akkumuliert und schließlich nach Bindung eines Proteinrezeptors internalisiert werden (Montecucco, 1986; Niemann, 1991). Als mögliche Proteinrezeptoren werden das GPI verankerte glycosylierte Protein Thy-1 für TeNT (Herrerros *et al.*, 2001; Munro *et al.*, 2001) und Synaptotagmin für Botulinumtoxine als Rezeptoren diskutiert (Nishiki *et al.*, 1994; Li & Singh, 1998).

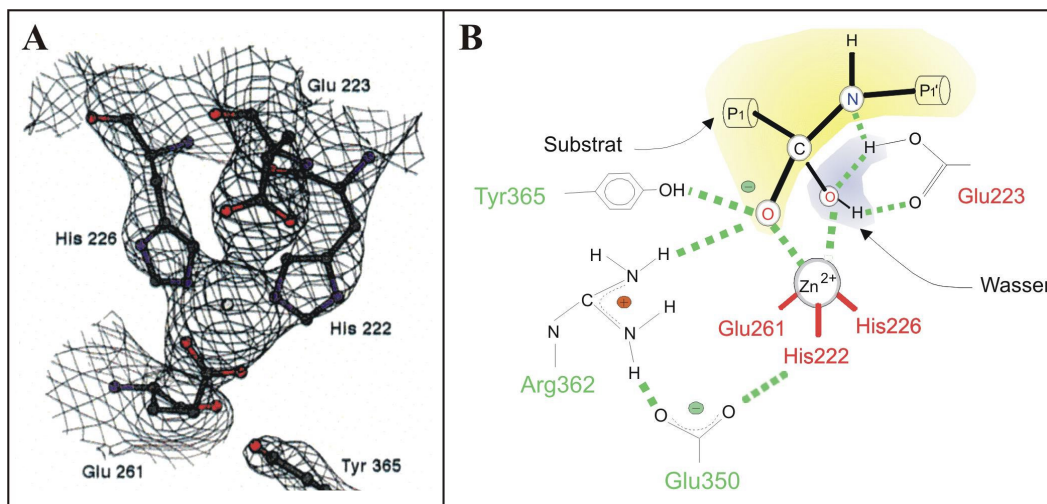
### 1.3.2. Enzymatische Aktivität der L-Ketten

Nach rezeptorvermittelter Endozytose des Neurotoxins wird die leichte Kette aus angesäuerten endosomalen Kompartimenten in das Zytosol transloziert und erreicht damit ihr Substrat (Kapitel 1.3.3; Abb. 7). Der an sich toxische Prozess der Neurotoxine besteht in der Hemmung der Exozytose und somit der Neurotransmitterausschüttung (Bigalke *et al.*, 1981). Dieses ist auf die gezielte Proteolyse einzelner an der vesikulären Exozytose beteiligter Proteine durch die L-Ketten der clostridiellen Neurotoxine zurückzuführen. Diese Zielmoleküle sind die sogenannten SNARE-Moleküle (soluble NSF attachment protein receptor) SNAP-25, Synaptobrevin2/VAMP2 oder Syntaxin 1a (Abb. 5). Sie sind in der Lage, sich auf der präsynaptischen Seite zu einem SDS-resistenten, thermisch ungewöhnlich stabilen ternären Komplex zusammenzulagern (Hayashi *et al.*, 1994). Dabei werden „coiled coils“ ausgebildet, wodurch es zu einer Annäherung der synaptischen Vesikel an die Plasmamembran kommt. Ein Calciumstrom löst schließlich die Fusion von Vesikel- und präsynaptischer Membran aus, so dass Acetylcholin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird. Proteolyse durch die clostridiellen Neurotoxine führt dazu (Abb. 5), dass der SDS-resistente Komplex nicht mehr gebildet wird und somit Exozytose und Ausschüttung von Neurotransmittern verhindert werden.



**Abbildung 5: Substrate der clostridiellen Neurotoxine und Bildung des SNARE Komplexes.** In A ist der aus einem Vierhelixbündel (blau = Synaptobrevin2, rot = Syntaxin 1a, grün = SNAP-25) bestehende SNARE-Komplex, in B sind die Substrate der clostridiellen Neurotoxine und deren hydrolysierte Peptidbindungen gezeigt.

Eine Kokristallisation von BoNT/B und Synaptobrevin2 (Hanson & Stevens, 2000) ermöglichte erstmals einen strukturellen Einblick in die Assemblierung von Substrat und leichter Kette. Daraus entwickelten sich erste Modelle, die den katalytischen Mechanismus beschrieben. Biochemisch konnte dieser vor allem durch Arbeiten von Binz *et al.* (2002), Rigoni *et al.* (2001) und Rossetto *et al.* (2001) für BoNT/A aufgeklärt werden. Abbildung 6 zeigt den postulierten Mechanismus, der dem anderer zink-abhängigen Metalloproteasen, wie Thermolysin, ähnelt.



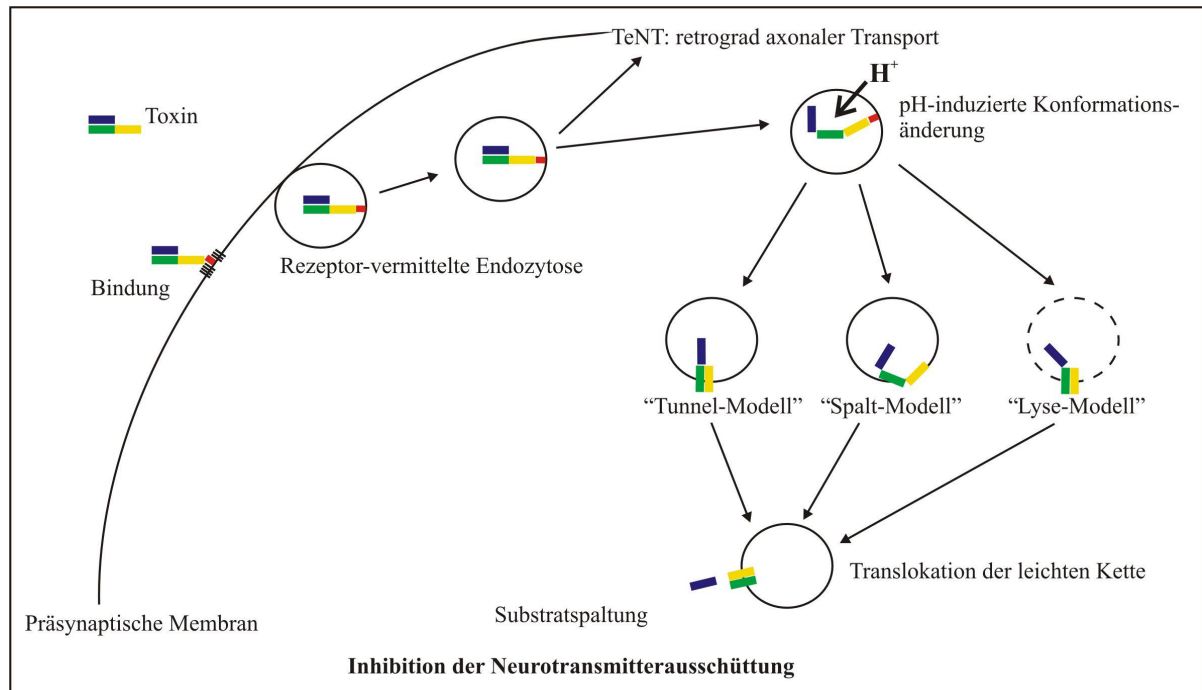
**Abbildung 6: Postulierter Katalysemechanismus für BoNT/A.** A zeigt eine vergrößerte Darstellung des aktiven Zentrums von LC/A (Aus: Lacy *et al.*, 1998), B den postulierten Mechanismus der Spaltung von SNAP-25 (Aus: Binz *et al.*, 2002). Tyr365 und Arg362 sind für die Stabilisierung des Übergangszustandes zuständig, Glu350 hält Arg362 in Position, als Protonendonator fungiert das von Zn<sup>2+</sup> und Glu223 koordinierte Wassermolekül.

### 1.3.3. Internalisierung und Translokation

Nach Bindung an neuronale Zellen und endozytotischer Aufnahme muss die katalytische Domäne die hydrophobe Membranbarriere der Vesikel überwinden (Abb. 7). Die Translokation zählt zu den am wenigsten verstandenen Mechanismen der Aufnahme der clostridiellen Neurotoxine. Nach bisherigen Erkenntnissen passieren die Neurotoxine saure Kompartimente (Williamson & Neale, 1994), in denen es zu einer pH induzierten Konformationsänderung kommt (Montecucco *et al.*, 1989). Diese führt vermutlich dazu, dass hydrophobe Anteile des Moleküls exponiert werden, so dass eine Membraninteraktion, –insertion und Porenbildung möglich wird. Aufgrund der hohen Konservierung innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne (Tab. 2) wird postuliert, dass ein „pH-Schalter“ in der Struktur verankert sei, der pH-abhängig die Konformationsänderung auslöst. Dieser konnte bisher nicht identifiziert werden. Der H<sub>N</sub>-Domäne wird im Aufnahmeprozess der Neurotoxine die Funktion der Porenbildung und Translokation der leichten Kette zugeschrieben (Högy *et al.*, 1992). Dass die schwere Kette in der Lage ist Poren zu bilden, konnte in zahlreichen elektrophysiologischen und Bindungsexperimenten nachgewiesen werden (Montecucco *et al.*, 1989; Montecucco *et al.*, 1988; Finkelstein, 1990; Shone *et al.*, 1987; Blaustein *et al.*, 1987; Donovan & Middlebrook 1986; Hoch *et al.*, 1985). Die entstehenden Poren konnten elektronenmikroskopisch für BoNT/B sichtbar gemacht werden (Schmid *et al.*, 1993; Flicker *et al.*, 1999). Durch strukturelle Vorhersagen wurden Teile der H<sub>N</sub>-Domäne ermittelt, die als isoliertes Peptid untersucht, in der Lage sind, Poren zu bilden (Lebeda & Olson, 1995; Oblatt-Montal *et al.*, 1995; Montal *et al.*, 1992). Andere Gruppen wiederum sprachen der leichten Kette ebenso porenbildende Eigenschaften zu (Kamata *et al.*, 1994; Fu & Singh, 1999). Dieser Befund verdeutlicht, dass bisher nicht ausgeschlossen werden kann, dass andere Domänen, außer der H<sub>N</sub>-Domäne, als Kofaktoren für die Translokation wichtig sind.

Für den Translokationsschritt werden, abgeleitet von anderen AB-Toxinen, drei Modelle diskutiert, die bisherige Daten hinsichtlich der Translokation in Einklang zu bringen versuchen (Abb. 7). Das erste wird als „Tunnel-Modell“ bezeichnet. In dieser Hypothese entfaltet sich die leichte Kette bei saurem pH und überwindet die hydrophobe Membranbarriere durch eine Pore, die durch die H<sub>N</sub>-Domäne gebildet wird. Nach Exposition in neutralem pH wird die leichte Kette nach Reduktion der Disulfidbrücke in das Zytoplasma entlassen und faltet sich zurück. Strukturanalysen der clostridiellen Neurotoxine sagten die Fähigkeit zur Porenbildung vorher (Montal *et al.*, 1992; Lebeda & Olson, 1995), Interaktionen der H<sub>N</sub>-Domäne mit Membranen konnten experimentell belegt werden (Montecucco *et al.*, 1988; Montecucco *et al.*, 1989). Auch eine Strukturänderung der leichten Kette bei saurem pH konnte durch spektroskopische Methoden nachgewiesen werden (Li & Singh, 2000). Trotz der bisherigen Erkenntnisse kann dieses Modell die Translokation nicht vollständig erklären. Die Befunde, dass die Poren nur eine Leitfähigkeit von wenigen PicoSiemens aufwiesen (Donovan & Middlebrook 1986; Hoch *et al.*, 1985; Hoch & Finkelstein 1985), Werte, die zu niedrig für die Dimension eines Proteinkanals sind, und dass

bei Translokation der leichten Ketten von TeNT, BoNT/A, /B und /E diese nicht gegen die Fettsäureanteile der Phospholipide durch die durch die  $H_N$ -Domäne gebildete Pore abgeschirmt werden (Montecucco *et al.*, 1986; Montecucco *et al.*, 1989), führten zu einer zweiten Hypothese.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aufnahme von clostridiellen Neurotoxinen.** Nach Bindung (rot = potentieller Rezeptor, schwarz = Polysialoganglioside) an die präsynaptische Membran motoneuronaler Zellen werden die Neurotoxine (blau = LC, grün =  $H_N$ , gelb =  $H_C$ ) Rezeptor-vermittelt endozytiert. Beim Durchlaufen saurer endosomaler Kompartimente findet vermutlich eine Konformationsänderung statt, die das Molekül translokationskompetent macht. Die diskutierten Translokationsmodelle sind schematisch dargestellt.

Dieses alternative Modell ist das sogenannte „Spalt-Modell“. Hier bildet die  $H_N$ -Domäne eher einen hydrophilen Spalt als eine Pore lateral zu den Lipidanteilen der Membran (Montecucco *et al.*, 1991; Montecucco *et al.*, 1994). Dieser beherbergt die nach pH Induktion partiell entfaltete leichte Kette, die ihre hydrophoben Segmente zu den Lipidanteilen ausrichtet. Nach der Überwindung des Spaltes, faltet sich die leichte Kette bei neutralem zytosolischen pH zurück in ihre ursprüngliche Form. Der von der schweren Kette gebildete hydrophile Spalt hingegen weitet sich vermutlich zu einer Pore auf, um die hydrophilen Anteile des Proteins in der hydrophoben Umgebung der Membran zu verringern. Daher ist in diesem Modell die Porenbildung eine Konsequenz der Translokation aber nicht wie im „Tunnelmodell“ eine Voraussetzung.

Die dritte Hypothese – das „Lyse-Modell“ – ist aufgebaut auf die Porenbildungshypothese des „Tunnelmodells“ (Beise *et al.*, 1994). Die das Toxin enthaltenden Vesikel werden durch  $H^+$ -ATPasen angesäuert, was zu einer Konformationsänderung innerhalb des Moleküls führt.



Diese befähigt die schwere Kette, in die Membran zu insertieren und Ionenkanäle zu bilden, welche die elektrochemischen Gradienten ändern. Dieses kann zu einer osmotischen Lyse der Vesikel und Freisetzung der leichten Kette in das Zytosol durch Destabilisierung der Membran führen (Cabiaux *et al.*, 1985).

**Tabelle 2: Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der H<sub>N</sub>-Domänen von clostridiellen Neurotoxinen in Prozent.**

	H <sub>N</sub> -BoNT/A	H <sub>N</sub> -BoNT/B	H <sub>N</sub> -BoNT/C	H <sub>N</sub> -BoNT/D	H <sub>N</sub> -BoNT/E	H <sub>N</sub> -BoNT/F	H <sub>N</sub> -BoNT/G	H <sub>N</sub> -TeNT
H <sub>N</sub> -BoNT/A		47	34	47	39	38	46	38
H <sub>N</sub> -BoNT/B	31		35	39	42	43	62	42
H <sub>N</sub> -BoNT/C	44	41		72	34	36	36	39
H <sub>N</sub> -BoNT/D	32	40	20		37	38	38	39
H <sub>N</sub> -BoNT/E	41	37	41	40		73	42	37
H <sub>N</sub> -BoNT/F	42	36	40	38	21		41	37
H <sub>N</sub> -BoNT/G	32	28	42	42	38	39		39
H <sub>N</sub> -TeNT	36	37	36	38	41	40	37	

In der unteren linken Hälfte der Tabelle ist der prozentuale Anteil ähnlicher Aminosäuren, in der oberen rechten Hälfte der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren zweier vergleichener H<sub>N</sub>-Domänensequenzen angegeben. Die Werte wurden mit dem Programm „CLUSTAL W“ nach Thompson *et al.* (1994) ermittelt ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align\\_clustalw.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl)).

Alle drei Modelle sind abgeleitet von besser untersuchten Translokationsmechanismen anderer bakterieller Toxine. Sie versuchen, die Erkenntnisse der clostridiellen Neurotoxine zur Translokation zu interpretieren. Trotzdem bleiben bisher vor allem mechanistische Fragen, wie z.B. die Frage nach dem „pH-Schalter“, welche Bereiche der H<sub>N</sub>-Domäne für die Translokation essentiell sind, oder welche Funktion einzelne Bereiche der H<sub>N</sub>-Domäne im Translokationsmechanismus einnehmen, ungeklärt. Aufgrund der hohen Konservierung innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne (Tab. 2) der clostridiellen Neurotoxine ist es allerdings wahrscheinlich, dass der Mechanismus innerhalb dieser Familie gleich ist.

## 1.4. Nutzung von clostridiellen Neurotoxinen

### 1.4.1. Die L-Ketten als Werkzeuge zur Untersuchung von Exozytose und intrazellulärem Transport

Aufgrund der Fähigkeit der clostridiellen Neurotoxine, die den SNARE-Komplex bildenden Proteine (Abb. 5) zu spalten (Hayashi *et al.*, 1994; Pellegrini *et al.*, 1995), werden die Neurotoxine in der Grundlagenforschung häufig als Werkzeug eingesetzt, um bestimmte Aspekte der vesikulären Exozytose und des intrazellulären Transportes aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene andere synaptische Proteine mit den isolierten SNARE-Proteinen und dem  $\sim$ -Komplex interagieren können. Deren Funktionen ist noch nicht aufgeklärt, jedoch wird vermutet, dass sie als Regulatoren der Exozytosemaschinerie fungieren oder die Sortierung einzelner an der vesikulären Endozytose beteiligten Proteine kontrollieren (Linial, 1997). Da die clostridiellen Neurotoxine die SNARE-Proteine

spezifisch an einer Stelle spalten, könnten die verkürzten Substrate zur Aufklärung der nötigen Domänen dienlich sein, die für die Assemblierung verschiedener im Exozytosekreislauf beteiligter Teilkomplexe nötig sind. Außerdem können die clostridiellen Neurotoxine Einblick in den Status der SNARE-Komplexbildung bieten, weil die Substrate im SNARE-Komplex nicht mehr gespalten werden (Hayashi *et al.*, 1994; Pellegrini *et al.*, 1995).

#### **1.4.2. Medizinische Nutzung der nativen Neurotoxine**

Obwohl clostridielle Neurotoxine durch Inhibition der Neurotransmitterausschüttung extrem toxisch auf den Menschen wirken, sind sie trotzdem nicht in der Lage, wie andere bakterielle Toxine (z.B. Diphtherietoxin) Zellen abzutöten (Borodic *et al.*, 1994). Das Fehlen der Zytotoxizität ist eine wichtige Voraussetzung für die medizinische Nutzung. Aufgrund der hohen Wirksamkeit und der Gewebsspezifität für Nervenzellen haben sich von *Clostridium botulinum* produzierte Toxine zu sehr potenten Pharmawirkstoffen entwickelt, um verschiedene Formen von spastischen Erkrankungen, sekundären Symptomen neuronaler Krankheiten (z.B. Parkinson) oder verschiedene Arten von muskulären Störungen, z.B. Strabismus, Blepharospasmus, Torticollis Spasticus, Spasmen der Kiefermuskulatur und weitere Formen der Dystonie zu behandeln (Münchau & Bhatia, 2000). Direkte Injektion von einigen Nanogramm Toxin hebt die Symptome für mehrere Wochen oder Monate auf. Die paralytische Intensität ist gut mit der injizierten Menge korrelierbar (Scott 1989). Es treten dabei keine fokalen oder systemischen Effekte außer der gewollten Muskelparalyse auf. Die Diffusion des Toxins in benachbarte Muskelstränge ist sehr gering.

Neuerdings finden die Toxine auch Einzug in weitere Gebiete der Medizin. Nicht nur spastische Syndrome, sondern auch Schmerzsymptomatiken wie myofacialer oder spannungsbedingter Kopfschmerz werden in einigen Fällen behandelbar (Schulte-Mattler *et al.*, 1999, Porta, 2000). Verwendungen als Relaxans bei orthopädischen Operationen (Guerrissi, 2000) oder als „Anti-Faltenmittel“ in der kosmetischen Chirurgie (Markey, 2000; Mendez-Eastman, 2000) sowie die mögliche Behandlung von Hyperhydrose (Atkins & Butler, 2002) oder von Tennisellenbogen (Keizer *et al.*, 2002) verleihen den Neurotoxinen einen hohen Bekanntheitsgrad.

Als Medikament zugelassen sind bisher nur die aus Clostridien gereinigten Botulinum Neurotoxin Komplexe des Serotyps A und B. großer Vorteil des Serotypes A ist, genauso wie es für den Typ C gilt, die lange Wirkdauer der leichten Kette im Vergleich zu den anderen Serotypen an ihrem Wirkort, deren Ursache noch nicht geklärt ist (Brashear *et al.*, 2000; Johnson, 1999). Ein gravierender Nachteil bei der Nutzung des Neurotoxinkomplexes ist jedoch – abhängig vom Immunsystem des Patienten – eine mögliche Immunantwort mit folgendem Antikörperboost, was vielen Patienten, die an einer chronischen Erkrankung leiden, eine weitere Behandlung verwehrt (Johnson, 1999). Daher sind insbesondere andere Serotypen oder weiter gereinigte Toxine unbedingt nötig, um eine dauerhafte Behandlung aller Patienten zu gewährleisten.



Aus diesem Grund hat man sich in den letzten Jahren darauf konzentriert, neue Lösungen zu finden, die es ermöglichen, das gereinigte Neurotoxin einzusetzen. Mitte der 90er Jahre wurden erstmals native schwere Ketten und rekombinante leichte Ketten rekonstituiert (Zhou *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1994), was zu funktionellen Neurotoxinen führte, aber nur geringe Ausbeuten an rekonstituiertem Toxin lieferte. Daher zielen neue Ansätze auf die Reinigung der Neurotoxine (Gessler & Bohnel, 1999) nach Isolierung aus Clostridien oder aber die Produktion von Gesamttoxin in *E. coli* (Li *et al.*, 2001; Kiyatkin *et al.*, 1997). Da die Produktion der Neurotoxine in *E. coli* mit hohen Sicherheitsauflagen verbunden ist, konzentrieren sich einige Gruppen auf die rekombinante Herstellung nicht-toxischer Fragmente und ihrer anschließenden chemischen Verknüpfung mit weiteren Proteinbestandteilen (Chaddock *et al.*, 2000a, b; Chaddock *et al.*, 2002; Duggan *et al.*, 2002).

## 1.5. Nutzung von AB-Toxinen als Proteintransporter

Während der letzten Dekade wurde der Einsatz von AB- oder AB<sub>5</sub>-Toxinen als potentielle Proteintransporter diskutiert und experimentell erforscht. Die Fähigkeit, spezifisch bestimmte Zelltypen zu infiltrieren und Membranbarrieren zu überwinden, verleihen diesen Molekülen ein enormes pharmakologisches Potential. Diphtherietoxin ist sicherlich nicht nur mechanistisch das am besten untersuchte AB-Toxin, sondern auch im Hinblick auf die Nutzung als Transporter für fusionierte Proteine. Peptide verschiedener Größe und unterschiedlicher Ladungseigenschaften konnten transloziert werden (Stenmark *et al.*, 1991), genauso wie vollständige Proteine verschiedener Größe. Eine an die katalytische Einheit von Diphtherietoxin (DT) zusätzlich fusionierte leichte Kette von DT oder Apolipoprotein A1 (Madhus *et al.*, 1992), eine verdoppelte Fc-Bindungsdomäne (Madhus *et al.*, 1991) oder Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) (Wiedlocha *et al.*, 1992) wurden nachweislich ins Zytosol transportiert. Inzwischen hat sich die Forschung darauf konzentriert, Diphtherietoxin zu einem therapeutisch wirksamen Fusionsprotein weiter zu entwickeln. Die aktuellste Zielrichtung ist die Bekämpfung von Krebs. Dazu wurde Diphtherietoxin mit Proteinen, die Apoptose einleiten, wie Bad oder Bcl-XL, fusioniert (Ichinose *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1999). Kombinationen von Diphtherietoxin und Interleukin (IL) 2 oder 3 resultierten bereits in therapeutisch nutzbaren Proteinen (IL3: Feuring-Buske *et al.*, 2002; Frankel *et al.*, 2000; Alexander *et al.*, 2000; IL2: Foss, 2001). Nicht nur Diphtherietoxin vermag einen zytosolischen Transport zu vermitteln, auch andere Proteintoxine der AB- oder AB<sub>5</sub>-Familie sind dazu in der Lage. Die B Untereinheit von Cholera Toxin transloziert beispielsweise Insulin (Arakawa *et al.*, 1998) oder ein Proteolipid Proteinpeptid (Yuki *et al.*, 2001). Anthrax Toxin ist ebenfalls befähigt, Proteine wie z.B. die katalytischen Einheiten von Cholera Toxin (Sharma *et al.*, 2000), TeNT (Arora *et al.*, 1994), Diphtherietoxin, Shiga Toxin (Arora and Leppla, 1994) oder die ADP ribosylierende Untereinheit von Pseudomonas Exotoxin A (Arora *et al.*, 1992) zu translozieren. Weiterhin kann die N-terminale Domäne von C2-Botulinum Toxin (AA 1-225) C3-transferase (Barth *et al.*, 2002) in das Zytosol transportieren.

Die clostridiellen Neurotoxine können nicht nur als therapeutisches Agens in Form der Proteintoxine verwendet werden, auch die Nutzung der absolut neuroselektiven schweren Kette, die ihre eigene Translokationsmaschinerie enthält, als neuronaler oder nicht-neuronaler Proteintransporter scheint durchführbar zu sein. Der retrograd-axonale Transport im Fall von TeNT verspricht zusätzlich die Möglichkeit, die Blut-Hirn Schranke zu überwinden. Forschungen konzentrierten sich aus diesem Grund, insbesondere darauf, das Bindungsfragment von TeNT zu einem Proteintransporter zu entwickeln. Stoffe wie das grün fluoreszierende Protein (GFP; Maskos *et al.*, 2002), Cardiotrophin-1 (Bordet *et al.*, 2001), Superoxiddismutase (SOD) oder das Maltose Bindungsprotein (MBP; Matthews *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 1995),  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ; Coen *et al.*, 1997) und lysosomale  $\beta$ -Hexosaminidase A (Hex-A; Dobrenis *et al.*, 1992) konnten in neuronale Zellen eingebracht werden, teilweise blieben auch die retrograden Transporteigenschaften erhalten, aber aufgrund der fehlenden H<sub>N</sub>-Domäne blieb Translokation ins Zytoplasma verwehrt. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Fusion des H<sub>C</sub>-fragmentes von BoNT/A und B an Biotin oder kleine Peptide (Zdanovskaia *et al.*, 2000). Um eine zytosolische Auslieferung der transportierten Proteins zu ermöglichen, wurde in einem kürzlich publizierten Ansatz die gesamte schwere Kette von BoNT/A an ein 10 kDa Aminodextran (Goodnough *et al.*, 2002) fusioniert, aber auch damit konnte keine Beförderung in das Zytoplasma nachgewiesen werden.

## 2. Aufgabenstellung

Die Translokation der leichten Kette in das Zytoplasma stellt für den Wirkmechanismus clostridieller Neurotoxine den am wenigsten verstandenen Teilschritt dar. Für eine mögliche Nutzung der Neurotoxine als neuroselektive Proteintransporter ist gerade dieser Prozess eminent wichtig. Auf der Basis des rekombinanten Botulinum Neurotoxin Typ D, sollten daher die molekularen Eigenschaften der Translokationsdomäne untersucht werden.

Zunächst sollten durch eine Deletionsanalyse der  $H_N$ -Domäne Bereiche identifiziert werden, die für die Funktionalität des Moleküls essentiell sind. Weiterhin konnte man annehmen, dass durch die hohe Konservierung der  $H_N$ -Domäne einzelnen Aminosäuren charakteristische Funktionen zukommen. Durch gezielte Mutagenese sollten daher Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise pH-induzierte Konformationsänderungen auslösen könnten, also einen „pH-Schalter“ darstellen. Außerdem sollten Aminosäuren bestimmt werden, die in diese strukturellen Änderungen des Moleküls involviert sind oder für die Interaktion mit Membranen wichtige Funktionen einnehmen. Durch Einführung von künstlich generierten Disulfidbrücken innerhalb der  $H_N$ -Domäne sollten die vermutlich während des Translokationsprozesses ablaufenden, pH-induzierten Konformationsänderungen unterbunden werden, um zu klären, welche Teile der  $H_N$ -Domäne darin involviert sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte analysiert werden, ob die Translokation N-terminale Verlängerungen des Moleküls toleriert, und ob die clostridiellen Neurotoxine somit als Proteintransporter tauglich sind. Die katalytischen Aktivitäten der leichten Ketten sind durch einzelne Punktmutationen aufhebbar. Dieses ist eine ideale Voraussetzung für die Nutzung der clostridiellen Neurotoxine als nicht-toxische Transportermoleküle. Dazu sollte rekombinantes BoNT/D am N-Terminus mit Proteinen verschiedener Größe und Struktur fusioniert und auf Funktionalität untersucht werden. Außerdem sollte ermittelt werden, ob die angehängten Proteine in das Zytoplasma transportiert und ihre katalytischen Aktivitäten nach Translokation beibehalten würden.

Weiterhin sollte herausgefunden werden, welche Einflüsse die katalytische Untereinheit und die  $H_C$ -Domäne auf den Translokationsprozess haben und ob die  $H_N$ -Domäne allein die Translokation vollziehen kann. Ersetzen von  $H_C$  oder LC durch Domänen gleicher Funktion, aber abstammend von anderen Serotypen oder anderen AB-Toxinen, sollte Einblicke liefern, ob Wechselwirkungen zwischen diesen Domänen für die Translokation essentiell sind.

## 3. Methoden

### 3.1. Arbeiten mit DNA

#### 3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1988) lassen sich beliebige Teile einer Nukleinsäuresequenz, der Matrize, *in vitro* selektiv vervielfältigen oder verändern. An hitzedenaturierte Matrize werden zwei zum Randbereich des zu amplifizierenden Genbereiches komplementäre Oligonukleotide (Primer) bei niedriger Temperatur gebunden (Annealing). Dieser anhybridisierte doppelsträngige Bereich dient der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Polymerisation des komplementären DNA-Stranges. Die Polymerisation erfolgt in Anwesenheit von Desoxynukleotiden vom 5'- zum 3'-Ende. Die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge werden im nächsten Schritt durch Erhitzen wieder zu Einzelsträngen denaturiert, an die wiederum die Primer hybridisieren können. Ausgehend von einem DNA-Doppelstrang erhält man nach n durchgeführten PCR-Reaktionszyklen theoretisch  $2^n$  Doppelstränge. Für die DNA-Polymerisation wird rekombinante *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab) verwendet. Diese zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate ( $2 \times 10^{-6}$ ) aus, welche durch eine  $3' \rightarrow 5'$  Exonukleaseaktivität erreicht wird.

Ein typischer Ansatz für eine PCR-Reaktion sieht wie folgt aus:

- 1  $\mu$ l Template-DNA (10-20 ng/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l 3'-Primer (25 pmol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l 5'-Primer (25 pmol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
- 5  $\mu$ l 10 x *Pwo*-Polymerase-Puffer (Peqlab)
- 0,7  $\mu$ l *Pwo*-DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)
- ad 50  $\mu$ l mit autoklaviertem dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz durchläuft in einem Hybaid TouchDown Thermocycler (Biometra) mit beheiztem Deckel folgendes Temperaturprogramm:

- |                    |      |  |
|--------------------|------|--|
| 1. Schritt: 2 min  | 94°C | Denaturierung doppelsträngiger DNA                   |
| 2. Schritt: 1 min  | 94°C | Denaturierung doppelsträngiger DNA                   |
| 3. Schritt: 2 min  | 54°C | Hybridisierung der Primer (5-10°C < Smp der Primer)  |
| 4. Schritt: 2 min  | 72°C | Polymerisation                                       |
| 5. Schritt: 10 min | 72°C | Polymerisation unvollständig polymerisierter Stränge |

Die Schritte 2 bis 4 werden 29 mal wiederholt. Die erhaltenen PCR-Fragmente werden im Anschluss gereinigt (Kap. 3.1.5.1.) und mit Hilfe eines 1 %igen Agarosegels analysiert (Kap. 3.1.4.).

### 3.1.2. Restriktionsspaltung

Restriktionsenzyme hydrolysieren die Bindung zwischen Phosphatgruppe und Desoxyribose im Zuckerphosphatrückgrad beider Stränge eines DNA-Doppelstranges. Die Spaltprodukte tragen an den 5'-Enden eine Phosphatgruppe, an den 3'-Enden eine Hydroxylgruppe. In der Gentechnologie werden am häufigsten Typ II-Endonukleasen verwendet. Diese schneiden die DNA innerhalb einer für das Enzym charakteristischen Erkennungssequenz aus 4-8 Basenpaaren. Sie erzeugen dabei glatte bzw. 3'- oder 5'-überhängende Enden.

Die Verwendung von Restriktionsenzymen dient verschiedenen Zwecken. Mit ihrer Hilfe können DNA-Stücke schnell aus Plasmiden herausgeschnitten werden, um sie in andere Vektoren einzufügen. Außerdem können erfolgreiche Subklonierungen dieser Art anhand des Spaltmusters bestimmter Restriktionsenzyme identifiziert werden.

Ein typischer analytischer Restriktionsansatz hat folgende Zusammensetzung:

5,0	μl	Plasmid-DNA (etwa 1 μg)
2,0	μl	10 x Puffer
2,0	μl	BSA [1 mg/ml] (optional)
0,5	μl	Restriktionsenzym (5-10 Units)
<u>10,5</u>	<u>μl</u>	<u>dH<sub>2</sub>O</u>
20,0	μl	Σ

Der Ansatz wird 90' bei 37°C inkubiert.

Je nach verwendeten Restriktionsenzymen sind unterschiedliche Pufferbedingungen für eine optimale Enzymaktivität notwendig. Die Wahl des in die Reaktion eingesetzten 10 x Puffers richtet sich nach den Bedürfnissen der Enzyme (s. Herstellerangaben (Biolabs)). Ein präparativer Restriktionsansatz wird analog, aber in größerem Maßstab (5 μg DNA) durchgeführt. Außerdem erfolgt hierbei häufig nach der Hälfte der Inkubationszeit eine erneute Zugabe von Restriktionsenzym, da die Enzyme im Laufe der Zeit an Aktivität verlieren.

### 3.1.3. Dephosphorylierung eines Vektors

Um Genfragmente mit hoher Effizienz in geeignete Plasmid-Vektoren zu klonieren, muss eine Religation des Vektors ohne Insertion verhindert werden. Zu diesem Zweck behandelt man Vektor-DNA, besonders nach Linearisierung mit nur einem Restriktionsenzym oder solchen Nukleasen, die glatte Enden erzeugen, mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm/Shrimps. Diese entfernt die terminalen 5'-Phosphatgruppen des linearen Vektors und verhindert dadurch eine Rezirkularisierung des Vektors.

Durchführung der Dephosphorylierung:

16,0	μl	DNA-Lösung (ca. 5 μg DNA)
2,0	μl	10 x Dephosphorylierungspuffer
<u>1,0</u>	<u>μl</u>	<u>alkalische Phosphatase (0,1 U/μl)</u>
19,0	μl	Σ

Der Reaktionsansatz wird 60 min bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 min noch einmal die gleiche Enzymmenge zugegeben wird. Danach wird das Enzym inaktiviert, indem eine EDTA-Konzentration von 20 mM eingestellt und die Probe 10 min lang auf 65°C erwärmt wird. Durch diese Behandlung werden die Zn<sup>2+</sup>-Ionen der Phosphatase, die für die Stabilität der Untereinheiten und seine katalytische Aktivität notwendig sind, chelatisiert. Das denaturierte Enzym kann dann durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aus der Probe entfernt werden.

#### **10 x Dephosphorylierungspuffer:**

500 mM Tris/HCl, pH 8,5 (bei 20°C)  
1 mM EDTA

#### **3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA- und RNA-Fragmenten verwendet. In einem elektrischen Feld wandert die DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Mobilität der Nukleinsäuren hängt dabei von ihrer Molekülgröße und der Dichte der Gelmatrix ab. Bei DNA werden in dieser Arbeit für präparative 0,8 %ige, für analytische Zwecke 1 %ige und für die Analyse von RNA 2 %ige Agarosegele verwendet. Mit Hilfe des  $\lambda$ -DNA-Standards lässt sich die Molekülgröße von DNA-Fragmenten durch Vergleich der Laufstrecke und anhand deren Intensität die jeweilige Masse bestimmen.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose (w/v) durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wird die Lösung mit 0,5  $\mu$ l Ethidiumbromid pro 20 ml versetzt und in ein horizontales Gelbett (Eigenbau bzw. Easy Cast Electrophoresis System, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH) gegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben werden mit einem Fünftel ihres Volumens an Auftragspuffer für Agarosegele versetzt und die Elektrophorese für die ersten 5 min bei 45 V, anschließend 40 min bei 65 V (Power Pac 3000, Biorad) durchgeführt. Währenddessen interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und macht so die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) sichtbar. Eine Aufzeichnung erfolgt mit dem Photodokumentationssystem Digit Store Duo der Firma Intas (Göttingen).

#### **TAE-Laufpuffer:**

40 mM Tris  
0,11 % (v/v) Essigsäure  
1 mM EDTA, pH 8,0

#### **Auftragspuffer für Agarosegele:**

0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF  
30 % (w/v) Glycerin

### 3.1.5. Reinigung von DNA

#### 3.1.5.1. Reinigung von PCR-Produkten

Bevor ein durch PCR gewonnenes DNA-Fragment durch Restriktionsendonukleasen geschnitten werden kann um es als Insert in einen Vektor zu ligieren, muss die DNA-Polymerase entfernt werden. Ansonsten würde die bei 37°C nur wenig aktive DNA-Polymerase, die durch Restriktionsendonukleasen generierten überhängenden Enden wieder mit Nukleotiden zu einem glatten Ende auffüllen. Dadurch wäre eine nachfolgende Ligation des Inserts nicht mehr möglich. Die Reinigung erfolgt in Anlehnung an das *QIAquick Spin Handbook* (1997) unter Verwendung eines *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) durch selektive Bindung der im PCR-Reaktionsgemisch enthaltenen DNA an eine mit Silicagel beschichtete Membran. Die Membran bindet nur DNA-Fragmente von 100-10000 Bp, so dass Primer und Template-DNA entfernt werden.

#### 3.1.5.2. Reinigung der Spaltprodukte nach einem Restriktionsschnitt

Zur Isolation von Spaltprodukten nach einem Restriktionsschnitt (Kap. 3.1.2.) werden die DNA-Fragmente zunächst in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (Kap. 3.1.4.) und dann aus diesem mit Hilfe des *QIAquick-Gel-Extraction Kits* (Qiagen, 1997) wiedergewonnen. Das Trennverfahren beruht auf der selektiven Bindung von DNA an eine Silicamatrix bei hoher Salzkonzentration. Die Banden der DNA-Fragmente werden unter einer UV-Lampe (366 nm) (Roth) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA der erhaltenen Gelstücke wird nach dem von Qiagen mitgelieferten Extraktionsprotokoll isoliert.

### 3.1.6. Ligation

T4-DNA-Ligase kann DNA-Fragmente, die z.B. durch Restriktionsspaltung entstanden sind, wieder miteinander verknüpfen, wenn die Enden der linearen DNA glatt oder komplementär vorliegen. Das Enzym katalysiert dabei die Veresterung eines 5'-Phosphorsäureesters mit einer 3'-Hydroxylgruppe. Wurde der Vektor zuvor mit alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert, so besitzt das rekombinierte DNA-Molekül in beiden Strängen je einen Einzelstrangbruch, an dem eine 3'-Hydroxylgruppe des Inserts auf eine 5'-Hydroxylgruppe des Vektors trifft. Dennoch ist das DNA-Molekül stabil genug für eine Transformation in eine Bakterienzelle, in der Reparaturenzyme des Wirtes den Einzelstrangbruch beheben.

In einem Ligationsansatz werden etwa 20 ng Vektor-DNA und soviel Insert-DNA eingesetzt, dass sich ein molares Vektor-Insert-Verhältnis von 1 : 3 bis 1 : 4 ergibt. Liegen die Enden der DNA glatt vor, so wird die Ligation mit einem molaren Vektor-Insert-Verhältnis von 1 : 6 durchgeführt. Das Gemisch aus Vektor und Insert wird mit 1 µl 10 x Ligationspuffer (MBI Fermentas) und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt. Anschließend wird der Ansatz mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und mindestens 3 h bei 22°C inkubiert. Ligationen von

glatten DNA-Enden werden ca. 16 h bei 16°C inkubiert. Danach erfolgt durch Erhitzen des Ansatzes für 10 min auf 65°C eine Inaktivierung der Ligase. Dieser Schritt löst die Ligase von der DNA ab, um die Effizienz der nachfolgenden Transformation zu erhöhen. Parallel zu jeder Ligationsreaktion wird eine Kontrolle mitgeführt, die zwar Vektor und T4-DNA-Ligase, aber kein DNA-Insert enthält. Nach einer Transformation zeigt diese Kontrolle die Anzahl an Kolonien an, die auf eine Religation des Vektors zurückzuführen sind.

### **3.1.7. Transformation**

Das gramnegative Bakterium *E. coli* ist nicht in der Lage, Fremd-DNA von außen mit ausreichender Effizienz aufzunehmen. Deshalb wird die Zellwand von *E. coli* durch Behandlung mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an zweiwertigen Metallkationen destabilisiert und damit die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Plasmid-DNA gesteigert. Auf diese Weise werden die Zellen kompetent gemacht. Der Wirkungsgrad einer Transformation kann durch einen Hitzeschock oder einen kurzen starken Stromstoß erhöht werden.

#### 3.1.7.1. Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgt nach der Methode von Dagert und Ehrlich (1979).

20 ml 2YT-Medium werden mit 200 µl einer Übernachtskultur eines geeigneten *E. coli*-Stammes angeimpft und 2 h bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4°C und 2500 rpm abzentrifugiert (5403, Eppendorf), in 20 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lsg. resuspendiert und 2 h im Eis inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation (1200 rpm, 4°C) wird das Bakteriensediment in 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach weiteren 2 h auf Eis sind die Bakterien kompetent und können 48 h lang für eine Transformation verwendet werden.

#### 3.1.7.2. Herstellung kompetenter, tiefrierbarer Bakterien-Zellen

Die Herstellung kompetenter, tiefrierbarer Bakterien-Zellen erfolgt analog der Herstellung kompetenter Zellen. Es werden 200 ml 2YT-Medium mit 2 ml Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4°C und 2500 rpm abzentrifugiert (5403, Eppendorf), das Pellet in 100 ml einer 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 enthaltenden Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut sedimentiert (8 min, 4°C) und in 20 ml einer 15 mM CaCl<sub>2</sub> und 15 % (v/v) Glycerin enthaltenden Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.



### 3.1.7.3. Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* mit DNA, die sowohl die proteolytisch aktive leichte als auch die schwere Kette codierte, wurde unter speziellen Sicherheitsauflagen nach der S2-Sicherheitsverordnung (Aktenzeichen: 501h-40654/3/57/3) durchgeführt.

Eine Plasmid-Lösung, z. B. ein Ligationsansatz mit etwa 20 ng Vektor-DNA oder 7-10 ng ringförmiger Plasmid-DNA, wird mit 100 µl kompetenter (auch tiefgefrorener) *E. coli*-Zellen gemischt und 30 min auf Eis stehengelassen. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 5 min bei 37°C. Anschließend werden die Bakterien 10 min lang auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 300 µl 2YT-Medium wird der Ansatz 30 min bei 37°C und 800 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können die transformierten Bakterien die jeweilige Antibiotikaresistenz ausbilden, bevor sie auf einer 2YT-Agarplatte, die das für die Selektion notwendige Antibiotikum enthält, ausplattiert werden. Die transformierten Zellen wachsen bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht zu Kolonien heran.

### **3.1.8. Plasmid-Präparation**

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle unabhängig von der chromosomalen DNA vermehrt werden. Auf den unterschiedlichen Eigenschaften von chromosomaler und Plasmid-DNA bei ihrer Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung beruhen die hier verwendeten Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA, die eine Abwandlung des Protokolls von Birnboim und Doly (1979) darstellen. Beim raschen Absenken des pH-Wertes nach alkalischer Denaturierung renaturiert Plasmid-DNA und bleibt löslich, wohingegen chromosomale DNA an Zellwandbruchstücken und Proteinen haftet und mit diesen abzentrifugiert werden kann.

#### 3.1.8.1. Plasmid-Mini-Präparation

Mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) lassen sich innerhalb kurzer Zeit kleine Mengen (etwa 5-10 µg pro ml Kultur) Plasmid-DNA in hoher Reinheit aus Bakterien isolieren. Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das *QIAprep Miniprep Handbook* von Qiagen (1997).

#### 3.1.8.2. Plasmid-Midi-Präparation

Die Midi-Präparationsmethode beinhaltet eine Plasmidreinigung über kommerzielle Anionenaustauschersäulen. Auch diese Extraktionsmethode basiert auf einer alkalischen, mit dem Einsatz von SDS gekoppelten Lyse der Zellen. Anschließend wird die Plasmid-DNA bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Bei mittlerer Salzkonzentration wird sie von Verunreinigungen befreit und bei hoher Salzkonzentration wieder eluiert. Mit dieser Methode kann man DNA-Ausbeuten von

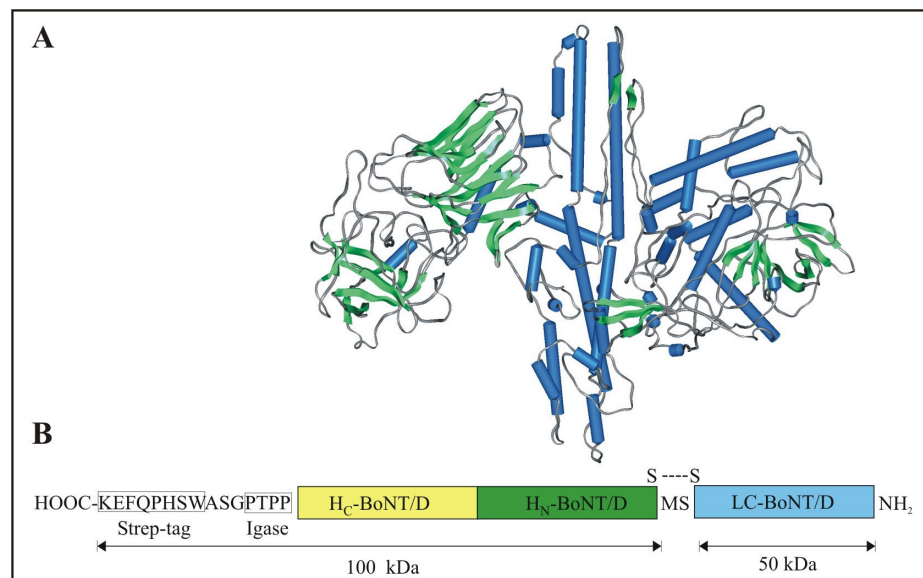
bis zu 4 µg pro ml Kultur erzielen. Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das *Plasmid Handbook* von Qiagen (1995).

### 3.1.8.3. Bestimmung der DNA-Konzentration

Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration macht man sich zunutze, dass die Menge an Ethidiumbromid, die während einer Agarose-Gelelektrophorese in die DNA interkaliert, proportional zur Anzahl ihrer Basenpaare ist. Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Probe mit denen eines mitgelaufenen Standards lässt sich die DNA-Konzentration auf einem Transilluminator (366 nm) abschätzen.

### 3.1.9. Klonierung von BoNT/D und Derivaten

Das Plasmid pBN 31, welches die proteolytisch aktive L-Kette von BoNT/D kodiert, wird nach *Bam*H I und *Nco* I Verdau in das entsprechend verdaute und dephosphorylierte pBoNT/D E230A ligiert (Tab. 3).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung von BoNT/D.** A zeigt die Kristallstruktur von BoNT/A (3BTA, blau =  $\alpha$ -Helices, türkis =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil), B einen schematischen Vergleich zu dem klonierten BoNT/D, bei dem zusätzliche eingeführte Aminosäuren aufgeführt sind (hellblau = LC, ~50 kDa, grün/gelb = HC, ~100 kDa). Ebenso sind der *Strep*-tag<sup>®</sup> II und die zusätzlich eingeführte Igase-Schnittsequenz genannt (B).

In der folgenden Tabelle sind sämtliche Klonierungen zusammengefasst. Dabei wurden jeweils Fragmente durch Restriktionsverdau der Template DNA oder durch PCR an der Template DNA mit anschließendem Restriktionsverdau isoliert und nachfolgend in den entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten Akzeptorvektor ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden durch Sequenzierung (Kap. 3.1.10.) mit geeigneten Oligonukleotiden überprüft.

Tabelle 3: Klonierungen von BoNT/D, Mutanten, Chimären und Fusionsproteinen

DNA	Template	Oligos	Restr.-Verdau	Akzeptorvektor
pBoNT/D	pBN31		<i>Bam</i> H I, <i>Nco</i> I	pBoNT/D E230A
pBoNT/D Δbelt	pBoNT/D	#HC-belt Rv/#SBN206	<i>Nco</i> I, <i>Sal</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#LC-belt Rv/#Sma9	<i>Sal</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D P628G	pBoNT/D	#SBN380/BoNT/D P628G Rv	<i>Nco</i> I, <i>Aat</i> II	pBoNT/D
	pBoNT/D	#BoNT/D P628G Fw/#Sma 9	<i>Aat</i> II, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D P632G	pBoNT/D	#SBN380/BoNT/D P632G Rv	<i>Nco</i> I, <i>Kas</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#BoNT/D P632G Fw/#Sma 9	<i>Kas</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D PP/GG	pBoNT/D	#SBN380/BoNT/D DM P/G Rv	<i>Nco</i> I, <i>Kas</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#BoNT/D P632G Fw/#Sma 9	<i>Kas</i> I, <i>Eco</i> R V	
pLH <sub>N</sub> /D-H <sub>C</sub> /DT	pBoNT/D	#SBN 380/#ChimD Rv2	<i>Nco</i> I, <i>Sac</i> I	pBoNT/D
	pET15b DT E148S	#ChimDT Fw2/#ChimDT Rv	<i>Sac</i> I, <i>Sma</i> I	
pGFP-LH <sub>N</sub> /D-H <sub>C</sub> /DT	pChimeraD-DT	--	<i>Nco</i> I, <i>Sma</i> I	pGFP BoNT/D
pGFP-BoNT/D	pBoNT/D	--	<i>Bam</i> H I, <i>Eco</i> R V	pGFP-BoNT/D <sub>VA</sub>
pBoNT/D DKD/AAA	pBoNT/D	#SBN 380/#Tripl DKD/AAA Rv	<i>Nco</i> I, <i>Sac</i> II	pBoNT/D
	pBoNT/D	#Tripl DKD/AAA Fw/#Sma 9	<i>Sac</i> II, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D D618A	pBoNT/D	#SBN 380/#BoNT/D D618T616A Rv	<i>Nco</i> I, <i>Aat</i> II	pBoNT/D
	pBoNT/D	#BoNT/D Aat II Fw/#Sma 9	<i>Aat</i> II, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D K619A	pBoNT/D	#SBN 380/#BoNT/D K619 Rv	<i>Nco</i> I, <i>Aat</i> II	pBoNT/D
	pBoNT/D	#BoNT/D Aat II Fw/#Sma 9	<i>Aat</i> II, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D D622A	pBoNT/D	#SBN 380/#BoNT/D D622A Rv	<i>Nco</i> I, <i>Sac</i> II	pBoNT/D
	pBoNT/D	#Tripl DKD/AAA Fw/#Sma 9	<i>Sac</i> II, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D T616A	pBoNT/D	#SBN 380/#BoNT/D D618T616 Rv	<i>Nco</i> I, <i>Aat</i> II	pBoNT/D
	pBoNT/D	#BoNT/D Aat II Fw/#Sma 9	<i>Aat</i> II, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D H819A	pBoNT/D	#SBN 380/#BoNT/D H/A Rv	<i>Nco</i> I, <i>Cla</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#BoNT/D H/A Fw/#Sma 9	<i>Cla</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D DKE/AAA	pBoNT/D	#SBN 380/#DKE/AAA Rv	<i>Nco</i> I, <i>Pst</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#DKE/AAA Fw/#Sma 9	<i>Pst</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D KKD/AAA	pBoNT/D	#SBN 380/#KKD/AAA Rv	<i>Nco</i> I, <i>Pst</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#KKD/AAA Fw/#Sma 9	<i>Pst</i> I, <i>Eco</i> R V	
pLuc-BoNT/D	pPBCLuc0	#Luc Fw/#Luc Rv	<i>Eco</i> R I, <i>Kas</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#Luc LCD Fw/#SBN A Rv	<i>Kas</i> I, <i>Nco</i> I	
pBoNT/D YYF/AAA	pBoNT/D	#SBN 380/#F/A Rv	<i>Nco</i> I, <i>Mun</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#F/A MunI Fw/#YY/AA XhoI Rv	<i>Mun</i> I, <i>Xho</i> I	
	pBoNT/D	#YY/AA Fw/#Sma 9	<i>Xho</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D RWD/AAG	pBoNT/D	#SBN 380/#RW/AA XhoI Rv	<i>Nco</i> I, <i>Xho</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#RW/AA Fw/#D/G KasI Rv	<i>Xho</i> I, <i>Kas</i> I	
	pBoNT/D	#D/G Fw/#Sma 9	<i>Kas</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D RI/CC	pBoNT/D	#SBN 380/#R/C Rv 687	<i>Nco</i> I, <i>Acc</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#R/C Fw 687/#I/C Rv 828	<i>Acc</i> I, <i>Cla</i> I	
	pBoNT/D	#I/C Fw 828/#Sma 9	<i>Cla</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D KV/CC	pBoNT/D	#SBN 380/#V/C Rv 593	<i>Nco</i> I, <i>Nhe</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#V/C Fw 593/#K/C Rv 745	<i>Nhe</i> I, <i>Xho</i> I	
	pBoNT/D	#K/C Fw 745/#Sma 9	<i>Xho</i> I, <i>Eco</i> R V	
pBoNT/D KN/CC	pBoNT/D	#SBN 380/#K492C Rv	<i>Nco</i> I, <i>Xba</i> I	pBoNT/D
	pBoNT/D	#K492C Fw/#N857C Rv	<i>Xba</i> I, <i>Acc</i> I	

	pBoNT/D	#N857C Fw/#Sma 9	<i>Acc I, EcoR V</i>	
pBoNT/D GN/CC	pBoNT/D	#SBN 380/#N477C Rv	<i>Nco I, Bgl II</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#N477C Fw/#G676C Rv	<i>Bgl II, Eco47 III</i>	
	pBoNT/D	#G676C Fw/#Sma 9	<i>Eco47 III, EcoR V</i>	
pBoNT/D FI/CC	pBoNT/D	#SBN 380/#F724C Rv	<i>Nco I, Xba I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#F724C Fw/#I787C Rv	<i>Xba I, Pst I</i>	
	pBoNT/D	#I787C Fw/#Sma 9	<i>Pst I, EcoR V</i>	
pBoNT/D-LCA	pBN3	#LCABoNT/DFw pQE/#LCABoNT/DRv	<i>EcoR I, Nco I</i>	pBoNT/D
pBoNT/D Δ578-632	pBoNT/D	#SBN 380/#F584 Del Rv	<i>Nco I, Kas I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#P638 Del Fw/#Sma 9	<i>Kas I, EcoR V</i>	
pBoNT/D Δ661-714	pBoNT/D	#SBN 380/#F667 Del Rv	<i>Nco I, Kas I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#I720 Del Fw/#Sma 9	<i>Kas I, EcoR V</i>	
pBoNT/D Δ841-869	pBoNT/D	#SBN 380/#T847 Del Rv	<i>Nco I, Kas I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#S875 Del Fw/#Sma 9	<i>Kas I, EcoR V</i>	
pBoNT/D Δ795-869	pBoNT/D	#SBN 380/#P801 Del Rv	<i>Nco I, Kas I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#S875 Del Fw/#Sma 9	<i>Kas I, EcoR V</i>	
pBoNT/D ΔCys453	pBoNT/D	#HC-D delta Cys/#Sma 9	<i>Nco I, EcoR V</i>	pBoNT/D
pBoNT/D ΔH <sub>N</sub>	pBoNT/D	#HC-LC D Fw/#Iba Rv	<i>Sal I, Sma I</i>	pBoNT/D Δbelt
pLuc-BoNT/D D618A	pBoNT/D D618A	--	<i>Nco I, Sma I</i>	pLuc-BoNT/D
pLuc-BoNT/D K619A	pBoNT/D K619A	--	<i>Nco I, Sma I</i>	pLuc-BoNT/D
pLuc-BoNT/D D622A	pBoNT/D D622A	--	<i>Nco I, Sma I</i>	pLuc-BoNT/D
pLuc-BoNT/D DKD/AAA	pBoNT/D DKD/AAA	--	<i>Nco I, Sma I</i>	pLuc-BoNT/D
pLuc-BoNT/D KKD/AAA	pBoNT/D KKD/AAA	--	<i>Nco I, Sma I</i>	pLuc-BoNT/D
pLuc-BoNT/D YYF/AAA	pBoNT/D YYF/AAA	--	<i>Nco I, Sma I</i>	pLuc-BoNT/D
pBcl-2-BoNT/D	pBcl-2 BlueskriptSK+	#Bcl-2 Fw/#Bcl-2 Rv	<i>EcoR I, Pst I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#LCD Fw PstI/#SBN-A Rv	<i>Pst I, Nco I</i>	
pDHFR-BoNT/D	pDHFR-pCR2.1TOPO	#DHFR Fw/#DHFR Rv	<i>EcoR I, Pst I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#LCD Fw PstI/#SBN-A Rv	<i>Pst I, Nco I</i>	
pLCA-BoNT/D	pBN-3	#LCABoNT/DFw pQE /#LCA Rv Pst I	<i>EcoR I, Pst I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D	#LCD Fw PstI/#SBN-A Rv	<i>Pst I, Nco I</i>	
pLCA-BoNT/D E230A	pBN-3	#LCABoNT/DFw pQE /#LCA Rv Pst I	<i>EcoR I, Pst I</i>	pBoNT/D
	pBoNT/D E230A	#LCD Fw PstI/#SBN-A Rv	<i>Pst I, Nco I</i>	

### 3.1.10. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung von Mutationen, Ligationen oder der korrekten Synthese von PCR-Produkten wird die Plasmid-DNA sequenziert. Alle Sequenzierungen werden mit dem ABI310 Sequenziergerät der Firma Perkin-Elmer und dem zugehörigen Sequenzierkit (BigDye™ Terminator) durchgeführt.

Die hier angewendete DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Methode von Sanger *et al.*, (1977) durch Kettenabbruch. Hierbei wird unter Verwendung eines spezifischen Primers, welcher komplementär zu einem Bereich stromaufwärts bzw. stromabwärts des zu untersuchenden Insert ist, die DNA neu synthetisiert. Um die neu synthetisierten Stränge zu markieren, wird zunächst eine Markierungsreaktion mit fluoreszenzmarkierten 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTP) durchgeführt. Durch den Einbau eines solchen modifizierten Nukleotids kommt es zum Abbruch der Verlängerungsreaktion. Dadurch

ergeben sich statistisch verteilt unterschiedliche Kettenlängen, die mit jeweils einem spezifischen Farbstoff enden (Lee *et al.*, 1992). Die DNA-Fragmente werden durch eine Kapillargelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und beim Passieren eines Fensters durch Anregung mit LASER-Licht zur Fluoreszenz gebracht. Die je nach Nukleotid bzw. Fluorophor emittierten unterschiedlichen Wellenlängen werden fokussiert, von einem Spektrographen nach Wellenlänge zerlegt und simultan von einer CCD-Kamera (charge-coupled device) aufgenommen und digitalisiert. Anschließend wurden die Rohdaten von der ABI Prism DNA Sequencing Analysis 3.0 Software ausgewertet. Aus der Abfolge der Fluoreszenzsignale kann die Gesamtsequenz ermittelt werden.

Für eine Sequenzierreaktion werden 200 ng Plasmid DNA mit 1 pmol Primer und 2 µl BigDye RR Terminator AmpliTaq<sup>®</sup> versetzt und mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Danach wird das folgenden PCR-Programm durchlaufen:

Denaturierung	30 s	96°C
Annealing	15 s	50°C
Polymerisation	4 min	60°C
25 Zyklen		

Anschließend wird die DNA durch Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Zum Reaktionsansatz werden 90 µl HPLC-H<sub>2</sub>O und 10 µl 3 M NaOAc-Lösung, pH 4,6 gegeben. Zur DNA-Präzipitation werden 250 µl abs. Ethanol hinzugefügt, gemischt und 15 min bei 14000 rpm (5415 C, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, das Pellet mit 250 µl 70 % (v/v) Ethanol/HPLC-H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Auch dieser Überstand wird verworfen. Das Pellet wird 5 min bei 37°C getrocknet und in 25 µl HPLC-H<sub>2</sub>O aufgelöst. Die DNA wird 2 min bei 90°C denaturiert, bevor die Sequenz analysiert wird.

Das Chromatogramm der DNA-Sequenzanalyse wird als Chromatogramm-Datei im \*.scf Dateiformat mit dem Programm *Chromas 1.51* von Technelysium Pty Ltd auf Mutationen überprüft.

## 3.2. Produktion und Nachweis von Proteinen

### 3.2.1. Produktion von Proteinen mit *Strep-tag*<sup>®</sup> II in *E. coli*

Die Expression und Aufreinigung von *Strep-tag*<sup>®</sup> II Proteinen, die sowohl die proteolytisch aktive leichte Kette als auch schwere Kette enthielten, wurde unter speziellen Sicherheitsauflagen durchgeführt. Maßgeblich für die Produktion war die S2-Sicherheitsverordnung (Aktenzeichen: 501h-40654/3/57/3), die mit zusätzlichen Sicherheitsauflagen, wie u.a. dem Tragen einer P3-Atenschutzmaske bei einigen Arbeitsschritten, versehen war.

### 3.2.1.1. Induktion der Genexpression in *E. coli*

20 ml 2YT-Medium mit Antibiotikazusatz (100 µg/ml Ampicillin) werden aus einer auf 2YT/AMP Platte gewachsenen Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird aus dieser Vorkultur eine 250-1000 ml Kultur aus 2YT-Medium mit Antibiotikazusatz 1 : 100 angeimpft. Diese Kultur wächst bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,7 (Photometer: Ultraspec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech)), bevor die Expression des Gens für ein *Strep-tag*<sup>®II</sup> -Fusionsprotein durch Zugabe von 50 µl Anhydrotetracyclin (aTc in DMF: 1 mg/ml) je 250 ml Kulturvolumen induziert wird. Plasmide, die den pQE-Vektor als Ursprung haben, werden mit IPTG (0,25 mM f.c.) induziert. Vor und während der Induktion werden 2 ml Aliquots aus der Kultur entnommen, um später auf einem SDS-Polyacrylamidgel den zeitlichen Verlauf der Expression verfolgen zu können. Nach 5 h Induktion der Genexpression (RT, 180 rpm) wird die Bakteriensuspension 20 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert (GSA-Rotor, RC2-B, Sorvall Superspeed). Das Pellet wird bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

### 3.2.1.2. Ultraschallaufschluß

Das Pellet wird nach dem Auftauen in 23 ml Puffer W resuspendiert. Um die Proteolyse des rekombinant hergestellten Proteins zu verhindern, werden die *E. coli*-eigenen Proteasen mit 115 µl Benzamidin [1 M], 58 µl PMSF [0,2 M] und 46 µl Pepstatin A [0,5 mg/ml] inhibiert. Da BoNT/D eine Zn<sup>2+</sup>-Metalloprotease ist, darf keinerlei Chelatbildner zur Komplexierung von zweiwertigen Metallionen zugesetzt werden.

Die resuspendierten Zellen werden im Eisbad mit Ultraschall lysiert (2 x 90 s, Duty cycle 50 %, dazwischen 1 x 60 s Pause oder 5 min Duty cycle 30 %, jeweils 50 W; Branson Sonifier 250). Anschließend werden die Zelltrümmer 20 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert (SS-34-Rotor, RC2-B, Sorvall Superspeed). Zytosolische Proteine, unter anderem das rekombinante Protein, verbleiben dabei im Überstand. Ein Aliquot dieser Probe wird mit 4 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und bei -20 °C gelagert. Aus dieser Kontrolle wird nach Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels ersichtlich, ob das gesuchte Protein durch die Bildung von Einschlusskörpern oder ungenügendem Zellaufschluss in das Pellet gelangte, oder ob es sich in löslicher Form im Zytosol befand und durch die Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden konnte. Um auch sehr kleine Zelltrümmer und ungelöste Bestandteile, welche die Affinitätschromatographiesäule leicht verstopfen können, zu entfernen, wird der Überstand in einem Ti70-Rotor ultrazentrifugiert (1 h, 50000 rpm, 4°C, L8-70 M Ultrazentrifuge, Beckman).

### 3.2.1.3. Aufreinigung durch Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Der bei der Ultrazentrifugation erhaltene Überstand wird in eine zuvor mit 10 ml Puffer W äquilibrierte Säule dekantiert. Anschließend wird mit 5 ml Puffer W gewaschen. Zur

genauen Kontrolle können jeweils fünf 1 ml-Fractionen aufgefangen werden. Die Elution erfolgt mit Puffer E<sub>S</sub> in je nach Expressionsrate sechs bis acht 0,5 ml-Fractionen. Anschließend wird die Säule mit 10 ml Puffer R regeneriert (Rotfärbung) und mit 10 ml Puffer W gewaschen.

Vom Säulendurchfluss, den Waschfraktionen sowie den Eluat werden jeweils 18 µl mit 6 µl 4 x Gelladepuffer versetzt und 10 µl auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, in Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

**Puffer W:**

100 mM Tris/HCl, pH 8,0

**Puffer E<sub>S</sub>:**

10 mM Desthiobiotin

100 mM Tris/HCl, pH 8,0

**Puffer R:**

1 mM HABA

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

### 3.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

In dieser Arbeit wird eine modifizierte Form der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) angewendet. Proportional zur Peptidlänge lagern sich SDS-Moleküle an das Makromolekül und bestimmen so den Grad der negativen Ladung des Komplexes. Diese werden im Sammelgel bei einem pH-Wert von 6,8 in einem elektrischen Feld zwischen Chlorid- und langsamer laufenden Glycin-Anionen fokussiert. Im Trenngel mit pH 8,8 ist das Glycin ein neutrales Zwitterion, und der SDS-Proteinkomplex wird aufgetrennt. Je nach Proteingröße wird der Acrylamid-Gehalt des Trenngels zwischen 10 und 15 % variiert. Zur Unterstützung der Denaturierung mit SDS werden die Proben unter reduzierenden Bedingungen erhitzt. Das zugesetzte 2-Mercaptoethanol reduziert vorhandene Disulfid-Bindungen.

#### 3.2.2.1. SDS-Polyacrylamidgel

Das 0,75 mm dicke Gel setzt sich zusammen aus einem 1 cm hohen Taschenbereich, einem 1 cm hohen und 8,3 cm breiten Sammelgel, gefolgt von einem Trenngel mit den Maßen 5 cm x 8,3 cm. Zuerst wird das Trenngel gegossen. Sofort nach dem Gießen wird das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach einer halben Stunde Polymerisation bei Raumtemperatur wird das Isopropanol mit einem Stück saugfähigem Papier entfernt, um nachfolgend das 6,3 %ige Sammelgel zu gießen. Sofort nach Einfüllen des Sammelgels wird ein 15-zähliger Kamm aus 0,75 mm starkem Teflon (1 cm tief) in das Sammelgel gesteckt, um die Taschen zu formen. Das nach etwa einer halben Stunde auspolymerisierte Gel wird entweder noch am selben Tag verwendet,

oder bis zum nächsten Tag mit feuchten Tüchern abgedeckt in einer Plastiktüte im Kühlschrank aufbewahrt.

Zusammensetzung der Gießlösungen für je 1 Minigel

<b><u>Trenngel</u></b>	8 %	10 %	12,5 %	15 %
30% AA-Bis-Mix 29:1	1,32 ml	1,65 ml	2,06 ml	2,47 ml
1 M Tris pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
dH <sub>2</sub> O	2,37 ml	2,04 ml	1,64 ml	1,23 ml
10% SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
10% APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
<b><u>Sammelgel</u></b>	5,7 %			
30% AA-Bis-Mix 29:1	0,42 ml			
1 M Tris/HCl pH 6,8	0,31 ml			
dH <sub>2</sub> O	1,75 ml			
10% SDS	25 µl			
TEMED	5 µl			
10% APS	20 µl			

### **30 %ige Acrylamid-/Bisacrylamidlösung:**

29 % (w/v) Acrylamid

1 % (w/v) N'-N'-Methylenbisacrylamid

#### **3.2.2.2. Probenvorbereitung**

Die hier verwendeten Geltaschen nehmen ein Probenvolumen von 10 µl auf. Handelt es sich bei den Proben um rekombinante, aufgereinigte Proteine oder um Bakterienlysate, so werden sie mit 1/3 des Probenvolumens an 4 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und 5 min bei 99°C denaturiert.

#### **Probenpuffer für Proteingele (4 x) nicht reduzierend**

25 mM Tris/HCl, pH 6,75

40 % (w/v) Glycerin

8 % (w/v) SDS

0,004 % (w/v) Bromphenolblau

0,004 % (w/v) Xylencyanol FF

#### **Probenpuffer für Proteingele (4 x) reduzierend:**

25 mM Tris/HCl, pH 6,75

40 % (w/v) Glycerin

8 % (w/v) SDS

20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

0,004 % (w/v) Bromphenolblau

0,004 % (w/v) Xylencyanol FF

### **3.2.3. Elektrophorese**

Zwei Gele werden senkrecht in die Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean™, Biorad bzw. Eigenbau) eingespannt. Dabei entsteht zwischen ihnen das Pufferreservoir für die Kathode. Sowohl dieses Reservoir als auch dasjenige für die Anode werden mit Laemmli-Laufpuffer



gefüllt. Anschließend werden die Taschen des Sammelgels mit den Proben und Molekulargewichtsstandard beladen. Die Elektrophorese wird bei 20 mA pro Gel durchgeführt, bis der Farbmarker des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hat. Das Gel wird anschließend mit Coomassie Blue R250 gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

**Laemmli-Laufpuffer:**

- 25 mM Tris
- 250 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS

**3.2.4. Coomassiefärbung**

Das Gel wird 30-45 min in Coomassie-Lösung geschwenkt und danach mehrere Stunden lang entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Während des Entfärbens wird die Entfärbelösung von Zeit zu Zeit gegen frische ausgetauscht. Bis zum Trocknen wird das Gel dann in Wasser aufbewahrt. Zum Trocknen wird ein Whatman-3MM-Papier mit Wasser angefeuchtet und das Gel darauf luftblasenfrei ausgebreitet. Danach wird es 100 min lang unter Vakuum auf 70°C erwärmt (Slab Gel Dryer SGD 2000 mit Gel Pump GP 110, Savant) bis das Gel vollständig trocken ist.

**Coomassie-Lösung:**

- 0,25 % (w/v) Coomassie Blau R250
- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure
- filtriert

**Entfärbelösung:**

- 30 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

**3.2.5. Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Konzentration aufgereinigter Proteine erfolgt durch SDS-PAGE zusammen mit einer BSA-Standardreihe. Von den parallel zu bestimmenden Proteinen werden je 2-3 Proben mit einem Volumen zwischen 0,5 und 5 µl sowie je 10 µl einer BSA-Standardreihe mit 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; und 1,6 mg/10µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese werden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt, das Gel luftblasenfrei zwischen zwei 0,5 mm starke Kunststoffplatten gelegt und mit einem Sharp JX-325 High Resolution Color Scanner gescannt. Die einzelnen Proteinbanden des so erhaltenen Bildes werden mit dem Programm ImageMaster™ 1-D (Pharmacia Biotech) detektiert und integriert. Durch lineare Regression wird aus den so erhaltenen OD x mm<sup>2</sup>-Werten und den bekannten BSA-Konzentrationen eine Kalibrationsgerade erstellt, aus welcher unter der Annahme der gleichen Coomassie-Färbbarkeit von BSA und dem zu bestimmenden Protein die Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine errechnet werden. Durch diese Methode können, im Gegensatz zur

Bestimmung über photometrische Messungen, auch die Konzentrationen nicht 100 % reiner Proteine mit vergleichbarer Genauigkeit bestimmt werden.

### 3.2.6. Bestimmung des Proteingehaltes nach Biorad

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration verschiedener Proben wird mit dem *DC Protein Assay Kit* von Biorad durchgeführt. Es stellt eine Modifikation der Proteinbestimmung nach Lowry dar (Lowry *et al.*, 1951), bei der Proteine mit einer alkalischen Kupfertartratlösung und Folinreagenz reagieren. Es kommt zunächst zu einer Reaktion zwischen Protein und Kupfer. Das kupferbehandelte Protein bewirkt anschließend eine Reduktion des Folinreagenzes, das dabei 1, 2 oder 3 Sauerstoffatome verliert. So entsteht ein kolloidales, molybdän- und wolframhaltiges, lösliches Mischoxid mit einer charakteristischen blauen Farbe und einem Absorptionsmaximum bei 750 nm.

Ein definiertes Volumen der Probe wird mit dH<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt und mit 125 µl Reagenz A versetzt. Der Ansatz wird gemischt, 1 ml Reagenz B hinzupipettiert, erneut gemischt und vor der Messung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um Messfehler zu minimieren, werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve werden BSA-Probenstandards mit Konzentrationen von 0,2, 0,5, 0,8, 1,2 und 1,5 mg/ml verwendet.

#### Reagenz A (Biorad) enthält:

- 1 - 5 % Natriumhydroxid
- < 1 % Natriumtartrat
- < 0,1 % Kupfersulfat

#### Reagenz B (Folinreagenz) (Biorad) enthält:

- < 1 % Lithiumsulfat
- < 1 % Wolframsäure, Natriumsalz
- < 1 % Molybdänsäure, Natriumsalz
- < 1 % Phosphorige Säure
- < 1 % Chlorwasserstoffsäure

### 3.2.7. Westernblot

Beim Westernblot nach Khyse-Anderson (1984) werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen. Sowohl Nitrozellulose als auch Immobilon-P-Membranen aus PVDF können verwandt werden. Die Proteine haften insbesondere durch starke hydrophobe Wechselwirkungen auf der Immobilon-P-Membran. Dort können sie mit spezifischen Reagenzien nachgewiesen werden.

#### 3.2.7.1. Transfer auf eine Blot-Membran

Der Proteintransfer erfolgt durch Naß-Blot-Verfahren in einer kühlbaren Westernblotkammer (TE Series Transphor Electrophoresis Unit, Fa. Hoefer), in die vier Gestelle zur Aufnahme jeweils eines Blot-Ansatzes eingesetzt werden können.

Zunächst werden 6 Whatman-3MM-Papiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Die Membran wird mit dem Blotpuffer befeuchtet. Auf einen in Blotpuffer schwimmenden Schwamm werden 3 getränkte Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Es folgt das zuvor in Blotpuffer eingelegte (5 min, RT) Polyacrylamidgel und die

mit Blotpuffer gewaschene Nitrozellulosemembran. Darüber werden 3 in Blotpuffer getränkte Whatman-3MM-papiere gelegt. Nach oben wird der Blot mit einem zweiten Schwamm abgedeckt und in ein Kunststoffgestell gespannt. Dieses wird vertikal in die mit Blotpuffer gefüllte Wet-Blotkammer gesteckt. Im Blotstapel dürfen sich keine Luftblasen befinden, da diese einen gleichmäßiges elektrisches Feld und damit einen homogenen Transfer verhindern. Außerdem ist darauf zu achten, dass sich die Blotpapiere ober- und unterhalb des Polyacrylamidgels nicht berühren, da es sonst an dieser Stelle zu einem erleichterten Stromfluss kommt, was ebenfalls den Transfer des Proteins aus dem Gel heraus behindert.

Der einzustellende Stromfluss hängt von der Fläche des Gels ab. Bei einem 40 cm<sup>2</sup> Gel können die Proteine entweder über Nacht bei 50 mA oder in 1,5 h bei 400 mA transferiert werden. Beim Blotten großer Proteine wird dem Blotpuffer 0,1 % (w/v) SDS zugesetzt. Zur Überprüfung eines vollständigen Proteintransfers wird dieses anschließend mit Coomassieblau gefärbt werden. Der Nachweis, dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden, kann ebenfalls durch eine Coomassieblau-Färbung erbracht werden.

**Blotpuffer:**

48 mM Tris/HCl pH 8.0  
380 mM Glycin  
10 % (v/v) Methanol

**Nitrozellulose-Membran**

0,2 µm Nitrozellulose  
Hersteller: Roth

3.2.7.2. Immunologische Identifizierung von Proteinen auf der Westernblot-Membran

Unter Verwendung von Antikörpern können Proteine, die durch einen Westernblot auf einer Membran immobilisiert wurden, nachgewiesen werden. Die Bindung eines Antikörpers an ein Protein kann mit einem zweiten, gegen diesen gerichteten (sekundären) Antikörper nachgewiesen werden, wobei letzterer entweder radioaktiv markiert oder kovalent an z.B. Peroxidase gebunden ist.

3.2.7.2.1. Durchführung des immunchemischen Nachweises von Proteinen

Nach dem Westernblot wird die Membran 1 h bei RT in einer Lösung aus PBS/Tween<sup>®</sup>20 (0,5 % (w/v) Tween<sup>®</sup>20 in PBS) und 3 % (w/v) BSA (bei *Strep-tag*<sup>®</sup>II) oder 5 % Magermilchpulver geschwenkt. Dabei sättigen das BSA bzw. das Magermilchpulver und Tween<sup>®</sup>20 unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran ab (Blatteiger and Newhall, 1982). Anschließend wird die Membran mit der entsprechenden ersten Antikörperlösung bedeckt (in PBS/Tween<sup>®</sup>20, 0,1 % BSA, 5 ml pro Trenngel) und 1,5 h bei RT inkubiert. Danach wird mit PBS/Tween<sup>®</sup>20 gewaschen (6 mal 10 min, RT) und die Membran 1,5 h bei RT mit dem entsprechenden sekundären, peroxidasegekoppelte Antikörper (in PBS/Tween<sup>®</sup>20, 0,1 % BSA, 5 ml pro Trenngel) inkubiert. Danach wird erneut mit PBS/Tween<sup>®</sup>20 gewaschen (6mal 10 min, RT), um unspezifische Reaktionen zu vermeiden.

### 3.2.7.2.2. Detektion der Proteine

Die Bestimmung der Lokalisation der Proteine auf der Membran erfolgt durch eine Chemolumineszenzreaktion, für die das SuperSignal<sup>®</sup> West ECL-System von Pierce verwendet wird. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase aus Meerettich katalysiert die Oxidation von Luminol, einem Diacylhydrazin, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Nach der Oxidationsreaktion befindet sich das Produkt zunächst in einem energetisch angeregten Zustand. Beim Übergang eines Elektrons aus diesem angeregten Zustand in den Grundzustand wird Energie frei, die in Form eines Lichtquanten abgegeben wird. Die auftretenden Lichtblitze können mit Hilfe eines Autoradiographiefilms oder einer geeigneten Kamera detektiert werden.

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben in *ECL Western Blotting protocols* (Amersham, 1992). 3 ml Reagenz 1 und 3 ml Reagenz 2 werden gemischt und der Blot darin 60 s geschwenkt. Anschließend wird die Membran in eine Klarsichtfolie gesteckt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Entwickelt wird der Film in der Filmentwicklungsmaschine Optimax von Protec. Alternativ werden die Membrane von einer Kodak image station 440cf aufgenommen und mit dem Programm Kodak 1D (v3.5.5SB) ausgewertet, was einen quantitativen Vergleich der Signale erlaubt.

### **3.2.8. Proteinreinigung per HPLC**

Für die HPLC (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) wird eine ÄKTAPurifier 10 Apparatur mit einem Fraktionensammler Frac-900 (Pharmacia Biotech) verwendet. Die HPLC-Säulen sind zwischen 5 und 100 cm lang mit einem Innendurchmesser von 1–25 mm. Mit Kieselgel oder ähnlich porösem Material von 10 mm Durchmesser oder weniger gefüllt, kann eine 25 cm lange Säule 5000 Böden (theoretische Trennstufen) aufweisen – selbst Bodenzahlen von 65000/m sind nicht ungewöhnlich. Neben mit funktionellen Gruppen chemisch modifizierten Kieselgelen haben sich besonders unpolare stationäre Phasen (Umkehrphasen mit alkylsilyliertem Kieselgel) durchgesetzt (RP-HPLC).

Zur weiteren Reinigung von Proteinen nach ihrer Expression wird eine Größenausschlusssäule (Superdex 200, Pharmacia Biotech) verwendet. Die Elution wird gemäß dem Datenblatt der Superdex 200 Größenausschlusssäule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min mit Puffern mit einer Ionenstärke >10 mM isokratisch durchgeführt, um Präzipitationen zu vermeiden. Das Injektionsvolumen soll 500 µl bzw. 0,5 mg Protein dabei nicht übersteigen, um ausreichende Trennung zu erzielen. Die Steuerung der Anlage als auch die Auswertung erfolgt mit der Software Unicorn 2.0 (Pharmacia Biotech). Als Detektor wird ein UV-Detektor mit drei Wellenlängen (215 nm, 254 nm, 280 nm; UV-900; Pharmacia Biotech) eingesetzt.

Proteinreinigung Superdex 200:

Laufpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8.0  
 100 mM NaCl  
 Flussrate: 0,5 ml/min

Zur CD-Analyse:

20 mM Phosphatpuffer, pH 7,5  
 100 mM NaCl  
 alternativ:  
 20 mM Natriumacetat, pH 5,1  
 100 mM NaCl

**3.3. Präparation neuronaler Zellen****3.3.1. Präparation hippocampaler neuronaler Zellen**

Die Präparation der hippocampalen Zellen und die Durchführung der Experimente wurde in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger und cand. med. Clemens Reisinger (Institut für Anatomie der Humboldt-Universität (Charité), Berlin) vollzogen.

Hippocampale Neuronen werden aus 17 Tage alten NMRI Mäusen präpariert (Lautenschlager *et al.*, 2000). Aus dem Gehirn entfernte Teile des Hippocampus wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde einmal mit Dissoziierungsmedium (MEM versetzt mit 10% fötalem Kälberserum, 100 IE Insulin/l, 0,5 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 44 mM Glucose und 10 mM HEPES Puffer) gewaschen und mechanisch dissoziiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (210 x g, 2 min, 21°C), aufgenommen in Ausgangsmedium (serumfreies neurobasales Medium versetzt mit B27, 0,5 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 25 M Glutamat) und auf 0,5% Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Die Deckgläschen wurden in einer Schale mit 24 Vertiefungen (Nunc) mit einer Dichte von 40000 Zellen/Vertiefung aufbewahrt. Die hippocampalen Neuronen wurden bis zu 21 Tagen *in vitro* (DIV) in einer der menschlichen Umgebung angepassten Medium mit 10% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**3.3.2. Präparation von Rattenhirn Synaptosomen**

Bei der Homogenisation des Gehirns kommt es zur Scherung der Axone. Die synaptischen Endköpfchen bilden dabei größtenteils abgeschlossene Kompartimente, die als Synaptosomen bezeichnet werden. Die Aufreinigung solcher Synaptosomen durch unterschiedliche Zentrifugationsschritte erfolgte nach Huttner *et al.*, 1983 und Dunkley *et al.*, 1988.

Als Ausgangsmaterial für die Synaptosomenpräparation diente das Gehirn einer frisch getöteten WISTAR-Ratte (männlich, ca. 150 g, Zentrales Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover), der das Cerebellum, das Stammhirn und der größte Teil der weißen Substanz entfernt wurde. Die Aufreinigung erfolgte mit eisgekühlten Reagenzien bei 4°C. Das Gehirn wurde einmal mit Homogenisationspuffer (HB) gewaschen und in 10 ml HB, dem ein Proteaseinhibitorcocktail (AEL (1:250), ABP (1:250) und PMSF (40 mg/ml in 2-Propanol; 1:500) zugesetzt worden war, mit einem Glas/Teflon-Homogenisator bei 800 rpm durch acht- bis zehnmaliges Auf- und Abbewegen homogenisiert. Die sich anschließenden Zentrifugationen erfolgten in 15 ml Polycarbonat-Röhrchen (Kendro) in der Kühlzentrifuge

Sorvall RC5C/B bei 4°C, SS-34 Rotor. Zunächst wurde das Homogenisat bei 2600 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet (P1) wurde mit 10 ml HB gewaschen, die Überstände (Ü1) vereinigt und bei 10000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Dieses Pellet (P2) wurde mit 10 ml HB gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das gewaschene Pellet, welches die Synaptosomen enthielt, wurde in 2 ml HB resuspendiert und vorsichtig auf einen dreilagigen Percoll Gradienten (10, 15 und 23% Percoll in HB, Volumen der Schichten jeweils 3 ml) pipettiert. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 16500 rpm für 7 min. Anschließend wurde die Synaptosomenfraktion an der Interphase der 15%- und der 23%-Stufe mit einer Pasteurpipette entnommen, mit physiologischem Puffer (PB) auf ein Volumen von 10 ml gebracht und bei 1000 rpm für 15 min zentrifugiert. Diese intakten Synaptosomen wurden im gewünschten Volumen PB oder PB-BSA Puffer aufgenommen und für weitere Experimente benutzt. Es wurde eine Gesamtproteinbestimmung nach Biorad (Kap. 3.2.6.) durchgeführt, um die Konzentration für folgende Experimente zu ermitteln.

#### Proteaseinhibitoren-Cocktails:

AEL: Aprotinin (1 mg/ml), E64 (1 mg/ml), Leupeptin (1 mg/ml) in dH<sub>2</sub>O

ABP: Antipain (5 mg/ml), Bestatin (1 mg/ml), Pepstatin A (1 mg/ml) in Methanol

#### Physiologischer Puffer (PB/PB-BSA):

140 mM NaCl

5 mM KCl

20 mM HEPES/NaOH pH 7,3

5 mM NaHCO<sub>3</sub>

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

10 mM Glucose

2 mM CaCl<sub>2</sub>

(optional: 0,5 % BSA)

#### Homogenisierungspuffer (HB):

320 mM Sucrose

5 Mm HEPES/NaOH pH 7,3

### **3.3.3. Präparation von Rückenmarksneuronen**

Um die Aufnahme der Toxine unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurden primäre neuronale Zellkulturen angelegt. Dabei wurden Rückenmarksneurone (Spinal Cord Cells, SC) aus Hühnerembryonen des 10. embryonalen Entwicklungstages gewonnen (Meder, 2001). Die SC Neurone stellen motorische, d.h. vom ZNS zur Muskulatur leitende Zellen, sowie inhibitorische und exzitatorische Interneurone dar.

Die Präparation erfolgte aus einem 10 Tage lang bei 37°C und wassergesättigter Luft bebrüteten Hühnerembryo. Nach Desinfizierung mit 70-%igem Ethanol wurde das Ei am abgerundeten Pol so geöffnet, dass der Hühnerembryo mit einer Pinzette erreicht werden konnte. Der Embryo wurde entnommen und durch Dekapitation getötet. Unter einem Biookular wurden unter sterilen Bedingungen dem auf dem Rücken liegenden Embryo ventral alle Brust- und Bauchorgane entnommen. Nach der Darstellung der Wirbelsäule und

des großen Beckens wurde der Wirbelkanal eröffnet. Dazu wurden die Wirbelkörper mit der Pinzette (No. 5, gewinkelt 45°) an beiden Seiten durchtrennt und der so erhaltene Wirbelspan abgehoben. Das Rückenmark wurde in einem Stück entnommen und in Dulbecco's Aufbewahrungslösung (mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gegeben. Unter dem Biokular wurde im Anschluss die *Dura mater spinalis* weitestgehend entfernt. Das Rückenmark wurde dazu mit einer Pinzette in jeweils ein 15 ml Zellkultur-Röhrchen überführt, in das 5 ml Dulbecco's Medium (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ), 0,5 ml Trypsin-Lösung (0,25 % in  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 0,5 ml DNase-Lösung (2 mg/ml in Dulbecco's Medium ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) vorgelegt worden waren. Nach einer einfachen mechanischen Zerkleinerung des neuronalen Gewebes wurde das verschlossene Röhrchen im Wasserbad 10 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Röhrchen wurden danach für ca. 2 min senkrecht gestellt, um ein Absetzen der Zellen zu ermöglichen. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, 2 ml MEM 1 (37°C, 10 %  $\text{CO}_2$ -äquillibriert) zugegeben und die Gewebefragmente durch mehrfaches Aufziehen in einer verengten Pasteurpipette dissoziiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine sichtbaren Gewebeteile mehr vorlagen. Je 200 µl der Zellsuspension wurde in 4fach Zellkulturschalen (15 mm i.Ø, Nunc) gegeben. Nach 60 – 90 min haben sich die Neurone am Boden der Kulturschale abgesetzt und wurden mit jeweils mit 300 µl MEM 1 versetzt. Vom 3. bis 6. Tag wurden FUDR und Uridin in erhöhter Konzentration (MEM 1FU) zugesetzt, um den Anteil der nicht-neuronalen Zellen durch Hemmung der Mitose zu reduzieren. Die Kultur der Zellen erfolgte in sterilen Wärmeschränken bei 37°C, 10 %  $\text{CO}_2$  und wassergesättigter Atmosphäre. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage zu ca. 80 % gewechselt. Unter den genannten Kulturbedingungen war eine Kultur für rund drei bis vier Wochen möglich, bevor erste Anzeichen von Apoptose zu beobachten waren. Die Zellen wurden nach dem 21. Tag in der Kultur nicht mehr für Experimente genutzt.

Lösungen und Medien zur Kultivierung und Präparation siehe Kap. 9.1.10.

### **3.4. Arbeiten mit adhärennten Zellen**

#### **3.4.1. Passagieren adhärennter Zellen**

Haben adhärennte Zellen den Boden der Kulturschale völlig bedeckt, müssen sie vom Boden gelöst und in geringerer Konzentration in einer neuen Kulturflasche ausgesät werden, da es sonst zu einer Induktion der Apoptose und damit zum Absterben der kultivierten Zellen kommt.

Das Nährmedium (Vero Zellen: MEM, 7,5 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) wird abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dieser Waschschritt ist essentiell, da nur so Trypsininhibitor, der im Medium vorhanden ist, entfernt wird. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma) werden die Zellen dann vom Flaschenboden gelöst und in frischem Nährmedium aufgenommen, wodurch das Enzym

gleichzeitig inhibiert wird. Die Zellen können nun in neuen Kulturflaschen oder auf Deckgläschen ausgesät werden.

### **3.4.2. Auftauen und Einfrieren von Eukaryontenzellen**

Die Zellen werden in der Hand solange aufgetaut, bis sie sich, immer noch gefroren, in eine Kulturflasche schütten lassen, in die bereits das Nährmedium vorgelegt wurde. Nach ihrem Anheften am Flaschenboden, was etwa 2 h dauert, wird das Medium gegen frisches ausgetauscht, um das für die Zellen toxisch wirkende DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen.

Zum Einfrieren werden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma) vom Flaschenboden gelöst (siehe Kap. 3.4.1.) und mit eisgekühltem Einfriermedium versetzt. Anschließend werden sie mit einer Geschwindigkeit von 1 °C pro min auf –80 °C abgekühlt und dann zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **Einfriermedium**

- 70 % Nährmedium
- 20 % Fötale Kälberserum
- 10 % DMSO

### **3.4.3. Transiente Transfektion von Vero-Zellen**

Die Zellen werden 48 h vor der Transfektion so in einer Flasche mit 25 cm<sup>2</sup>-Bodenfläche ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 30 – 50 % erreichen. 15 µg Plasmid-DNA werden mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 250 µl gebracht und mit 250 µl 2x HBS (50 mM HEPES pH 7,0, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,28 M NaCl) vermischt. Anschließend gibt man langsam und unter ständiger Bewegung der Pipette 30 µl 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzu. Nach kurzem Vortexen wird der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Es bilden sich Calciumphosphat-DNA-Kristalle, deren Größe für eine erfolgreiche Transfektion der Zellen entscheidend ist. Die DNA-Lösung wird mit 5 ml MEM-Medium (Gibco) versetzt und auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel und weitere 24 h später können die transfizierten Zellen im Versuch eingesetzt werden.

## **3.5. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie**

Mit der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie ist es möglich, Proteine in der Zelle zu lokalisieren. Dabei werden auf Deckgläschen fixierte Zellen mit Antikörpern inkubiert, die gegen spezifische zelluläre Antigene gerichtet sind, und diese anschließend mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper dargestellt.

### **3.5.1. Fluoreszenzfärbung**

Auf unbeschichteten Deckgläschen in einer subkonfluenten Kolonisation vorliegende Vero Zellen wurden mit 15-42 µg/ml GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT (Kap. 5.4.2.2.) in MEM (Gibco) bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> für verschiedene Zeiten inkubiert. Alternativ wurden Rückenmarksneuronen



(Kap. 3.3.3.) die auf Deckgläschen ausgesät waren analog in MEM1 (Kap. 9.1.10.) inkubiert. Zusätzlich wurden zur Überprüfung des Endozytoseprozesses bei einigen Experimenten hTransferrinRhod (30 µg/ml) oder DextranTMRhod (1 mg/ml) zugesetzt.

Die Zellen werden nach Inkubation dreimal mit PBS gewaschen, 10 min mit einer 4 %igen para-Formaldehydlösung fixiert und exakt 5 min permeabilisiert. Da auch die Permeabilisierungslösung para-Formaldehyd enthält, geht die Fixierung in dieser Zeit weiter. Soll nur die Aufnahme extrazellulärer Proteine betrachtet werden, wird das Permeabilisieren unterlassen und die Fixierungszeit auf 15 min ausgedehnt. Die Zellen werden dann mit PBS gewaschen und 5 min mit einer Lösung aus 50 mM Glycin in PBS inkubiert, die dafür sorgt, dass noch vorhandenes para-Formaldehyd abreagieren kann. Enthalten die zugegebenen Proteine bereits Fluoreszenzfarbstoffe, so können die Zellen nach diesem Schritt eingebettet werden (s.u.). Nach einem weiteren Waschschrift werden für Antikörper unspezifische Proteinbindungsstellen durch 60minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Blocklösung abgesättigt. Nach 30 min wird die Blocklösung einmal erneuert. Die fertig vorbereiteten Zellen werden dann 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper, verdünnt in PBS mit 5 % FCS und 0,5 % BSA inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Bei jedem dieser Waschschriffe werden die Zellen zunächst 15 min mit der Waschlösung inkubiert. Während dieser Inkubationszeit können unspezifisch gebundene Antikörpermolekül abdissoziieren. Danach werden die Zellen 1 h bei Raumtemperatur mit einem an einen sekundären Antikörper kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff in PBS mit 5 % FCS und 0,5 % BSA inkubiert. Ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörpermoleküle werden gewaschen. Danach werden die Präparate in Mowiol, dem 1,4-Diazobicyclo[2.2.3]octane (Dabco) als Antibleichmittel zugesetzt wurde, eingebettet.

#### **4 % para-Formaldehyd**

90 ml dH<sub>2</sub>O  
 200 µl 2 M NaOH  
 auf 50 °C erhitzen  
 unter Rühren 4 g para-Formaldehyd zugeben  
 wenn alles gelöst ist Zugabe von  
 10 ml 10x PBS  
 auf Raumtemperatur abkühlen lassen,  
 pH-Wert kontrollieren, filtrieren

#### **Mowiol**

6 g Glycerin  
 2,4 g Mowiol  
 6 ml dH<sub>2</sub>O  
 2 h bei Raumtemperatur stehenlassen  
 12 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5  
 bei 50 °C rühren, bis sich das Mowiol gelöst hat  
 15 – 20 min 5000 rpm  
 Lagerung bei –20 °C

#### **Blocklösung**

PBS  
 10 % FCS  
 0,5 % BSA

#### **Permeabilisierungslösung**

4 % para-Formaldehyd in PBS  
 1 % TritonX-100

**PBS:** siehe Kap. 3.3.2.

## 3.6. Subzelluläre Fraktionierung

Nach Inkubation von Zellen mit rekombinantem Toxin ermöglicht eine subzelluläre Fraktionierung eine Aufschlüsselung nach unterschiedlichen Zellkompartimenten mit anschließender Detektion der rekombinanten Toxine oder Toxinfragmente. Die Fraktionierung nach einem modifizierten Protokoll von Whittaker (1959) erlaubt eine Darstellung von Makrosomen, Mikrosomen und Zytosol. Zur Konzentrierung des Proteins in der zytosolischen Fraktion kann eine Fällung mit Trichloressigsäure (Kap. 3.6.3.) durchgeführt werden.

### 3.6.1. Inkubation von Zellen vor der Fraktionierung

150 – 250 µg Synaptosomen (nach Biorad (Kap. 3.2.6.)) werden mit 30 nM GFP oder GFP-BoNT/D für 60 bis 90 min bei 37°C inkubiert. Alternativ wird eine mit Vero Zellen konfluent bewachsene 25 cm<sup>2</sup> Flasche zweimal mit je 5 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und nach Kap. 3.6.2. fortgeführt.

### 3.6.2. Durchführung der subzellulären Fraktionierung

Nach Kap. 3.6.1. behandelte kultivierte Zellen werden vom Boden der Petrischale gelöst und 5 min lang bei 1000 rpm (5417 R, Eppendorf) und 4 °C zentrifugiert. Alternativ werden die nach Kap. 3.6.1. behandelten Synaptosomen zentrifugiert (4600xg, 4°C). Die Zellen oder Synaptosomen werden in TC-Puffer (10 ml/g Zellen, 200 µl/Synaptosomen) resuspendiert und durch 200maliges Auf- und Abbewegen des Stempels eines 5 ml Zellhomogenisators aufgeschlossen. Zelltrümmer und Nuklei werden abzentrifugiert (Makrosomenfraktion, P1; 1000 g, 5 min, 4 °C, 5417 R, Eppendorf) und der aus Zytoplasma und Membranfraktion bestehende Überstand in der Ultrazentrifuge bei 125000 x g (TLA 100, TL-100 Ultrazentrifuge, Beckman) für 1,5 h zentrifugiert. Die Sedimente (Mikrosomenfraktion, P2 und P1) werden in je 50 µl EP-Puffer (Kap. 3.7.6.1.) aufgenommen oder direkt mit 33 µl Probenpuffer für Proteingele versetzt. Aus dem Überstand (Zytosol, S2) werden vorhandene Proteine mit Trichloressigsäure gefällt (Kap. 3.6.3.) oder direkt nach Kap. 3.7.6.2. nachgewiesen.

#### TC-Puffer

- 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- 5 mM Tris/HCl pH 8,0
- 2 mM DTT
- 1 mM PMSF
- 2 µM Pepstatin A
- 10 µM Leupeptin
- 5 mM Benzamidin
- 300 mM Saccharose

### 3.6.3. TCA-Fällung

Liegt das Protein in der Probe nur in geringer Konzentration vor, so kann es durch eine Fällung mit Trichloressigsäure konzentriert werden.

Dazu wird ein Probenvolumen mit der gewünschten Proteinmenge mit dem gleichen Volumen an 20 %iger (w/v) gekühlter Trichloressigsäure versetzt und 60 min im Eis inkubiert. Die gefällten Proteine werden 10 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) abzentrifugiert und das Sediment zweimal mit je 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen, um Salze zu entfernen. Anschließend wird es 2 min lang bei 37 °C getrocknet, mit 30 µl 1x Probenpuffer für Proteingele (Kap. ) versetzt und so lange bei 37 °C geschüttelt (Thermomixer 5436, Eppendorf), bis es sich vollständig gelöst hat. Sollte dabei ein Farbumschlag des Bromphenolblau nach gelb zu beobachten sein, wird mit 1 M Tris/HCl pH 8,0 titriert, bis es wieder blau erscheint. Die Probe wird nun 2 min bei 99°C denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

## 3.7. Analyse von BoNT/D und Derivaten

### 3.7.1. Trypsinaktivierung von clostridiellen Neurotoxinen

Zwischen L- und H-Kette clostridieller Neurotoxine befindet sich eine proteolytisch sensitive Region, die von zwei Cysteinen eingerahmt wird. Zur Freisetzung der katalytischen Funktion (LC) wird das authentische BoNT/D in diesem Bereich hydrolysiert. Zur Überprüfung der Spaltbarkeit werden die rekombinant hergestellten BoNT/D Proteine mit auf Agarosekugeln immobilisiertem Trypsin gespalten.

Dazu werden zunächst 2,8 µl der 50 %igen Trypsinsuspension (= 0,1 U; Lot: 109H7006) entnommen und eine Minute bei 3500 rpm (5415 C, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Beads in 100 µl Dialysepuffer aufgenommen (= 0,001 U/µl). Je 6 µg des BoNT/D Proteins werden mit 5 µl der obigen Suspension versetzt und 60 min bei 30°C und 800 rpm, um die Beads in Suspension zu halten, inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zentrifugation für eine Minute bei 3500 rpm (5415 C, Eppendorf) und Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß abgestoppt. Um die Trypsinsensitivität einiger BoNT/D Mutanten genauer zu untersuchen, wurden alternativ je 5 µg Protein mit 0,001 mg/ml nicht immobilisiertem Trypsin bei 37°C und 400 rpm verdaut. Ein 2 µl Aliquot wird mit 3 µl eiskaltem 4 x reduzierendem Gelladepuffer und 6 µl dH<sub>2</sub>O auf einem SDS-Gel (10 %) analysiert. Zur Überprüfung der Ausbildung der Disulfidbrücken wird außerdem ein weiteres Aliquot mit Gelladepuffer ohne 4-Mercaptoethanol analysiert.

### 3.7.2. *In vitro* Toxizitätsbestimmung von clostridiellen Neurotoxinen am *Nervus phrenicus* der Maus

Um die Toxizität von clostridiellen Neurotoxinen zu bestimmen, kann das Toxin im Tierversuch gespritzt werden und eine LD<sub>50</sub> bestimmt werden. Dieses Experiment kann auf

einfache Weise durch Einsatz von Zwerchfellen der Maus nach Habermann *et al.* (1980) ersetzt werden. Man ermittelt die Dosis-abhängige Zeitkurve bis zur Vergiftung über die Paralyse elektrisch angeregter (1 Hz) Muskelzuckungen des *nervus phrenicus*. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass eine Wirksamkeit von rekombinanten BoNT/D Präparationen deren Bindung und Internalisation in Motoneurone voraussetzt, d.h. es werden zusätzlich zur Proteaseaktivität auch die biologischen Aktivitäten der H-Ketten überprüft. Die Aussagekraft dieser Tests am Zwerchfell entspricht Toxizitätstests an lebenden Mäusen (persönliche Mitteilung: Prof. Dr. H. Bigalke). Diese Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Dr. H. Bigalke, in dessen Labor dieser Test standardmäßig etabliert ist, der Abteilung Toxikologie der MH-Hannover durchgeführt. Er stellte auch das native BoNT/D zur Verfügung.

Aus männlichen weißen Albinomäusen wird das Zwerchfell präpariert, in 4 ml physiologischem Puffer (Krebs-Ringer: 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM Glucose, pH 7,5) gelagert und mit Toxinpräparationen in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Während des gesamten Versuchs wird das Zwerchfell mit einer Frequenz von 1 Hz über zwei Oberflächen-Ringlektroden elektrostimuliert, so dass über den *nervus phrenicus* Kontraktionen des Zwerchfells ausgelöst werden. Diese isometrischen Kontraktionen werden direkt über einen Kraftwandler auf ein Messgerät übertragen und mit der VitroDat Online software (FMI GmbH) aufgenommen und ausgewertet. Nach Applikation des Toxins bestimmt man die Zeit, in der eine Abnahme der Kontraktionsamplitude auf 50 % beobachtet wird. Dieser Wert geht in die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven ein und ist ein direktes Maß für die Toxinkonzentration.

Um die physiologische Toxizität von BoNT/D und Derivaten zu berechnen, wird zunächst eine Dosis-/Wirkungskurve vom rekombinanten Wildtyp aufgenommen. Jede Konzentration wird dabei mehrfach gemessen, da sich jede Zwerchfellpräparation individuell verhält. Von den produzierten BoNT/D Mutanten, Chimären oder Fusionsproteinen (Kap. 5.1.) wird jeweils mindestens ein Doppelwert einer Konzentration gemessen, bei der die Dosis-/Wirkungskurve des rekombinanten Wildtyps die größte Steigung aufweist. In diesem „linearen“ Bereich können die Toxizitäten verschiedener Proteine verglichen werden (Kap 5.2.). An die aufgenommene Wildtypkurve wird eine Funktion angepasst, mit welcher die Paralysezeiten der mutierten Proteine in Relation gebracht werden. Daraus ergeben sich die Toxizitäten der BoNT/D Derivate im Vergleich zum Wildtyp.

### **3.7.3. Spaltung von rekombinantem Synaptobrevin 2**

Zur Überprüfung der katalytischen *in vitro* Aktivität der hergestellten BoNT/D Mutanten wird deren katalytische Aktivität an rekombinantem Synaptobrevin2 ohne Transmembranregion getestet. Das Protein wurde von Dr. U. Matti zur Verfügung gestellt. Hierzu wird 1 nM Protein nach Aktivierung mit an Agarosekugeln immobilisiertem Trypsin (Kap. 3.7.1.) und Reduzierung mit 10 mM Dithiothreitol (30 min bei 37°C) für 2, 5, 20 und 45 min bei 37°C mit Synaptobrevin2 inkubiert. Die Reaktion wird mit eiskaltem 4 x

Probenpuffer für Proteingele (Kap. 3.2.2.2.) abgestoppt. Die Proben werden 2 min bei 99°C denaturiert. Als Minuskontrolle wird Synaptobrevin2 ohne Toxinzugabe nach Inkubation für 45 min bei 37°C analysiert. Als Positivkontrolle wird analog die Spaltung von Synaptobrevin2 durch 1 nM rekombinante L-Kette von BoNT/D, zur Verfügung gestellt von Dr. T. Binz, analysiert. Die Analyse erfolgt per SDS-PAGE (15 %), Färbung mit Coomassie und Auswertung per Densitometrie. Der prozentuale Anteil an gespaltenem Synaptobrevin2 wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

#### **3.7.4. Bindung an Synaptosomen**

Um die Bindungseigenschaften der nach Kap. 3.2.1. hergestellten Proteine zu überprüfen, werden Bindungsexperimente an frisch präparierten Rattenhirn-Synaptosomen inkubiert. Dazu werden 200 oder 600 nM Toxin in PB-BSA auf Eis mit je 100 µg synaptosomalem Protein (nach Biorad (Kap. 3.2.6.)) versetzt. Das Gesamtvolumen beträgt 30 µl. Anschließend werden die Ansätze auf Eis für 90 min inkubiert. Nach Inkubation werden die Synaptosomen zentrifugiert (4600 g, 4°C, 5417 R, Eppendorf) und mit 30 µl 1x Probenpuffer für Proteingele versetzt. Nach SDS-PAGE (Kap. 3.2.2.) wurden die Ansätze auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Kap. 3.2.7.) und die gebundenen Proteine immunochemisch nachgewiesen.

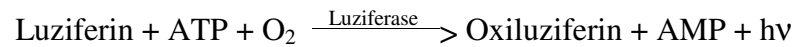
PB-BSA siehe Kapitel 3.3.2.

#### **3.7.5. Substratsspaltung in Synaptosomen**

Um zu überprüfen, inwieweit die nach Kap. 3.2.1. hergestellten Proteine in der Lage sind, ihr Substrat *in vivo* in Synaptosomen zu spalten, werden diese mit frisch präparierten Synaptosomen inkubiert. Dazu werden 10, 30 oder 100 nM Toxin in PB-BSA auf Eis mit je 12 µg synaptosomalem Protein (nach Biorad (Kap. 3.2.6.)) versetzt. Das Gesamtvolumen beträgt 30 µl. Anschließend werden die Ansätze bei 37°C für 60 min inkubiert. Nach jeweils 20 min wird durch Schwenken der Reaktionsgefäße resuspendiert. Nach Inkubation werden die Synaptosomen zentrifugiert (4600 x g, 4°C) und mit 10 µl 4x Probenpuffer für Proteingele versetzt. Nach SDS-PAGE (Kap. 3.2.2.) werden die Ansätze auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Kap. 3.2.7.) und das Substrat durch Verwendung Synaptobrevin2 spezifischer Antikörper immunochemisch nachgewiesen. Die Substratsspaltung wird durch Abnahme der Intensität im Vergleich zur Kontrolle ohne Toxin nachgewiesen und prozentual in Relation zum Wildtyp ausgedrückt. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgt durch Bildung des Mittelwertes der Doppelversuche bzw. der unterschiedlichen Experimente. Als Kontrolle für die Menge an geschlossenen, funktionellen Synaptosomen wurden diese mit äquivalenter Konzentration isolierter L-Kette inkubiert. Inkubation mit leichter Kette alleine verursacht ca. 5 % Substratsspaltung. Diese ist jedoch vermutlich auf Hydrolyse von Substrat aus geschädigten Synaptosomen zurückzuführen.

### 3.7.6. Detektion von Luziferase Aktivität

Die Enzymaktivität der Luziferase aus *photinus pyralis* lässt sich mit Hilfe einer Biolumineszenzreaktion bestimmen.



Die dabei entstehenden Lichtblitze werden mit Hilfe eines Luminometers gemessen und in relativen Lichteinheiten ausgedrückt. Das System kann durch eine Proteinstandardreihe kalibriert werden. Eine Standardreihe von 200 ng – 100 fg der verwendeten Proteine wird dazu in Messpuffer (MP), wie unter Kap. 3.7.6.2. beschrieben, gemessen.

#### 3.7.6.1. Inkubation von Synaptosomen

300-400 µg Synaptosomen (nach Biorad (Kap. 3.2.6.)) werden mit 30 nM rekombinanter Luziferase oder mit Luziferase Fusionsprotein auf Eis für 60 min inkubiert. Von der Suspension werden 2 µl abgenommen und mit 48 µl Extraktionspuffer (EP) versetzt. Die Suspension wird zentrifugiert (4600 g, 4°C, 5417 R, Eppendorf) und je dreimal mit 150 µl PB-BSA gewaschen. Von der ersten Waschsuspension werden 2 µl, von den vereinigten Waschüberständen 10 µl Probe ad 50 µl mit EP versetzt. Anschließend werden die Synaptosomen in 200 µl PB-BSA für 45 min bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot von 2 µl der Suspension wird mit 48 µl EP versetzt. Die Suspension wird erneut zentrifugiert (4600 g, 4°C, 5417 R, Eppendorf) und je dreimal mit 150 µl PB-BSA gewaschen. Von der ersten Waschsuspension werden 2 µl, von den vereinigten Waschüberständen 10 µl Probe ad 50 µl mit EP versetzt. Das Sediment wird nach Kap. 3.6.2. fraktioniert. Nach allen Schritten werden dabei wiederum 10 µl Probe genommen und mit 40 µl EP versetzt. Die Luziferase Aktivität wurde aus allen genommenen Proben bestimmt.

#### 3.7.6.2. Durchführung des Enzymnachweises

Die unter Kap. 3.6.2. bzw. Kap. 3.7.6.1. genommenen Proben mit einem Volumen von je 50 µl werden in 5 ml Messröhrchen (Sarstedt, Nr. 55.476) mit 300 µl Messpuffer (MP) versetzt. Unter Verwendung des Lumat LB9501 (Berthold) werden anschließend die relativen Lichteinheiten (RLU) nach Auslösung der Biolumineszenzreaktion durch Injektion von Luziferinlösung gemessen. Die erhaltenen Werte können anhand von Kalibrationsgeraden der jeweiligen Proteine in mol-Protein umgerechnet werden.

##### Messpuffer (MP):

25 mM Glycylglycin  
15 mM MgSO<sub>4</sub>  
5 mM ATP (frisch zugesetzt)

##### 5x Extraktionspuffer (EP):

125 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8  
10 mM EDTA  
10 mM DTT (frisch zugesetzt)  
50 % (v/v) Glycerol  
5 % Triton X-100

##### Luziferinlösung:

250 µM in dH<sub>2</sub>O

### 3.7.7. Nachweis von Disulfidbrücken mit Ellman-Reagenz

Der Nachweis von Disulfidbrücken kann indirekt durch Titration der freien SH-Gruppen mit Ellman-Reagenz (Ellman, 1959) erfolgen. Ist durch Mutation zweier Aminosäuren keine Disulfidbrücke ausgebildet, so enthält das Protein zwei SH-Gruppen mehr als der Wildtyp. Es wird der Umsatz von 5,5'-Dithiobis-[2-nitrobenzoesäure] (DTNB) bei 412 nm in Phosphatpuffer (nach Sörensen, Ellman-Reagenz) gemessen. Dazu wird eine Kalibrationsgerade über den zu messenden Bereich mit Glutathion (red., GSH) erstellt. Anschließend wird die Proteinlösung bis zum Stillstand der Reaktion bis zu einer Stunde lang gemessen. Die Proteinlösung darf maximal  $7 \cdot 10^{-8}$  Mol SH-Gruppen enthalten, was einer Extinktion von 0,9 AU entspricht. Um alle freien SH-Gruppen titrieren zu können, wird die Messung unter denaturierenden Bedingungen (6 M Harnstoff) durchgeführt. Errechnet wird die Anzahl der SH-Gruppen nach der Formel: (Mole SH-Gruppen laut Kalibrationsgerade)/(eingesetzte Mole Protein)=Anzahl SH-Gruppen.

#### Phosphatpuffer nach Sörensen (denaturierend):

0,1 M Phosphat pH 8.0  
6 M Harnstoff

#### Ellman-Reagenz:

39,6 mg DTNB in 10 ml  
Phosphatpuffer

#### Ansatz:

0,5 ml Phosphatpuffer  
x ml Proteinlösung oder GSH-Eichlösung  
(0,5-x) ml dH<sub>2</sub>O  
0,02 ml Ellman-Reagenz

#### GSH-Eichlösung:

0,25 mg GSH (red.)/1ml  
Phosphatpuffer

### 3.7.8. Aufnahme von TNS-Bindungskinetiken

Mit Hilfe des Fluoreszenzhydrophobizitätsmarkers TNS (2-(p-Toluidino)naphthalene-6-sulfonsäure), welches an „geclusterte“, hydrophobe Bereiche eines Proteins bindet und durch die Proteinbindung ein Fluoreszenzsignal erzeugt, können Expositionen von hydrophoben Proteinbereichen bei Umfaltungsprozessen sichtbar gemacht werden (Kamata *et al.*, 2000). So können Umfaltungsprozesse von Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zeitabhängig verglichen werden.

5 µg rekombinantes HPLC-gereinigtes Protein (Kap. 3.2.8.) in 400 µl 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0 wird mit 500 µl TNS Lösung versetzt (300 µM TNS in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0). Durch Zugabe einer vorher experimentell bestimmten Menge an 10 %iger Zitronensäure wird der pH Wert auf 4 erniedrigt und im selben Augenblick die Messung gestartet. Mit Hilfe eines Spektrofluorometers (Shimadzu) wird in entsprechenden Fluoreszenzküvetten bei  $\lambda_{exc} = 350$  nm angeregt und bei  $\lambda_{em} = 440$  nm die Emission über die Zeit von 90 s gemessen.

### **3.8. Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie**

CD-Messungen dienen in erster Linie der Konfigurations- und Konformationsanalyse chiraler Moleküle. Darüber hinaus können damit intermolekulare Wechselwirkungen untersucht werden. In diesem Fall wurden CD-Spektren mit der Absicht, den Gehalt an Sekundärstruktur zu ermitteln und Aussagen über die korrekte Faltung der exprimierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp zu machen, aufgenommen. Des Weiteren wurde der thermische Denaturierungsprozess (Schmelzkurven) bei 225 nm gemessen. Diese Messmethode ermöglicht genaueren Einblick in strukturelle Unterschiede, die die Feinstruktur des Moleküls betreffen. Die Messungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. J. Alves aus der Biophysikalischen Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

#### **3.8.1. Aufnahme von CD-Spektren**

Die Spektren werden mit einem Dichrograph III (Jobin-Yvon) Spektropolarimeter, welches mit einem Computer-kontrollierten Temperaturküvettenhalter bestückt ist, gemessen. Die Spektren werden im fernen UV-Bereich zwischen 190 und 250 nm in einer Küvette mit 0,1 mm Schichtdicke bei 25°C mit einer Geschwindigkeit von 6 nm/min und einer Antwortzeit von 2 s aufgenommen. Die zu messenden Proteine werden vorher per HPLC gereinigt (Kap. 3.2.8.) und anschließend über Microcon30 Ultrazentrifugationsröhrchen aufkonzentriert. Es werden jeweils ca. 45 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,6 bis 0,8 mg/ml eingesetzt. Für jedes Protein werden ein Spektrum in 20 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 100 mM NaCl und ein Spektrum in 50 mM Na-Acetat, pH 5, 100 mM NaCl aufgenommen. Die erhaltenen Spektren werden mit dem Programmpaket CDPro von N. Sreerama (Sreerama & Woody, 2000; <http://lamar.ColoState.EDU/~sreeram/CDPro/main.html>) ausgewertet.

#### **3.8.2. Aufnahme von Schmelzkurven**

Temperaturinduzierte Denaturierung einzelner Proteine wird ebenfalls bei neutralem und saurem pH-Wert analog zu den CD-Spektren aufgenommen. Es werden jeweils 2 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 30 µg/ml eingesetzt. Der Denaturierungsprozess wird bei 225 nm in einer Küvette mit 4 mm Schichtdicke und einer Heizrate von 0,5°C/min zwischen 25 und 80°C Küvetteninnentemperatur verfolgt.

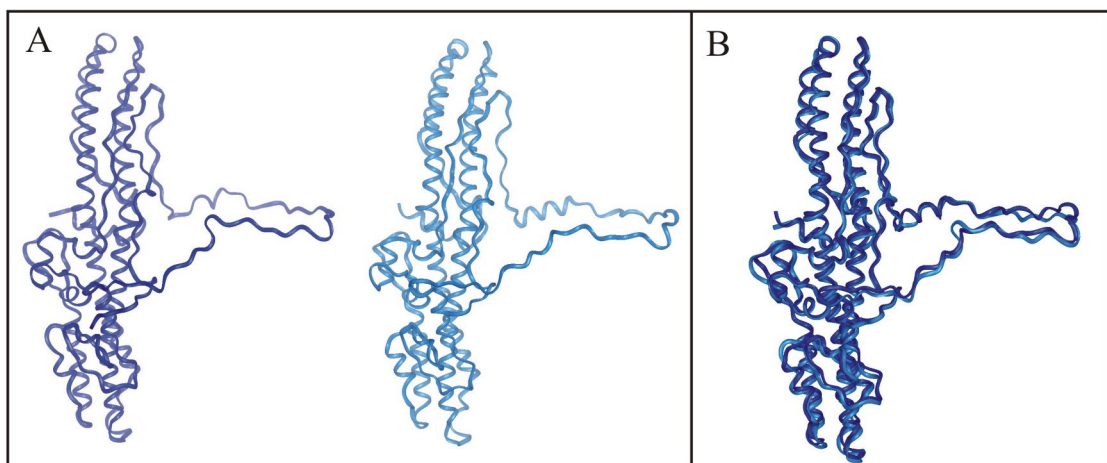


## 4. Strukturanalyse und Ansätze

Die Botulinumtoxin Serotypen A und B sind für die Majorität aller Vergiftungsfälle beim Menschen verantwortlich. Für BoNT/D ist der Mensch vermutlich nicht empfänglich. Aus diesem Grund wurde BoNT/D als Modell zur Untersuchung des Translokationsmechanismus ausgewählt. Im folgenden werden die verschiedenen Ansätze beschrieben, mit denen neue Erkenntnisse gewonnen werden sollten. Als Grundlage für die Planung diente dabei eine computergestützte strukturelle Analyse der Translokationsdomäne von BoNT/D.

### 4.1. Berechnung der Struktur von H<sub>N</sub>-BoNT/D

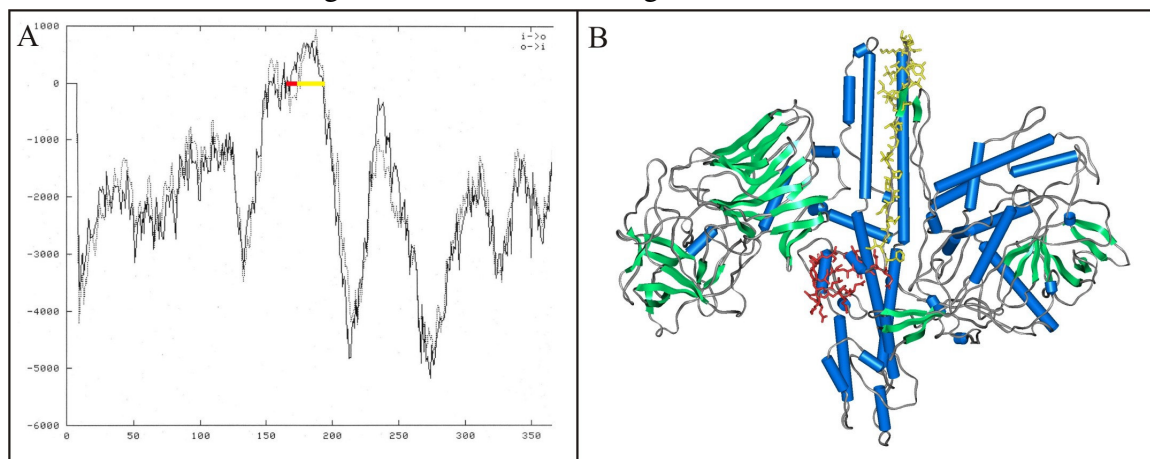
Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist die Sequenzidentität zwischen den verschiedenen BoNT-Serotypen innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne sehr groß. Bedingt durch diese hohe Primärsequenzübereinstimmung und die Verfügbarkeit der Strukturen für BoNT/A und BoNT/B, ließ sich die Struktur für die H<sub>N</sub>-Domäne von BoNT/D mit dem Programm Swiss-Model (<http://www.expasy.ch/swissmod>) berechnen. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse dieses „Modelings“. Dabei werden nur dann korrekte Daten geliefert, wenn die Übereinstimmung zwischen Schablone und Primärsequenz des zu berechnenden Proteins ausreichend groß ist. Zwischen BoNT/A und BoNT/B besteht eine große strukturelle Homologie und so war zu erwarten, dass sich auch andere Serotypen in diese Homologie einreihen. Ein Overlay (Abb. 9, B) zeigt, dass die BoNT/D Aminosäuresequenz gut an die Struktur von BoNT/A angepasst wurde. Diese berechnete Struktur diente im Vergleich zu den Strukturen von BoNT/A & B als Basis zur Auswahl von Mutanten.



**Abbildung 9: Strukturvergleich der H<sub>N</sub>-Domäne von BoNT/A und /D.** Die Primärsequenz von H<sub>N</sub>-BoNT/D wurde mit Hilfe von SwissModel (<http://www.expasy.ch/swissmod>) auf die Struktur von BoNT/A „gemodelt“. A zeigt die „gemodelte“ Struktur von H<sub>N</sub>-BoNT/D (Ribbon, dunkelblau) im Vergleich zu H<sub>N</sub>-BoNT/A (Ribbon, hellblau, aus 3BTA). B zeigt die übereinandergelegten Strukturen.

## 4.2. Identifizierung potentieller Transmembranregionen

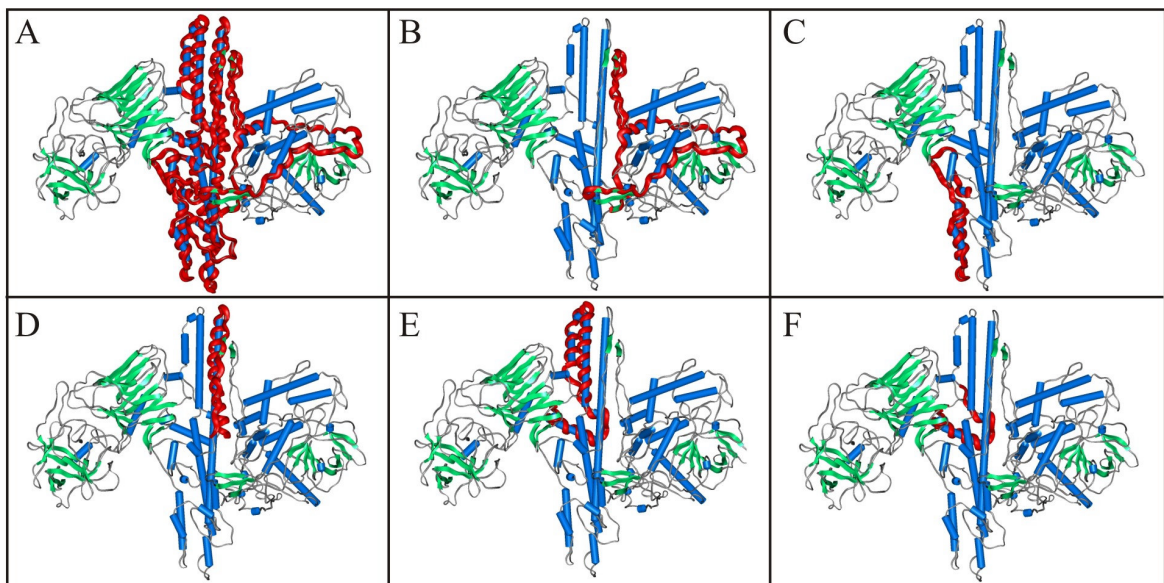
Um die leichte Kette in das Zytosol zu translozieren, muss eine Membranbarriere überwunden werden. Diese Fähigkeit wird der  $H_N$ -Domäne zugeschrieben. Die Berechnung der Hydropathie eines Moleküls lässt Rückschlüsse auf Molekülbereiche zu, die Interaktionen mit Membranen ausführen können bzw. die Membran durchspannen können. Diese Berechnungen sind jedoch spekulativ. Die Vorhersagen wurden für BoNT/D mit dem Programm TMPred (Hofmann & Stoffel, 1993) durchgeführt. In diesen Analysen wird in einem gegebenen Fenster von 19 Aminosäuren die Änderung der freien Gibbs Energie für den Fall betrachtet, dass jede Aminosäureseitenkette einzeln von einer ethanolischen Umgebung in Wasser überführt wird. Die Summe der Energieänderungen dividiert durch die Anzahl der Aminosäuren in diesem Fenster ergibt den Hydropathieindex, der gegen die Aminosäureposition aufgetragen wird. Negative Indizes spiegeln hydrophile Bereiche wieder, positive zeigen hydrophobe an. Bei Maxima größer 1000 cal/mol Aminosäurereste ist die Existenz einer Transmembrandomäne an dieser Stelle als möglich anzusehen. Für die Translokationsdomäne von BoNT/D ergab sich die Vorhersage, dass die Bereiche G660 bis E689 und G643 bis E659 als Transmembranregionen fungieren könnten (Abb. 10). Streng genommen wird der Wert von 1000 cal/mol Aminosäurereste nicht überschritten, so dass keine starke Evidenz vorliegt. Im entsprechenden Bereich befindet sich jedoch ein von Oblatt-Montal *et al.* (1995) untersuchtes Peptid – für BoNT/A G659-T681 –, welches vermutlich befähigt ist, sich zu einer helicalen Struktur umzufalten. Berechnungen haben ergeben, dass ein solcher helicaler Bereich entstammend aus vier Molekülen – also ein 4 Helix Bündel – eine Pore in Membranen bilden könnte. Des weiteren ist für denselben Bereich für TeNT ein porenbildender Abschnitt ermittelt worden (Montal *et al.*, 1992). Durch diese Befunde lässt sich die Tendenz einer möglichen Transmembranregion untermauern.



**Abbildung 10: Berechnung von Transmembranregionen in  $H_N$ -BoNT/D** mit dem Programm TMPred. Eine mögliche Transmembranregion umfasst den Bereich G660 bis E689 (gelb). Erweitern kann man die hydrophoben Bereiche mit den Aminosäuren G643 bis E659 (rot). Beide Bereiche sind in einem Hydropathieplot (A: (cal/mol)/As-Position) und schematisch in der Sekundärstruktur-Darstellung der Struktur von BoNT/A (B, 3BTA) markiert (blau =  $\alpha$ -Helix, grün =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil). Die Kristallstruktur wurde für dieses Schema gewählt, da in der „gemodelten“  $H_N$ -Domänenstruktur von BoNT/D keine Sekundärstrukturelemente definiert werden konnten.

### 4.3. Deletionsmutanten

Welche Bereiche der  $H_N$ -Domäne für die Translokation wichtig sind, sollte eine Deletionsanalyse herausgefunden werden. Um auszuschließen, dass auch die Bindungsdomäne oder katalytische Untereinheit Translokationskompetenz vermitteln, wurde als Negativkontrolle die gesamte  $H_N$ -Domäne entfernt (Abb. 11, A). Ebenso wurde der Gürtelbereich entfernt (Abb. 11, B). Der Gürtel könnte quasi als Energielieferant der Translokation dienen, da er in der Kristallstruktur geordnet um die leichte Kette geschlungen ist, er nach „Injektion“ dieser jedoch völlig ungeordnet vorliegen könnte, was einen enormen entropischen Gewinn für die Reaktion bedeuten würde. Weiterhin wurden Teile der 105 Å langen  $\alpha$ -Helices und der amphiphatischen Bereiche vor diesen  $\alpha$ -Helices entfernt (Abb. 11, C-E), sowie der Verbindungsbereich zwischen der  $H_C$ - und der  $H_N$ -Domäne (Abb. 11, F). Bei allen Deletionen wurden anhand der „gemodelten“  $H_N$ -Domäne von BoNT/D strukturell günstige Verknüpfungspunkte gesucht, bei denen die endständigen Aminosäuren der deletierten Bereiche nicht zu weit entfernt waren, um eine Beeinträchtigung der globalen Struktur möglichst gering zu halten. Zudem wurden zwischen den Verknüpfungspunkten jeweils vier Glycine als flexibler Abstandhalter eingebaut.

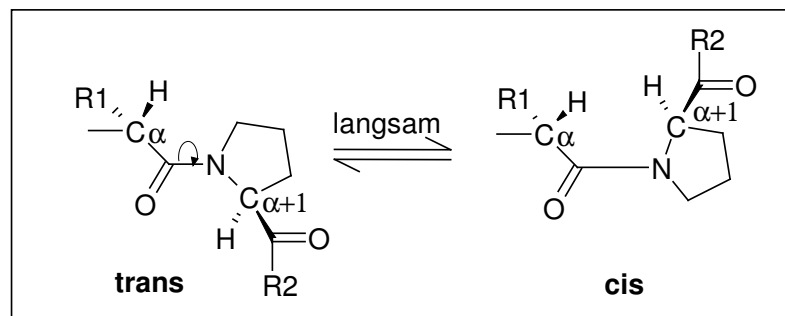


**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Deletionsmutanten von  $H_N$ -BoNT/D.** Die entfernten Bereiche sind schematisch durch überlagerte rote Bandstrukturen anhand der Kristallstruktur von BoNT/A (3BTA) gezeigt (blau =  $\alpha$ -Helix, grün =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil). Zu sehen sind BoNT/D  $\Delta H_N$  (A), BoNT/D  $\Delta$ belt (B), BoNT/D  $\Delta$ 578-632 (C), BoNT/D  $\Delta$ 661-714 (D), BoNT/D  $\Delta$ 795-869 (E) und BoNT/D  $\Delta$ 841-869 (F).

## 4.4. Punktmutanten

### 4.4.1. Mutation von Aminosäuren, die mögliche Schlüsselpositionen für pH-induzierte Konformationsänderungen darstellen

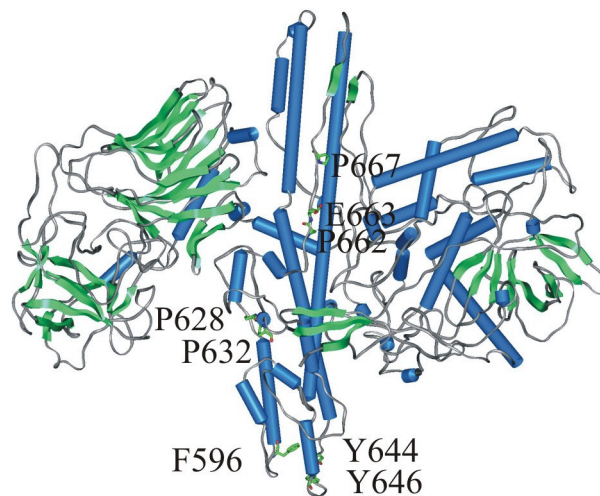
Durch Mutationen von hochkonservierten Aminosäuren innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne sollten denkbare Bereiche, die in Konformationsänderungen involviert sind, ausfindig gemacht werden. Die Aminosäuren P628, P632 (PP), P662, E663 und P667 (PEP) wurden mutiert und als Mehrfachmutanten untersucht (Abb. 13, 16). Durch den Doppelbindungscharakter der C-N Bindung der Peptidbindung gibt es prinzipiell für die benachbarten C $\alpha$ -Atome eine cis- und eine trans-Stellung. Die trans-Stellung ist bei allen Peptidbindungen energetisch wesentlich günstiger. Einzige Ausnahme sind X-Pro Peptidbindungen. Hier wird durch die Methylengruppe des Prolinrings die trans-Stellung sterisch destabilisiert, so dass die trans-Stellung nur noch geringfügig günstiger ist als cis. Im Gleichgewicht liegen bei entfalteten Proteinen bereits etwa 10-30 % aller X-Pro-Peptidbindungen im cis-Zustand vor (Abb. 12). Damit ist die Prolinisomerisierung für die Heterogenität des entfalteten Zustands entscheidend mitverantwortlich. Die Isomerisierung ist ein langsamer Prozess mit einer relativ hohen Aktivierungsenergie von ca. 80 kJ/mol (Halbwertszeit der Reaktion bei Raumtemperatur ca. 100 Sekunden). Die Lage des Isomerisierungsgleichgewichtes ist pH abhängig (Steinberg *et al.*, 1960) und so können bei pH induzierten Umfaltungen eines Moleküls diese Isomerisierungen entscheidend für globale Änderungen der Struktur sein, wie es u.a. für Diphtherietoxin diskutiert wird (Johnson *et al.*, 1993, Schmid *et al.*, 1993b, DeLeers *et al.*, 1983).



**Abbildung 12: Cis/trans Isomerisierung von Prolinen.** Dargestellt ist die langsam verlaufende Isomerisierungsreaktion von Prolinen im Peptidverbund vom trans- zum cis-Zustand (Nelson & Cox, 2001).

Neben der hohen bis strikten Konservierung war ein zusätzliches Kriterium für die Auswahl dieser Aminosäuren die Lage innerhalb der für BoNT/D berechneten potentiellen Transmembranregion, die die von Oblatt-Montal *et al.* (1995) untersuchte Peptidsequenz enthielt.

Eine strukturell wichtige Interaktion innerhalb einer Molekülstruktur sind  $\pi$ -elektronische Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen, die „sandwich-artig“ angeordnet sind. Über solche Wechselwirkungen kann zum einen die Struktur im Ausgangszustand, zum anderen können aber auch Übergangszustände bei strukturellen Umfaltungen stabilisiert werden. In BoNT/D, aber auch in den Strukturen der Serotypen A und B zeigt sich eine solche „ $\pi$ -stacking“ Interaktion am C-terminalen Bereich der ersten 105 Å langen  $\alpha$ -Helix, die zwischen den strikt konservierten Aminosäuren Y744, Y747 und F596 ausgebildet wird. Um zu untersuchen, ob die Interaktionen zwischen diesen Resten strukturelle Änderungen beeinflussen, wurden diese zu nicht aromatischen Aminosäuren mutiert und als Mehrfachmutante untersucht (Abb. 13 und Abb. 16).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung von mutierten Aminosäuren, die mögliche Schlüsselpositionen für pH-Wert induzierte Konformationsänderungen darstellen.** Anhand der Kristallstruktur von BoNT/A (3BTA) sind die Positionen der mutierten Aminosäuren schematisch dargestellt (blau =  $\alpha$ -Helix, grün =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil). Zur besseren Betrachtung sind die entsprechenden Aminosäuren in „stick“-Form gerendert dargestellt.

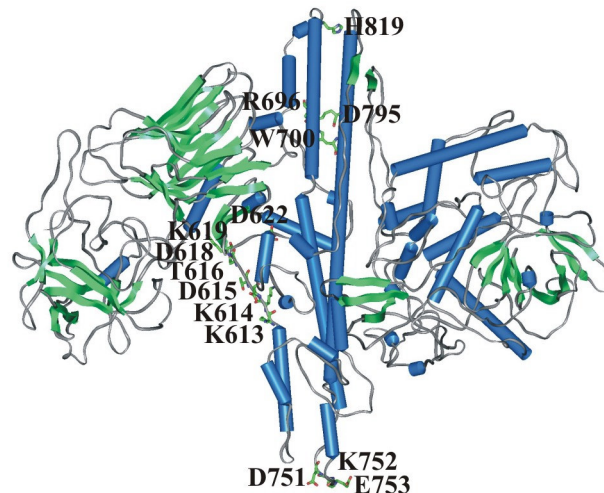
#### 4.4.2. Mutation oberflächenexponierter Aminosäuren, die möglicherweise pH-induzierte Konformationsänderungen auslösen können

Durch Clustering von geladenen Aminosäuren kann es zu einer Änderung des  $pK_a$ -Wertes der Seitenkette kommen, so dass diese bereits beim pH-Wert, wie er in Endosomen vorliegt, protoniert werden. Normalerweise kann nur Histidin mit einem  $pK_a$ -Wert von 6 unter physiologischen pH Bedingungen den Protonierungszustand ändern, in entsprechender Umgebung jedoch auch Aspartat ( $pK_a$  3,7) und Glutamat ( $pK_a$  4,3). Anhand der Kristallstrukturen von BoNT/A und B und der „gemodelten“  $H_N$ -BoNT/D Struktur wurden nach Berechnung von elektrostatischen Oberflächen „geclusterte“ geladene und konservierte Bereiche der  $H_N$ -Domäne analysiert. Möglicherweise können pH-vermittelte Protonierungen oder Deprotonierungen einzelner Aminosäuren dieser Bereiche Einfluss auf eine Konformationsänderung des Moleküls durch Aufhebung oder Entstehung von Wechselwirkungen haben. Diese Aminosäuren stellten demnach einen denkbaren „pH-



Schalter“ dar. Folgende oberflächenexponierte Aminosäuren wurden für eine Mutationsanalyse ausgewählt: D618, K619 und D622 (DKD) in allen acht Serotypen konservierte Aminosäuren, und K613, K614 und D615 (KKD), hochkonservierte Aminosäuren, die Interaktionen durch Wasserstoffbrücken innerhalb der Translokationsdomäne ausbilden. Bei den zuerst genannten Aminosäuren (DKD) konnten in der Struktur von BoNT/B, zusätzlich zu Wechselwirkungen innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne, Wasserstoffbrücken zwischen der H<sub>N</sub>- und der H<sub>C</sub>-Domäne identifiziert werden (Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000).

Des Weiteren wurden die konservierten Aminosäuren D751, K752, E753 (DKE) und die strikt konservierten Aminosäuren R696, W700 und D795 (RWD) mutiert. Durch Protonierung von D751 und E753 könnte die Schleife, die die beiden 105 Å langen  $\alpha$ -Helices verbindet, unpolarer werden und dadurch Interaktionen mit Membranen verstärkt werden. Durch Protonierung von D795 könnten die von R696, W700 und D795 ausgebildeten Wasserstoffbrücken, die die beiden 105 Å langen  $\alpha$ -Helices verbinden, abgebaut und somit die Interaktion zwischen den  $\alpha$ -Helices vermindert werden. Als Einzelmutanten wurden die hochkonservierten Aminosäuren T616 und H819 untersucht. Die Positionen sind schematisch in der Struktur (Abb. 14) und im Sequenzalignment (Abb. 16) zu sehen.

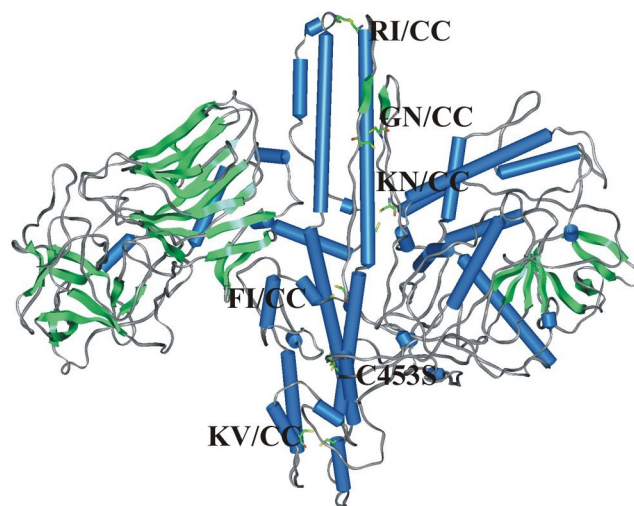


**Abbildung 14: Schematische Darstellung möglicher pH sensitiver Aminosäuren.** Anhand der Kristallstruktur von BoNT/A (3BTA) sind die Positionen der ausgewählten Mutanten schematisch dargestellt (blau =  $\alpha$ -Helix, grün =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil). Zur besseren Betrachtung sind die entsprechenden Aminosäuren in „stick“-Form gerendert dargestellt.

#### 4.4.3. Cystein-Mutanten

In diesem Ansatz sollten Bereiche der Translokationsdomäne durch zusätzlich eingeführte Disulfidbrücken verknüpft werden, so dass dadurch Umfaltungsprozesse während der Translokation blockiert wären. Die Bindungslänge einer Disulfidbindung beträgt 2.1 Å. Aus diversen Publikationen (Duché *et al.*, 1996; Duché *et al.*, 1994; Falnes *et al.*, 1994; Falnes &

Olsnes, 1995; Zhan *et al.*, 1994) geht hervor, dass aber auch Aminosäuren befähigt sind, Disulfidbrücken zu bilden, die räumlich weiter entfernt liegen. Die SH-Gruppen der hier modellierten Cysteinmutanten liegen 2,4-3,6 Å entfernt. Dieses wurde durch anhand der „gemodelten“ Struktur von H<sub>N</sub>-BoNT/D evolviert. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die gewählten Aminosäuren konserviert sind. Zu Cystein mutiert wurden die Aminosäuren R681 und I822 (RI/CC), welche die beiden 105 Å langen  $\alpha$ -Helices verknüpfen, G670 und N476 (GN/CC), welche die berechnete Transmembranregion (Kap. 4.2.) mit dem Gürtel verknüpfen, K491 und N851 (KN/CC), welche den Gürtel mit dem Verbindungsstück zwischen H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub> verbinden, F718 und I781 (FI/CC), welche einen Teil der amphiphatischen Regionen mit einer der 105 Å langen  $\alpha$ -Helices verbinden, und K745 und V591 (KV/CC), welche ebenfalls einen Teil der amphiphatischen Regionen mit einer der 105 Å langen  $\alpha$ -Helices verbinden. In einem anderen Ansatz wurde C453 in S mutiert, um die Disulfidbrücke zwischen schwerer und leichter Kette zu zerstören und somit die Einflüsse dieser auf die Translokation zu untersuchen. Eine schematische Übersicht bieten die Abbildungen 15 und 16.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der zu Cystein mutierten bzw. des mutierten Cystein-Restes.** Anhand der Kristallstruktur von BoNT/A (3BTA) sind die Positionen der ausgewählten Aminosäuren gezeigt (blau =  $\alpha$ -Helix, grün =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil). Zur besseren Betrachtung sind die entsprechenden Aminosäuren in „stick“-Form gerendert dargestellt.

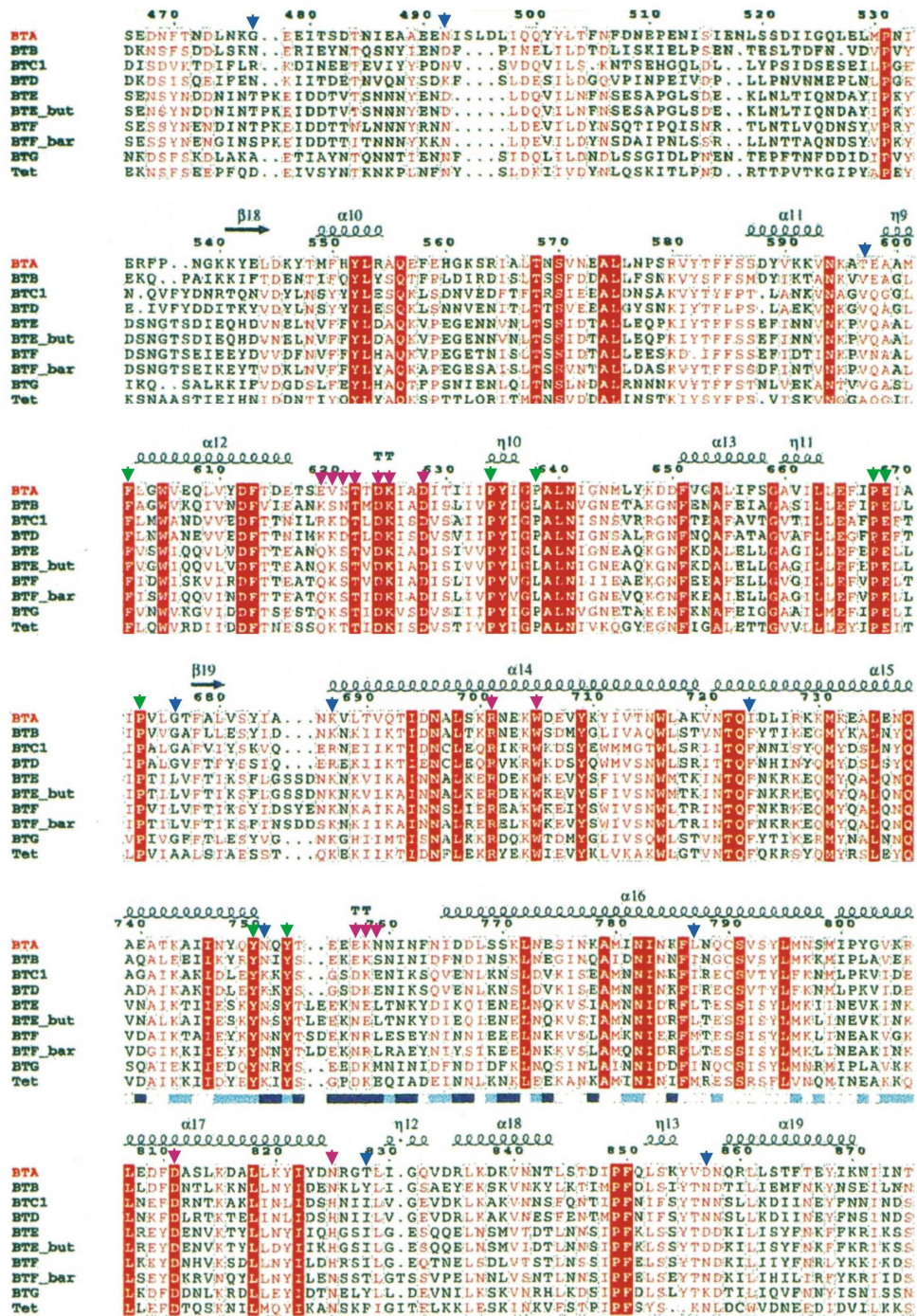


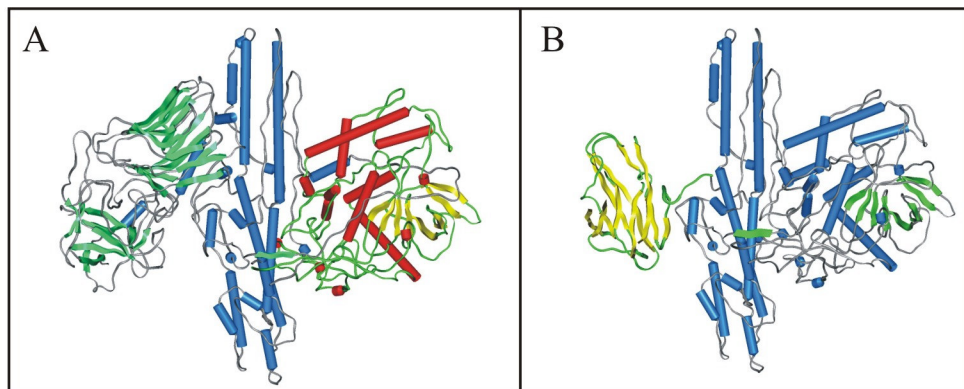
Abbildung 16: Positionen der mutierten Aminosäuren innerhalb eines Sequenzalignments der H<sub>N</sub>-Domäne. Das Sequenzalignment (BTx = BoNT/A-G, but = *C. butyricum*, bar = *C. barati*) wurde aus Lacy & Stevens (1999) entnommen und umfasst den Bereich der H<sub>N</sub>-Domäne (Rot = stark konservierte Aminosäure, rot unterlegt = strikt konservierte Aminosäure). Mutierte Positionen in BoNT/D sind durch Pfeile markiert (Blau = Kap. 4.4.3., Violett = Kap. 4.4.2., Grün = Kap. 4.4.1.).



## 4.5. Chimäre Proteine

Durch Ersetzen abgeschlossener Domänen durch andere, sollten Rückschlüsse gezogen werden, ob die Domänen autark arbeiten können. Im ersten Ansatz wurde die leichte Kette von BoNT/D ersetzt durch die des Serotyps A (Abb. 17). Die Homologie unter den Serotypen ist bezüglich der leichten Kette nicht sehr hoch (etwa 35 % durchschnittlich), so dass dadurch zum einen getestet werden sollte, ob eine andere leichte Kette durch die schwere Kette transloziert wird, bzw. ob die dabei eventuell nötigen Wechselwirkungen auch mit anderen Proteinen ausgebildet werden können. Die leichte Kette wurde direkt an die schwere Kette von BoNT/D fusioniert. Dabei entstammte das eine Cystein, welches die Disulfidbrücke zwischen den Ketten aufbaut, der schweren Kette von BoNT/D und das andere der leichten Kette von BoNT/A.

In einem zweiten Ansatz wurde die Bindungsdomäne von BoNT/D durch die von Diphtherietoxin ersetzt (Abb. 17). Zwischen LH<sub>N</sub>-BoNT/D und der Bindungsdomäne von Diphtherietoxin wurden vier Glycine als flexibler Spacer eingebaut. Durch den Ersatz der neuronalen Bindungsdomäne sollte das Molekül nicht mehr an neuronale, sondern an epitheliale Zellen binden, auf denen eine hohe Zahl an Rezeptoren für das Diphtherietoxin vorhanden ist.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der erzeugten chimären Proteine.** Bild A zeigt schematisch den Austausch der leichten Kette von BoNT/D durch die von BoNT/A, Bild B die Substitution der H<sub>C</sub>-Domäne von BoNT/D durch die Bindungsdomäne von Diphtherietoxin. Die Strukturen wurden nach den Datensätzen von Lacy *et al.*, 1998 (3BTA) und Benneth *et al.*, 1994 (1DDT) gebildet (blau bzw. rot =  $\alpha$ -Helix, türkis bzw. gelb =  $\beta$ -Faltblatt, grau bzw. grün = Turns, Random Coil).

## 4.6. Fusionsproteine

Eine Nutzung von AB-Toxinen als Proteintransporter wurde durch viele Ansätze an verschiedenen AB-Toxinfragmenten getestet (Kap. 1.5.). Für clostridiale Neurotoxine, die aufgrund ihrer „Neuroselektivität“ besonders interessant sind, gab es bislang keine Untersuchungen, die eine zytosolische Auslieferung der angehängten Protein belegen konnten. Durch Konstruktion von BoNT/D Fusionsproteinen sollte untersucht werden, ob

zusammen mit der leichten Kette - im „Huckepack-Verfahren“ - andere Proteine verschiedener Beschaffenheit in das Zytosol transloziert werden können. Dieser Ansatz kann zum einen Einblicke in den Translokationsmechanismus, zum anderen in die mögliche Nutzung des Moleküls als potentieller Proteintransporter liefern.

Für die Fusion ausgewählt wurden Dihydrofolatreduktase (DHFR), das antiapoptotisch wirkende Protein Bcl-2, das grün fluoreszierende Protein (GFP) und die Enzyme Luziferase (Luc), sowie die leichte Kette von BoNT/A (LC/A) (Abb. 18).

Die Dihydrofolatreduktase aus der Maus ist ein 21 kDa großes Protein, welches gleichermaßen aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern besteht (Sawaya *et al.*, 1997). Mit diesem Protein sollte die Notwendigkeit der Entfaltung während der Translokation untersucht werden. Der Entfaltungsprozess von DHFR kann spezifisch durch Bindung des Folatantagonisten Methotrexat inhibiert werden (Beaumelle *et al.*, 1997; Salvador *et al.*, 2000; Eilers und Schatz, 1986). Somit wird das Protein in einer gefalteten, globulären Struktur stabilisiert und kann sich bei Translokationsprozessen nicht mehr entfalten.

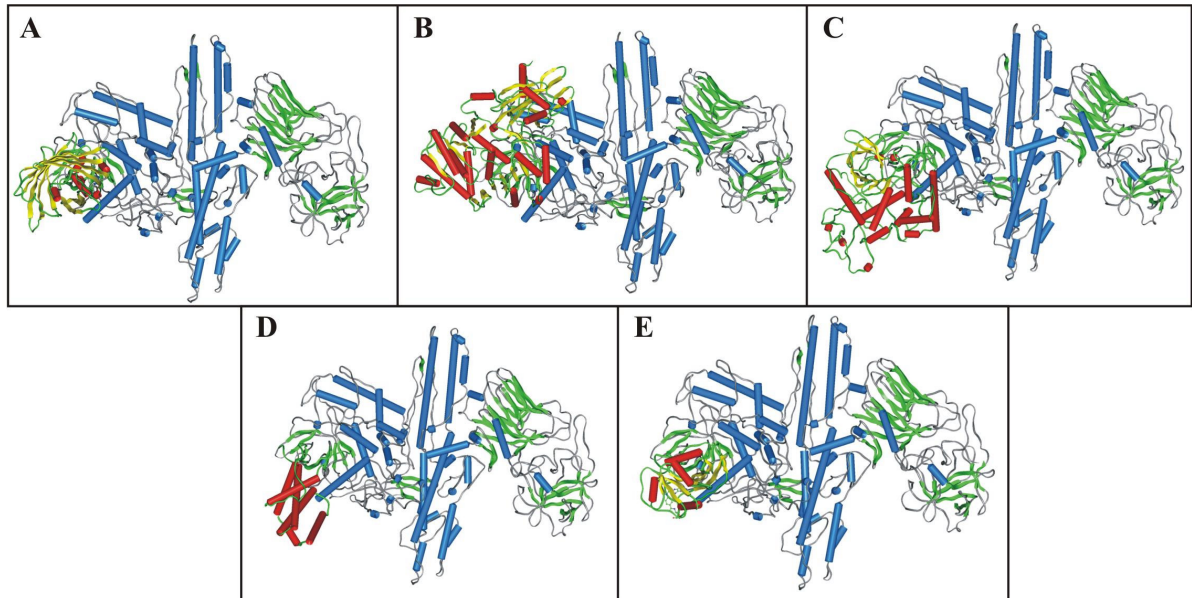
Die Fusion mit Bcl-2 sollte neben der Untersuchung der Translokation einen Transfer in Richtung eines neuronalen Transporters für therapeutisch nutzbare Substanzen darstellen. Der Name „Bcl“ ist von chronischer lymphatischer B-Zellen-Leukämie abgeleitet und wurde Genen gegeben, die in diese Krankheit involviert sind. Mitglieder der Bcl-2 Familie besitzen homologe Domänen (BH), über welche Homo- oder Heterodimerisierung vermittelt wird. Apoptose oder Überleben einer Zelle ist reguliert durch relative Balance von proapoptotischen (Bax, Bcl-XS, Bcl-XL, Bad, Bar) oder anti-apoptotischen (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Dad-1) Mitgliedern dieser Familie und ihrer Heterodimerisierung. Murines Bcl-2 ist ein 26 kDa Protein, welches als Sekundärstrukturmerkmal überwiegend  $\alpha$ -Helices aufweist.

GFP, aus dem Organismus *aequorea victoria*, ist ein 26 kDa großes hauptsächlich aus  $\beta$ -Fasstruktur bestehendes Protein (Brejc *et al.*, 1997). Es kann aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften zur direkten Detektion der Fusionsproteine in Zellen benutzt werden.

Die leichte Kette von Serotyp A, ein ~50 kDa großes Protein, sollte strukturell ähnlich wie die leichte Kette von Serotyp D aufgebaut sein. Dieses konnte durch Modellanalysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Mit ihr und der Luziferase sollte überprüft werden, ob der Raumbedarf des fusionierten Moleküls, der ungefähr analog LC/D ist, wichtig ist für die Translokation, bzw. ob die Translokation durch die Größe der fusionierten Proteine limitiert wird. Zum anderen kann die katalytische Aktivität der leichten Kette als Reporter dienen, um die Effizienz der Translokation nachzuweisen (Blasi *et al.*, 1993; Kalandakanond & Coffield, 2001).

Die Luziferase, aus dem Insekt *photinus pyralis*, ist mit 62 kDa größer als die leichte Kette von BoNT/D selbst und besteht aus einer  $\alpha$ -helical dominierten globulären, Zwei-

Domänenstruktur (Conti *et al.*, 1996). Sie kann durch Reaktion mit ihrem Substrat Luziferin unter ATP und Sauerstoffverbrauch Biolumineszenz erzeugen, die die höchste Leuchtintensität der bekannten Biolumineszenzreaktionen aufweist. Daher ist die Luziferase ideal zur Detektion kleinster Mengen geeignet.

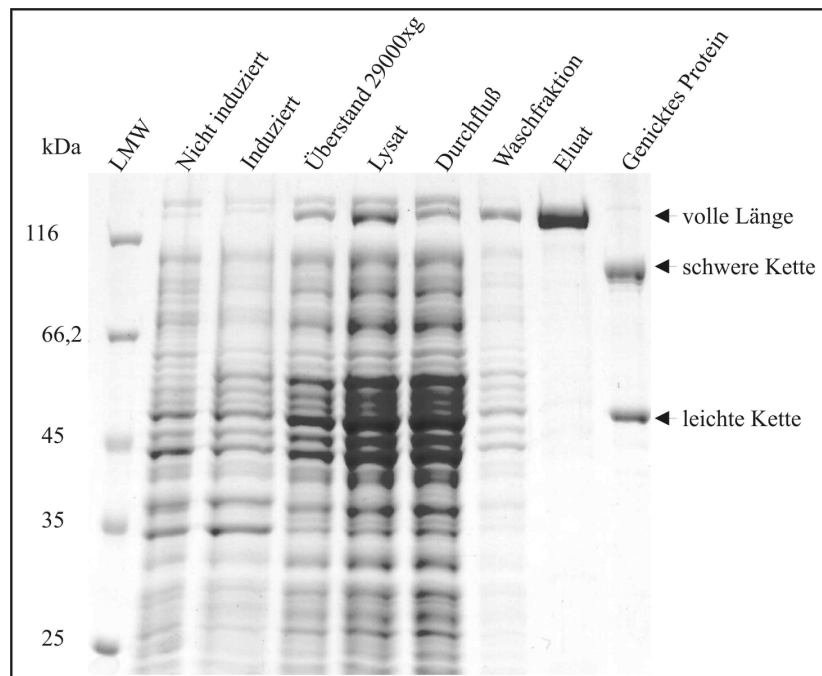


**Abbildung 18: Schematische Darstellung der erzeugten Fusionsproteine.** Bild A zeigt schematisch die Fusion von GFP, Bild B die Fusion von Luziferase, Bild C die Fusion von LC/A, Bild D die Fusion von Bcl-2 und Bild E die Fusion von DHFR-Mtx an BoNT/D. Die Strukturen wurden nach den Datensätzen von Lacy *et al.*, 1998 (3BTA: BoNT/A, LC/A), Brejc *et al.*, 1997 (1EMB: GFP), Petros *et al.*, 2001 (1G5M: Bcl-2), Sawaya *et al.*, 1997 (1RG7: DHFR) und Conti *et al.*, 1996 (1LCI: Luziferase) gebildet (blau bzw. rot =  $\alpha$ -Helix, türkis bzw. gelb =  $\beta$ -Faltblatt, grau bzw. grün = Turns, Random Coil).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Produktion von rekombinantem BoNT/D, Mutanten und Fusionsproteinen

BoNT/D wurde nach der in Kap. 3.2.1. beschriebenen Methode unter S2-Sicherheitsbedingungen produziert und gereinigt. Die Expression von aktivem BoNT/D erzielte Ausbeuten von  $2,5 \pm 0,6$  mg/l Protein. Dieses kann spezifisch zwischen leichter und schwerer Kette mit immobilisiertem Trypsin genickt werden. Ein typischer Aufreinigungsverlauf ist in Abbildung 19 zu sehen.



**Abbildung 19: Expression und Reinigung von BoNT/D.** Verlauf der Aufreinigung von BoNT/D nach Kap. 3.2.1. Die rechte Spur zeigt das Protein nach proteolytischer Aktivierung (Kap. 3.7.1.) unter reduzierenden Bedingungen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines 10 %igen Gels und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. LMW: Molekularmassenstandard.

Die Deletionen im Bereich der  $H_N$ -Domäne hatten große Auswirkung auf die lösliche Proteinausbeute (Tab. 4), was darauf hindeutet, dass die Struktur erheblich beeinträchtigt ist. Dass sich die Entfernung einer Teildomäne wesentlich stärker auf die Ausbeute an löslichem Protein auswirkt als die Entfernung einer gesamten, strukturell abgeschlossenen Domäne, konnte in vorhergehenden Arbeiten, in denen versucht wurde, Teile der schweren oder leichten Kette zu deletieren, gezeigt werden (Bade, 1999; Rummel, 1999). Auch hier kann bestätigt werden, dass die Deletion der gesamten  $H_N$ -Domäne weniger nachteilig verläuft als die Deletion von Teilbereichen. Eine Ausnahme stellt die Deletion 841-869 dar, die ähnlich viel Protein wie BoNT/D  $\Delta H_N$  lieferte (Tab. 4).

Tabelle 4 : Charakterisierung von hergestellten BoNT/D-Mutanten.

	Protein	Ausbeute [mg/l]	Nicking	Disulfid- Brücke	Bindung [%]	katal. Aktivität [%]
<b>Wildtyp</b>	BoNT/D	2,500 ± 0,600	ja	ja	100 ± 4	100 ± 12
<b>Deletionsmutanten</b> (siehe Kap. 4.3.)	BoNT/D ΔH <sub>N</sub>	0,364 ± 0,044	nein	k.A.	109 ± 13	200 ± 7
	BoNT/D Δbelt	0,026 ± 0,003	ja	nein	95 ± 8	179 ± 15
	BoNT/D Δ578-632	0,182 ± 0,022	ja	ja	98 ± 2	n.e.
	BoNT/D Δ661-714	0,052 ± 0,006	nein	k.A.	93 ± 8	n.e.
	BoNT/D Δ841-869	0,364 ± 0,048	ja	ja	102 ± 3	n.e.
	BoNT/D Δ795-869	0,026 ± 0,003	nein	k.A.	99 ± 4	n.e.
<b>Punktmutanten</b> (siehe Kap. 4.4.1.)	BoNT/D PP/GG	1,196 ± 0,144	ja	ja	100 ± 3	95 ± 15
	BoNT/D PEP/AQA	2,028 ± 0,243	ja	ja	106 ± 5	167 ± 31
	BoNT/D YYF/AAA	0,832 ± 0,141	ja	ja	93 ± 10	132 ± 5
(siehe Kap. 4.4.2.)	BoNT/D DKD/AAA	0,962 ± 0,241	ja	ja	98 ± 9	131 ± 15
	BoNT/D D618A	1,144 ± 0,137	ja	ja	95 ± 8	118 ± 6
	BoNT/D K619A	0,963 ± 0,112	ja	ja	93 ± 8	121 ± 13
	BoNT/D D622A	0,910 ± 0,218	ja	ja	99 ± 5	115 ± 23
	BoNT/D DKE/AAA	2,964 ± 0,356	ja	ja	103 ± 6	145 ± 27
	BoNT/D KKD/AAA	1,924 ± 0,637	ja	ja	109 ± 11	128 ± 9
	BoNT/D RWD/AAG	2,158 ± 0,264	ja	ja	97 ± 6	113 ± 17
	BoNT/D T616A	0,486 ± 0,056	ja	ja	96 ± 6	106 ± 13
	BoNT/D H819A	1,560 ± 0,187	ja	ja	99 ± 4	104 ± 9
(siehe Kap. 4.4.3.)	BoNT/D C453S	0,962 ± 0,115	ja	nein	102 ± 3	128 ± 5
	BoNT/D RI/CC	1,300 ± 0,156	ja	ja	104 ± 3	114 ± 17
	BoNT/D KV/CC	3,458 ± 0,415	ja	ja	99 ± 5	n.e.
	BoNT/D KN/CC	1,872 ± 0,225	ja	ja	106 ± 7	n.e.
	BoNT/D GN/CC	1,872 ± 0,326	ja	ja	103 ± 4	n.e.
	BoNT/D FI/CC	1,066 ± 0,128	ja	ja	107 ± 9	n.e.
<b>Chimäre</b> (siehe Kap. 4.5.)	LC/A-HC/D	0,104 ± 0,012	ja	nein	103 ± 6	<b>n.d.</b>
	LH <sub>N</sub> /D-H <sub>C</sub> /DT	0,195 ± 0,023	ja	ja	<b>n.d.</b>	170 ± 9
<b>Fusionsproteine</b> (siehe Kap. 4.6.)	GFP- LH <sub>N</sub> /D-H <sub>C</sub> /DT	0,104 ± 0,012	ja	ja	<b>n.d.</b>	152 ± 5
	GFP-BoNT/D	0,494 ± 0,059	ja	ja	99 ± 5	107 ± 17
	Luc-BoNT/D	0,130 ± 0,018	ja (*)	ja	99 ± 4	113 ± 12
	Luc-BoNT/D DKD/AAA	0,234 ± 0,028	ja (*)	ja	110 ± 12	n.e.
	Luc-BoNT/D KKD/AAA	0,416 ± 0,050	ja (*)	ja	97 ± 6	n.e.
	Luc-BoNT/D YYF/AAA	0,260 ± 0,031	ja (*)	ja	95 ± 8	n.e.
	Luc-BoNT/D D618A	0,104 ± 0,012	ja (*)	ja	99 ± 4	n.e.
	Luc-BoNT/D K619A	0,130 ± 0,016	ja (*)	ja	102 ± 3	n.e.
	Luc-BoNT/D D622A	0,104 ± 0,012	ja (*)	ja	100 ± 3	n.e.
	DHFR-BoNT/D	0,936 ± 0,159	ja (*)	ja	98 ± 7	120 ± 5
	Bcl-2-BoNT/D	0,001 ± 0,000	ja	ja	99 ± 5	148 ± 9
	LC/A-BoNT/D	0,156 ± 0,019	ja	ja	103 ± 6	143 ± 14
	LC/A-BoNT/D E230A	0,130 ± 0,016	ja	ja	102 ± 3	<b>n.d.</b>

(\*) = fusioniertes Protein wird durch Trypsin angegriffen, n.d. = nicht detektierbar, n.e. = nicht ermittelt, katalytische (katalyt.) Aktivität zum Zeitpunkt 5 Min bei 37°C verglichen, k.A. = keine Angaben möglich.

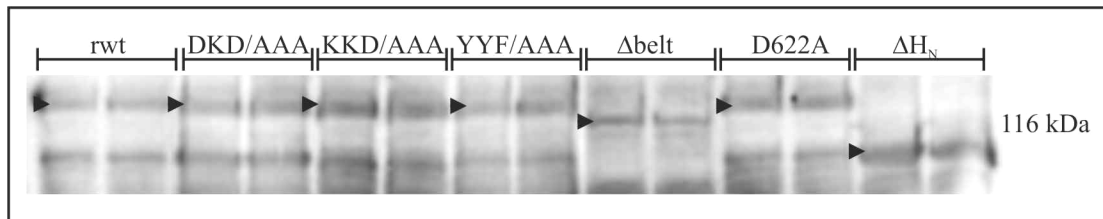
Die Mutation von ein bis drei Aminosäuren der H<sub>N</sub>-Domäne von BoNT/D hatte zum Teil einen Einfluss auf die Ausbeute an löslichem Protein. Dieses könnte auf minimale Änderungen der Struktur hinweisen, die durch Einführung der Mutationen entstanden sind. Tabelle 4 zeigt die Ausbeuten der unterschiedlichen Mutanten. Die Proteinausbeuten der Chimären und Fusionsproteine waren höher als die einiger Deletionsmutanten. Insgesamt scheint die Einführung von zusätzlichen Domänen in das Molekül die Ausbeute ähnlich zu beeinflussen wie die Deletion. Auffällig ist, dass für die Fusion Luc-BoNT/D durch zusätzliche Einführung von Mutationen in die H<sub>N</sub>-Domäne die Ausbeute teils sogar verbessert wird. Auf jeden Fall lässt sich im Luc-BoNT/D Fusionsprotein keine Destabilisierung durch die Mutationen feststellen, wie es für den Fall der Punktmutanten auftrat. Tendenziell verhält sich die Größe des fusionierten Proteins umgekehrt proportional zur Ausbeute an löslichem Protein. Einen Sonderfall stellt Bcl-2-BoNT/D dar. Hierbei konnte nach Induktion ein toxischer Effekt des Proteins auf *E. coli* festgestellt werden, da kaum ein Bakteriensediment im Vergleich zu parallel induzierten anderen Fusionsproteinen zu erzielen war. Somit konnte in diesem Fall nur eine sehr geringe Menge an löslichem Protein – ungefähr 1 µg/l – isoliert werden. Mögliche Ursachen könnten die „Codonusage“ des Bcl-2 Gens und eine Beeinträchtigung der Faltung von Bcl-2 sein. Diese Vermutung erklärt jedoch nicht das Absterben der *E.coli* nach Induktion.

Als erster Anhaltspunkt für die korrekte Faltung der exprimierten Proteine diente das Nicking der Proteine. Dabei wurde zum einen getestet, ob der exponierte trypsinsensitive Spaltbereich zwischen HC und LC genauso gut wie der des Wildtyps gespalten werden kann, zum anderen wurde das Vorhandensein der Disulfidbrücke zwischen HC und LC geprüft. Tabelle 4 zeigt die Resultate für alle Proteine in einer Übersicht.

Die meisten Proteine wurden gemäß dem Wildtyp zwischen HC und LC genickt und bildeten die Disulfidbrücke aus, einige jedoch sind verglichen mit dem Wildtyp wesentlich empfindlicher gegenüber Trypsin, was sich in einem Abbau der schweren Kette während des Nickings äußerte (Kap. 5.3.1.). Einige Proteine bildeten keine Disulfidbrücke aus, möglicherweise aufgrund von strukturellen Spannungszuständen, und zwei der Deletionsmutanten sind auch bei gegenüber der Standardmenge zehnfach höheren Trypsinkonzentrationen, nicht zwischen HC und LC zu spalten. Dieses deutet daraufhin, dass die Spaltstelle nicht mehr wie beim Wildtyp exponiert ist und könnte ein Hindernis für die Translokation der leichten Kette bedeuten.

Um weiterhin auszuschließen, dass durch eingeführte Mutationen oder Fusionen Änderungen in den durch H<sub>C</sub> oder LC vermittelten Eigenschaften im Vergleich zum Wildtyp entstanden sind, wurden Bindungsexperimente an Rattenhirn-Synaptosomen und Spaltungsanalysen mit dem Substrat von BoNT/D, Synaptobrevin2, durchgeführt. Botulinumtoxine binden spezifisch, vermittelt durch komplexe Ganglioside, an neuronale Zellen. Synaptosomen, eine Suspension von geschlossenen synaptischen Endköpfchen, enthalten wie intakte Nervenzellen komplexe Ganglioside in hoher Konzentration. Der Nachweis erfolgte nach

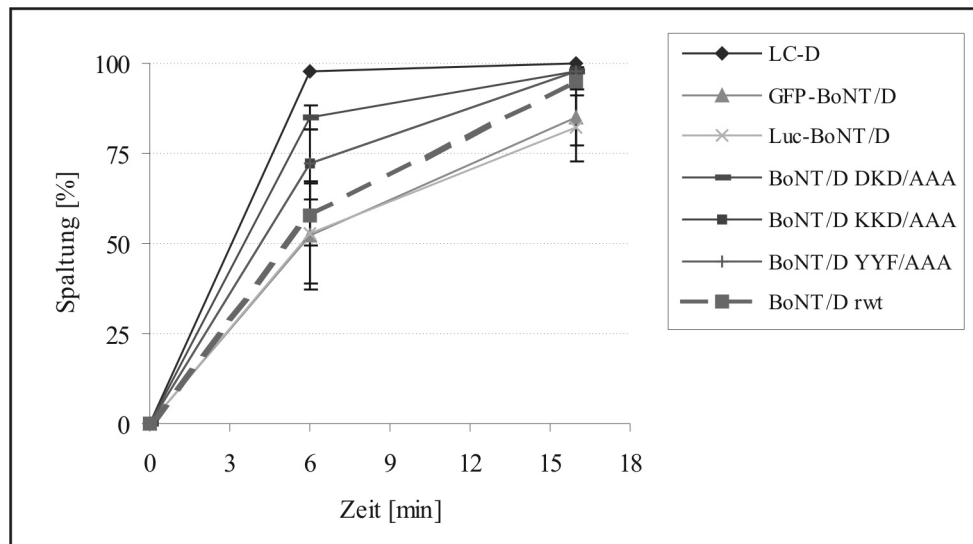
Bindung immunochemisch über *Strep*-tag<sup>®</sup> spezifisches Antiserum, was sowohl den Nachweis kleinster Mengen als auch die quantitative Auswertung ermöglichte.



**Abbildung 20: Bindung von rekombinantem BoNT/D und davon abgeleiteten Mutanten an Synaptosomen.** Die Proteine wurden in jeweils zwei getrennten Ansätzen an Synaptosomen gebunden. Der Nachweis erfolgte mit *Strep*-tag<sup>®</sup> Antiserum. Gezeigt ist die Bindung von BoNT/D (rwt), BoNT/D DKD/AAA, BoNT/D KKD/AAA, BoNT/D YYF/AAA, BoNT/D  $\Delta$ belt, BoNT/D D622A und BoNT/D  $\Delta$ H<sub>N</sub>.

In Abbildung 20 ist exemplarisch die Bindung einiger Mutanten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Die Bindung wurde quantifiziert und ist in Tabelle 4 für alle Proteine aufgelistet. Keine der Mutanten wies eine statistisch gesicherte verminderte Bindung auf.

Für die Durchführung der *in vitro* Substratspaltungs-Analysen wurden die BoNT/D Proteine zunächst mit immobilisiertem Trypsin genickt und anschließend mit Dithiothreitol (DTT) reduziert. Dieses reduziert die Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette und erhöht die *in vitro* Aktivität wahrscheinlich durch eine mögliche Ablösung des Gürtels von dem aktiven Zentrum der leichten Kette. Es konnte in den Kristallstrukturen von BoNT/A und B festgestellt werden, dass der Gürtelbereich bei BoNT/A den Zugang aktiven Zentrum verwehrt, bei BoNT/B hingegen dem Substrat den Zugang zumindest partiell ermöglicht (Lacy *et al.*, 1998; Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000). Der Befund für BoNT/A erwies sich auch für BoNT/D als zutreffend. Ohne die „Trypsin-DTT“ Behandlung wurden auch nach 45 minütiger Inkubation nur 30 % des eingesetzten Substrates gespalten. Nach Reduzierung der Proteine erfolgte die Umsatzreaktion mit dem Substrat Synaptobrevin2  $\Delta$ TM unter Substratsättigungsbedingungen. Es enthält im Gegensatz zum Wildtyp keine Transmembranregion, was die Ausbeute an löslichem Protein drastisch erhöht. Die Katalyse wird dadurch nicht beeinträchtigt (Yamasaki *et al.*, 1994).



**Abbildung 21:** Die *in vitro* Substratspaltungseffizienz von BoNT/D wird durch Mutationen oder Fusionen nicht beeinträchtigt. Die BoNT/D-Derivate wurden unter Substratsättigungsbedingungen mit Synaptobrevin2  $\Delta$ TM bei 37°C inkubiert. Nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung wurde der Anteil an umgesetztem Substrat im Verhältnis zur Ausgangsmenge ermittelt und als %-Spaltung ausgedrückt.

In Abbildung 21 sind die Substratspaltungskinetiken ausgewählter Mutanten gezeigt. Auffällig ist, dass der Anfangsumsatz bei einigen Proteinen die Katalysegeschwindigkeit der leichten Kette nicht erreicht. Erklärbar ist dieses durch unvollständige Reduktion oder Nicking der Proteine, deren katalytische Wirkung somit durch den Gürtelbereich inhibiert wurde. Wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, konnte für die katalytische Aktivität der untersuchten Mutanten und Fusionsproteine kein nachteiliger Effekt im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

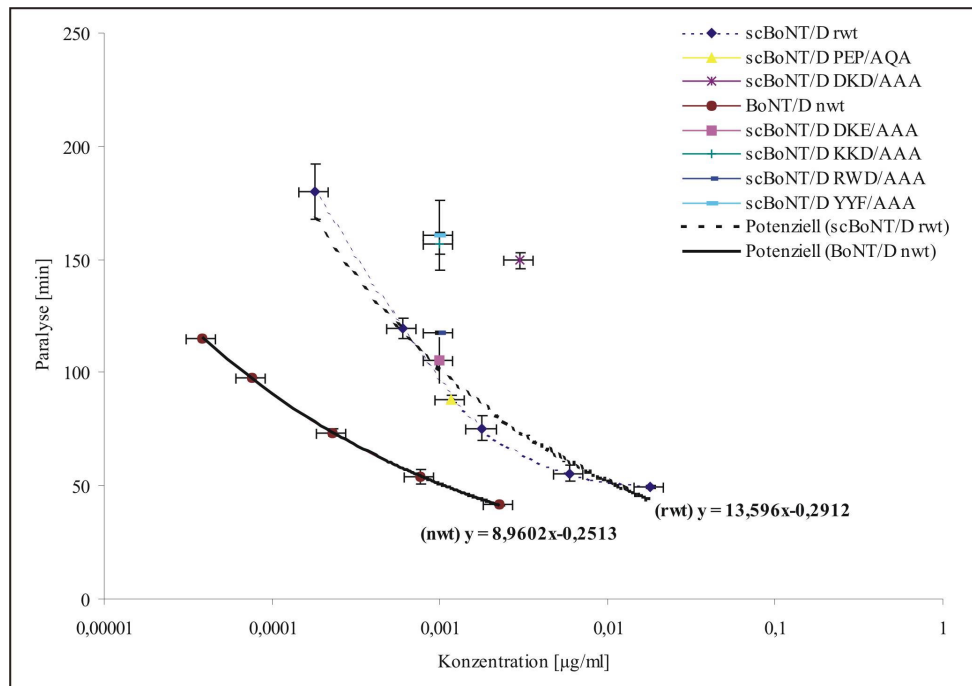
## 5.2. Funktionelle Analysen von H<sub>N</sub>-Domäne Mutanten

Die hergestellten Deletionsmutanten, die eine Einsicht in die Funktion verschiedener Bereiche der H<sub>N</sub>-Domäne gestatten sollten, und die Punktmutanten, die genaue Einblicke in die Funktion einzelner Aminosäuren für die Translokation ermöglichen sollten, wurden durch zwei experimentelle Ansätze untersucht, die indirekt die Effizienz des Translokationsprozesses messen: die Ermittlung der physiologischen Toxizität am Zwerchfell der Maus und Spaltung des Substrates Synaptobrevin2 in Rattenhirn Synaptosomen. Zur besseren Vergleichbarkeit war es nötig, die zu vergleichenden Proteine parallel zum Wildtyp zu exprimieren und aufzureinigen. Nur anhand dieses internen Vergleiches können die Toxizitäten und Spaltungsaktivitäten korrekt eingeordnet und mit anderen Präparationen verglichen werden.

Die physiologische Toxizität von BoNT/D und Derivaten kann durch Messung der Paralyse des *nervus phrenicus* eines Zwerchfelles ermittelt werden. Es wird die Toxizität und der Faktor, um den die Toxizität verändert wurde, ausgedrückt. Um reproduzierbare Ergebnisse



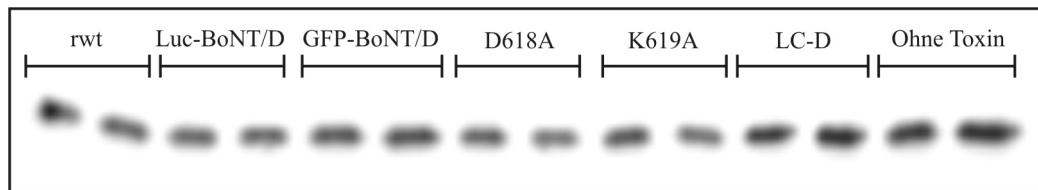
zu erhalten, wurden BoNT/D, BoNT/D Mutanten, Chimäre oder Fusionsproteine (Kap. 5.4.) in ungenickter Form gemessen, da sich zeigte, dass die schweren Ketten nach Mutation nicht in allen Fällen gleich stabil gegenüber Trypsinverdau waren wie der Wildtyp (Kap. 5.3.1.).



**Abbildung 22: Toxizität von BoNT/D am Zwerchfell der Maus.** Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven von nicht genicktem (sc) rekombinanten BoNT/D (rwt) und nativem BoNT/D (nwt), sowie Doppelbestimmungen einer einzelnen Konzentration ausgewählter Mutanten. An die Dosis-Wirkungskurven wurde eine Funktion angepasst und abgebildet. Die Paralysezeiten der mutierten Proteine werden mit der Funktion der Dosis-Wirkungskurve des rekombinanten Wildtyps in Relation gebracht, was eine Aussage über die Toxizität ermöglicht.

Abbildung 22 zeigt die Dosis-Wirkungskurven vom nicht genicktem (sc) rekombinanten Wildtyp und vom nativen Wildtyp. Weiterhin sind Doppelbestimmungen einzelner Konzentrationen ausgewählter Mutanten zu sehen. Die Standardabweichungen in x-Richtung ergaben sich aus Fehlern der Proteinkonzentrationsbestimmung, wurden aber zur Berechnung der Toxizitäten und Toxizitäts-Faktoren nicht hinzugezogen, da dieser Fehler für alle Proteine gleich sein sollte. Der native Wildtyp ist gegenüber dem nicht genickten rekombinanten Wildtyp ungefähr 10mal wirksamer (Abb. 22). Diese Differenz kann durch Nicken des rekombinanten Wildtyps ausgeglichen werden (Tab. 5). Das rekombinante Protein ist demzufolge genauso toxisch wie das native.

Mit Rattenhirn-Synaptosomen steht für die funktionelle Untersuchung von clostridiellen Neurotoxinen ein semi-*in vivo* System zur Verfügung, bei dem über die Spaltung des Substrates die Geschwindigkeit der Toxinaufnahme und die Translokation der L-Kette gemessen werden kann. Abbildung 23 stellt eine typische Analyse verschiedener Mutanten im Vergleich zum Wildtyp dar.



**Abbildung 23: Spaltung von Synaptobrevin2 in Rattenhirn-Synaptosomen.** Synaptosomen werden mit 30 nM Toxin für 50' bei 37°C inkubiert. Die Detektion des Substrates erfolgte im Western Blot durch Synaptobrevin2 spezifische Antikörper. Gezeigt ist die Substratspaltung von BoNT/D (rwt), Luc-BoNT/D, GFP-BoNT/D, BoNT/D D618A, BoNT/D K619A und LC-BoNT/D.

Die Toxinkonzentration wurde so gewählt, dass die Substratspaltung durch BoNT/D zwischen 50 und 70 % lag. Das Spaltfragment des Substrates ist nicht detektierbar, da es vermutlich intrazellulär abgebaut wird (Link *et al.*, 1992). Die Resultate der Messungen am Zwerchfell und an Synaptosomen sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5 : *In vivo* Funktionsanalyse hergestellter Proteine**

Protein	Zwerchfell		Synaptosomen
	Toxizität [%]	Toxizitäts-Faktor	Spaltungs-aktivität [%]
<b>Wildtyp</b>			
BoNT/D	100,0 ± 0,0		100 ± 7
BoNT/D genickt	815,8 ± 236,8	8,2 ± 2,4	120 ± 3
<b>Deletionsmutanten</b> (siehe Kap. 4.3.)			
BoNT/D ΔH <sub>N</sub>	n.d.	n.d.	n.d.
BoNT/D Δbelt	0,4 ± 0,2	-299,3 ± 127,3	50 ± 1
BoNT/D Δ578-632	0,1 ± 0,0	-178,6 ± 39,2	59 ± 4
BoNT/D Δ661-714	0,0 ± 0,0	-40208,7 ± 8762,7	26 ± 6
BoNT/D Δ841-869	1,0 ± 0,1	-100,0 ± 12,8	42 ± 9
BoNT/D Δ795-869	0,0 ± 0,0	-13333,3 ± 3333,3	21 ± 1
<b>Punktmutanten</b> (siehe Kap. 4.4.1.)			
BoNT/D PP/GG	71,6 ± 42,0	-2,1 ± 1,3	75 ± 7
BoNT/D PEP/AQA	131,3 ± 32,7	1,3 ± 0,3	110 ± 9
BoNT/D YYF/AAA	20,7 ± 12,0	-7,5 ± 4,5	51 ± 8
(siehe Kap. 4.4.2.)			
BoNT/D DKD/AAA	8,9 ± 3,0	-12,8 ± 4,3	40 ± 11
BoNT/D D618A	51,9 ± 23,3	-2,4 ± 1,1	53 ± 10
BoNT/D K619A	55,9 ± 2,6	-1,8 ± 0,1	70 ± 5
BoNT/D D622A	18,7 ± 5,8	-6,0 ± 1,9	43 ± 14
BoNT/D DKE/AAA	87,9 ± 61,6	-2,7 ± 1,2	105 ± 15
BoNT/D KKD/AAA	22,5 ± 8,5	-5,2 ± 2,0	45 ± 14
BoNT/D RWD/AAG	60,8 ± 13,7	-1,7 ± 0,4	80 ± 4
BoNT/D T616A	40,6 ± 21,3	-3,5 ± 1,9	70 ± 22
BoNT/D H819A	55,6 ± 54,5	-50,5 ± 49,5	93 ± 7
(siehe Kap. 4.4.3.)			
BoNT/D C453S	121,6 ± 51,1	0,1 ± 1,6	105 ± 1
BoNT/D C453S genickt	865,3 ± 250,2	8,7 ± 2,5	127 ± 5
BoNT/D RI/CC	117,4 ± 91,8	-0,9 ± 2,9	97 ± 2
BoNT/D KV/CC	85,1 ± 49,6	-0,7 ± 2,1	68 ± 27
BoNT/D KN/CC	98,8 ± 36,0	-0,1 ± 1,5	93 ± 7
BoNT/D GN/CC	140,7 ± 60,1	1,4 ± 1,6	117 ± 5
BoNT/D FI/CC	92,4 ± 58,2	-0,7 ± 2,2	113 ± 2

n.d. nicht detektierbar.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine jede Deletion die Toxizität drastisch reduzierte. Bei einer Deletion der gesamten H<sub>N</sub>-Domäne ließ sich bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml am Zwerchfell keine Toxizität feststellen. Das Molekül war, verglichen mit dem rekombinanten Wildtyp, de facto unwirksam. Dieses ist ein eindeutiger Beweis, dass die H<sub>N</sub>-Domäne für die Translokation essentiell ist. Ein ähnlich starker Effekt wurde erzielt, wenn Teile der 105 Å langen α-Helices entfernt wurden. Auch diese Bereiche scheinen absolut essentiell für die Funktionalität des Moleküls zu sein. Erstaunlicherweise bestand nach Deletion des Gürtels, eines Teils der amphiphatischen Regionen der H<sub>N</sub>-Domäne oder des Verbindungsstückes zwischen H<sub>C</sub>- und H<sub>N</sub>-Domäne noch eine Resttoxizität von ca. 1 % verglichen mit dem Wildtyp. Dieses spricht dafür, dass diese Bereiche sehr wichtig jedoch nicht essentiell sind.

Trotz der immensen Reduktion der Toxizität waren die Deletionsmutanten mit Ausnahme der Deletion der H<sub>N</sub>-Domäne noch in der Lage, ihr Substrat zu spalten. Im Unterschied zur Zwerchfellpräparation ist hier die Anzahl der vorhandenen Nervenendigungen und somit Rezeptoren ungleich höher. Weiterhin ist eine höhere Toxinkonzentration nötig, um einen messbaren Effekt zu erzielen. Aus diesen Gründen können beide Systeme nicht direkt miteinander verglichen werden. Tabelle 5 zeigt die Substratspaltung im Vergleich zum Wildtyp. Die Relation zwischen Wildtyp und Mutanten entspricht den errechneten Toxizitäten der Deletionsmutanten.

Mutationen ausgewählter Proline der H<sub>N</sub>-Domäne (Kap. 4.4.1.), die mit dem Ziel mutiert wurden, Konformationsänderungen in dieser Domäne während der Aufnahme zu beeinflussen oder gar zu unterbinden, zeigten keinen Einfluss auf die Toxizität und auf die Substratspaltung (Tab. 5), obwohl nahezu alle der mutierten Proline in allen acht Serotypen konserviert vorlagen. Daher ist eine Rolle der mutierten Proline für die Translokation ausgeschlossen. Vielmehr scheinen sie für die Stabilität des Moleküls verantwortlich zu sein. BoNT/D PEP/AAA beispielsweise ist durch die Mutationen geringfügig destabilisiert, was sich unter neutralen Bedingungen in einem zu kleineren Temperaturen verschobenen Schmelzpunkt äußert (Kap. 5.3.2.). Diese Destabilisierung beeinflusst anscheinend nicht die Funktion der H<sub>N</sub>-Domäne.

Die Mutation der strikt konservierten aromatischen Aminosäuren Y744, Y747 und F596, die vermutlich in π-stacking Interaktionen stehen, in nicht aromatische Alanine, führte zu einer Verringerung der Toxizität um den Faktor 8 (Tab. 5). Die Analyse der Substratspaltung spiegelt das Ergebnis der Zwerchfellexperimente wieder, BoNT/D YYF/AAA zeigt deutlich geringere Spaltungsaktivität. Auch hier sind die Auswirkungen weniger stark ausgeprägt als im Zwerchfellexperiment.

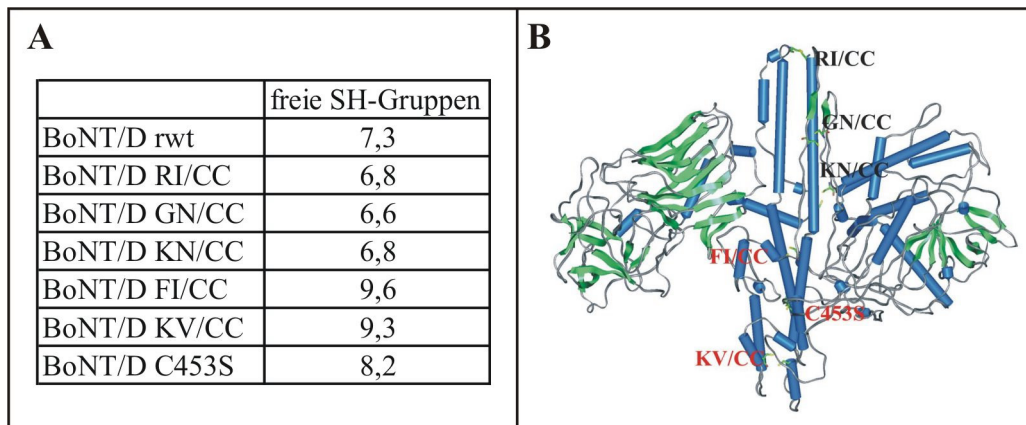
Außerdem wurden geclusterte konservierte Aspartate und Glutamate zu hydrophoben Aminosäuren mutiert (Kap. 4.4.2.). Dadurch sollten Protonierung, die im Zuge der Penetration durch Ansäuerung des Vesikellumens stattfinden, unterbunden werden und somit

die Rolle dieser Ladungscluster für die pH-induzierte Umfaltung des Moleküls untersucht werden. Den deutlichsten Effekt zeigte BoNT/D DKD/AAA mit einer Verringerung der Toxizität um den Faktor 13. Analysiert man die einzelnen Aminosäureaustausche dieser Dreifachmutante, so zeigte BoNT/D D622A den stärksten Effekt mit einer Reduktion der Toxizität um den Faktor 6. Additiv ergaben die Einzelmutanten BoNT/D D622A, K619A und D618A ungefähr das von der Dreifachmutante hervorgerufene Resultat.

Eine weitere Dreifachmutante – BoNT/D KKD/AAA – wies eine ähnlich starke Reduktion der Toxizität wie die D622A Mutation auf. Die Mutation der strikt konservierten Aminosäuren R696, W700 und D795 (RWD), die die 105 Å langen  $\alpha$ -Helices über Wasserstoffbrücken verknüpfen, zeigte keinen Effekt, ebenso die Mutation der Aminosäuren D751, K752, E753 (DKE), die die Schleife, welche die beiden 105 Å langen  $\alpha$ -Helices verbindet, hydrophober machen und somit befähigen sollte, mit Membranen zu interagieren. Die Mutanten BoNT/D T616A und BoNT/D H819A zeigten keinen Effekt auf die Toxizität und nehmen daher wahrscheinlich keinen Einfluss auf die pH-Wert induzierte Strukturänderung in aziden Vesikeln.

Auch in den Substratspaltungsexperimenten mit Rattenhirn-Synaptosomen weisen BoNT/D DKD/AAA, BoNT/D KKD/AAA und BoNT/D D622A die schwächsten Spaltungsaktivitäten auf. Die Mutanten BoNT/D DKE/AAA und BoNT/D H819A zeigen keinen, BoNT/D RWD/AAG und BoNT/D T616A einen moderaten Effekt.

Durch Einführung von Cysteinen sollte die  $H_N$ -Domäne durch Disulfidbrücken verknüpft werden, um aufzuklären, welche Bereiche der  $H_N$ -Domäne in die postulierte pH-induzierte Konformationsänderung involviert sind (Kap. 4.4.3.). Weiterhin sollte durch die Mutation eines der Cysteine, die an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligt sind, der Einfluss der Disulfidbrücke auf die Translokation ermittelt werden. Mit der Titration von freien SH-Gruppen unter denaturierenden Bedingungen kann im Vergleich zum Wildtyp zweifelsfrei nachgewiesen werden, ob zusätzlich eingeführte Cysteine eine Disulfidbrücke ausbilden oder nicht. Die eingesetzte Proteinmenge wurde dabei so gewählt, dass man im linearen Bereich der Eichgerade arbeitete. Der Substratumsatz erreichte nach ungefähr 60 min einen „Plateauzustand“.



**Abbildung 24: Ausbildung von Disulfidbrücken der „Cysteinmutanten“.** Die freien SH-Gruppen der mutierten Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mit Ellman-Reagenz bis zum Stillstand der Reaktion titriert. Bild A zeigt die errechneten freien SH-Gruppen, Bild B eine schematische Übersicht über die Position der eingeführten Cysteinreste (3BTA; blau =  $\alpha$ -Helix, türkis =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil). Diese sind zur besseren Betrachtung in „stick“-Form gerendert dargestellt. Rot markierte Cystein-Mutationen bildeten keine Disulfidbrücke aus.

BoNT/D-RI/CC, -GN/CC und -KN/CC besaßen nicht mehr freie SH-Gruppen als BoNT/D (Abb. 24). Hieraus ließ sich schließen, dass zwischen den beiden eingeführten Cysteinen eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Demgegenüber war die Anzahl an freien SH-Gruppen bei den Mutanten BoNT/D-FI/CC und -KV/CC um exakt 2 bzw. 2,3 gegenüber BoNT/D erhöht, was belegte, dass diese Cysteine keine Disulfidbrücke formten. Weiterhin war zu sehen, dass die C453S Mutation tatsächlich dazu führte, dass keine Disulfidbrücke mehr zwischen leichter und schwerer Kette ausgebildet ist. Dieses wurde außerdem nach dem Nicking elektrophoretisch unter reduzierenden Bedingungen überprüft (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigten sich nach Färbung mit Coomassie-Blau nur die ~100 kDa große schwere und die ~50 kDa große leichte Kette, nicht aber die durch eine Disulfidbrücke verbundene ~150 kDa große Spezies.

Erstaunlicherweise zeigte keine der „Cysteinmutanten“ einen Effekt auf die Toxizität (Tab. 5). Insbesondere von der C453S Mutation wurde eine drastische Reduktion erwartet. Frühere Untersuchungen mit nativen Toxinen hatten ergeben, dass ein Fehlen der Disulfidbrücke zwischen schwerer und leichter Kette die Toxizität des Moleküls aufhebt (Schiavo *et al.*, 1990; DePaiva *et al.*, 1993). Hier zeigte sich eindeutig, dass diese Aussage nicht für rekombinantes BoNT/D gilt. Um diesen Befund weiter zu belegen, wurde die Mutante in vollständig genickter Form im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Ähnlich wie bei dem Wildtyp BoNT/D steigerte die proteolytische Aktivierung auch die Toxizität von BoNT/D C453S um den Faktor 8-10. Dieses Ergebnis kann nur bedeuten, dass die nicht kovalenten Wechselwirkungen zwischen schwerer und leichter Kette ausreichen, um die leichte Kette analog dem Wildtyp ins Zytosol zu transportieren. Ebenso wie die Toxizität der „Cysteinmutanten“ nicht von der des Wildtyps abwich, so wiesen sie auch die gleiche Substratspaltungsaktivität in Synaptosomen wie der Wildtyp auf. Gleiches gilt auch für die

BoNT/D C453S. Eine proteolytische Aktivierung von BoNT/D oder BoNT/D C453S erhöhte die Substratspaltungsaktivität gleichermaßen.

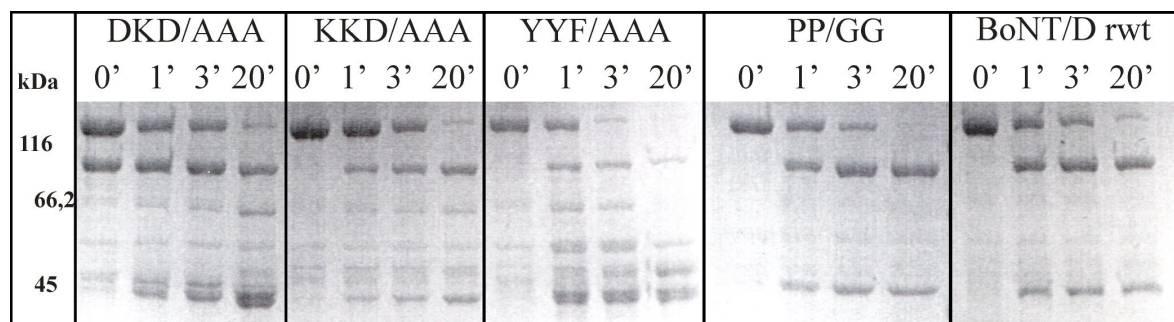
### 5.3. Strukturelle Charakterisierungen von H<sub>N</sub>-Domäne Mutanten

Einige der hergestellten Punktmutanten erzeugten eine signifikant reduzierte Toxizität und Spaltungseffizienz: BoNT/D DKD/AAA, BoNT/D D622A, BoNT/D KKD/AAA und BoNT/D YYF/AAA. Um zu überprüfen, dass die beobachteten Effekte nicht auf eine durch die Mutationen hervorgerufene „Zerstörung“ der Struktur der H<sub>N</sub>-Domäne zurückzuführen ist, wurden diese Mutanten in den folgenden Experimenten weitergehend untersucht.

#### 5.3.1. Erhöhte Trypsinsensitivität von HC einzelner Punktmutanten

Einige der Punktmutanten, die auch die Toxizität nachhaltig beeinflussten, wiesen während des Nickings eine erhöhte Trypsinsensitivität auf, was sich in einem Abbau der schweren Kette äußerte. Diese Proteine wurden daher mit nicht immobilisiertem Trypsin verdaut, um diese erhöhte Sensitivität zu untersuchen. Tatsächlich zeigten nur die Proteine BoNT/D DKD/AAA, KKD/AAA und YYF/AAA einen verstärkten Abbau der schweren Kette unter Trypsineinfluss (Abb.25). Die Punktmutante BoNT/D D622A, die ebenfalls eine geringere Toxizität aufwies, zeigte keine erhöhte Sensitivität ebenso keine der Mutanten (BoNT/D PP/GG exemplarisch in Abb. 25 gezeigt), die genauso toxisch wie der Wildtyp wirkten.

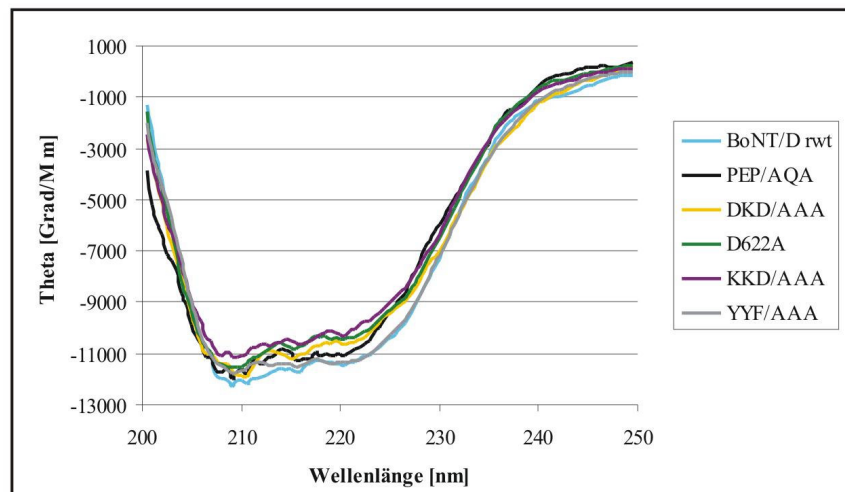
Die erhöhte Trypsinsensitivität erklärt auf folgende Weise die geringere Toxizität: entweder wurde die Struktur der Proteine nachhaltig verändert, oder durch die eingeführten Mutationen wurden trypsin-sensitive Stellen innerhalb der schweren Kette durch minimale Strukturänderungen der mutierten Bereiche durch Aufhebung von bestehenden Wechselwirkungen freigelegt.



**Abbildung 25: Erhöhte Trypsinsensitivität von HC einzelner Punktmutanten.** Je 5 µg Protein wurden mit 0,001 mg/ml Trypsin bei 37°C und 400 rpm verdaut. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines 10 %igen Gels und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. Gezeigt sind BoNT/D DKD/AAA, BoNT/D KKD/AAA, BoNT/D YYF/AAA, BoNT/D PP/GG und BoNT/D (rwt).

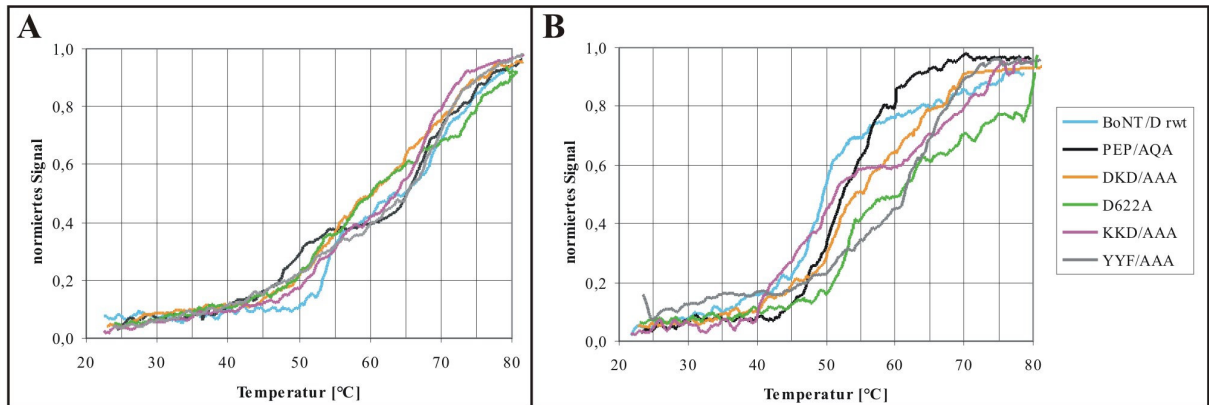
### 5.3.2. Strukturanalyse durch Circular Dichroismus Spektroskopie

Um weitere Strukturinformationen zu erhalten, wurden CD-Spektren und CD-Schmelzkurven aufgenommen. Die Analyse bei pH 5,1 und 7,5 sollte die pH-Extrema, die während der *in vivo* Aufnahme erreicht werden, simulieren.



**Abbildung 26: CD-Spektren bei pH 7,5.** Die CD-Spektren wurden in 20 mM Na-Phosphat pH 7,5, 100 mM NaCl bei einer Proteinkonzentration von  $0,7 \pm 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  aufgenommen. Die Spektren weisen charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm auf, die auf einen hohen Gehalt an  $\alpha$ -Helizität schließen lassen. Gezeigt sind die CD-Spektren von BoNT/D (rwt), BoNT/D PEP/AQA, BoNT/D DKD/AAA, BoNT/D D622A, BoNT/D KKD/AAA und BoNT/D YYF/AAA.

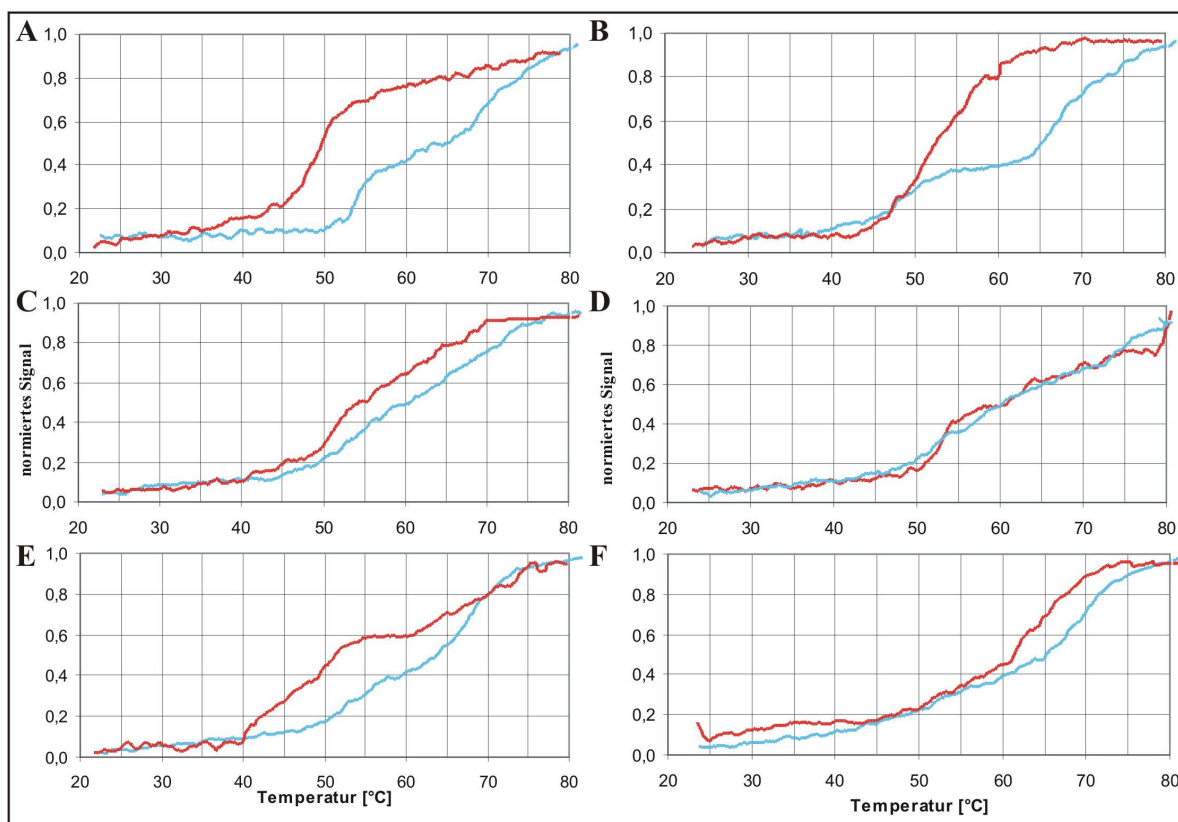
Die Analyse der CD-Spektren ergab, dass der Kurvenverlauf bei den Mehrfachmutanten nicht signifikant verschieden von dem für wt BoNT/D war. Der Sekundärstrukturgehalt lag beim Wildtyp und den Mutanten bei  $30 \pm 1 \%$   $\alpha$ -Helizität und  $17,5 \pm 0,5 \%$   $\beta$ -Faltblattstruktur ( $19 \pm 1 \%$  Turns,  $33,5 \pm 1 \%$  Random Coil). Die Messung der CD-Spektren bei pH 5,1 und die daraus berechneten prozentualen Strukturanteile zeigten keine signifikante Abweichung gegenüber den Messungen bei pH 7,5 (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund steht damit in Einklang mit früher erhobenen Daten von Datta & DasGupta (1988) sowie Robinson *et al.*, (1982). Obwohl der Gehalt an Sekundärstruktur bei unterschiedlichem pH-Wert gleich war, blieb aber die Möglichkeit offen, dass sich bestehende Teildomänen bei pH-Wert Absenkung gegeneinander verschieben. Um die die Toxizität beeinflussenden Punktmutanten näher zu charakterisieren, wurden CD-Schmelzkurven aufgenommen. Mit dieser Methode können selbst geringfügige Strukturunterschiede aufgedeckt werden. Verfolgt wurde der thermische Denaturierungsprozess der Proteine bei 225 nm (Abb. 27).



**Abbildung 27: Schmelzkurven bei pH 7,5 und 5,1 einzelner Punktmutanten.** Bild A zeigt die Schmelzkurven bei pH 7,5 in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl; Bild B zeigt die Schmelzkurven bei pH 5,1 in 20 mM Na-Acetat pH 5,1, 100 mM NaCl. Die Heizrate betrug 30°C/h, die Proteinkonzentration je 30 µg/ml. Gezeigt sind die CD-Schmelzkurven von BoNT/D (rwt), BoNT/D PEP/AQA, BoNT/D DKD/AAA, BoNT/D D622A, BoNT/D KKD/AAA und BoNT/D YYF/AAA.

Bei pH 7,5 (Abb. 27, A) schmilzt der Wildtyp biphasisch, was auf zwei unterschiedlich stabile Teildomänen hinweist. Die beiden Schmelzpunkte sind um ca. 20°C verschieden. Die Mutanten zeigten ein ähnliches, biphasisches Schmelzverhalten. Auch hier liegen die Schmelzpunkte im Bereich des Wildtyps. Bei pH 5,1 lassen sich stärkere Abweichungen zwischen Wildtyp und den Mutanten erkennen. Der Wildtyp geht von einem biphasischen in ein monophasisches Schmelzen über. Ein ähnliches Resultat lieferte die Dreifachmutante BoNT/D PEP/AQA, die die Toxizität nicht beeinflusst und als Negativkontrolle dienen sollte. Die beiden bei pH 7,5 unterschiedlich stabilen Teildomänen schmelzen nun gleichzeitig, oder nach Umfaltung werden beide durch kooperative Effekte erleichtert denaturiert. Abbildung 28 zeigt einen paarweisen Vergleich der Mutanten aus Abbildung 27.





**Abbildung 28: Paarweiser Vergleich der Schmelzkurven einzelner Punktmutanten bei pH 7,5 und 5,1.** Diese Abbildung zeigt die Schmelzkurven aus Abbildung 27 im paarweisen Vergleich, die rote Kurve die Schmelzkurve des jeweiligen Proteins bei pH 5,1, die blaue bei pH 7,5. BoNT/D rwt (A), BoNT/D PEP/AQA (B), BoNT/D DKD/AAA (C), BoNT/D D622A (D), BoNT/D KKD/AAA (E) und BoNT/D YYF/AAA (F). Die aus den Wendepunkten der Kurven ermittelten Schmelzpunkte sind in Tabelle 6 dargestellt.

Deutlich zu sehen ist, dass der Übergang von einem bi- zu einem monophasischen Schmelzen nur beim Wildtyp und BoNT/D PEP/AQA vollzogen wird. Alle anderen Mutanten schmelzen auch bei pH 5,1 eher biphasisch. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der, aus den Wendepunkten der Schmelzkurven ermittelten, Schmelzpunkte der Proteine, die diesen Befund bestätigen.

**Tabelle 6: Schmelzpunkte der Punktmutanten bei pH 7,5 und 5,1.**

	pH 7,5		pH 5,1	
	1.Smp	2.Smp	1.Smp	2.Smp
BoNT/D rwt	54	70	49	--
PEP/AQA	49	68	53	--
DKD/AAA	53	[68]	52	[65]
D622A	52	[70]	52	[70]
KKD/AAA	54	68	47	69
YYF/AAA	[52]	69	[53]	65

Die Schmelzpunkte der Proteine wurden aus den Wendepunkten der Schmelzkurven ermittelt (Abb. 28). In Klammern gesetzte Schmelzpunkte wurden abgeschätzt, da ein genauer Wendepunkt nicht aus dem Kurvenverlauf zu ermitteln war.

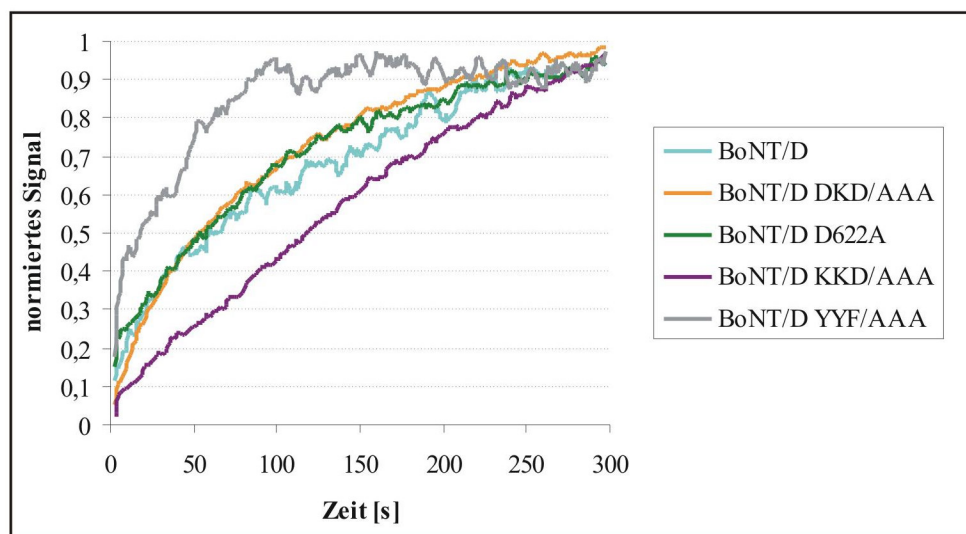
Interpretiert man das bei den gemessenen pH-Werten unterschiedliche Schmelzverhalten als Umfaltung und die Umfaltung des Wildtyps und BoNT/D PEP/AQA als Voraussetzung für

die Translokationskompetenz des Moleküls, so kann man die die Toxizität beeinflussenden Mutanten als nicht mehr translokationskompetent ansehen.

Zusammengefasst zeigten die Punktmutanten, die die Toxizität beeinflussen, bei neutralem pH keine signifikanten Strukturveränderungen, d. h. die Struktur ist intakt. Die eingeführten Mutationen führten jedoch dazu, dass ein Entfaltungsprozess bei saurem pH, wie er während der Aufnahme der Toxine in sauren Kompartimenten durchlaufen wird, behindert wird. Davon ließe sich eine geringere Toxizität der Mutanten ableiten.

### 5.3.3. Messung des Umfaltungsprozesses durch Bindung von TNS

Durch die Aufnahme von CD-Schmelzkurven wurde indiziert, dass bei den die Toxizität beeinflussenden Mutanten die Umfaltung bei saurem pH inhibiert wird. Mit Hilfe von TNS (2-(p-Toluidino)naphthalin-6-sulfonsäure), einem Fluoreszenz-Hydrophobizitätsmarker, der an geclusterte oberflächenexponierte hydrophobe Bereiche eines Proteins bindet, sollte die Exposition von hydrophoben Bereichen bei Umfaltung in saurem pH detektiert werden. Erst nach Bindung von TNS an das Protein ist Fluoreszenz nachweisbar (Turner & Brand, 1968). Durch dieses Verfahren konnte bereits nachgewiesen werden, dass das genickte BoNT/B sich bei saurem pH schneller umfalten kann als ungenicktes Toxin und somit eine höhere Toxizität aufweist (Kamata *et al.*, 2000). Abbildung 29 zeigt die normierten Kinetiken der TNS-Bindung von BoNT/D und dessen Mutanten bei pH 4.



**Abbildung 29: TNS-Bindungskinetik bei pH 4.** Je 5  $\mu\text{g}$  BoNT/D und BoNT/D-Mutanten wurden in 500  $\mu\text{l}$  20 mM Na-Phosphat pH 7,5, 100 mM NaCl mit 300  $\mu\text{M}$  TNS und soviel 10 % Zitronensäure versetzt, dass pH 4 erreicht wurde. Die Kinetik der TNS-Bindung wurde bei 440 nm ( $\lambda_{\text{em}}$ ) gemessen ( $\lambda_{\text{exc}}=350$  nm).

Die Mutante BoNT/D YYF/AAA faltet sich schneller, die Mutante BoNT/D KKD/AAA langsamer und alle anderen mit unveränderter Geschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp um. Die geringere Toxizität von BoNT/D KKD/AAA kann nach diesem Ergebnis also auf eine verlangsamte Exposition hydrophober Bereiche bei saurem pH zurückgeführt werden.

BoNT/D YYF/AAA sollte nach Kamata *et al.* (2000) demnach toxischer als der Wildtyp sein, was aber nicht der Fall ist. Erklärbar ist die schnellere TNS Bindung jedoch auch durch eine Spreizung der langen  $\alpha$ -Helices durch Wegnahme der  $\pi$ -Wechselwirkungen der aromatischen Ringe, so dass von vornherein mehr hydrophobe Bereiche exponiert sind, welche das Protein aber nicht translokationskompetenter machen. Dieses konnte auch anhand von gemessenen TNS-Bindungsspektren (Daten nicht gezeigt) vermutet werden.

Durch Messung der CD-Schmelzkurven konnte für alle Mutanten, die die Toxizität reduzieren, eine Inhibition der Entfaltung bei pH 5,1 festgestellt werden, d.h. die im Zuge der Translokation durchlaufene Umfaltung findet nicht mehr statt, durch TNS-Bindungskinetiken wurde dieser Befund jedoch nicht untermauert. Verglichen mit den Ergebnissen der CD-Schmelzkurven bleibt demnach festzustellen, dass die bei thermischer Denaturierung gemessenen Entfaltungsprozesse nicht der durch TNS-Bindung gemessenen Exposition hydrophober Abschnitte entsprechen.

## **5.4. Funktionelle Analysen von Fusionsproteinen und Chimären**

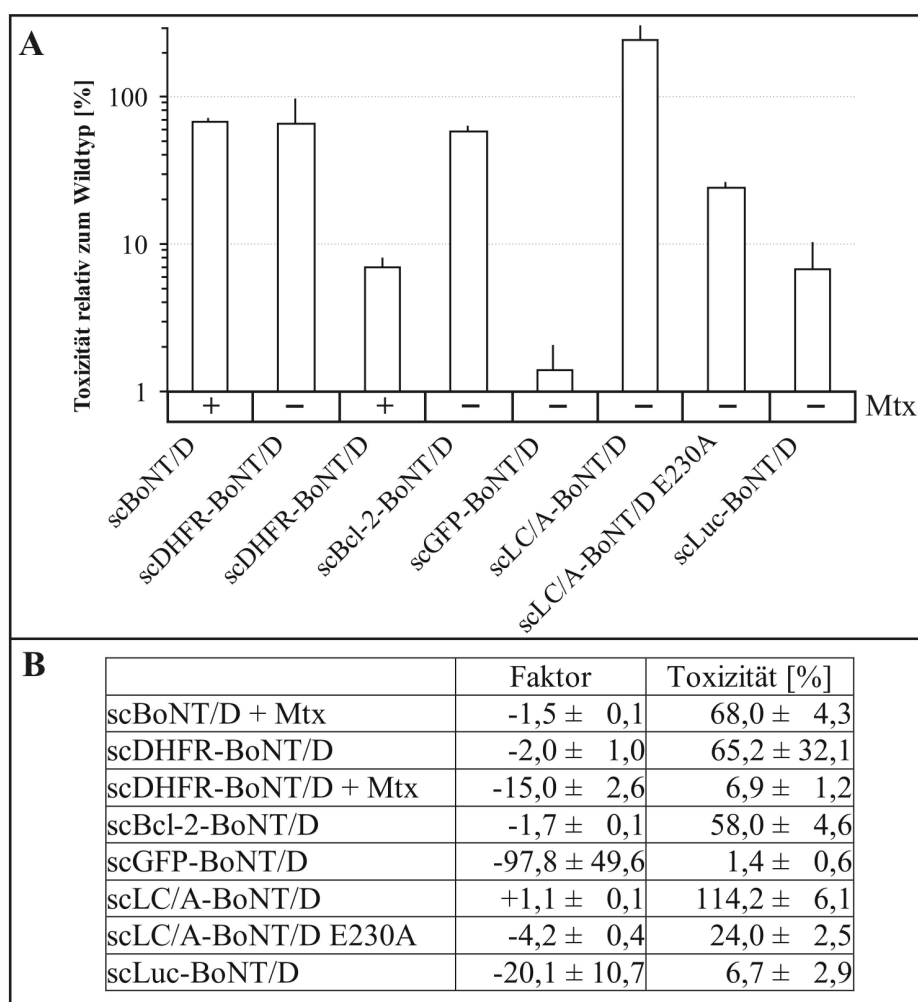
### **5.4.1. Analyse der Fusionsproteine**

Durch N-terminale Fusionen sollte untersucht werden, ob die „Translokationsmaschinerie“ von BoNT/D in der Lage ist, angehängte Proteine zusätzlich zu der leichten Kette in das Zytosol zu transportieren (Kap. 4.6.). Die deutlich verminderte Expressionsrate der Fusionsproteine (Tab. 4) deutete bereits auf eine Beeinträchtigung der Struktur hin, wobei die Ausbeute mit zunehmender Molekülgröße sank. Die Messung der Toxizität dieser Proteine ergab jedoch ein anderes Bild.

Die Fusion von DHFR oder Bcl-2 an BoNT/D inhibierte die Toxizität und somit die Translokation wenig, wohl aber die Fusion mit GFP (Abb. 30). Die Toxizität wurde bei diesem Fusionsprotein nahezu um zwei Größenordnungen reduziert, obwohl die Größe des Fusionsproteins der von DHFR-BoNT/D und Bcl-2-BoNT/D entsprach. Die Fusion mit LC/A erhöhte die Toxizität des Fusionsproteins sogar leicht, was aber auf einen synergistischen Effekt der beiden katalytisch aktiven leichten Ketten zurückgeführt werden konnte. Inaktiviert man die leichte Kette von BoNT/D innerhalb dieses Fusionsproteins durch Mutation des aktiven Zentrums (E230A), so wird nur der Effekt der Fusion mit LC/A messbar. Hier zeigte sich eine Reduktion der Toxizität um einen Faktor von 4. Verglichen mit rekombinanten BoNT/A (sc) ist die Toxizität nur um den Faktor 2 reduziert (Daten nicht gezeigt). Eine Fusion mit der Luziferase, die um ca. 15 kDa größer ist als die leichte Kette selbst, resultierte in einem funktionellen Molekül mit einer um den Faktor 20 reduzierten Toxizität. Fusionen von LC/D mit GFP oder Luziferase zeigten also die stärksten Auswirkungen auf die Toxizität. Damit sind die Fusionsproteine deutlich weniger toxisch als der Wildtyp, jedoch bleibt bei beiden trotz der Fusion die Funktionalität des Moleküls

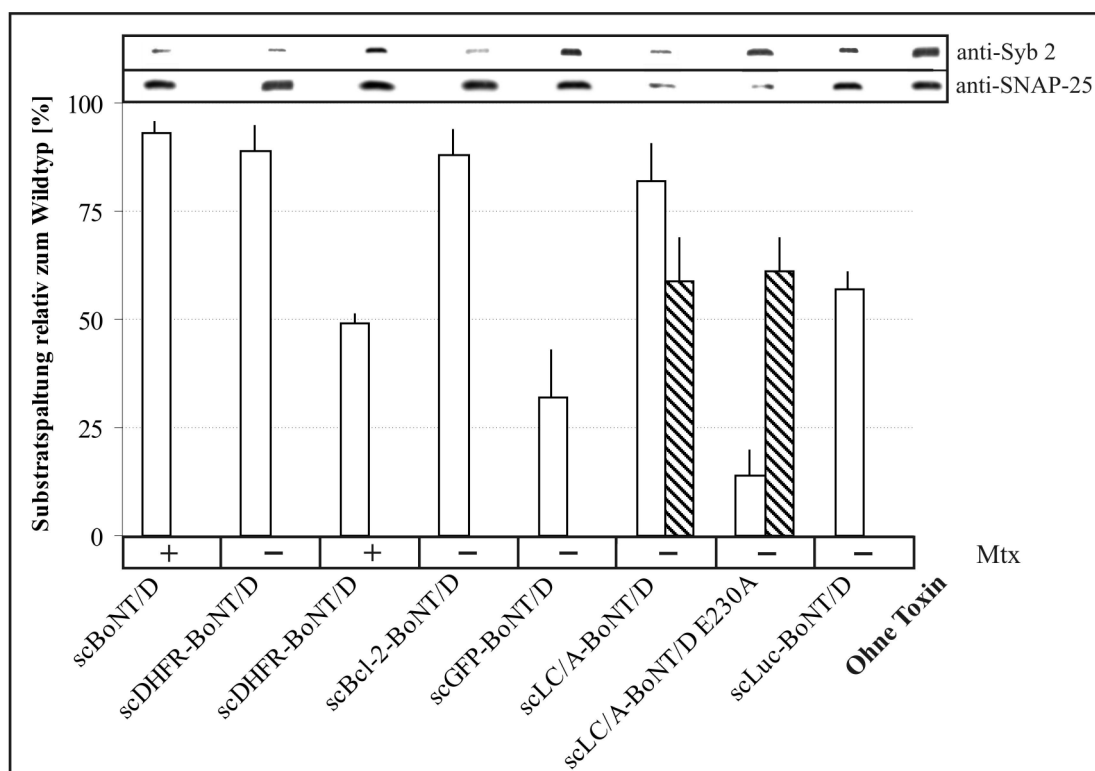
erhalten. Da Bindung und katalytische Effizienz aller Fusionsproteine nicht beeinflusst waren (Tab. 4), deutet die reduzierte Toxizität entweder auf einen veränderten Aufnahmeweg oder auf eine langsamer verlaufende Translokation hin.

Inkubierte man DHFR-BoNT/D mit Methotrexat, einem Folat-Analagon und somit Liganden der DHFR, so wurde die Konformation der DHFR fixiert und eine Entfaltung erschwert (Eilers & Schatz, 1986), wodurch die Toxizität um eine Größenordnung reduziert wurde. Weiterhin konnte auch bei BoNT/D selbst ein leichter Einfluss von Mtx gemessen werden, dessen Ursache bislang unklar ist. Dieser beruht jedoch nicht auf Inhibition von Bindung oder Katalyse (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Inhibition der Translokation durch Interaktion mit der leichten Kette, ähnlich der mit Dihydrofolatreduktase, wird durch Inkubation von LC/A-BoNT/D mit Mtx bestätigt, da hier die Toxizität ebenfalls drastisch reduziert wird (Faktor 8; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 30: Physiologische Toxizität verschiedener BoNT/D Fusionsproteine am Zwerchfell der Maus.** Nach Messung der Paralysezeit der rekombinanten ungenickten (sc) Proteine am Zwerchfell wurde die physiologische Toxizität im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp errechnet. Ausgedrückt ist die Toxizität in % der Wildtyp-Toxizität (A, B) sowie der Faktor, um den die Toxizität reduziert wurde (B). Die Standardabweichung ergibt sich aus den Abweichungen der Paralysezeiten bei Bestimmung von Doppel- oder Mehrfachwerten.

Bei der *in vivo* Spaltung von Synaptobrevin2 unter Verwendung von Synaptosomen ergibt sich ein ähnliches Bild wie an den Zwerchfellen (Abb. 31). Die Fusionsproteine können Synaptobrevin2 spalten, d.h. die Funktionalität von BoNT/D bleibt auch nach Fusion erhalten, und die fusionierten Moleküle gelangen zusammen mit der leichten Kette ins Zytosol. Dieses wird anhand von LC/A-BoNT/D eindeutig bewiesen, denn nach Inkubation mit LC/A-BoNT/D oder LC/A-BoNT/D E230A wurde auch SNAP-25 gespalten (Abb. 31). Somit ist auch die Funktionalität der fusionierten LC/A nach Translokation gezeigt. Die Fusionsproteine spalten in gleicher Zeiteinheit weniger Substrat als der Wildtyp. Wie bei vorangegangenen Experimenten, sind die gemessenen Effekte auf die Aktivität der Moleküle weniger stark im Vergleich zu Messungen am Zwerchfell, jedoch ist die Relation der gemessenen Effekte untereinander die gleiche. Der Effekt von Methotrexat auf die Aktivität von BoNT/D ist demzufolge kaum noch messbar, jedoch der auf die Translokation von DHFR-LC/D, was durch signifikante Reduktion der Substratspaltung durch DHFR-BoNT/D in Gegenwart von Mtx gezeigt wird.



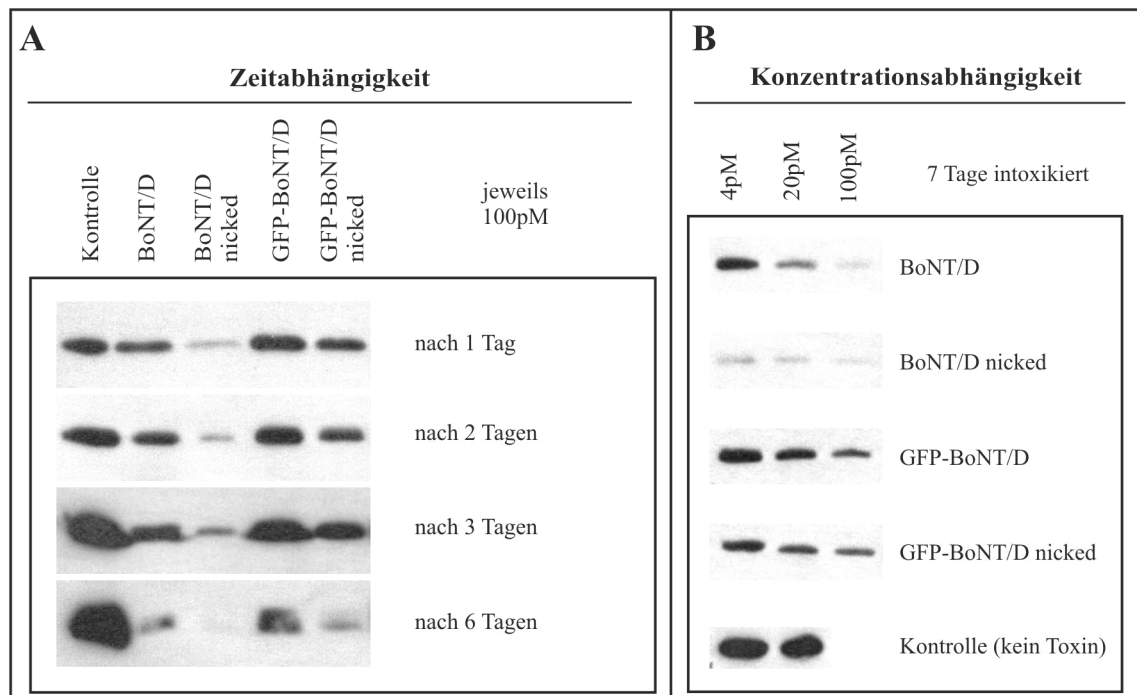
**Abbildung 31: Aktivität der BoNT/D Fusionsproteine in Rattenhirn-Synaptosomen.** Synaptosomen wurden mit 30 nM Toxin (sc) zum Teil in Gegenwart von Methotrexat (Mtx, 0,6  $\mu$ M) inkubiert. Die Detektion der Substrate erfolgte durch Synaptobrevin2 oder SNAP-25 spezifische Antikörper (obere Darstellung). Die Spaltung ist relativ zum rekombinanten Wildtyp (100 %) ausgedrückt. Offene Balken: Synaptobrevin2 Spaltung, gestrichelt: SNAP-25 Spaltung.

#### 5.4.1.1. Substratspaltung in hippocampalen Neuronen

Durch die hier vorliegende Arbeit ergab sich zum ersten Mal die Möglichkeit, rekombinante Botulinumtoxine in der Zellkultur einzusetzen. Aus Untersuchungen mit nativen, aus

Clostridien isolierten Toxinen konnte der Aufnahmeweg und die Wirkung direkt in der neuronalen Zellkultur nachgewiesen werden (Verderio *et al.*, 1999; Matteoli *et al.*, 1996). In Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Humboldt Universität (Charité) in Berlin wurde das GFP-Fusionsprotein im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp an hippocampalen Neuronen analysiert. Dabei stand zunächst der Nachweis der Substratspaltung im Vordergrund, aber auch die Charakterisierung des Aufnahmewegs im Vergleich zum Wildtyp.

In der Abbildung 32 wird die zeit- und konzentrationsabhängige Spaltung von Synaptobrevin2 dargestellt. Bei der Zeitabhängigkeit wurden die Neurone am Tag 1 nach Präparation mit 100 pM Toxin inkubiert, die Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten geerntet und das Substrat durch Synaptobrevin2 spezifische Antikörper nachgewiesen. Bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit wurden die Neurone 7 Tage lang mit unterschiedlichen Konzentrationen der Toxine inkubiert, danach geerntet und das Substrat analog nachgewiesen.



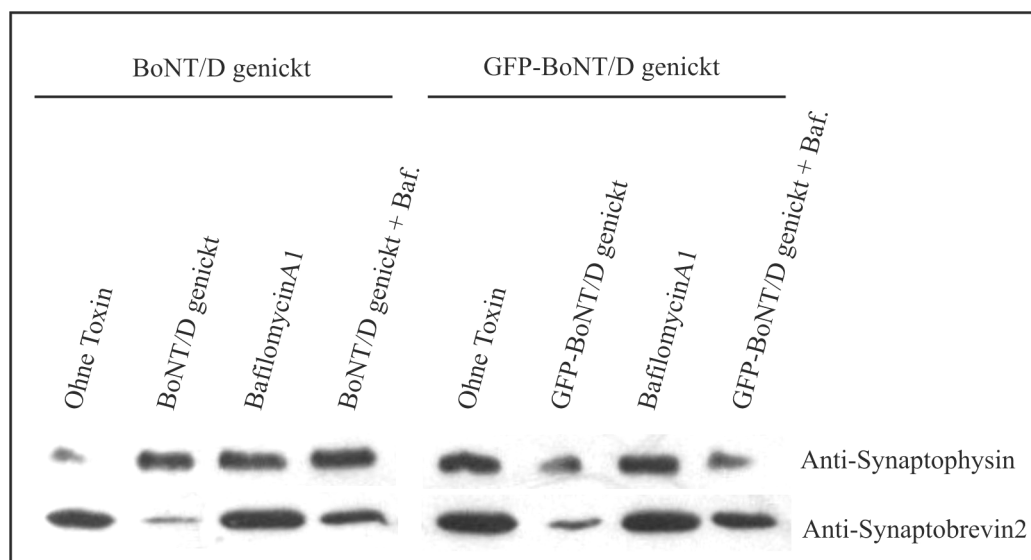
**Abbildung 32: Substratspaltung durch BoNT/D und GFP-BoNT/D in hippocampalen Neuronen.** Hippocampale Neurone wurden mit BoNT/D oder GFP-BoNT/D in genickter und ungenickter Form inkubiert. Bild A zeigt zeitabhängige Spaltung durch 100 pM Toxin, Bild B zeigt konzentrationsabhängige Spaltung nach 7 Tagen Inkubation.

BoNT/D und GFP-BoNT/D in genickter und ungenickter Form waren in der Lage, Synaptobrevin2 sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig zu spalten. GFP-BoNT/D war deutlich ineffizienter in bezug auf den Wildtyp, und die genickten Formen beider Toxine zeigten ähnlich wie am Zwerchfell (Tab. 5) deutlich stärkere Spaltung verglichen mit den nicht genickten Toxinen. Die bisherigen Ergebnisse in punkto GFP-BoNT/D bestätigten sich auch hier. Auffällig war bei der zeitabhängigen Spaltung, dass nach sechs Tagen deutlich mehr Substrat gespalten wurde als zum Zeitpunkt drei Tage nach Intoxikation. Dieses kann

auf unterschiedliche Suszeptibilitäten der Neuronenkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums hindeuten, ist aber bislang unklar.

Das Luc-BoNT/D Fusionsprotein konnte auf diese Art und Weise nicht untersucht werden, da die Luziferase in Proteinform intrazellulär innerhalb von 24 Stunden zu ca. 90 % proteolytisch abgebaut wird und somit Inkubationsdauern von mehreren Tagen nicht übersteht (Thompson *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1991). Aus diesem Grunde wurden auch die folgenden Experimente zunächst nur mit GFP-BoNT/D durchgeführt.

Ein weiterer Ansatz sollte den Aufnahmeweg des Fusionsproteins näher charakterisieren. Durch Inhibition der vesikulären H<sup>+</sup>-ATPase durch BafilomycinA1 (Schoonderwoert *et al.*, 2000) sollte die Translokation des Toxins deutlich inhibiert werden. Dieses konnte für native clostridielle Neurotoxine gezeigt werden (Williamson & Neale, 1994). Hippocampale Neurone wurden am 8. Tag nach Präparation 15 Minuten mit 10 nM Bafilomycin vorinkubiert und anschließend vier Stunden mit genicktem BoNT/D bzw. GFP-BoNT/D behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 zusammengestellt.



**Abbildung 33: Einfluss von BafilomycinA1 auf die Aktivität von BoNT/D und GFP-BoNT/D in hippocampalen Neuronen der Maus.** Hippocampale Neurone wurden am Tag 8 *in vitro* 15 Minuten mit 10 nM BafA1 inkubiert und anschließend mit genicktem BoNT/D oder GFP-BoNT/D (10 nM) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und Synaptobrevin2 sowie Synaptophysin durch spezifische Antikörper detektiert.

Die Experimente wurden in 24 „Well“ Platten durchgeführt, in denen die Neurone ausgesät worden waren. Als interner Marker für den Entwicklungszustand der Neurone wurde Synaptophysin detektiert. Die Expression dieses ebenfalls in neuronalem Gewebe vorkommenden Membranproteins findet erst in einem späteren Entwicklungsstadium der Neurone statt, Synaptobrevin2 hingegen wird aufgrund seiner Funktion schon sehr viel früher exprimiert (Ahnert-Hilger *et al.*, 1996). Da man davon ausgeht, dass die Neurone sich in unterschiedlichen Vertiefungen der Platten nicht alle gleich schnell entwickeln, ist diese interne Kontrolle nötig. Normiert man mittels des Synaptophysin-Signals die ermittelte

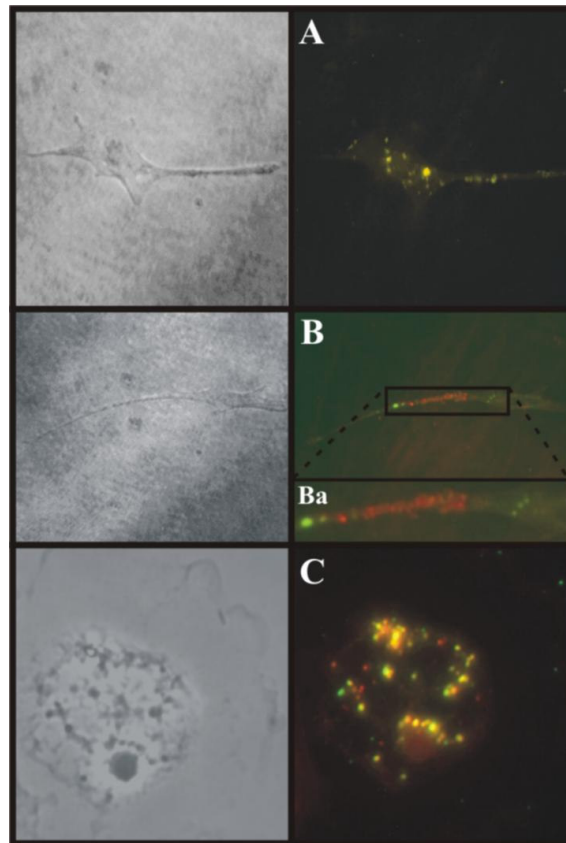
Menge an Synaptobrevin2, so lassen sich die folgenden Aussagen treffen: BafilomycinA1 hat keine Auswirkungen auf die Expression von Synaptophysin und Synaptobrevin2. Des Weiteren spaltet GFP-BoNT/D Synaptobrevin2 langsamer als der BoNT/D und sowohl die Translokation des Wildtyps als auch die des Fusionsproteins lassen sich durch BafilomycinA1 inhibieren. BoNT/D und GFP-BoNT/D durchlaufen also saure Kompartimente während des Penetrationsprozesses. Die Inhibition der Aufnahme durch BafA1 wurde unter Verwendung der Einzelkettenproteine auch an Synaptosomen verifiziert. Bei allen Fusionsproteinen fand bei Verwendung von BafA1 eine deutliche Inhibition der Substratspaltung statt (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund bestätigt, dass alle Fusionsproteine saure Kompartimente durchlaufen, also den gleichen Aufnahmeweg wie der Wildtyp haben.

#### 5.4.1.2. Aufnahme von GFP-BoNT/D in neuronalen Rückenmarkszellen

Um den Aufnahmeweg von GFP-BoNT/D mit zellbiologischen Fakten zu untermauern, wurden an neuronalen Rückenmarkszellen des Huhns Kolokalisationsstudien mit Zellkompartiment-spezifischen Markern durchgeführt. Zum einen sollte gezeigt werden, dass die Aufnahme, wie es für den Wildtyp erwartet wird, rezeptorvermittelt ist, zum anderen sollte ein Durchlaufen von sauren Kompartimenten per Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Neuronale Zellen wurden am Tag zwei oder acht nach Präparation für die Experimente verwendet.

Um rezeptorvermittelte Endozytose nachzuweisen, wurde ein Kolokalisationsexperiment mit Rhodamin-markiertem humanem Transferrin, einem Marker für rezeptorvermittelte Endozytose, durchgeführt. Als Marker für „fluid-phase“-Endozytose diente Rhodamin-markiertes Dextran. Mit Transferrin ist eine Kolokalisation, die sich in einem gelben Spot beim Übereinanderlegen des GFP- und des Transferrinsignals äußert, festzustellen (Abb. 34A). Mit Dextran lassen sich nur separate grüne oder rote Signale für GFP-BoNT/D bzw. Rhod-Dextran sehen (Abb. 34B). Die Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass GFP-BoNT/D entsprechend dem Wildtyp durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen wird.





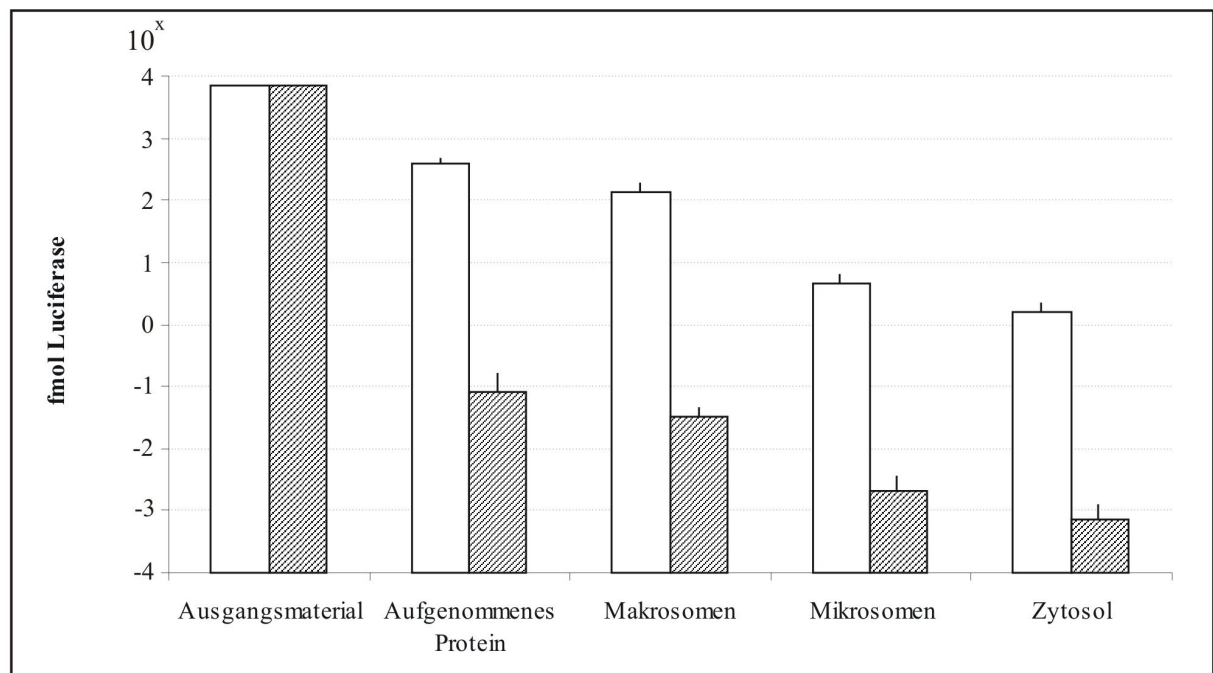
**Abbildung 34: GFP-BoNT/D wird rezeptorvermittelt endozytiert und passiert saure Kompartimente.** Neuronale Rückenmarkszellen des Huhns wurden mit genicktem GFP-BoNT/D (15  $\mu\text{g/ml}$ ) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. A zeigt die Fluoreszenzsignale von hTransferrinRhod (30  $\mu\text{g/ml}$ ) und GFP-BoNT/D, B die von DextranTMRhod (1 mg/ml) und GFP-BoNT/D (Ba = Ausschnittsvergrößerung). C zeigt die immunochemische Färbung von sauren Kompartimenten mittels anti-Lysobisphosphatidinsäure spezifischem Antikörper (6C4) sowie das Signal von GFP-BoNT/D. Kolokalisation wird durch Auftreten von gelben Spots, resultierend aus den übereinandergelegten GFP- und Rhodamin-Signalen, verdeutlicht. Das jeweils linke Bild zeigt den rechten Bildausschnitt als Phasenkontrast-Aufnahme.

Mit einem Antikörper, der gegen Lysobisphosphatidinsäure, einem Marker für späte Endosomen (Kobayashi *et al.*, 2001), gerichtet ist, und anschließender Detektion durch Rhodamin-gekoppelten sekundären Antikörper konnte eine partielle Kolokalisation nachgewiesen werden, die Indiz für ein Durchlaufen von sauren Kompartimenten während der Aufnahme von GFP-BoNT/D ist (Abb. 34C). Dieses Ergebnis unterstreicht die mit BafilomycinA1 an hippocampalen Neuronen erhaltenen Daten.

#### 5.4.1.3. Nachweis von Luziferase Aktivität

Zur weiteren Untermauerung des Aufnahmewegs und der Translokation der an BoNT/D fusionierten Proteine wurden Zellfraktionierungsexperimente mit Synaptosomen durchgeführt mit dem Ziel, die Luziferase-Aktivität direkt als Reporter zu benutzen, um so die Translokation der mit Luziferase fusionierten leichten Kette quantitativ nachzuweisen.

Synaptosomen wurden gemäß Kap. 3.7.6.1. mit 7 pmol nicht genicktem Luc-BoNT/D oder Luziferase als Kontrolle für unspezifische Bindung bzw. für Material, das während des Experimentes verschleppt wurde, inkubiert und anschließend in Makro-, Mikrosomen und Zytosol fraktioniert (Kap. 3.6.2.). Über die Aufnahme von Kalibrationsgeraden der einzelnen Proteine konnten aus den gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) die Menge an Protein, die in den einzelnen Fraktionen enthalten waren, errechnet werden. Abbildung 35 zeigt das Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten.

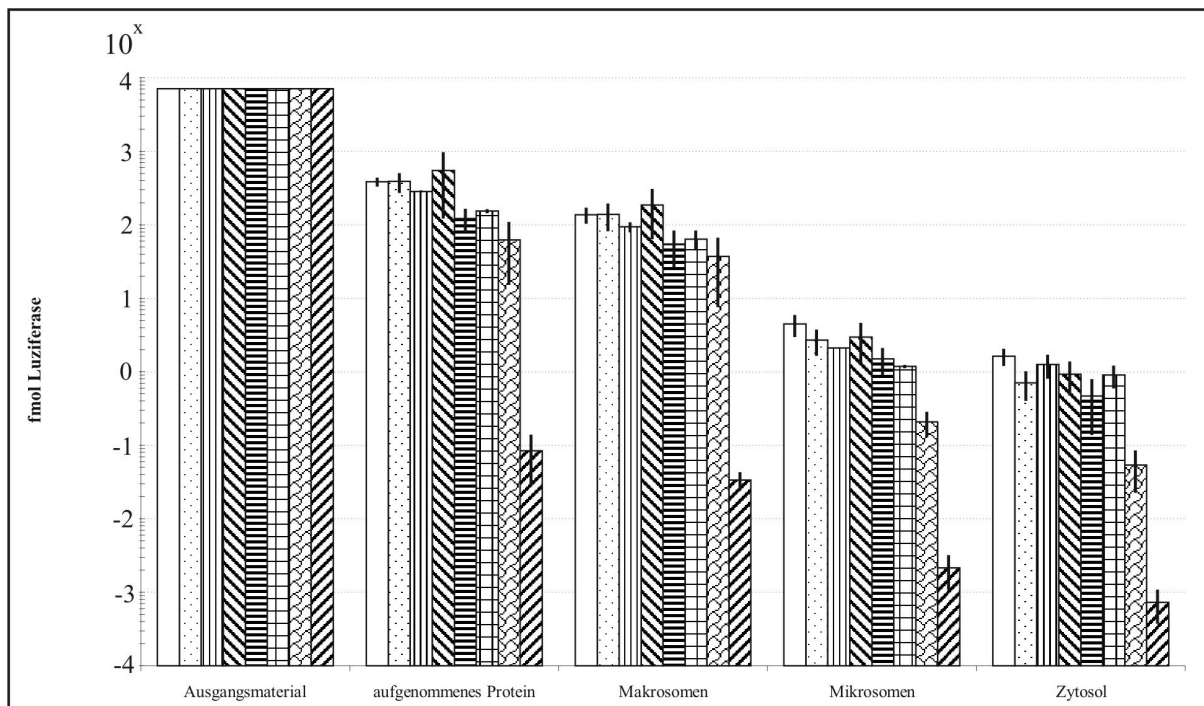


**Abbildung 35: BoNT/D vermittelter Transport von Luziferase ins Zytosol von Synaptosomen.** Synaptosomen wurden mit Luc-BoNT/D oder rekombinanter Luziferase in äquimolarer Konzentration inkubiert. Nach Zellaufschluss und subzellulärer Fraktionierung wurde die Luziferase Aktivität quantitativ ermittelt (Kap. 3.7.6.2.). Luc-BoNT/D (□) , Luziferase (▨)

Zu sehen ist, dass vermittelt über BoNT/D die fusionierte Luziferase tatsächlich in das Zytosol gelangt. Weiterhin wird die Luziferase ohne BoNT/D nicht durch unspezifische Bindung in den Experimenten verschleppt. Der Gehalt an durch BoNT/D translozierter Luziferase beträgt zwar nur 0,5 % des aufgenommenen Materials und ist aber damit um mehrere Größenordnungen höher als der Gehalt an unspezifisch aufgenommener Luziferase. Die Luziferase wird also zusammen mit der leichten Kette ins Zytoplasma transloziert. Über dieses Experiment lässt sich die translozierte Menge an leichter Kette bzw. Luziferase berechnen. Fehlerbehaftet ist diese Berechnung jedoch durch den intrazellulären Abbau der Luziferase (Thompson *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1991), so dass angenommen werden kann, dass ein höherer prozentualer Anteil als 0,5 % des aufgenommenen Materials ins Zytoplasma gelangen.

Um dieses Experiment als weiteren Beleg dafür zu nutzen, dass die in Kapitel 5.3. beschriebenen Mutanten, die geringere Toxizität aufwiesen, tatsächlich die Translokation

beeinflussen, wurden diese Mutationen in das Luziferasefusionsprotein übertragen und das Experiment wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 zu sehen. Tatsächlich beeinflussen insbesondere die YYF/AAA und die DKD/AAA Mutationen die Translokation negativ, jedoch bei weitem nicht so stark wie im Zwerchfellexperiment. Das Experiment liefert damit ähnliche Resultate wie die Spaltungsexperimente in Synaptosomen.



**Abbildung 36: Messung der Translokationseffizienz von  $H_N$ -Mutationen anhand von Luziferase-BoNT/D.** Synaptosomen werden mit verschiedenen Luc-BoNT/D Konstrukten oder rekombinanter Luziferase in äquimolarer Konzentration inkubiert. Nach Zellaufschluss und subzellulärer Fraktionierung (Kap. 3.6.2.) wurde die Luziferase Aktivität ermittelt. Luc-BoNT/D ( $\square$ ), Luc-BoNT/D D618A ( $\square$  mit Punkten), Luc-BoNT/D K619A ( $\square$  mit vertikalen Linien), Luc-BoNT/D D622A ( $\square$  mit diagonalen Linien), Luc-BoNT/D DKD/AAA ( $\square$  mit horizontalen Linien), Luc-BoNT/D KKD/AAA ( $\square$  mit Kreuzschraffur), Luc-BoNT/D YYF/AAA ( $\square$  mit schraffierten Linien), Luziferase ( $\square$  mit diagonalen Linien).

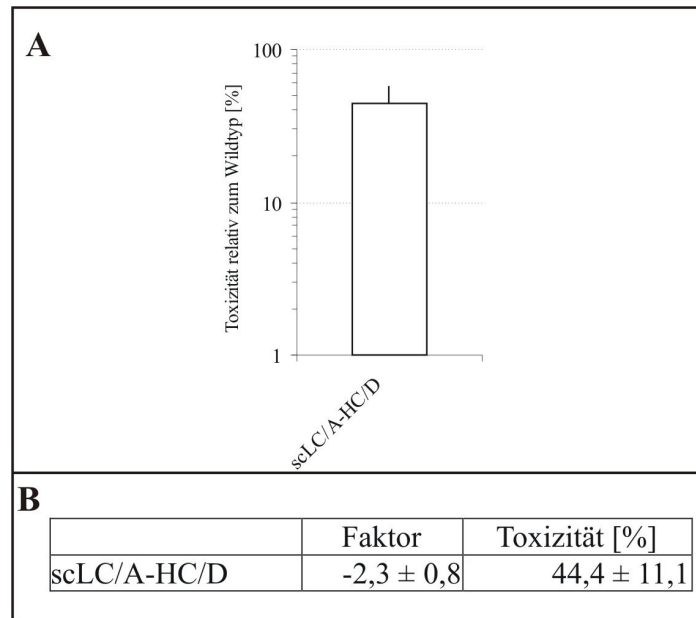
#### 5.4.2. Analyse der chimären Proteine

##### 5.4.2.1. Funktionelle Analyse von LC/A-HC/D

Mit dem Ersatz der leichten Kette von BoNT/D mit der des Serotypes A sollte geprüft werden, ob anstelle der authentischen leichten Kette L-Ketten anderer Serotypen transloziert werden können (Kap. 4.5.).

Durch die Fusion von LC/A an HC/D wurde die Ausbeute an löslichem Protein drastisch reduziert (Tab. 4), jedoch war das chimäre Protein nur wenig in seiner Toxizität verglichen mit BoNT/D reduziert (Abb. 37). Der Vergleich mit dem BoNT/D Wildtyp ist jedoch nicht sehr aussagekräftig, da die leichte Kette von BoNT/A vermutlich eine andere Substratspaltungskinetik als die des Serotyps D aufweist. Ungenicktes rekombinantes BoNT/A ist ungefähr Faktor 2 weniger toxisch als BoNT/D (Daten nicht gezeigt). Ein

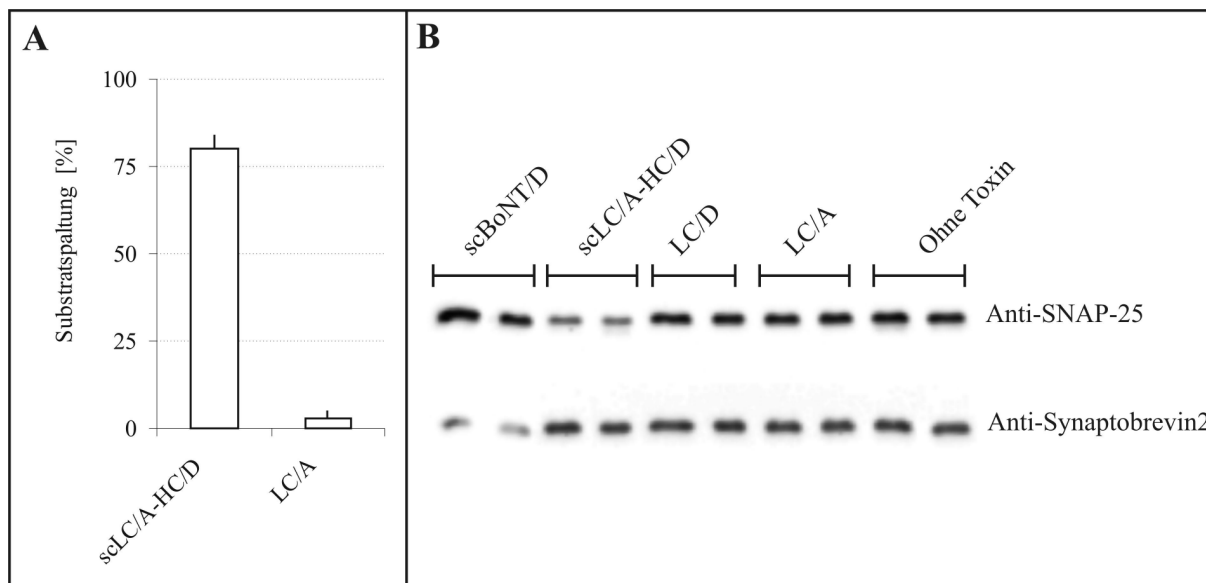
Vergleich mit BoNT/A ist jedoch ebenso nicht aussagekräftig, da sich hier die schweren Ketten, die die Bindung vermitteln und die Aufnahme steuern, unterschiedlich verhalten. Somit können keine quantitativen Werte ermittelt werden, man kann jedoch aussagen, dass eine Translokation einer anderen leichten Kette möglich ist und dass dadurch die Toxizität im Vergleich zum Wildtyp BoNT/D nur wenig beeinträchtigt ist.



**Abbildung 37: Physiologische Toxizität von scLC/A-HC/D.** Nach Messung der Paralysezeit des rekombinanten ungenickten (sc) Proteins am Zwerchfell wurde die physiologische Toxizität errechnet. Ausgedrückt ist die Toxizität im Vergleich zum Wildtyp (A, B) sowie der Faktor, um den die Toxizität reduziert wurde (B). Die Standardabweichung ergibt sich aus den Abweichungen der Paralysezeiten bei Bestimmung von Doppel- oder Mehrfachwerten.

Die Messung der Substratspaltung in Synaptosomen bietet einen besseren Einblick in die Funktionsweise des chimären Neurotoxins LC/A-HC/D als das Zwerchfellexperiment. Zwar konnte nach Paralyse des Zwerchfells erwartet werden, dass die leichte Kette von BoNT/A durch die schwere Kette von BoNT/D transloziert wurde und ihr Substrat SNAP-25 spaltete (Blasi *et al.*, 1993; Kalandakanond & Coffield, 2001), jedoch konnte dieses an Synaptosomen auf direkterem Weg nachgewiesen werden.

Nach Inkubation wurde sowohl das Substrat von BoNT/D, Synaptobrevin2, als auch das Substrat von BoNT/A, SNAP-25, mit spezifischen Antikörpern detektiert. Abbildung 38 zeigt, dass LC/A-HC/D selektiv SNAP-25 spaltet, BoNT/D hingegen selektiv Synaptobrevin2. Obgleich die Effizienz der Proteine BoNT/D und LC/A-HC/D in bezug auf die Spaltung ihrer Substrate ähnliches Ausmaß zu haben scheint (Abb. 38B), ist auch bei diesem Experiment ein direkter Vergleich mit BoNT/D nicht möglich. Daher sind unter Abbildung 38 (A) auch nur die Prozent SNAP-25 Spaltung und keine Relation zum Wildtyp BoNT/D angegeben.

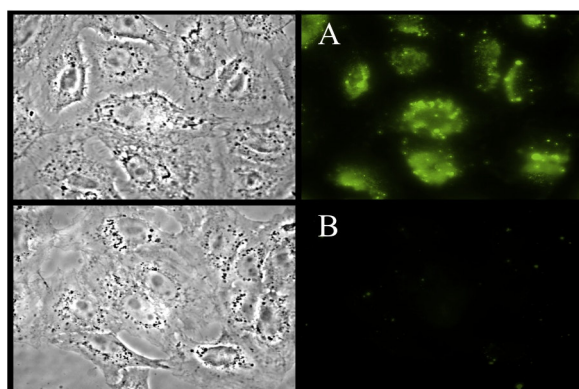


**Abbildung 38: Substratspaltungsaktivität von scLC/A-HC/D in Rattenhirn-Synaptosomen.** Synaptosomen wurden mit 30 nM Toxin (sc) inkubiert. Die Detektion des Substrates erfolgte durch Synaptobrevin2 und SNAP-25 spezifische Antikörper. B zeigt die Detektion von SNAP-25 und Synaptobrevin2. scLC/A-HC/D spaltet selektiv SNAP-25, scBoNT/D Synaptobrevin2. Die Spaltung von SNAP-25 ist in % der Kontrolle ohne Toxin (100 %) ausgedrückt (A).

#### 5.4.2.2. Aufnahme von GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT in Vero Zellen

Durch Ersetzen der H<sub>C</sub>-Domäne durch die Bindungsdomäne von Diphtherietoxin sollte ein Einfluss des H<sub>C</sub>-Fragmentes auf die Translokation untersucht werden (Kap. 4.5.).

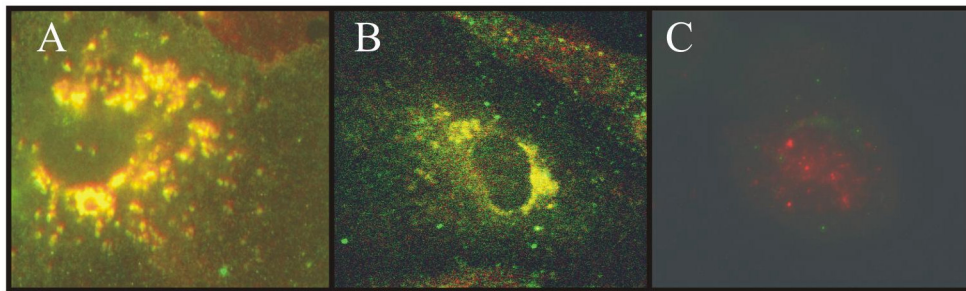
Das vorliegende chimäre Fusionsprotein ließ sich nickeln und bildete die Disulfidbrücke zwischen der chimären schweren Kette (cHC) und GFP-LC/D aus (Tab. 4). Abbildung 39 (A) zeigt, dass GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT von der gesamten Zellpopulation aufgenommen wird, nicht aber GFP-BoNT/D (B). Fluoreszenzsignale sind in vesikelartigen Strukturen zu erkennen und teilweise eine flächige Grünfärbung der Zellen.



**Abbildung 39: Aufnahme von GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT in Vero Zellen.** Vero Zellen wurden mit genicktem GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT (A) oder GFP-BoNT/D (B) [je 100 nM] 90 min bei 37°C inkubiert. Nur GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT wird aufgenommen. Das jeweils linke Bild zeigt den rechten Bildausschnitt als Phasenkontrastaufnahme.

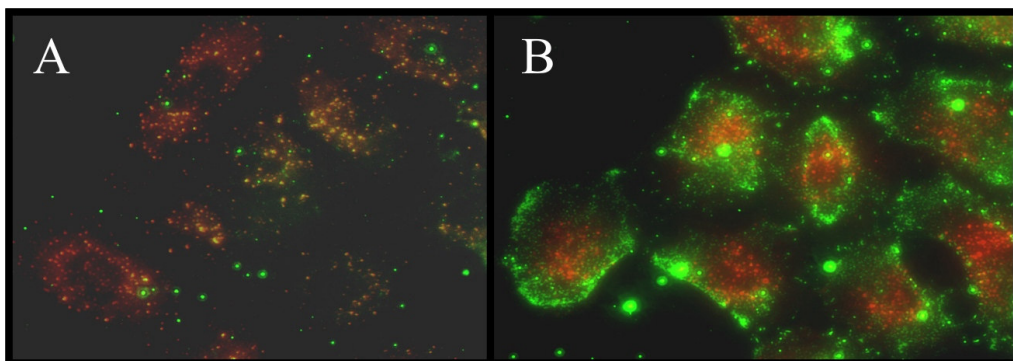


Durch Kopplung der LH<sub>N</sub>-Domäne von BoNT/D mit der Bindungsdomäne von Diphtherietoxin wird die Bindung an nicht neuronale Zellen ermöglicht. Eine Bindung sollte über den heparinbindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorpräkursor, den Rezeptor von Diphtherietoxin, erfolgen (Naglich *et al.*, 1992). Abbildung 40 bestätigt, dass GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen wird. Das chimäre Fusionsprotein kolokalisiert mit humanem Transferrin, einem Marker für rezeptorvermittelte Endozytose, jedoch nicht mit Dextran, einem Marker für „fluid-phase“-Endozytose.



**Abbildung 40: GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT wird rezeptorvermittelt endozytiert.** Genicktes GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT [42 µg/ml] und hTransferrinRhod [30 µg/ml] wurde an Vero Zellen für 45 min bei 0°C gebunden. Nach Waschen und 2 (A) oder 30 min (B) Inkubation bei 37°C sind beide Proteine teilweise kolokalisiert (B: konfokale Aufnahme). Inkubation von Vero Zellen mit GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT und Dextran-TMRhod [1 mg/ml] für 30 min bei 37°C zeigt keine Kolokalisierung (D). Kolokalisation wird durch Auftreten von gelben Spots, resultierend aus den übereinandergelegten GFP- und Rhodamin-Signalen, verdeutlicht.

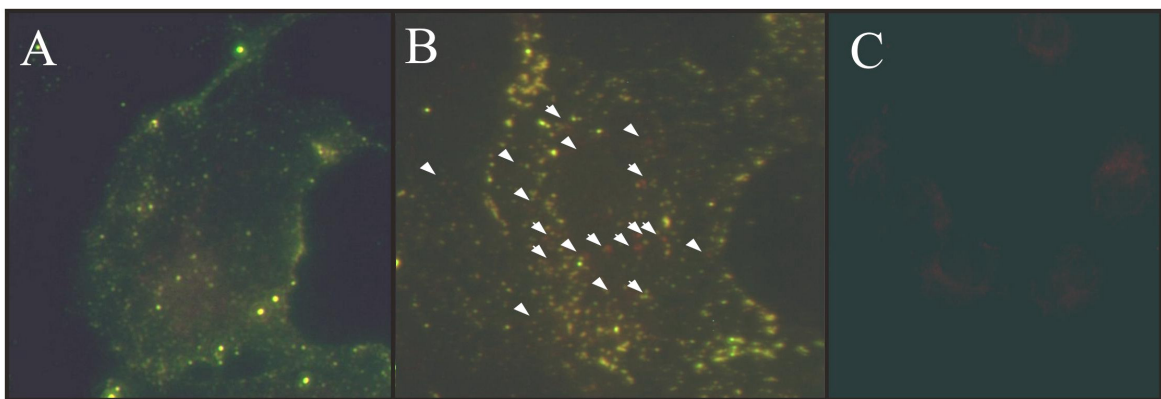
Um die vesikelartigen Strukturen als endosomale Kompartimente zu identifizieren, wurde immunochemisch eine Kolokalisation mit Anti-EEA1-Antikörper, einem gegen frühe Endosomen gerichteter Antikörper (Mu *et al.*, 1995), durchgeführt.



**Abbildung 41: GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT passiert frühe endosomale Kompartimente.** Genicktes GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT [35 µg/ml] wird bei 0°C 45 min an Vero Zellen gebunden. Nach Waschen und einem 37°C Puls von 5 min kolokalisiert es teilweise mit Rhodamin markiertem Anti-EEA1 Antikörper, einem Marker für frühe Endosomen (Bild A). Nach weiterer Inkubation für 45 min bei 37°C tritt keine Kolokalisierung mehr auf (Bild B). Kolokalisation wird durch Auftreten von gelben Spots, resultierend aus den übereinandergelegten GFP- und Rhodamin-Signalen, verdeutlicht.

Zu Beginn der Endozytose liegt das Protein angereichert in frühen Endosomen vor (Abb. 41A), was am Auftreten von gelben Spots, die sich aus übereinandergelegten Signalen erzeugt von GFP und Rhodamin ergeben, ersichtlich wird. Bei andauernder Inkubation verlässt es diese frühen Kompartimente vollständig (Abb. 41B).

Das vorliegende chimäre Fusionsprotein sollte weiterhin zu Translokationsstudien der GFP markierten leichten Kette dienen. Um diesen Prozess *in vivo* zu visualisieren, wurde das Protein bei 0°C an Vero Zellen gebunden, danach wurde gewaschen und bei 37°C endozytiert. Nach Fixierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte immunochemischer Nachweis der chimären schweren Kette mittels *Strep-tag*<sup>®</sup> Antiserum, welches nachfolgend durch Rhodamin gekoppelten sekundären Antikörper markiert wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 42 zu sehen.

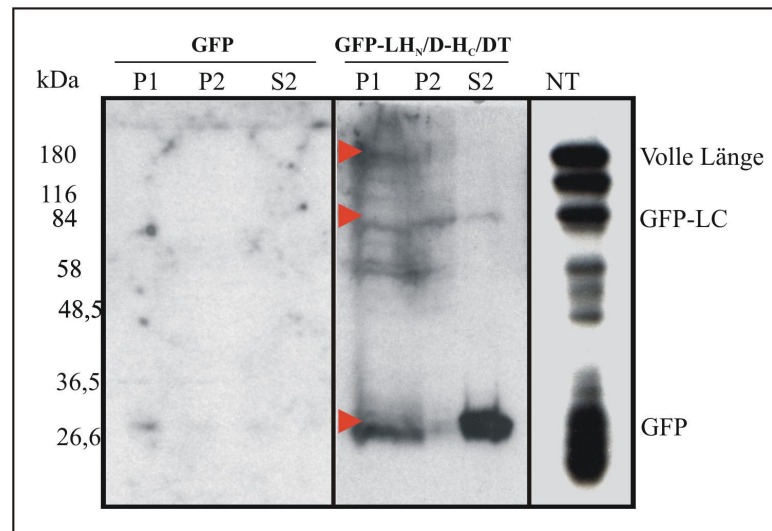


**Abbildung 42: GFP-LC/D und cHC trennen sich als Folge der Translokation.** Genicktes GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT [15 µg/ml] wurde während 20 min Inkubation bei 37°C in Vero Zellen aufgenommen (A). Nach Waschen wurde weitere 40 min bei 37°C inkubiert (B). cHC wurde durch Immunfluoreszenz anti-*Strep-tag*<sup>®</sup> II visualisiert. Die Pfeile zeigen vesikuläre Strukturen ohne GFP-LC/D. Kollokalisierung wird durch Auftreten von gelben Spots, resultierend aus den übereinandergelegten GFP- und Rhodamin-Signalen, verdeutlicht. C: ohne Inkubation mit GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT.

Nach zwanzigminütiger Inkubation bei 37°C ist eine vollständige Kollokalisierung von Rhodamin markierter schwerer Kette und GFP-getaggtter leichter Kette zu beobachten (A). Nach 60 Minuten treten jedoch deutlich mehr ausschließlich Rhodamin markierte Vesikel auf (B). Dieses kann als Trennung der GFP markierten leichten Kette von der schweren Kette interpretiert werden. Die translozierte GFP-getaggtte leichte Kette lässt sich vermutlich aufgrund zu starker Verdünnung nicht im Zytosol nachweisen.

Um die Trennung der beiden Ketten während der Aufnahme biochemisch zu unterlegen und eine Translokation der leichten Kette in das Zytosol zu zeigen, wurden die Zellen nach erfolgter Inkubation subzellulär in Makrosomen, Mikrosomen und Zytosol fraktioniert. Ein Nachweis der GFP markierten Toxinbestandteile aus den erhaltenen Fraktionen erfolgte durch Western Blot und Anti-GFP Antikörper. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindung diente die Endozytose einer äquimolaren Menge an GFP in einem zweiten Ansatz.

Abbildung 43 zeigt, dass GFP allein in keiner der erhaltenen Fraktionen zu finden ist. Das chimäre Fusionsprotein ist in Makro-, und Mikrosomen und die GFP-getaggtete leichte Kette in der zytosolischen Fraktion nachweisbar. Anteile von Gesamttoxin sind dort nicht zu finden. Weiterhin treten in der zytosolischen Fraktion große Mengen an GFP auf, was auf einen bevorzugten proteolytischen Abbau des L-Kettenanteils der GFP-getaggteten leichten Kette im Zytosol hindeutet.



**Abbildung 43: GFP-LC und cHC trennen sich als Folge der Translokation.** GFP oder genicktes GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT [15 µg/ml] wurden für 60 min bei 37°C in Vero Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden gewaschen, trypsiniert und pelletiert. Nach Resuspension in TC-Puffer wurde eine subzelluläre Fraktionierung in Makrosomen (P1), Mikrosomen (P2) und Zytosol (S2) durchgeführt. Der Nachweis von GFP erfolgte nach Western Blot mit GFP spezifischem Antikörper.

Um einen indirekten Nachweis der Translokation durch Spaltung des nicht neuronalen Substrates Cellubrevin (Yamasaki *et al.*, 1994) zu erbringen, wurde sowohl versucht, dieses direkt in Vero Zellen nachzuweisen, als auch den endogenen Level durch transiente Transfektion zu erhöhen. Der endogene Expressionslevel war zu niedrig für eine Detektion mit Cellubrevin spezifischen Antikörpern. Des weiteren konnten die Vero Zellen nur sehr schlecht transfiziert werden, so dass auch nach Transfektion (Max. 15-20 %, CaPO<sub>4</sub>-Methode) mit einem für Cellubrevin kodierenden Plasmid die exprimierte Menge für biochemische Analysen nicht ausreichte (Daten nicht gezeigt).



## 6. Diskussion

Clostridielle Neurotoxine (CNT) sind aufgrund ihrer enzymatischen Wirkungsweise, durch die die Neurotransmission blockiert wird, und der einzigartigen Neuroselektivität die giftigsten bekannten Substanzen. Viele Teilaspekte der Intoxikation – insbesondere die Überwindung der Membranbarriere durch Translokation der katalytischen Untereinheit – sind jedoch noch nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit war es, den Translokationsmechanismus am Beispiel von Botulinum Neurotoxin Serotyp D zu charakterisieren und weiterhin die Umwandlung dieses potenten Neurotoxins in einen neuroselektiven Transporter zu vollziehen.

### 6.1. Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Struktur innerhalb der Familie der clostridiellen Neurotoxine

Unter Einhaltung der von der Bezirksregierung Hannover auferlegten Sicherheitsmaßnahmen (Aktenzeichen: 501h-40654/3/57/3) wurden BoNT/D und verschiedene BoNT/D-Derivate rekombinant in *E. coli* produziert und isoliert. Dieses war eine wichtige Grundlage für die Analyse des Translokationsmechanismus durch gezielte Mutagenese und auch für die Charakterisierung der rekombinanten Proteine als potentielle Proteintransporter. Die Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von rekombinanten Toxinfragmenten wurde in den letzten Jahren konzentriert verfolgt. Dabei wurden in den meisten Fällen die leichten Ketten von BoNT/A oder TeNT charakterisiert (Li & Singh, 1999; Tonello *et al.*, 1999; Kadkhodayan *et al.*, 2000) und in einigen Arbeiten versucht, diese rekombinanten Fragmente mit der nativen (Zhou *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1994) oder der rekombinanten (Li *et al.*, 1999) schweren Kette zu rekonstituieren. Die rekombinanten leichten Ketten waren katalytisch genauso aktiv wie die nativen, auch die rekonstituierten Toxine verhielten sich wie die nativen Toxine, jedoch waren die Ausbeuten an rekonstituiertem Toxin in allen Fällen sehr gering. Zwei Ansätze sind bisher bekannt, in denen Gesamttoxin in *E. coli* produziert wurde. So konnten BoNT/C als katalytisch inaktive Mutante (Kiyatkin *et al.*, 1997) und TeNT (Li *et al.*, 2001) rekombinant hergestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zum ersten Mal, dass auch Botulinum Neurotoxin Typ D rekombinant in *E. coli* in hoher Ausbeute und Reinheit produziert werden kann. Das Nicking zwischen schwerer und leichter Kette geschah in *E. coli* nicht, konnte aber durch immobilisiertes Trypsin *in vitro* erreicht werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen HC und LC auf SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch durch Auftreten der ~150 kDa großen Spezies nachgewiesen werden. Toxizitätsanalysen am Zwerchfell zeigten, dass das aus *E. coli* isolierte Einzelkettenprotein an neuronales Gewebe bindet und auch funktionell ist. Es war

als Einzelkettenprotein aber ca. 10mal weniger toxisch als das genickte native Toxin. Durch selektives Nicking zwischen HC und LC wurde die Toxizität des rekombinanten Toxins verzehnfacht. Das rekombinante Protein ist somit genauso toxisch wie das native. Die Diskrepanz in der Toxizität zwischen dem Einzelketten und dem genickten Toxin wird auch bei anderen Serotypen beobachtet. Natives BoNT/E wird durch das Nicking ungefähr 100mal potenter (Datta & DasGupta, 1988), natives BoNT/B um den Faktor 10 (Maisey *et al.*, 1988) und auch rekombinantes TeNT ist als Zweikettenprotein 2 bis 2,5mal aktiver (Li *et al.*, 2001). Nach rezeptorvermittelter Endozytose durchlaufen die clostridiellen Neurotoxine saure Kompartimente (Williamson & Neale, 1994; Matteoli *et al.*, 1996). Diese pH-Wert Erniedrigung zieht vermutlich eine Konformationsänderung nach sich, die das Molekül befähigt, mit Membranen zu interagieren (Boquet *et al.*, 1984; Roa & Boquet, 1985). Die darauf folgende Bildung einer Pore oder eines Spaltes führt schließlich zur Translokation der leichten Kette (Boquet & Duflot, 1982; Cabiaux *et al.*, 1985; Montecucco *et al.*, 1986; Montecucco *et al.*, 1989). Die Steigerung der Toxizität durch die Überführung in die Zweikettenform des Proteins beruht nicht auf geänderten Bindungsaffinität (Kozaki & Sakaguchi, 1982) oder einer global geänderten Konformation des Moleküls (Datta & Singh, 1988; Singh & DasGupta, 1990), Teile der Struktur werden jedoch in eine flexiblere Konformation überführt (Cai & Singh, 2001), was bei einer pH-Wert Erniedrigung eine deutlich schnellere „Freilegung“ eines hydrophoben membraninteragierenden Segmentes ermöglicht (Kamata *et al.*, 2000). Das Nicking ist somit für eine optimale Translokationskompetenz des Proteins unentbehrlich.

Da BoNT/D zu den am wenigsten untersuchten Serotypen zählt, konnte die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse hinsichtlich der Einordnung dieses Serotyps in die strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der Familie der CNT liefern. Durch *in vitro* Spaltungsexperimente wurde belegt, dass der Gürtel, der sich um die leichte Kette schlingt, vergleichbar zu BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998) den aktiven Spalt verdeckt. Erst nach dem Nicking des Proteins und Reduktion der Disulfidbrücke zwischen HC und LC konnte die volle katalytische Aktivität erzielt werden. Des Weiteren zeigten CD-Analysen, dass der Sekundärstrukturgehalt von BoNT/D vergleichbar ist zu den anderen Serotypen (Tab. 7).

**Tabelle 7: Sekundärstrukturmerkmale von BoNT/D im Vergleich mit anderen Serotypen.**

Serotyp	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Messbedingungen	Zitat
BoNT/D	30 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1	Un-, genickt, pH 7 & 5	
BoNT/A	25 $\pm$ 3 22 30 $\pm$ 1	44 $\pm$ 3 44 42 $\pm$ 2	pH 6 & 9  Holo & Apo	Datta & DasGupta, 1988 Singh & DasGupta, 1989 Fu <i>et al.</i> , 1998
BoNT/B	28	41		Singh & DasGupta, 1989
BoNT/E	20 $\pm$ 2 21 22	41 $\pm$ 6 43 44	pH 6 & 9, nicked	Datta & DasGupta, 1988 Singh & DasGupta, 1989 Singh & DasGupta, 1990
TeNT	20 22	50 50	pH 5,5, 4, 7	Robinson <i>et al.</i> , 1982 Singh <i>et al.</i> , 1990

Der stark abweichende Gehalt an  $\beta$ -Faltblatt kann durch Verwendung älterer Auswertalgorithmen erklärt werden, die eine korrekte Ermittlung von  $\beta$ -Sekundärstrukturgehalt nicht zuließen. Ein visueller Vergleich der für BoNT/D gemessenen Spektren mit alten Arbeiten bestätigte diese Vermutung. Eine Änderung der Gesamtsekundärstruktur bei Erniedrigung des pH-Wertes, oder durch das Nicking konnte in dieser und auch in diversen anderen publizierten Arbeiten (Tab. 7) durch CD-Spektroskopie nicht festgestellt werden. Im Hinblick auf thermische Denaturierungsexperimente lässt sich nur ein Vergleich mit BoNT/A durchführen, das als Gesamttoxin untersucht wurde und ein konzertiertes Schmelzen bei 52°C zeigt (Fu *et al.*, 1998). BoNT/D schmilzt biphasisch bei 54°C und 70°C. Bei der Charakterisierung von BoNT/A wurde jedoch eine viermal schnellere Heizrate von 2°C/min verwendet. Möglicherweise kann bei dieser Heizrate der zweite Schmelzübergang nicht aufgelöst werden. Experimente mit BoNT/D bei höheren Heizraten ergaben ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

## 6.2. Funktion einzelner Segmente der H<sub>N</sub>-Domäne im Translokationsmechanismus

Durch die schwere Kette erlangen die clostridiellen Neurotoxine ihre Spezifität für neuronales Gewebe, sowie die Fähigkeit, ihre katalytische Untereinheit in das Zytosol neuronaler Zellen zu befördern. Nach bisherigen Modellen gelten die durch sauren pH induzierte Konformationsänderung und die Fähigkeit der H<sub>N</sub>-Domäne, mit Membranen zu interagieren, als treibende Kräfte für die Translokation.

Der Einsatz von rekombinantem BoNT/D ermöglichte erstmals die Untersuchung der Funktion der Translokationsdomäne durch Deletionen bestimmter Bereiche. Reduziert man BoNT/D auf die Bindungsdomäne und die leichte Kette, so wird das Molekül untoxisch. Bindung an neuronale Zellen und katalytische Aktivität der leichten Kette werden durch die Deletion der H<sub>N</sub>-Domäne nicht beeinträchtigt (siehe Tab. 4), was eine korrekte und unabhängige Faltung der Teildomänen belegt. Dieser Befund zeigt, dass die leichte Kette und auch die H<sub>C</sub>-Domäne keine Translokation vermitteln können, sondern nur die H<sub>N</sub>-Domäne. Deletiert man nur einen Teil der Translokationsdomäne, so erhält man Proteine, deren Toxizität extrem erniedrigt ist. Insbesondere Eingriffe in die zwei 105 Å langen  $\alpha$ -Helices (Tab. 5) bewirken die stärkste Inaktivierung, aber auch Deletion des Gürtels oder Teile der amphiphatischen Bereiche, die den Helices vorangehen, reduzieren die Toxizität um 2 Größenordnungen. Als Ursache könnte auch vermutet werden, dass die Struktur dahingehend verändert wurde, dass das Molekül nicht mehr translokationskompetent ist. Zwei der Deletionsmutanten ließen sich nicht nickeln (Tab. 4). Möglicherweise kann dieses Kriterium zusätzlich die Translokation beeinflussen und zu den äußerst geringen Toxizitäten von BoNT/D  $\Delta$ 661-714 und BoNT/D  $\Delta$ 795-869 führen. Es kann lediglich für die Deletion des Gürtels gemutmaßt werden, dass ausschließlich der fehlende Gürtel und nicht die veränderte Struktur den Effekt erzeugt, da der Bereich des Gürtels eher zur Positionierung

der leichten Kette als zur Aufrechterhaltung der Struktur der H<sub>N</sub>-Domäne beiträgt (Lacy *et al.*, 1998), und somit der Translokation nur der entropische Energiegewinn durch Deletion des Gürtels genommen wird. Die Schlussfolgerung, die sich aus der Deletionsanalyse ergibt, ist demzufolge, dass für eine effiziente Translokation eine vollständige H<sub>N</sub>-Domäne unentbehrlich ist.

Während der Translokation der leichten Kette in das Zytosol der Zelle muss es zwangsläufig zu einer Trennung von HC und LC kommen, zumindest muss der Gürtel sich von der leichten Kette trennen, da sonst die leichte Kette ihre katalytischen Fähigkeiten nicht entfalten (Stecher *et al.*, 1989) oder ihr Substrat nicht erreichen kann. Intrazellulär kann die Thioredoxin Reduktase exponierte Disulfidbrücken reduzieren (Kistner & Habermann, 1992; Schiavo *et al.*, 1990), was zu einer Trennung der Ketten im Zytosol nach oder während der Translokation führen würde. Aus diesem Grund haben viele Gruppen den Einfluss der die HC und LC verbindenden Disulfidbrücke auf die Translokation untersucht. Zum Teil ergaben sich dabei widersprüchliche Daten. 1988 wurde von Bhattacharyya *et al.* die These formuliert, dass die Disulfidbrücke zwischen HC und LC von nativem BoNT/A nicht essentiell sei. DePaiva *et al.* (1993) konnten für natives BoNT/A nachweisen, dass die Disulfidbrücke bzw. die nicht modifizierten Thiole essentiell sind für die Intoxikation von *Aplysia* Neuronen. Schiavo *et al.* (1990) zeigten, dass nach chemischer oder enzymatischer Reduktion von nativem TeNT das Molekül nicht mehr toxisch ist. Kistner *et al.* (1993) hingegen stellte durch Injektion von mit DTT reduziertem nativem oder rekombinierten TeNT nur eine Abnahme der Toxizität fest. Es konnte experimentell bestätigt werden, dass natives TeNT auch durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten wird, und dass die Disulfidbrücke sich nach Reduktion, abhängig von der äußeren Umgebung, schnell zurückbilden kann. Ebenso präsentierten Maisey *et al.* (1988), dass bei Rekonstitution von nativer leichter und schwerer Kette von BoNT/A oder B nur dann ein toxisches Protein entsteht, wenn die Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette ausgebildet ist. Neuere Untersuchungen implizieren, dass erst nach Reduktion des Proteins eine strukturelle Änderung innerhalb von nativem BoNT/A vollzogen werden kann, die für die Entwicklung der Toxizität extrem wichtig ist (Cai & Singh, 2001). Auch für andere Proteintoxine vom Typ AB konnte eine wichtige Rolle der die Untereinheiten verbindenden Disulfidbrücke festgestellt werden. Alkylierung der entsprechenden Cysteine in Ricin oder Diphtherietoxin, veränderte weder die Bindungs- noch die katalytischen Eigenschaften, die Proteine waren in *in vitro* Systemen toxisch, jedoch war in beiden Fällen *in vivo* keine Zytotoxizität mehr vorhanden (Wright *et al.*, 1984; Wright & Robertus, 1987), was eine Funktion der Disulfidbrücke im Aufnahmeprozess nahe legte. In dieser Arbeit konnte eindeutig bewiesen werden, dass die Disulfidbrücke oder die beteiligten Thiole bei rekombinantem BoNT/D keine Funktion im Aufnahmeprozess übernehmen. Entfernen eines der beiden an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligten Cysteine auf DNA-Ebene bietet den entscheidenden Vorteil, dass sich die Disulfidbrücke zwischen HC und LC unabhängig von der äußeren Umgebung nicht mehr ausbilden kann. Toxizitätsexperimente am Zwerchfell und Untersuchung der Substratspaltung in Synaptosomen ergaben, dass die Toxizitäten und

Aktivitäten selbst nach dem Nicking von BoNT/D und BoNT/D C453S gleich sind. Im Unterschied zu allen vorherigen Arbeiten konnte hier der Serotyp D erstmals in rekombinanter Form untersucht werden und natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass BoNT/D sich in bezug auf die Disulfidbrücke anders verhält als andere Serotypen. Vernachlässigt man jedoch diese These, so kann man vermuten, dass die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen schwerer und leichter Kette, wie sie schon von diversen Gruppen gezeigt wurden (Kistner *et al.*, 1993; Bhattacharyya *et al.*, 1988), und die Ausbildung der „Gürtel-Schleife“ bei der rekombinanten Produktion von BoNT/D besonders gut vollzogen wurden. Dieses konnte durch Trennungsversuche der Ketten per HPLC belegt werden, bei denen 1,5 M Harnstoff angewandt werden musste, um die leichte von der schweren Kette chromatographisch zu trennen (Bade, 1999). Diese Interaktionen reichen anscheinend aus, um die katalytische Untereinheit ins Zytosol zu translozieren. Die Disulfidbrücke fungiert daraus folgend nur als zusätzliche „Sicherheitsmaßnahme“, um die beiden Ketten zu verknüpfen. Diese stellt für native Toxine anscheinend ein essentielles Kriterium zur Ausbildung der Toxizität dar (dePaiva *et al.*, 1993; Schiavo *et al.*, 1990).

Um Einblicke in die Funktion bestimmter Bereiche bei pH-induzierten Konformationsänderungen zu erlangen, wurden einzelne oder mehrere Aminosäuren gezielt mutiert. Neben funktionellen Aspekten der Aminosäuren, wie Änderungen des Protonierungszustandes bei pH-Wert Absenkung und cis/trans-Isomerie, waren vor allem die hohe Sequenz- und Strukturkonservierung wichtige Auswahlkriterien. Bei Mutation vieler strikt konservierter Aminosäuren zeigte sich jedoch kein Effekt auf die Funktion des Proteins. Dieser Befund legt nahe, dass die hohe Konservierung innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne vorwiegend der Faltung und Stabilität dient. Bei Entfernung einzelner Wechselwirkungen scheint das Molekül noch genügend Stabilität aufzuweisen, um eine 100 %ige Funktionalität beizubehalten. Einige Spekulationen aus den letzten Jahren können durch diese Befunde entkräftet werden, beispielsweise aus den Publikationen von Oblatt-Montal *et al.* (1995) und Montal *et al.* (1992). In beiden Arbeiten wurde ein Teil der amphipatischen Bereiche der H<sub>N</sub>-Domäne als isoliertes Peptid untersucht (Abb. 44).

TeNT	GVVLLLE <sup>Y</sup> I <sup>PE</sup> ITL <sup>P</sup> VIAALSIA
BoNTA	GAVILLE <sup>F</sup> I <sup>PE</sup> IAI <sup>P</sup> VLGTFALV
BoNTD	GVAFLLE <sup>G</sup> F <sup>PE</sup> FTI <sup>P</sup> ALGVFTFY

**Abbildung 44: Sequenzvergleich der untersuchten Peptidregion** (Montal *et al.*, 1992; Oblatt-Montal *et al.*, 1995) im Vergleich zu BoNT/D. Rot = strikt konservierte Aminosäuren, unterstrichen = als Dreifachmutante untersucht (BoNT/D PEP/AAA).

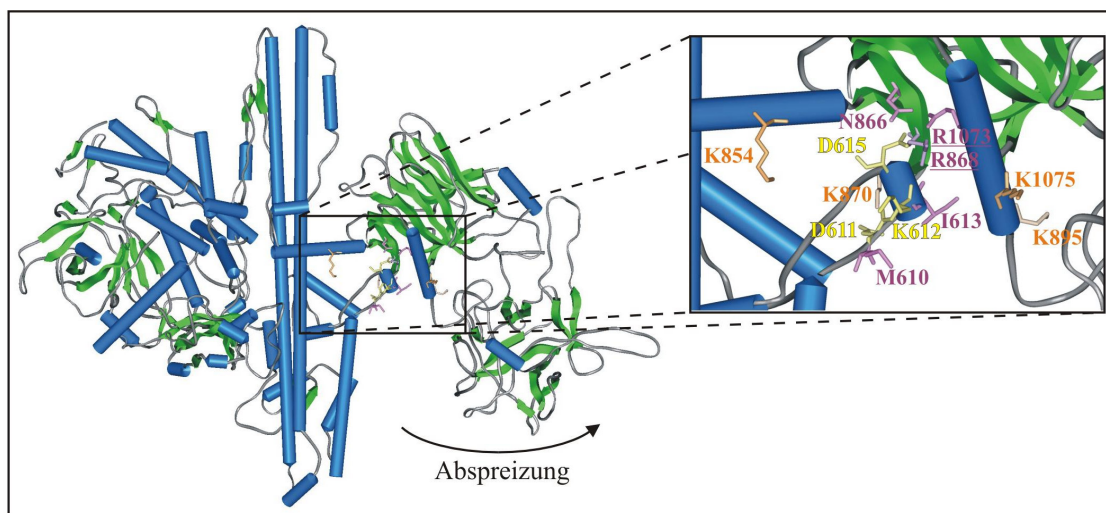
Nach Sequenzvergleich stellte man hohe Konservierung unter den Serotypen, hohe Hydrophobizität und nach Modellanalysen auch die potentielle Fähigkeit fest, nach Übergang zu  $\alpha$ -helicaler Struktur Ionenkanäle zu bilden. Dieses konnte experimentell gezeigt werden. Die Qualität dieser Kanäle entsprach denen, der von der gesamten H<sub>N</sub>-Domäne ausgebildeten Kanäle. Ein Modell wurde entwickelt, in dem ein tetramerisierter Peptibereich, entstammend aus 4 Toxinmolekülen, eine Pore bildet. Die strikt konservierten

Proline in diesem Peptidbereich sollten für die Aufweitung der Poren zuständig sein, die strikt konservierten Glutamate für die Ionenspezifität. Mutation der Proline und eines der Glutamate in BoNT/D, zeigte jedoch keinen Effekt auf die Funktionalität des Toxins. Dieses impliziert, dass diese Aminosäuren eher für die natürliche Faltung und Stabilität des Toxins wichtig sind. Eine Schmelzpunktniedrigung nach Mutation dieser Aminosäuren (Kap. 5.3.1.) bestätigt diese These. Eine durch diesen Bereich vermittelte Porenbildung kann damit widerlegt werden. Ebenso kann eine Involvierung der mutierten Proline in eine pH-induzierte globale Änderung der Struktur, wie es für bestimmte Proline u.a. in Diphtherietoxin diskutiert wird (Johnson *et al.*, 1993, Schmid *et al.*, 1993b, DeLeers *et al.*, 1983), ausgeschlossen werden.

Auch Diphtherietoxin besteht aus drei funktionellen Domänen, von denen die mittlere die Translokationsdomäne darstellt. Sie besteht aus mehreren Schichten übereinanderliegender Helices. Die mittlere Schicht besteht aus hydrophoben  $\alpha$ -Helices, die als TH8 und TH9 bezeichnet werden und einen essentiellen Bereich für die Translokation darstellen. Beide Helices sind in der Lage, in Membranen zu insertieren (Cabiaux *et al.*, 1994 ; Zhan *et al.*, 1994). Sie werden durch eine geladene Schleife, die E349 und D352 enthält, verbunden. Bei saurem, endosomalen pH können diese Aminosäuren vermutlich protoniert und somit unpolar werden, was eine Beschleunigung der Membraninteraktion bewirken würde. Durch Ladungsumkehr dieser Aminosäuren durch Mutation in Lysin wurde die Translokation partiell inhibiert (Ren *et al.*, 1999a; Silverman *et al.*, 1994; O'Keefe *et al.*, 1992), was indirekt diese Annahme unterstreicht. In BoNT/D wurde eine Helix-Helix-Verbindungsschleife innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne identifiziert, die ähnlich dem Diphtherietoxin in exponierter Lage auftritt und ein konserviertes Aspartat und ein Glutamat enthält. Zwischen diesen Aminosäuren ist im Unterschied zu Diphtherietoxin ein konserviertes Lysin positioniert. Durch Mutation aller drei Aminosäuren in Alanin sollte eine generell unpolare Helixverbindung generiert werden, die, wenn dieser Bereich mit Membranen interagiert, eine Verbesserung der Translokationseigenschaften des Proteins erzielen sollte. Auch hier zeigte sich kein Effekt durch die Mutationen auf die Eigenschaften von BoNT/D, womit eine analoge Funktion zu der von Diphtherietoxin nicht gegeben ist.

Bei einem weiteren Ansatz, der als Ziel verfolgte, einen in der Struktur verankerten „pH-Schalter“ zu finden, der eine Konformationsänderung bei einer Erniedrigung des pH-Wertes auslöst, konnten nach computergestützter Analyse einer berechneten, elektrostatischen Oberfläche der Translokationsdomäne zwei geladene exponierte Cluster aufgefunden werden, die gezielt mutiert wurden. Die Dreifachmutation der Aminosäuren D618, K619 und D622 reduzierte die Toxizität erheblich. Die Mutation der Aminosäure D622 erzeugte dabei den stärksten Effekt. Bindung und Katalyse waren durch die eingeführten Mutationen nicht beeinträchtigt, jedoch ergab sich bei der Dreifachmutante im Gegensatz zu den Einzelmutanten eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber Trypsin. Durch CD-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die Gesamtsekundärstruktur unverändert gegenüber dem Wildtyp war. Betrachtete man jedoch die Schmelzkurven bei pH 7,5 und 5, so zeigten alle

Mutanten bei beiden pH-Werten das gleiche Schmelzverhalten. Der Wildtyp oder BoNT/D PEP/AQA, eine Mutante, die die Toxizität nicht beeinflusste, änderten ihr Schmelzverhalten jedoch bei saurem pH. Demzufolge findet nach Mutation dieser Positionen (DKD) keine dem Wildtyp entsprechende Entfaltung mehr statt. Bei saurem pH exponieren die clostridiellen Neurotoxine nachweislich hydrophobe Bereiche, was sie wahrscheinlich dazu befähigt, mit Membranen zu interagieren (Kamata *et al.*, 2000; Roa & Boquet, 1985; Boquet *et al.*, 1984). Um den Umfaltungsprozess näher zu charakterisieren, wurden daher Bindungskinetiken mit TNS, einem Fluoreszenz-Hydrophobizitätsmarker, der an „geclusterte“ hydrophobe, oberflächenexponierte Bereiche eines Proteins bindet, aufgenommen. Diese zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp. Der Grund für die verminderte Toxizität von BoNT/D DKD/AAA besteht also nicht in einem Verlust der Fähigkeit, hydrophobe Bereiche bei saurem pH zu exponieren. Ursache für die verringerte Toxizität kann eine abgeschwächte Wechselwirkung zwischen der Translokations- und der Bindungsdomäne sein. Ein direkter Einblick in Interaktionen zwischen Teildomänen innerhalb der BoNT/D Struktur war nicht möglich, da ein molekulares „Modeling“ der gesamten Struktur von BoNT/D aufgrund der zu hohen Diversität zwischen den Bindungsdomänen der Serotypen A, B und D erfolglos verlief. Daher konnten diese Interaktionen nur anhand der Strukturen von BoNT/A und B ermittelt und auf BoNT/D abgeleitet werden. In der Struktur von Serotyp B (Swaminathan & Eswaremoorthy, 2000) können Wasserstoffbrücken zwischen der H<sub>N</sub>- und H<sub>C</sub>-Domäne ausgehend von Aminosäuren festgestellt werden, die den in BoNT/D mutierten Aminosäuren D618, K619 und D622 entsprechen (Abb. 45).



**Abbildung 45: Interaktionen zwischen H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub>.** Anhand der Struktur von BoNT/B (1EPW; blau =  $\alpha$ -Helices, grün =  $\beta$ -Faltblatt, grau = Turns, Random Coil) sind die mit den in BoNT/D mutierten analogen Aminosäuren D611, K612 und D615 (gelb, „stick“) dargestellt. Durch Wasserstoffbrücken wechselwirkende Reste mit diesen Aminosäuren sind lila („stick“) gefärbt. Fehlende Interaktionen zwischen H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub> könnten eine Abwinklung der H<sub>C</sub>-Domäne bewirken und vermutlich trypsinsensitive Positionen offen legen (orange/unterstrichen, „stick“).

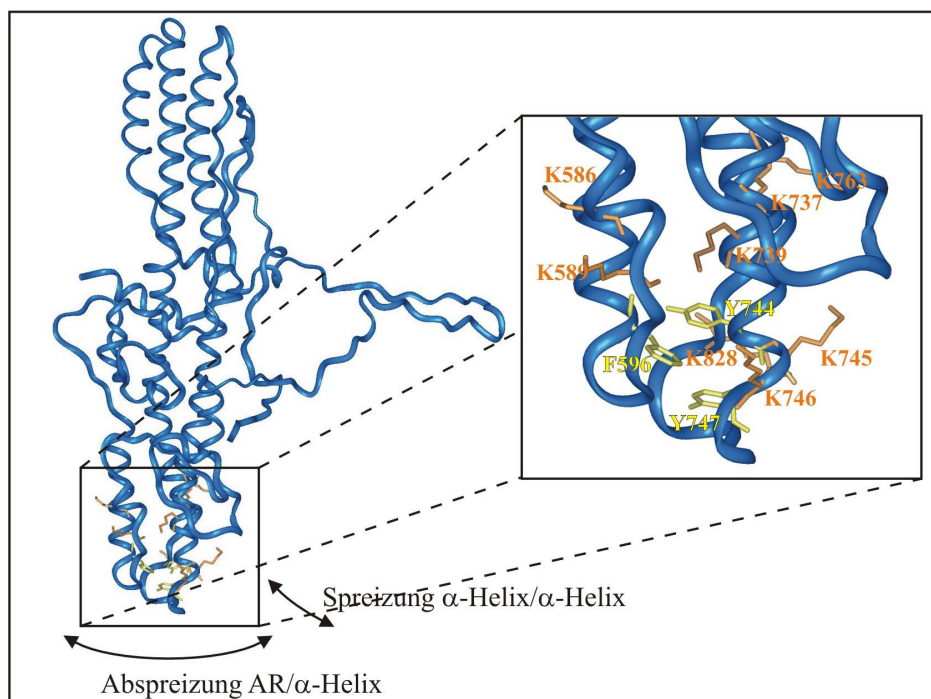
Nach BoNT/B Nomenklatur bilden D611 und I613 sowie K612 und M610 Wasserstoffbrücken innerhalb der H<sub>N</sub>-Domäne aus, und D615 interagiert mit R868, N866

und R1073 und verknüpft somit  $H_N$  und  $H_C$  (Abb. 45). Nimmt man für BoNT/D eine ähnliche Struktur wie BoNT/B an, so würden zum einen durch die Mutationen wichtige Interaktionen zwischen  $H_N$  und  $H_C$  aufgehoben, zum anderen könnten durch darauf folgende minimale strukturelle Änderungen, wie z.B. eine leichte Abspreizung der  $H_C$ - von der  $H_N$ -Domäne, trypsinsensitive Positionen offengelegt werden. In Frage kämen dabei nach BoNT/B Nomenklatur: R1073 und R868, die Aminosäuren, die zuvor mit D615 in Wechselwirkung standen sowie K854, 870, 895 und 1075. In der Struktur von BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998) können entsprechende, von den mutierten Aminosäuren ausgehende Wasserstoffbrücken zwischen  $H_C$  und  $H_N$  nicht festgestellt werden, jedoch finden sich auch hier analoge Positionen, die bei einer Abwinklung von HC eine erhöhte Trypsinsensitivität erzeugen könnten (Daten nicht gezeigt). Das unterschiedliche Schmelzverhalten von Wildtyp und Mutanten ist also vermutlich auf reduzierte Interaktion zwischen  $H_N$  und  $H_C$  zurückzuführen. Weiterhin scheinen diese Interaktionen wichtig für eine intralumenale pH-induzierte Konformationsänderung zu sein. Werden diese Wechselwirkungen im Ausgangsmolekül, d.h. nach Mutation der Aminosäuren, nicht gebildet, so führt dieses zu drastischen Einbußen in der Translokationseffizienz des Proteins. Die Aminosäuren D618 und insbesondere D622 könnten demzufolge als mögliche „pH-Schalter“-Positionen für BoNT/D in Frage kommen.

Der zweite den „pH-Schalter“ betreffenden Ansatz schließt die in den amphiphatischen „Loops“ der  $H_N$ -Domäne gelegenen Aminosäuren K613, K614 und D615 ein. Durch Mutation dieser Aminosäuren in Alanin wird die Toxizität um einen Faktor von 5 reduziert. Bindung und Katalyse sind unbeeinträchtigt, und es wurde verglichen mit dem Wildtyp leicht erhöhte Trypsinsensitivität festgestellt. CD-Analysen stellten auch hier keinen Unterschied in der Gesamtsekundärstruktur fest, wiederum aber fand bei Untersuchung des Schmelzverhaltens das gleiche Phänomen statt wie bei BoNT/D DKD/AAA. In diesem Bereich der  $H_N$ -Domäne sind Wechselwirkungen zwischen der  $H_C$ - und  $H_N$ -Domäne aufgrund der räumlichen Distanz als unwahrscheinlich anzusehen. Vielmehr können Wasserstoffbrücken innerhalb der Translokationsdomäne abgebaut werden, was zu einer minimalen Strukturänderung führen kann und bei welcher ebenfalls trypsinsensitive Positionen zugänglicher werden könnten. In Frage kommende Aminosäuren wären K769 und K568, beide sind im Sequenzvergleich mit anderen Serotypen hochkonserviert. Weiterhin konnte bei Aufnahme von TNS-Bindungskinetiken beobachtet werden, dass bei BoNT/D KKD/AAA eine deutliche langsamere Exposition von hydrophoben Bereichen stattfindet. Dieser Befund kann nach Kamata *et al.* (2000) für eine geringere Toxizität verantwortlich sein. Durch Entfernen von Wechselwirkungen innerhalb der amphiphatischen Bereiche der  $H_N$ -Domäne können bei pH-induzierter Konformationsänderung die darunter liegenden hydrophoben Helices nicht dem Wildtyp entsprechend exponiert werden, was eine Verlangsamung der Translokation zur Folge hat.



Zu der Fragestellung, ob „ $\pi$ -stacking“ Interaktionen innerhalb der  $H_N$ -Domäne in Konformationsänderungen involviert sind, wurden die strikt konservierten aromatischen Aminosäuren Y750, 752 und F602 mutiert, welche vermutlich durch derartige Interaktionen eine der 105 Å langen  $\alpha$ -Helices mit Teilen der amphiphatischen Regionen verbinden oder sogar Übergangszustände bei Konformationsänderungen stabilisieren können. Die Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin reduzierte wiederum nur die Translokationseigenschaften und somit die Toxizität des Moleküls erheblich. Verglichen mit dem Wildtyp konnte ebenfalls eine leicht erhöhte Trypsinsensitivität vermerkt werden. CD-Analysen stellten auch hier keinen Unterschied in der Gesamtsekundärstruktur fest, das Schmelzverhalten blieb jedoch wiederum BoNT/D DKD/AAA oder BoNT/D KKD/AAA. Durch Mutation dieser aromatischen in nicht aromatische Aminosäuren können keine  $\pi$ -Wechselwirkungen untereinander mehr ausgebildet werden. Dadurch kann es vermutlich zu einer flexibleren Struktur im betreffenden Bereich der 105 Å langen  $\alpha$ -Helices kommen. Vorstellbar wäre auch eine Abschwächung der Interaktionen zwischen den amphiphatischen Regionen, der Bereich in dem F596 liegt, und den langen  $\alpha$ -helicalen Bereichen, was zu einer Abspreizung dieser Schleife führen könnte. In beiden Fällen können dabei trypsin-sensitive und hydrophobe Positionen offengelegt werden, die durch Inspektion der „gemodelten“  $H_N$ -Domäne von BoNT/D ermittelt wurden.



**Abbildung 46: Mögliche durch Mutation der Aminosäuren F596, Y744 und Y747 hervorgerufene strukturelle Effekte.** In der „gemodelten“ Struktur der  $H_N$ -Domäne von BoNT/D (blau = „Ribbon“-Darstellung) sind die mutierten Aminosäuren F596, Y744 und Y747 (gelb, „stick“) dargestellt. Fehlende Interaktionen könnten eine Abspreizung der amphiphatischen Regionen (AR) von den 105 Å langen  $\alpha$ -Helices oder eine Spreizung der 105 Å langen  $\alpha$ -Helices hervorrufen, was vermutlich in einer Freilegung trypsin-sensitiver Positionen resultiert (orange, „stick“).

In Frage kommende trypsinsensitive Aminosäuren, die das erste Szenario betreffen, sind K737, K745, K752 und K769, K568 und K589, die die Abwinklung der amphiphatischen Regionen von den 105 Å langen  $\alpha$ -Helices betreffen (Abb. 46). Durch Aufnahme von TNS-Bindungskinetiken konnte gezeigt werden, dass bei BoNT/D YYF/AAA eine deutliche schnellere Exposition von hydrophoben Bereichen stattfindet. Zwar könnte dieses Ergebnis nach Kamata *et al.* (2000) eine Erhöhung der Toxizität hervorrufen, aber ebenso würde es die Vermutung untermauern, dass durch Abwinklung der amphiphatischen Bereiche von den 105 Å langen hydrophoben  $\alpha$ -Helices oder einer Spreizung der  $\alpha$ -Helices hydrophobe Bereiche bereits im Ausgangsmolekül exponiert sind (Abb. 46). So kann auch ohne pH-vermittelte Umfaltung eine größere Menge TNS an das Protein binden.

Der Versuch, die pH-induzierte Konformationsänderung der  $H_N$ -Domäne durch Disulfidbrücken zu inhibieren, lieferte keine eindeutige Aussage. In drei der insgesamt fünf konstruierten Disulfidbrücken-Mutanten bildeten sich solche zwar aus, zeigten jedoch keinen Effekt auf die Eigenschaften von BoNT/D. Die ausgebildeten Disulfidbrücken sind oberflächenexponiert. Da bekannt ist, dass clostridielle Neurotoxine durch intrazellulär wirkende Redoxsysteme wie das Thioredoxinreduktase/Thioredoxin-System reduziert werden können, und da dieses oberflächenexponierte Disulfidbrücken reduzieren kann (Kistner & Habermann, 1992; Schiavo *et al.*, 1990), bleibt fraglich, ob tatsächlich kein Effekt der ausgebildeten Disulfidbrücken auftritt, oder ob diese intralumenal vor Auslösung der Translokation reduziert wurden. Abhilfe könnte hier ein *in vitro* System schaffen, bei dem die Redoxbedingungen selbst bestimmt werden könnten (Heyn *et al.*, 2002). Ein anderer Ansatz wäre die Mutation von Aminosäuren die abgeschirmt im Inneren des Moleküls liegen.

Insgesamt bleibt nochmals zu unterstreichen, dass nur eine vollständige  $H_N$ -Domäne in der Lage ist, die leichte Kette effizient zu translozieren. Wechselwirkungen zwischen der  $H_C$ - und der  $H_N$ -Domäne scheinen sich positiv auf pH-induzierte Konformationsänderungen auszuwirken. Interaktionen innerhalb der  $H_N$ -Domäne, vermittelt durch die amphiphatischen Bereiche, unterstützen diesen Prozess ebenfalls.

### 6.3. Clostridielle Neurotoxine als Proteintransporter

Die clostridiellen Neurotoxine versprechen im Hinblick auf einen Proteintransporter einzigartige Möglichkeiten. Zum einen wirken sie selektiv auf Nervenzellen, zum anderen, betrachtet man TeNT, könnte vermittelt durch den retrograd axonalen Transport die Blut-Hirn Schranke überwunden werden. Aus diesen Gründen hat man sich in den letzten Jahren vielfach auf die Nutzung von TeNT als Proteintransporter konzentriert (Kap. 1.5.). Dabei wurde die  $H_C$ -Domäne als Transportfragment verwendet, was aber eine Translokation ins Zytosol aufgrund der fehlenden  $H_N$ -Domäne verwehrt. Auch ein neuerer Ansatz, bei dem die gesamte schwere Kette von BoNT/A verwendet wurde (Goodnough *et al.*, 2002), konnte keine Beförderung des fusionierten Proteins in das Zytoplasma belegen.

In dieser Arbeit wurden Proteine an BoNT/D fusioniert, die auf verschiedene Arten detektiert werden konnten und unterschiedliche strukturelle Eigenschaften und Größen aufwiesen. Gewählt wurden drei Proteine mit einer Größe von ungefähr 25 kDa, Dihydrofolatreduktase (DHFR), Bcl-2 und GFP sowie zwei Proteine mit einer Größe, die ungefähr der LC entspricht, die leichte Kette von BoNT/A (LC/A) und Luziferase (Luc). In allen Fällen waren die Bindung an neuronale Zellen und die katalytische Aktivität der leichten Kette unbeeinflusst, und auch der Aufnahmeweg der Toxine wurde durch die Fusionen nicht geändert. BoNT/D war in der Lage, die fusionierten Proteine ins Zytosol zu transportieren. Dabei gab es unterschiedliche Auswirkungen auf die Translokation. DHFR und Bcl-2 beeinflussten diese kaum, GFP reduzierte den Translokationsschritt dramatisch um einen Faktor von nahezu 100, gemessen an der Toxizität des Fusionsproteins. Fusionierte man LC/A an BoNT/D, so ließ sich sogar eine leichte Erhöhung der Toxizität feststellen, was aber durch einen additiven Effekt der beiden leichten Ketten erklärbar war. Deaktivierte man die leichte Kette von BoNT/D durch Mutation des aktiven Zentrums, so zeigte sich, dass auch hier die Toxizität geringfügig abgeschwächt wurde. Die Fusion mit Luziferase reduzierte die Toxizität stärker als die mit LC/A. Eventuell ist bei der Größe der Luziferase ein limitierender Faktor der Translokationskompetenz von BoNT/D erreicht. Clostridiale Neurotoxine ermöglichen demnach, N-terminal fusionierte Proteine zusammen mit der leichten Kette in das Zytosol von Zielzellen einzuschleusen, jedoch konnten nicht alle getesteten Proteine mit gleicher Effizienz transloziert werden.

Durch Messung der Toxizität und Substratspaltung von Synaptobrevin2 konnte bewiesen werden, dass die Fusionsproteine in bezug auf die Translokation von LC/D noch funktionell sind. Angestrebt war aber der gemeinsame zytosolische Transport von LC/D und den fusionierten Proteinen. Direkten Nachweis lieferte die bei LC/A-BoNT/D auftretende Spaltung von SNAP-25, die belegte, dass LC/A das Zytosol erreichte und ihre katalytische Aktivität aufrechterhalten wurde. Weitere Daten lieferte Luc-BoNT/D. Luziferaseaktivität konnte nach Translokation direkt im Zytosol detektiert werden. Die angehängten Proteine behalten demnach ihre enzymatische Aktivität bei. Die intrazelluläre Konzentration ist jedoch sehr gering, sie liegt bei 0,5 % des aufgenommenen Materials für translozierte Luziferase. Nimmt man an, dass sich die translozierte Menge an fusioniertem Protein proportional zu der Menge an translozierter LC/D verhält, so würden toxischer wirkende Proteine als GFP- oder Luc-BoNT/D wie z.B. Bcl-2-BoNT/D oder DHFR-BoNT/D ungefähr zehn- bis zwanzigmal mehr Protein in das Zytosol ausliefern. Eine Nutzung eines solchen Transporters ist daher für Anwendungen, bei denen eine katalytische Menge an fusioniertem Protein im Zytosol ausreicht, denkbar.

Warum die Fusionen so unterschiedlich wirksame Proteine ergaben, konnte durch weitere Experimente aufgeklärt werden. Es gab Hinweise, dass fusionierte Proteine sich bei Translokationsprozessen entfalten müssen. Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) entfaltet sich generell bei Translokationsprozessen, d.h. wenn Membranen überwunden werden. Wenn man die Struktur von DHFR mit Methotrexat (Mtx), einem Folat-Analogon,

(liganden)stabilisiert, so unterbleibt diese Entfaltung (Eilers & Schatz, 1986), was zu einer Inhibition der Translokation führt (Beaumelle *et al.*, 1997; Klingenberg & Olsnes, 1996). Durch Fusion von DHFR an BoNT/D wurde dieser Aspekt im Detail untersucht. Tatsächlich zeigte sich, dass bei Vorinkubation von DHFR-BoNT/D mit Mtx die Translokation und somit die Toxizität um eine Größenordnung verringert wird. Bindung und Katalyse werden nicht durch Mtx inhibiert. Eine Entfaltung des fusionierten Proteins ist also entscheidend für die Translokation. Vergleicht man nun GFP-BoNT/D mit diesem Ergebnis, so kann man behaupten, dass GFP, obgleich es ähnlich groß ist wie DHFR, anscheinend so stabil ist, dass es sich nicht entfaltet, was zu einer drastischen Reduktion der Translokation führt. Alternativ fehlen für manche der fusionierten Proteine – wie GFP – Kofaktoren, die für eine Entfaltung nötig sind. Die unelastische  $\beta$ -Fassstruktur inhibiert somit die Translokation ähnlich wie die stabilisierte DHFR-Mtx Struktur. Die Einführung eines „Spacers“ könnte eventuell eine Verbesserung bedeuten, da ähnlich wie bei immobilisierten Enzymen die natürlichen Eigenschaften des fusionierten Moleküls in größerem Umfang erhalten bleiben. Fusionen von Ricin A oder Diphtherietoxin an DHFR (Beaumelle *et al.*, 1997; Klingenberg & Olsnes, 1996) bestätigen, dass nur die nicht stabilisierte Form der DHFR zusammen mit der katalytischen Untereinheit transloziert werden kann. Weiterhin wurde auch die Fusion von Diphtherietoxin mit Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) auf nötige Entfaltung untersucht (Wiedlocha *et al.*, 1992). Durch Bindung von Heparin, Inositol, Hexaphosphat oder anorganischem Sulfat wurde eine stabilisierte Faltung von FGF erzeugt, indiziert durch hohe Trypsinresistenz, die wiederum dazu führte, dass die Translokation verhindert wurde. Eine Entfaltung scheint also Voraussetzung für den Ablauf der Translokation zu sein. Dass die Translokation von DHFR-BoNT/D durch Mtx jedoch nicht völlig unterbunden wird, wie es in anderen Arbeiten gezeigt wird, deutet auf eine flexible Translokationsmaschinerie hin, für die vermutlich eine partielle Entfaltung ausreichend ist. Anscheinend sind die gebildeten Poren ausreichend groß, um auch nicht völlig entfaltete Proteine einer bestimmten Größe noch passieren zu lassen. Alternativ könnte aber auch ein Teil der DHFR ohne gebundenes Substrat vorliegen. Betrachtet man Luc-BoNT/D und geht man nur von partieller Entfaltung aus, so kann hier bereits ein Limit für die Translokation durch die Größe oder strukturelle Beschaffenheit des nur partiell entfaltenen fusionierten Moleküls erreicht sein.

Alle Indizien deuten daraufhin, dass sich bei der Translokation auch die leichte Kette entfaltet. Auch für andere AB-Toxine wie z.B. Diphtherietoxin wurde nachgewiesen, dass eine Entfaltung der katalytischen Untereinheit für die Translokation notwendig ist. Durch Einführung von zusätzlichen Cysteinen konnte die leichte Kette durch Disulfidbrücken verknüpft werden. Daraus folgend wurde die leichte Kette nicht mehr transloziert (Falsnes *et al.*, 1993). Anzeichen für eine Entfaltung der leichten Kette gibt es auch für clostridielle Neurotoxine. Li und Singh (2000) berichteten bereits von einer pH-induzierten globalen Strukturänderung der leichten Kette, die eventuell die Translokation erleichtert. Weiterhin können die durch Molecular Modeling errechneten Poren der clostridiellen Neurotoxine (5 Å, Montal *et al.*, 1992; 8 Å, Oblatt-Montal *et al.*, 1995) oder die tatsächlich gemessenen Poren, mit einer Größe von ungefähr 20 Å bzw. 14 x 25 Å (Hoch and Finkelstein, 1985;

Schmid *et al.*, 1993) unmöglich eine komplett gefaltete leichte Kette, die eine Größe von 55 Å x 55 Å x 62 Å (3BTA) aufweist, passieren lassen. Ein weiteres Indiz für die nötige Entfaltung der leichten Kette liefert das Protein LC/A-BoNT/D. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich fusionierte Proteine, also wahrscheinlich auch die fusionierte LC/A, zur Translokation partiell entfalten müssen. Geht man davon aus, dass sich LC/A nach Fusion mit BoNT/D so verhält wie im Ausgangsmolekül BoNT/A, kann man vermuten, dass sich die leichten Ketten auch bei Translokation des Wildtyps entfalten. Ein zweiter Punkt ist die Inhibition der Translokation von LC/A-BoNT/D durch Mtx. BoNT/D wird nicht in Bindung und Katalyse durch Mtx inhibiert, jedoch ist ein geringer Einfluss auf die Toxizität zu vermerken (Faktor 1,5). Dieser erhöht sich drastisch (Faktor 8), wenn LC/A-BoNT/D mit Mtx inkubiert wird (Daten nicht gezeigt). Eventuell kann Mtx also auch an der leichten Kette clostridieller Neurotoxine binden, diese in ihrer Konformation stabilisieren und somit die Translokation der leichten Ketten – ähnlich wie bei der DHFR – inhibieren. BoNT/D selbst wurde nicht signifikant inhibiert, weil die Bindungsstelle des Mtx vermutlich sterisch durch den Bereich des Gürtels besetzt wird, beispielsweise bei einer Bindung in der Nähe des katalytischen Zentrums. Vergleichbar aufgebaute Substanzen, wie der Metallchelator BABIM, können tatsächlich an dieser Position binden (Eswaramoorthy *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2000). Für die Bindung von Mtx gibt es jedoch noch keine Studien.

Durch Fusion der schweren Kette von BoNT/D mit der leichten Kette von BoNT/A konnte erstmals gezeigt werden, dass die schwere Kette in der Lage ist, ein heterologes Protein zu translozieren. Bereits 1988 wurde von Maisey *et al.* gezeigt, dass eine gemeinsame Rekonstitution von leichten und schweren Ketten unterschiedlicher Serotypen (BoNT/A & B) nicht-toxische Derivate erzeugt. Auch eine getrennte Renaturierung der Ketten mit anschließender Rekonstitution erzeugte untoxische Proteine. Nur eine gemeinsame Renaturierung und Rekonstitution von Ketten des gleichen Serotyps resultierte in funktionellen Derivaten. Für TeNT gibt es ähnliche Daten (Poulain *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu konnte bei dem Chimären LC/A-HC/D eine Toxizität und somit eine Funktionalität erzielt werden, die nahezu der von BoNT/D glich. Die Translokation von LC/A konnte außerdem durch Spaltung von SNAP-25 in funktionellen Synaptosomen bewiesen werden. Zwar ist LC/A ein Protein der gleichen Familie, jedoch ist der Sequenzkonservierungsgrad unter den Serotypen nicht sehr hoch (durchschnittlich 35 %). Weiterhin unterscheiden sich die Größen der leichten Ketten im Übergang von der leichten zur schweren Kette um einige Aminosäuren und die Aminosäuresequenz in diesem Abschnitt, so dass auch fraglich war, ob sich der Gürtel um die leichte Kette falten kann. Dieses legt nahe, dass die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den beiden Ketten in diesem Chimären als nicht optimal anzusehen sind. Dass die Disulfidbrücke zwischen den Ketten dieses Chimären nicht ausgebildet wird, deutet auf eine nicht optimale Faltung hin. Der Gürtel ist jedoch vermutlich um die leichte Kette gefaltet, und auch die Wechselwirkungen zwischen leichter und schwerer Kette scheinen ausreichend zu sein, damit die leichte Kette von BoNT/A in das Zytosol transloziert wird. Die fehlende Disulfidbrücke hat daher vermutlich keinen negativen Einfluss, ähnlich wie bei BoNT/D

selbst. In dem Chimären LC/A-HC/D wurden anscheinend nahezu optimale Voraussetzungen für die Funktionalität getroffen, jedoch konnten jüngste Untersuchungen hinsichtlich der Nutzung der schweren Kette von BoNT/A als Proteintransporter die Auslieferung eines 10 kDa Aminodextrans durch HC/A nicht belegen (Goodnough *et al.*, 2002). In diesem Derivat wurden die beiden Proteine durch gemeinsame Renaturierung chemisch verknüpft. Vielleicht stellt diese Methode eine nicht optimale Weise dar, um funktionelle Moleküle zu erlangen. Eigene Rekonstitutionsexperimente resultierten ebenfalls in BoNT/D Molekülen, die um den Faktor 10 in ihrer Toxizität erniedrigt waren (Daten nicht gezeigt). Die rekombinante Produktion derartiger Chimären sicherte also vermutlich eine optimalere Faltung zu, resultierend in funktionellen Proteinen, so dass sich dieser Weg der Proteinherstellung für solche Derivate anböte. Eine andere Erklärung für die nicht nachweisbare Translokation des Aminodextrans (Goodnough *et al.*, 2002) wäre eine nicht optimale „Füllung“ des Gürtels der schweren Kette durch ein nur 10 kDa großes Protein. Durch Deletionsanalysen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass beim Fehlen des Gürtels nahezu keine Translokation mehr stattfindet. Dieses könnte ebenso der Fall sein, wenn der Gürtel durch mangelnde Interaktion mit dem zu translozierenden Protein nicht mehr funktionell ist, d.h. wenn er schon im Ausgangsmolekül als statistisches Knäuel vorliegt, und somit der Translokation der entropische Energiegewinn fehlen würde. Bei der Entwicklung eines Proteintransporters, der nur auf den schweren Ketten der clostridiellen Neurotoxine beruht, könnten weitere Untersuchungen diese Annahme bestätigen.

Chaddock *et al.* (2000a, b), Duggan *et al.* (2002) und Francis *et al.* (2000) demonstrierten für BoNT/A und Diphtherietoxin, dass diese AB-Toxine auch dann hinsichtlich der Translokation funktionell bleiben, wenn die Bindungsdomänen durch Proteine wie Nervenwachstumsfaktor (NGF), Weizenkeimagglutinin (WGA), einem Lectin aus *Erythrina cristagalli* (ECL) oder im Falle von Diphtherietoxin durch die neuronale Bindungsdomäne von TeNT ersetzt werden. Dabei wurden die Zellspezifität der clostridiellen Neurotoxine aufgrund der Bindungskapazitäten der Lectine auf nicht neuronale Zellen und die Wirkungsweise des Diphtherietoxins auf neuronale Zellen erweitert. Bei den Ansätzen bezüglich BoNT/A wurden die nicht-toxischen LH<sub>N</sub>-fragmente chemisch mit den neuen Bindungsdomänen verknüpft. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsdomäne von Diphtherietoxin an LH<sub>N</sub>-BoNT/D auf DNA-Ebene fusioniert. Gleichzeitig wurde das Chimäre N-terminal mit GFP markiert, um es in Zellen zu visualisieren. Das entstandene Protein, GFP-LH<sub>N</sub>/D-HC/DT, konnte zwischen LC und chimärer HC genickt werden, und die Disulfidbrücke war ausgebildet. Durch Fusion mit der Bindungsdomäne von Diphtherietoxin war das Derivat befähigt, an den heparinbindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorpräkursoren von Epithelzellen, den Rezeptor von Diphtherietoxin, zu binden (Naglich *et al.*, 1992). Dieses konnte durch den Nachweis von rezeptorvermittelter Aufnahme der Chimären in Vero und MDCK (nicht gezeigt) Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte durch Immunfluoreszenz mit *Strep-tag*<sup>®</sup> Antiserum eine mögliche Trennung der chimären schweren Ketten von der GFP-markierten leichten Kette belegt werden, was durch Western Blot nach Fraktionierung der Zellen in Makro-, Mikrosomen und

Zytosol bestätigt wurde. Dieser Ansatz lieferte erstmals direkte Indizien, dass sich bei der Translokation die Ketten trennen und nur die leichte Kette in das Zytosol entlassen wird. Der direkte Nachweis der leichten Kette im Zytosol durch Spaltung von Cellubrevin konnte bisher nicht erbracht werden, zum anderen lagen die Mengen an Protein in den einzelnen Fraktionen an der Nachweisgrenze des Western Blots. Daher werden gegenwärtig Experimente mit GFP-BoNT/D in Kooperation mit Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger vom Institut für Anatomie der Humboldt Universität (Charité) in Berlin, durchgeführt, die darauf abzielen, die Aufnahme von GFP-BoNT/D an hippocampalen Neuronen zu verfolgen und die Trennung der Ketten nach subzellulärer Fraktionierung nachzuweisen.

Über die Effektivität der Translokation von GFP-LH<sub>N</sub>/D-H<sub>C</sub>/DT kann nach den bisherigen Ergebnissen keine Aussage gemacht werden. Die H<sub>N</sub>-Domäne reicht anscheinend aus, um die leichte Kette zu translozieren, jedoch hat sich in dieser Arbeit auch gezeigt, dass für eine effiziente Translokation eine Wechselwirkung zwischen der H<sub>N</sub>- und der H<sub>C</sub>-Domäne notwendig ist. Diese wird sicherlich von der nur halb so großen H<sub>C</sub>-Domäne von Diphtherietoxin nicht ausgebildet, so dass man mutmaßen kann, dass die Effizienz der Translokation nicht dem Wildtyp entspricht. Für BoNT/A, einem Serotyp bei dem diese Wechselwirkungen in der Kristallstruktur nicht auftreten, hat sich gezeigt, dass die Translokation nach dem chemischen Ersetzen der Bindungsdomäne ähnlich effektiv verläuft wie beim Wildtyp (Chaddock *et al.*, 2000b). Hinsichtlich der Trennung von HC und LC sollte kein Unterschied zum Wildtyp bestehen, da in diesem Bereich des Moleküls keine Veränderungen vorgenommen wurden. Für zukünftige Versuche, BoNT/D mit anderen Bindungsdomänen zu verknüpfen, sollten daher Ansätze gewählt werden, in denen nur die C-terminale Hälfte der H<sub>C</sub>-Domäne durch andere Bindungsdomänen ausgetauscht wird.

Zusammenfassend gesagt, können die clostridiellen Neurotoxine in Fusion mit entfaltbaren Proteinen als Proteintransporter dienlich sein. Die H<sub>N</sub>-Domäne vermittelt die Translokation unabhängig von der Bindungs- oder der katalytischen Domäne, jedoch vermutlich nicht so effizient wie im Wildtyp BoNT/D.

## 7.       **Ausblick**

Im Rahmen dieser Dissertation konnten viele neue Erkenntnisse hinsichtlich des Translokationsmechanismus clostridieller Neurotoxine gewonnen werden.

Da man BoNT/D in hohen Ausbeuten und Reinheiten produzieren kann, eröffnen sich Möglichkeiten, erstmals einen rekombinanten Serotyp zu kristallisieren und somit die tatsächliche Struktur von BoNT/D zu lösen, so wie es für die nativen Proteine der Serotypen A und B gelungen ist (Lacy *et al.*, 1998; Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000). Man könnte weiterhin, da bei rekombinantem Material die Möglichkeit besteht, durch gezielte Mutationen im aktiven Zentrum das Molekül zu inaktivieren, einen Kristall von katalytisch inaktivem Toxin und Substrat erstellen. Dieses lieferte weitere Einsichten in den katalytischen Mechanismus clostridieller Neurotoxine, wie sie strukturell für BoNT/B von Hanson & Stevens (2000) und biochemisch für BoNT/A von Binz *et al.* (2002) gezeigt wurden. Außerdem könnten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Translokation von BoNT/D die Struktur als Grundlage benutzen. Bezieht man sich auf die Annahme, dass sich die Translokation der leichten Kette durch Bindung von Methotrexat (Mtx) vermutlich inhibieren lässt, so könnte eine solche Kokristallisation direkt Einsichten in die Interaktion von Mtx mit BoNT/D schaffen, ähnlich wie sie die Bindung von Mtx an Dihydrofolatreduktase geliefert hat (Sawaya *et al.*, 1997).

Bei der Untersuchung der Translokationseigenschaften von BoNT/D zeigte sich, dass eine Entfaltung des fusionierten Proteins die Translokation erheblich verbessert. Vermutlich können auch partiell entfaltete Moleküle, je nach Größe der dabei auftretenden Domänen, transloziert werden. Ob die leichte Kette sich auch entfaltet, konnte durch die vorliegende Arbeit nur vermutet werden. Einen Beweis kann eine an verschiedenen Stellen durch Disulfidbrücken verknüpfte leichte Kette bringen, die sich durch diese intramolekulare Verknüpfung nicht mehr entfalten kann. Im Fall von Diphtherietoxin konnte so gezeigt werden, dass die leichte Kette sich zur Translokation entfalten muss (Falnes *et al.*, 1994; Falnes & Olsnes, 1995). Interessant ist auch die Fragestellung, ob es für die vermutlich stattfindende Entfaltung der leichten Kette Kofaktoren, beispielsweise Chaperone, gibt, die für die Translokation der clostridiellen Neurotoxine essentiell sind. Interaktionsexperimente wie Hefe-2-Hybrid oder Koimmunpräzipitationen könnten darüber Aufschluss geben. Für einige AB-Toxine konnten bereits Interaktionspartner identifiziert werden, die wahrscheinlich für Translokationsprozesse, die Entfaltung der Proteine voraussetzen, nötig sind. Für Diphtherietoxin gibt es interessante Daten, die vermuten lassen, dass die Translokationsdomäne selbst in der membranverankerten Form in der Lage ist, chaperonenartig auf die leichte Kette zu wirken (Ren *et al.*, 1999b; Hammond *et al.*, 2002). Das Molekül ist demzufolge unabhängig von äußeren Faktoren. Andere Arbeiten kommen jedoch zu dem Schluss, dass zytosolische Faktoren wie z.B. Thioredoxin Reduktase für die Translokation bzw. Faltung im Zytoplasma nötig sind (Ratts *et al.*, 2002). Für Cholera Toxin



konnte mit der Protein-Disulfid-Isomerase eine neue Klasse von Chaperonen identifiziert werden, die abhängig vom Redoxzustand die Faltung der katalytischen Untereinheit gewährleistet (Tsai *et al.*, 2001). Weiterhin konnte für Ricin *in vitro* und *in vivo* eine Interaktion mit dem molekularen Chaperon Calretikulin nachgewiesen werden (Day *et al.*, 2001).

Auch ein therapeutischer Einsatz des rekombinanten BoNT/D, welches genauso wirksam ist wie das native, ist vorstellbar. Aufgrund des Fehlens der akzessorischen Proteine des Toxin-Komplexes im Vergleich zum nativen Toxin, sollte die Immunogenität drastisch vermindert sein. Resultate von Coffield *et al.* (1997), sowie das Fehlen von humanen Vergiftungsfällen, deuten zwar darauf hin, dass BoNT/D nicht am Menschen wirkt, jedoch konnten neueste Erkenntnisse eine Wirksamkeit am Menschen nachweisen (persönliche Mitteilung: R. Eleopra). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BoNT/D in der Lage ist, N-terminal fusionierte Proteine in das Zytosol zu transportieren, und dass die fusionierten Proteine im Zytosol ihre Aktivität entfalten können. Eine Nutzung von clostridiellen Neurotoxinen als Proteintransporter eröffnet aufgrund ihrer hohen Neuroselektivität viele neue Möglichkeiten. Ein weiterer Vorteil ist, dass die katalytische Wirksamkeit der clostridiellen Neurotoxine durch einzelne Punktmutationen unwiderruflich aufgehoben werden kann, was unerlässlich für die Nutzung als Proteintransporter ist. Ob die schwere Kette ausreicht, einen vergleichbaren Transport zu gewährleisten, sollte zukünftig durch Fusionen mit weiteren Proteinen getestet werden. Die intrazelluläre Konzentration an transloziertem Protein ist, wie sich im Laufe der Untersuchungen zeigte, nicht sehr hoch, jedoch könnte sie ausreichen, um beispielsweise neuronale Enzymdefekte zu therapieren. Bei angeborenen Stoffwechselstörungen beispielsweise kommt es durch den Enzymdefekt zu einer verstärkten Anhäufung bestimmter Stoffwechselmetaboliten und einer verminderten Produktion von Stoffwechselprodukten (z.B. Markscheidenproteine). Die angehäuften Metaboliten können einzelne Organe schädigen oder zu eigenständigen Speicherkrankheiten führen. Das gespeicherte Material kann zelltoxisch wirken, z.B. im Marklager, und zu Entmarkungen führen. So entsteht eine Leukodystrophie, die in dem speziellen Fall eine "Speicherungs-dystrophie" ist. Das pathologisch Bemerkenswerte an diesen Erkrankungen ist, dass ein Zuviel an Material (Speicherung) zu einem Zuwenig an Gewebe (Dystrophie des Marklagers) führt. Beispiele dafür sind die familiäre amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder die neuronalen Formen von *Morbus Pompe* oder *Morbus Gaucher*. Denkbar ist auch eine Nutzung zur Bekämpfung von neuronalen Krebsarten nach Fusion an apoptotisch wirksame Proteine wie Bad oder Bcl-XL oder zur Verlangsamung von Apoptose neuronaler Zellen wie es bei Schlaganfällen oder der Alzheimer-Krankheit auftritt. Eine Fusion an antiapoptotisch wirkende Proteine wie z.B. Bcl-2, könnte hier den gewünschten Effekt erzielen.

## 8. Literatur

AHNERT-HILGER G, KUTAY U, CHAHOUD I, RAPOPORT T, WIEDENMANN B (1996). Synaptobrevin is essential for secretion but not for the development of synaptic processes. *Eur J Cell Biol* **70**(1):1-11.

ALEXANDER RL, RAMAGE J, KUCERA GL, CALIGIURI MA, FRANKEL AE (2000) High affinity interleukin-3 receptor expression on blasts from patients with acute myelogenous leukemia correlates with cytotoxicity of a diphtheria toxin/IL-3 fusion protein. *Leuk Res* **25**:875-81.

ALOUF JE, FREER JH (EDS) (1999). „The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Toxins“, Academic Press, London.

AMERSHAM (1992). ECL Western Blotting Protocols.

ARAKAWA T, YU J, CHONG DK, HOUGH J, ENGEN PC, LANGRIDGE WH (1998) A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nat Biotechnol* **16**:934-8.

ARORA N, KLIMPEL KR, SINGH Y, LEPPLA SH (1992) Fusions of anthrax toxin lethal factor to the ADP-ribosylation domain of Pseudomonas exotoxin A are potent cytotoxins which are translocated to the cytosol of mammalian cells. *J Biol Chem* **267**:15542-8.

ARORA N, WILLIAMSON LC, LEPPLA SH, HALPERN JL (1994) Cytotoxic effects of a chimeric protein consisting of tetanus toxin light chain and anthrax toxin lethal factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem* **269**:26165-71.

ARORA N, LEPPLA SH (1994) Fusions of anthrax toxin lethal factor with shiga toxin and diphtheria toxin enzymatic domains are toxic to mammalian cells. *Infect Immun* **62**:4955-61.

ATKINS JL, BUTLER PE (2002). Hyperhidrosis: a review of current management. *Plast Reconstr Surg* **110**(1):222-8.

AURELI P, FENICIA L, PASOLINI B, GIANFRANCESCHI M, MCCROSKEY LM, HATHEWAY CL (1986). Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *J Infect Dis* **154**: 207–11.

BACHMANN PA, GEDEK B, MAHNEL H, MAYR A, ROLLE M, SCHELS H (1984), Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Mayr A, Rolle M (eds), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

BADE S (1999). Biotechnische Herstellung neuroselektiver Transportermoleküle (Diplomarbeit).

BARTH H, ROEBLING R, FRITZ M, AKTORIES K (2002) The binary Clostridium botulinum C2 toxin as a protein delivery system: identification of the minimal protein region necessary for interaction of toxin components. *J Biol Chem* **277**:5074-81.

BEAUMELLE B, TAUPIAC MP, LORD JM, ROBERTS LM (1997). Ricin A Chain Can Transport Unfolded Dihydrofolate Reductase into the Cytosol. *J Biol Chem* **272**(35): 22097-102.

BEISE J, HAHNEN J, ANDERSEN-BECKH B, DREYER F (1994). Pore formation by tetanus toxin, its chain and fragments in neuronal membranes and evaluation of the underlying motifs in the structure of the toxin molecule. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **349**:66–73.

BENNETH MJ, CHO S, EISENBERG D (1994). Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci* **3**: 1444.

BHATTACHARYYA SD, SUGIYAMA H, RUST P, LACEY D (1988). Evidence that subunits of type A botulinum toxin need not be linked by disulfide. *Toxicon* **26**(9): 817-25.

- BIGALKE H, HELLER I, BIZZINI B, HABERMANN E (1981). Tetanus toxin and botulinum A toxin inhibit release and uptake of various transmitters, as studied with particulate preparations from rat brain and spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **316**: 244-51.
- BINZ T, BADE S, RUMMEL A, KOLLEWE A, ALVES J (2002). Arg362 and Tyr365 of the Botulinum Neurotoxin Type A Light Chain Are Involved in Transition State Stabilization. *Biochemistry* **41**: 1717-23.
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* **7**: 1513-23.
- BLASI J, CHAPMAN ER, LINK E, BINZ T, YAMASAKI S, DE CAMILLI P, SUDHOF TC, NIEMANN H, JAHN R (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* **365**(6442): 160-3.
- BLATTEIGER B, NEWHALL W (1982). The use of Tween-20<sup>®</sup> as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immun Meth* **55**: 297-307.
- BLAUSTEIN RO, GERMANN WJ, FINKELSTEIN A, DASGUPTA BR (1987). The N-terminal half of the heavy chain of botulinum type A neurotoxin forms channels in planar phospholipid bilayers. *FEBS Lett* **226**(1): 115-20.
- BLECK TP (1989). Clinical aspects of tetanus. In: *Botulinum Neurotoxins and Tetanus Toxin*, edited by L. L. Simpson. San Diego, CA:Academic, 379–398.
- BOHLINGER I (1992). Diplomarbeit, Tübingen.
- BOQUET P, DUFLLOT E (1982). Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(24): 7614-8.
- BOQUET P, DUFLLOT E, HAUTTECOEUR B (1984). Low pH induces a hydrophobic domain in the tetanus toxin molecule. *Eur J Biochem* **144**:339-44.
- BORDET T, CASTELNAU-PTAKHINE L, FAUCHEREAU F, FRIOCOURT G, KAHN A, HAASE G (2001). Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Mol Cell Neurosci* **17**:842-54.
- BORODIC GE, FERRANTE RJ, PERACE LB, ALDERSON K (1994). Pharmacology and histology of the therapeutic application of botulinum toxin. In: *Therapy with botulinum toxin*, herausgegeben von Jankovic J und Hallet M, New York, Dekker, 119-57.
- BRASHEAR A, WATTS MW, MARCHETTI A, MAGAR R, LAU H, WANG L (2000). Duration of effect of botulinum toxin type A in adult patients with cervical dystonia: a retrospective chart review. *Clin Ther* **22**:1516-24.
- BREJC K, SIXMA TK, KITTS PA, KAIN SR, TSIEN RY, ORMO M, REMINGTON SJ (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequora victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2306.
- BROOKS VB, CURTIS DR, ECCLES JC (1955). Mode of action of tetanus toxin. *Nature* **175**: 120–121.
- CABIAUX V, LORGE P, VANDENBRANDEN M, FALMANGE P, RUYSSCHAERT JM (1985). Tetanus toxin induces fusion and aggregation of lipid vesicles containing phosphatidylinositol at low pH. *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 840–849.
- CABIAUX V, QUERTENMONT P, CONRATH K, BRASSEUR R, CAPIAU C, RUYSSCHAERT JM (1994). Topology of diphtheria toxin B fragment inserted in lipid vesicles. *Mol Microbiol* **11**(1):43-50.
- CAI S, SINGH BR (2001). Role of the disulfide cleavage induced molten globule state of type A botulinum neurotoxin in its endopeptidase activity. *Biochemistry* **40**(50): 15327-33.
- CARLE A, RATTONE G (1884). Studio eperimentale sull'eziologia del tetano. *Giorn. Accad. Med. Torino* **32**: 174–179.

CHADDOCK JA, PURKISS JR, FRIIS LM, BROADBRIDGE JD, DUGGAN MJ, FOOKS SJ, SHONE CC, QUINN CP, FOSTER KA (2000 a). Inhibition of vesicular secretion in both neuronal and nonneuronal cells by a retargeted endopeptidase derivative of Clostridium botulinum neurotoxin type A. *Infect Immun* **68**(5): 2587-93.

CHADDOCK JA, PURKISS JR, DUGGAN MJ, QUINN CP, SHONE CC, FOSTER KA (2000 b) A conjugate composed of nerve growth factor coupled to a non-toxic derivative of Clostridium botulinum neurotoxin type A can inhibit neurotransmitter release in vitro. *Growth Factors* **18**:147-55.

CHADDOCK JA, HERBERT MH, LING RJ, ALEXANDER FC, FOOKS SJ, REVELL DF, QUINN CP, SHONE CC, FOSTER KA (2002). Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of Clostridium botulinum toxin type A. *Protein Expr Purif* **25**(2):219-28.

CHEN F, KUZIEMKO GM, STEVENS RC (1998). Biophysical Characterization of the Stability of the 150-Kilodalton Botulinum Toxin, the Nontoxic Component, and the 900-Kilodalton Botulinum Toxin Complex Species. *Infect Immun* **66**(6): 2420–2425.

COEN L, OSTA R, MAURY M, BRULET P (1997) Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9400-5.

COFFIELD JA, BAKRY NM, ZHANG RD, CARLSON J, GOMELLA LG, SIMPSON LL (1997). In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches. *J Pharmacol Exp Ther* **280**(3): 1489-98.

CONTI E, FRANKS NP, BRICK P (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287.

DAGERT M, EHRLICH SD (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Genes* **6**: 23-28.

DATTA A, DASGUPTA BR (1988). Circular dichroic and fluorescence spectroscopic study of the conformation of botulinum neurotoxin types A and E. *Mol Cell Biochem* **79**(2):153-9.

DAY PJ, OWENS SR, WESCHE J, OLSNES S, ROBERTS LM, LORD JM (2001). An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J Biol Chem* **276**(10):7202-8.

DELEERS M, BEUGNIER N, FALMAGNE P, CABIAUX V, RUYSSCHAERT JM (1983). Localization in diphtheria toxin fragment B of a region that induces pore formation in planar lipid bilayers at low pH. *FEBS Lett* **160**:82-6.

DE PAIVA A, POULAIN B, LAWRENCE GW, SHONE CC, TAUC L, DOLLY JO (1993). A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly. *J Biol Chem* **268**(28): 20838-44.

DOBRENIS K, JOSEPH A, RATTAZZI MC (1992) Neuronal lysosomal enzyme replacement using fragment C of tetanus toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:2297-301.

DONOVAN JJ, MIDDLEBROOK JL (1986). Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes. *Biochemistry* **25**(10): 2872-6.

DUCHE D, BATY D, CHARTIER M, LETELLIER L (1994). Unfolding of colicin A during its translocation through the Escherichia coli envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J Biol Chem* **269**(40):24820-5.

DUCHE D, IZARD J, GONZALEZ-MANAS JM, PARKER MW, CREST M, CHARTIER M, BATY D (1996). Membrane topology of the colicin A pore-forming domain analyzed by disulfide bond engineering. *J Biol Chem* **271**(26):15401-6.

DUGGAN MJ, QUINN CP, CHADDOCK JA, PURKISS JR, ALEXANDER FC, DOWARD S, FOOKS SJ, FRIIS LM, HALL YH, 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. *J Biol Chem* in press.
- DUNKLEY PR, HEATH JW, HARRISON SM, JARVIE PE, GLENFIELD PJ, ROSTAS JA (1988). A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* **441**: 59-71.
- EILERS M, SCHATZ G (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* **322**:228-32.
- ELLMAN GL (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-77.
- ESWARAMOORTHY S, KUMARAN D, SWAMINATHAN S (2002). A novel mechanism for Clostridium botulinum neurotoxin inhibition. *Biochemistry* **41**(31):9795-802.
- FALNES PO, CHOE S, MADSHUS IH, WILSON BA, OLSNES S (1994). Inhibition of membrane translocation of diphtheria toxin A-fragment by internal disulfide bridges. *J Biol Chem* **269**(11):8402-7.
- FALNES PO, OLSNES S (1995). Cell-mediated reduction and incomplete membrane translocation of diphtheria toxin mutants with internal disulfides in the A fragment. *J Biol Chem* **270**(35):20787-93.
- FEURING-BUSKE M, FRANKEL AE, ALEXANDER RL, GERHARD B, HOGGE DE (2002) A diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors. *Cancer Res* **62**:1730-6.
- FIGUEIREDO DM, MATTHEWS CC, PARKS DA, FAIRWEATHER NF, DOUGAN G, WILT SG, FISHMAN PS (2000) Interaction of tetanus toxin derived hybrid proteins with neuronal cells. *J Nat Toxins* **9**:363-79.
- FINKELSTEIN A (1990). Channels formed in phospholipid bilayer membranes by diphtheria, tetanus, botulinum and anthrax toxin. *J Physiol Paris* **84**(2): 188-90.
- FLICKER PF, ROBINSON JP, DASGUPTA BR (1999). Is formation of visible channels in a phospholipid bilayer by botulinum neurotoxin type B sensitive to its disulfide? *J Biol Chem* **128**(3): 297-304.
- FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W, STARKE K (EDS) (1998). Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- FOSS FM (2001) Interleukin-2 fusion toxin: targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* **941**:166-76.
- FRANCIS JW, BROWN RH JR, FIGUEIREDO D, REMINGTON MP, CASTILLO O, SCHWARZSCHILD MA, FISHMAN PS, MURPHY JR, VANDERSPEK JC (2000) Enhancement of diphtheria toxin potency by replacement of the receptor binding domain with tetanus toxin C-fragment: a potential vector for delivering heterologous proteins to neurons. *J Neurochem* **74**:2528-36.
- FRANCIS JW, HOSLER BA, BROWN RH JR, FISHMAN PS (1995) CuZn superoxide dismutase (SOD-1):tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells. *J Biol Chem* **270**:15434-42.
- FRANKEL AE, RAMAGE J, KISER M, ALEXANDER R, KUCERA G, MILLER MS (2000) Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor. *Protein Eng* **13**:575-81.
- FU FN, LOMNETH RB, CAI S, SINGH BR (1998). Role of zinc in the structure and toxic activity of botulinum neurotoxin. *Biochemistry* **37**(15): 5267-78.
- FU FN, SINGH BR (1999). Calcein permeability of liposomes mediated by type A botulinum neurotoxin and its light and heavy chains. *J Protein Chem* **18**(6): 701-7.

- GALAZKA A, GASSE F (1989). The present status of tetanus and tetanus vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* **195**:31–53.
- GESSLER F, BOHNEL H (1999). Production and purification of Clostridium botulinum type C and D neurotoxin. *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**(3):361-7
- GOODNOUGH MC, OYLER G, FISHMAN PS, JOHNSON EA, NEALE EA, KELLER JE, TEPP WH, CLARK M, HARTZ S, ADLER M (2002) Development of a delivery vehicle for intracellular transport of botulinum neurotoxin antagonists. *FEBS Lett* **513**:163-8.
- GUERRISSI JO (2000). Intraoperative Injection of Botulinum Toxin A into Orbicularis Oculi Muscle for the Treatment of Crow's Feet. *Plast Reconstr Surg* **104**(6):2219-2225.
- HABERMANN E, DREYER F, BIGALKE H (1980) Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission in vitro like botulinum A toxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **311**:33-40.
- HALL JD, MCCROSKEY LM, PINCOMB BJ, HATHEWAY CL (1985). Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. *J Clin Microbiol* **21**:654–655.
- HAMMOND K, CAPUTO GA, LONDON E (2002). Interaction of the membrane-inserted diphtheria toxin T domain with peptides and its possible implications for chaperone-like T domain behavior. *Biochemistry* **41**(9):3243-53.
- HANSON MA, STEVENS R (2000). Cocystal structure of synaptobrevin-II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 Å resolution. *Nature Struct Biol* **7**(8): 687-92.
- HANSON MA, OOST TK, SUKONPAN C, RICH DH, STEVENS RC (2000). Structural Basis for BABIM Inhibition of Botulinum Neurotoxin Type B Protease. *J Am Chem Soc* **124**(34):10248.
- HATHEWAY CL (1995). Botulism: the present status of the disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **195**: 55–75.
- HAYASHI T, MCMAHON H, YAMASAKI S, BINZ T, HATA Y, SÜDHOF TC, NIEMANN H (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* **13**(21):5051-61.
- HERREROS J, NG T AND SCHIAVO G (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* **12**:2947-2960.
- HERREROS J, SCHIAVO G (2002). Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. *Int J Med Microbiol* **291**(6-7): 447-53.
- HEYN J, BADE S, BINZ T, BIGALKE H (2002). Clostridial Neurotoxins: Translocation through membranes of erythrocyte ghosts. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **365** (Suppl. 2):R24.
- HOCH DH, ROMERO-MIRA M, EHRLICH BE, FINKELSTEIN A, DASGUPTA BR, SIMPSON LL (1985) Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:1692-6.
- HOCH DH, FINKELSTEIN A (1985) Gating of large toxin channels by pH. *Ann N Y Acad Sci* **456**:33-5.
- HOFMANN K, STOFFEL W (1993). Tmbase: A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe Seyler* **347**:166.
- HÖGY B, DAUZENROTH ME, HUDEL M, WELLER U, HABERMANN, E (1992). Increase of permeability of synaptosomes and liposomes by the heavy chain of tetanus toxin. *Toxicon* **30**(1): 63-76.
- HOLMES MA, MATTHEWS BW (1982). Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* **160**(4):623-39.

- HUTTNER WB, SCHIEBLER W, GREENGARD P, DE CAMILLI P (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* **96**: 1374-88.
- ICHINOSE M, LIU XH, HAGIHARA N, YOULE RJ (2002) Extracellular Bad fused to toxin transport domains induces apoptosis. *Cancer Res* **62**:1433-8.
- JOHNSON EA (1999) Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu Rev Microbiol* **53**:551-75.
- JOHNSON VG, NICHOLLS PJ, HABIG WH, YOULE RJ (1993). The role of proline 345 in diphtheria toxin translocation. *J Biol Chem* **268**: 3514-19.
- KADKHODAYAN S, KNAPP MS, SCHMIDT JJ, FABES SE, AND B. R. RUPP B (2000). Cloning, Expression, and One-Step Purification of the Minimal Essential Domain of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin Type A. *J Prot Expr Purif* **19**: 125-30.
- KALANDAKANOND S, COFFIELD J (2001). Cleavage of Intracellular Substrates of Botulinum Toxins A, C, and D in a Mammalian Target Tissue. *J Pharmacol Exp Ther* **296**(3): 749-755.
- KAMATA Y, KOZAKI S (1994). The light chain of botulinum neurotoxin forms channels in a lipid membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **205**(1): 751-7.
- KAMATA Y, TAHARA R., KOZAKI S (2000). Difference in hydrophobicity between botulinum type B activated and non-activated neurotoxins under low pH conditions. *Toxicon* **38**(9): 1247-51.
- KEIZER SB, RUTTEN HP, PILOT P, MORRE HH, V OS JJ, VERBURG AD (2002). Botulinum toxin injection versus surgical treatment for tennis elbow: a randomized pilot study. *Clin Orthop* **401**:125-31.
- KERNER J (1817). Medizinische Polizen. Vergiftung durch verborbene Würste. *Tübinger Blätter* **3**: 1-25.
- KHYSE-ANDERSON J (1984). Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* **10**: 203-09.
- KISTNER A, HABERMANN E (1992). Reductive cleavage of tetanus toxin and botulinum neurotoxin A by the thioredoxin system from brain. Evidence for two redox isomers of tetanus toxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **345**(2): 227-34.
- KISTNER A, SANDERS D, HABERMANN E (1993). Disulfide formation in reduced tetanus toxin by thioredoxin: the pharmacological role of interchain covalent and noncovalent bonds. *Toxicon* **31**(11): 1423-34.
- KITASATO S (1891). Experimentelle Untersuchungen uber das Tetanusgift. *Z Hyg Infektr* **10**: 267-305.
- KIYATKIN N, MAKSYMOWYCH AB, SIMPSON LL (1997). Induction of an immune response by oral administration of recombinant botulinum toxin. *Infect Immun* **65**(11):4586-91.
- KLINGENBERG O, OLSNES S (1996) Ability of methotrexate to inhibit translocation to the cytosol of dihydrofolate reductase fused to diphtheria toxin. *Biochem J* **313**:647-53.
- KOBAYASHI T, STARTCHEV K, WHITNEY AJ, GRUENBER J (2001) Localization of lysobisphosphatidic acid-rich membrane domains in late endosomes. *Biol Chem* **382**:483-5.
- KOZAKI S, SAKAGUCHI G (1982). Binding to mouse brain synaptosomes of Clostridium botulinum type E derivate toxin before and after typtic activation. *Toxicon* **20**(5): 841-6.
- LACY DB, STEVENS R (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* **291**(5): 1091-104.
- LACY DB, TEPP W, COHEN AC, DASGUPTA BR, STEVENS RC (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* **5**(10): 898-902.

- LAEMMLI UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-85.
- LAUTENSCHLAGER M, HOLTJE M, VON JAGOW B, VEH RW, HARMS C, BERGK A, DIRNAGL U, AHNERT-HILGER G, HORTNAGL H (2000). Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences. *Neuroscience* **99** (3): 519-27.
- LEBEDA FJ, OLSON MA (1995). Structural predictions of the channel-forming region of botulinum neurotoxin heavy chain. *Toxicon* **33**(4): 559-67.
- LEE LG, CONELL CR, WOO SL, CHENG RD, MCARDLE BF, FULLER CW, HALLORAN ND, WILSON RK (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res* **20** (10): 2471-83.
- LI L, SINGH BR (1998). Isolation of synaptotagmin as a receptor for type A and type E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. *J Nat Toxins* **7**:215-226.
- LI L, SINGH BR (1999). High-level expression, purification, and characterization of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain. *Protein Expr Purif* **17**(3):339-44.
- LI L, SINGH BR (2000) Spectroscopic analysis of pH-induced changes in the molecular features of type A botulinum neurotoxin light chain. *Biochemistry* **39**:6466-74.
- LI Y, AOKI R, DOLLY JO (1999). Expression and characterisation of the heavy chain of tetanus toxin: reconstitution of the fully-recombinant dichain protein in active form. *J Biochem* **125**(6): 1200-8.
- LI Y, FORAN P, FAIRWEATHER NF, DEPAIVA A, WELLER U, DOUGAN G, DOLLY JO (1994). A single mutation in the recombinant light chain of tetanus toxin abolishes its proteolytic activity and removes the toxicity seen after reconstitution with native heavy chain. *Biochemistry* **33**:7014-7020.
- LI Y, FORAN P, LAWRENCE G, MOHAMMED N (2001). Recombinant Forms of Tetanus Toxin Engineered for Examining and Exploiting Neuronal Trafficking Pathways. *J Biol Chem* **276**(33): 31394-401.
- LINIAL M (1997). SNARE proteins. Why so many, why so few. *J Neurochem* **69**:1781-92.
- LINK E, EDELMANN L, CHOU JH, BINZ T, YAMASAKI S, EISEL U, BAUMERT M, SUDHOF TC, NIEMANN H, JAHN R (1992). Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **189**(2):1017-23.
- LIU XH, CASTELLI JC, YOULE RJ (1999) Receptor-mediated uptake of an extracellular Bcl-x(L) fusion protein inhibits apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9563-7.
- LOWRY O, ROSENBROUGH N, FARR A, RANDALL R (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265.
- MACDONALD KL, RUTHERFORD GW, FRIEDMAN SM, DIETZ JR, KAYE BR, MCKINLEY GF, TENNEY JH, COHEN ML (1985). Botulism and botulism-like illness in chronic drug abusers. *Ann Intern Med* **102**(5):616-8.
- MADSHUS IH, STENMARK H, SANDVIG K, OLSNES S (1991) Entry of diphtheria toxin-protein A chimeras into cells. *J Biol Chem* **266**:17446-53.
- MADSHUS IH, OLSNES S, STENMARK H (1992) Membrane translocation of diphtheria toxin carrying passenger protein domains. *Infect Immun* **60**:3296-302.
- MAISEY EA, WADSWORTH JD, POULAIN B, SHONE CC, MELLING J, GIBBS P, TAUC L, DOLLY JO (1988). Involvement of the constituent chains of botulinum neurotoxins A and B in the blockade of neurotransmitter release. *Eur J Biochem* **177**(3): 683-91.



- MAJOR RH (ed) (1945). *Classic Descriptions of Disease*. Springfield, IL:Thomas.
- MAKSYMOWYCH AB, SIMPSON LL (1998). Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **273**(34): 21950-7.
- MARKEY AC (2000). Botulinum A exotoxin in cosmetic dermatology. *Clin Exp Dermatol* **25**(3):173-5.
- MARQUARDT H, SCHÄFER S (EDS) (1997). *Lehrbuch der Toxikologie – Sonderausgabe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- MASKOS U, KISSA K, ST CLOMENT C, BRULET P (2002) Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:10120-5.
- MATSUDA M, SUGIMOTO N, OZUTSUMI K, HIRAI T (1982). Acute botulinum-like intoxication by tetanus neurotoxin in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **104**:799–805.
- MATTEOLI M, VERDERIO C, ROSSETTO O, IEZZI N, COCO S, SCHIAVO G, MONTECUCCO C (1996). Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13310-5.
- MATTHEWS CC, FIGUEIREDO DM, WOLLACK JB, FAIRWEATHER NF, DOUGAN G, HALLEWELL RA, CADET JL, FISHMAN PS (2000) Protective effect of supplemental superoxide dismutase on survival of neuronal cells during starvation. Requirement for cytosolic distribution. *J Mol Neurosci* **14**:155-66.
- MEDER M (2001), *Bindung und Transport von Tetanustoxin in neuronalen Zellen in vitro*. Dissertation, Universität Hannover.
- MENDEZ-EASTMAN SK (2000). BOTOX: a review. *Plast Surg Nurs* **20**(2):60-5.
- MONTAL MS, BLEWITT R, TOMICH JM, MONTAL M (1992) Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of tetanus and botulinum neurotoxins. *FEBS Lett* **313**:12-8.
- MONTECUCCO C (1986). How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem Sci* **11**:315–317.
- MONTECUCCO C, PAPINI E, SCHIAVO G (1991). Molecular models of toxin membrane translocation. In: *A Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, edited by J. E. Alouf and J. H. Freer. London: Academic, p. 45–56.
- MONTECUCCO C, PAPINI E, SCHIAVO G (1994). Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett* **346**:92–98.
- MONTECUCCO C, SCHIAVO G (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol* **13**(1): 1-8.
- MONTECUCCO C, SCHIAVO G (1995). Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys* **28**:423–472.
- MONTECUCCO C, SCHIAVO G, BRUNNER J, DUFLOT E, BOQUET P, ROA M (1986). Tetanus toxin is labeled with photoactivatable phospholipids at low pH. *Biochemistry* **25**(4): 919-24.
- MONTECUCCO C, SCHIAVO G, DASGUPTA BR (1989). Effect of pH on the interaction of botulinum neurotoxins A, B and E with liposomes. *Biochem J* **259**(1): 47-53.
- MONTECUCCO C, SCHIAVO G, GAO Z, BAUERLEIN E, BOQUET P, DASGUPTA BR (1988). Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayer surface. *Biochem J* **251**(2): 379-83.
- MU FT, CALLAGHAN JM, STEELE-MORTIMER O, STENMARK H, PARTON RG, CAMPBELL PL, MCCLUSKEY J, YEO JP, TOCK EPC, TOH BH (1995). EEA1, an Early Endosome-Associated Protein. *J Biol Chem* **270**(22):

13503-511.

MÜNCHAU A, BHATIA KP (2000) Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ* **320**:161-5.

MUNRO P, KOJIMA H, DUPONT JL, BOSSU JL, POULAIN B, AND BOQUET P (2001) High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:623-629.

NAGLICH JG, METHERRALL JE, RUSSELL DW, EIDELS L (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* **69**(6):1051-61.

NELSON D, COX M (EDS) (2001). *Lehninger – Biochemie*. Springer Verlag Berlin, 3.Auflage.

NIEMANN H, BINZ T, GREBENSTEIN O, KURAZONO H, THIERER J, MOCHIDA S, POULAIN B, TAUC L (1991). Clostridial neurotoxins: from toxins to therapeutic tools? *Behring Inst Mitt* **89**: 153-62.

NIEMANN H, BLASI J, AND JAHN R (1994). Clostridial Neurotoxins: New Tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* **4**:179-185.

NISHIKI T, KAMATA Y, NEMOTO Y, OMORI A, ITO T, TAKAHASHI M AND KOZAKI S (1994) Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **269**:10498-10503.

OBLATT-MONTAL M, YAMAZAKI M, NELSON R, MONTAL M (1995). Formation of ion channels in lipid bilayers by a peptide with the predicted transmembrane sequence of botulinum neurotoxin A. *Protein Sci* **4**(8): 1490-7.

O'KEEFE DO, CABIAUX V, CHOE S, EISENBERG D, COLLIER RJ (1992). pH-dependent insertion of proteins into membranes: B-chain mutation of diphtheria toxin that inhibits membrane translocation, Glu-349-Lys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13):6202-6.

PELLEGRINI LL, O'CONNOR V, LOTTSPEICH F, BETZ H (1995). Clostridial neurotoxins compromise the stability of a low energy SNARE complex mediating NSF activation of synaptic vesicle fusion. *EMBO J* **14**:4705–4713.

PETROS AM, MEDEK A, NETTESHEIM DG, KIM DH, YOON HS, SWIFT K, MATAYOSHI ED, OLTERSDORF T, FESIK SW (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6):3012-7.

PORTA M (2000). A comparative trial of botulinum toxin type A and methylprednisolone for the treatment of tension-type headache. *Curr Rev Pain* **4**(1):31-5.

POULAIN B, MOCHIDA S, WELLER U, HÖGY B, HABERMANN E, WADSWORTH JD, SHONE CC, DOLLY JO, TAUC L (1991). Heterologous combinations of heavy and light chains from botulinum neurotoxin A and tetanus toxin inhibit neurotransmitter release in Aplysia. *J Biol Chem* **266**(15): 9580-5.

QIAGEN (1995), *Plasmid Purification Handbook*.

QIAGEN (1997), *QIAquick Spin Handbook*.

RATTS R, ZENG H, BERG EA, COSTELLO CE, VANDERSPEK J, MURPHY JR (2002). *In vitro* translocation assay for the diphtheria toxin catalytic domain across the endosomal membrane: implications for understanding the pathophysiology of the botulinum and tetanus neurotoxins. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **365** (Suppl. 2):R108.

REN J, SHARPE JC, COLLIER RJ, LONDON E (1999a). Membrane translocation of charged residues at the tips of hydrophobic helices in the T domain of diphtheria toxin. *Biochemistry* **38**(3):976-84.

REN J, KACHEL K, KIM H, MALENBAUM SE, COLLIER RJ, LONDON E (1999b). Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation. *Science* **284**(5416):955-7.

- RIGONI M, CACCIN P, JOHNSON EA, MONTECUCCO C, ROSSETTO O (2001). Site-Directed Mutagenesis Identifies Active-Site Residues of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin Type A. *Biochem Biophys Res Com* **288**: 1231–1237.
- ROA M, BOQUET P (1985) Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles at low pH. Protection of specific polypeptides against proteolysis. *J Biol Chem* **260**:6827-35.
- ROBINSON JP, HOLLADAY LA, HASH JH, PUETT D (1982). Conformational and molecular weight studies of tetanus toxin and its major peptides. *J Biol Chem* **257**(1):407-11.
- ROOD JI, MCCLANE BA, SONGER JG, TITBALL RW (eds) (1997). The Clostridia. Molecular Biology and Pathogenesis. Academic Press, San Diego.
- ROSSETTO O, CACCIN P, RIGONI M, TONELLO F, BORTOLETTO N, STEVENS RC, MONTECUCCO C (2001). Active-site mutagenesis of tetanus neurotoxin implicates TYR-375 and GLU-271 in metalloproteolytic activity. *Toxicon* **39**.
- RUMMEL A (1999), Biotechnische Herstellung von nicht-toxischen H-Ketten-Derivaten Clostridieller Neurotoxine in *E.coli* (Diplomarbeit).
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- SAKAGUCHI G (1983). *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacol Ther* **19**:165–194.
- SALVADOR N, AGUADO C, HORST M, KNECHT E (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem* **275**(35): 27447-56.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-67.
- SAWAYA MR, KRAUT J (1997). Loop and subdomain movements in the mechanism of Escherichia coli dihydrofolate reductase: crystallographic evidence. *Biochemistry* **36**(3):586-603.
- SCHIAVO G, PAPINI E, GENNA G, MONTECUCCO C (1990). An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. *Infect Immun* **58**(12): 4136-41.
- SCHIAVO G, MATTEOLI M, MONTECUCCO C (2001). Neurotoxins affecting Neuroexocytosis. *Physiol Rev* **80**(2):718-50.
- SCHMID FX (1993). Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**: 123-42.
- SCHMID MF, ROBINSON JP, DASGUPTA BR (1993) Direct visualization of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles. *Nature* **364**:827-30.
- SCHOONDERWOERT VT, HOLTHUIS JC, TANAKA S, TOOZE SA, MARTENS GJ (2000) Inhibition of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase perturbs the transport, sorting, processing and release of regulated secretory proteins. *Eur J Biochem* **267**:5646-54.
- SCHULTE-MATTLER WJ, WIESER T, ZIERZ S (1999). Treatment of tension-type headache with botulinum toxin: a pilot study. *Eur J Med Res* 1999 **4**(5):183-6.
- SCHWAB ME, THOENEN H (1976). Electron microscopic evidence for a transsynaptic migration of tetanus toxin in spinal cord motoneurons: an autoradiographic and morphometric study. *Brain Res* **105**:213–227.
- SCOTT AB (1989). Clostridial neurotoxins as therapeutic agents. In: *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*, edited by L. L. Simpson. San Diego, CA: Academic, p. 399-412.

- SHARMA M, KHANNA H, ARORA N, SINGH Y (2000) Anthrax toxin-mediated delivery of cholera toxin-A subunit into the cytosol of mammalian cells. *Biotechnol Appl Biochem* **32**:69-72.
- SHONE CC, HAMBLETON P, MELLING J (1987). A 50-kDa fragment from the NH<sub>2</sub>-terminus of the heavy subunit of Clostridium botulinum type A neurotoxin forms channels in lipid vesicles. *Eur J Biochem* **167**(1): 175-80.
- SILVERMAN JA, MINDELL JA, FINKELSTEIN A, SHEN WH, COLLIER RJ (1994). Mutational analysis of the helical hairpin region of diphtheria toxin transmembrane domain. *J Biol Chem* **269**(36):22524-32.
- SINGH BR, DASGUPTA BR (1989). Molecular topography and secondary structure comparisons of botulinum neurotoxin types A, B, and E. *Mol Cell Biochem* **86**(1): 87-95.
- SINGH BR, DASGUPTA BR (1990). Conformational changes associated with the nicking and activation of botulinum neurotoxin type E. *Biophys Chem* **38**(1-2): 123-30.
- SINGH BR, FULLER MP, SCHIAVO G (1990). Molecular structure of tetanus neurotoxin as revealed by Fourier transform infrared and circular dichroic spectroscopy. *Biophys Chem* **36**(2): 155-66.
- SKERRA A (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151** (1-2): 131-5.
- SREERAMA N, WOODY RW (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**(2):252-60.
- STECHER B, GRATZL M, AHNERT-HILGER G (1989). Reductive chain separation of botulinum A toxin - a prerequisite to its inhibitory action on exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett* **248**(1-2): 23-7.
- STEINBERG IZ, HARRINGTON WF, BERGER A, SELA M, KATCHALSKI E (1960). The configurational changes of poly-L-proline in solution. *J Amer Chem Soc* **82**: 5263-79.
- STENMARK H, MOSKAUG JO, MADSHUS IH, SANDVIG K, OLSNES S (1991) Peptides fused to the amino-terminal end of diphtheria toxin are translocated to the cytosol. *J Cell Biol* **113**:1025-32.
- SWAMINATHAN S, ESWARAMOORTHY S (2000). Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nature Struct Biol* **7**(8): 693-99.
- THOMPSON JF, GEOGHEGAN KF, LLOYD DB, LANZETTI AJ, MAGYAR RA, ANDERSON SM, BRANCHINI BR (1997). Mutation of a Protease-sensitive Region in Firefly Luciferase Alters Light emission Properties. *J Biol Chem* **272** (30): 18766-71.
- THOMPSON JF, HAYES LS, LLOYD DB (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* **103**: 171-7.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**:4673-4680.
- TONELLO F, PELLIZZARI R, PASQUALATO S, GRANDI G, PEGGION E, MONTECUCCO C (1999). Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: cloning, expression, purification, and proteolytic activity. *Protein Expr Purif* **15**(2): 221-7.
- TSAI B, RODIGHIERO C, LENCER WI, RAPOPORT TA (2001). Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* **104**(6):937-48.
- TURNER DC, BRAND L (1968). Quantitative estimation of protein binding site polarity. Fluorescence of N-arylamino-naphthalenesulfonates. *Biochemistry* **7**:3381-3390.

- UMLAND TC, WINGERT LM, SWAMINATHAN S, FUREY WF, SCHMIDT JJ, SAX M (1997). Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat Struct Biol* **4**(10): 788-92.
- VAIDYANATHAN VV, YOSHINO K, JAHNZ M, DORRIES C, BADE S, NAUENBURG S, NIEMANN H, BINZ T (1999) Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem* **72**:327-37.
- VAN ERMENGEM E (1897). Über ein neuen anaeroben *Bacillus* und seine Beziehungen zum *Botulismus*. *Z Hyg Infektkr* **26**:1-56.
- VERDERIO C, COCO S, ROSSETTO O, MONTECUCCO C, MATTEOLI M (1999). Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. *J Neurochem* **73**(1): 372-9.
- VON AHSEN O, LIM JH, CASPERS P, MARTIN F, SCHONFELD HJ, RASSOW J, PFANNER N (2000). Cyclophilin-promoted folding of mouse dihydrofolate reductase does not include the slow conversion of the late-folding intermediate to the active enzyme. *J Mol Biol* **297**(3):809-18.
- WHITTAKER VP (1959). The isolation and characterization of acetylcholine containing particles from brain. *Biochem J* **72**:694-706.
- WIEDLOCHA A, MADSHUS IH, MACH H, MIDDAUGH CR, OLSNES S (1992) Tight folding of acidic fibroblast growth factor prevents its translocation to the cytosol with diphtheria toxin as vector. *EMBO J* **11**:4835-42.
- WIENER M, FREYMAN D, GHOSH P, STROUD RM (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature* **385**:461-464.
- WILLIAMSON LC, HALPERN JL, MONTECUCCO C, BROWN JE, NEALE EA (1996). Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem* **271**:7694-7699.
- WILLIAMSON LC, NEALE EA (1994) Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. *J Neurochem* **63**:2342-5.
- WILSON BA, REICH KA, WEINSTEIN BR, COLLIER RJ (1990). Active-site mutations of diphtheria toxin: effects of replacing glutamic acid-148 with aspartic acid, glutamine, or serine. *Biochemistry* **29** (37): 8643-51.
- WRIGHT HT, MARSTON AW, GOLDSTEIN DJ (1984). A functional role for cysteine disulfides in the transmembrane transport of diphtheria toxin. *J Biol Chem* **259**(3):1649-54.
- WRIGHT HT, ROBERTUS JD (1987). The intersubunit disulfide bridge of ricin is essential for cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys* **256**(1):280-4.
- YAMASAKI S, BAUMEISTER A, BINZ T, BLASI J, LINK E, CORNILLE F, ROQUES B, FYKSE EM, SUDHOF TC, JAHN R, ET AL (1994). Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin. *J Biol Chem* **269**(17): 12764-72.
- YUKI Y, BYUN Y, FUJITA M, IZUTANI W, SUZUKI T, UDAKA S, FUJIHASHI K, MCGHEE JR, KIYONO H (2001) Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and proteolipid-protein-peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. *Biotechnol Bioeng* **74**:62-9.
- ZDANOVSKAIA MV, LOS G, ZDANOVSKY AG (2000) Recombinant derivatives of clostridial neurotoxins as delivery vehicles for proteins and small organic molecules. *J Protein Chem* **19**:699-707.
- ZHAN H, CHOE S, HUYNH PD, FINKELSTEIN A, EISENBERG D, COLLIER RJ (1994). Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry* **33**(37):11254-63.
- ZHOU L, DEPAIVA A, LIU D, AOKI R, DOLLY JO (1995). Expression and purification of the light chain of botulinum neurotoxin A: a single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain. *Biochemistry* **34**(46): 15175-81.

## 9. Anhang

### 9.1. Material

#### 9.1.1. Chemikalien

(+)-5-Fluor-2-Desoxyuridin p.a. (FUDR)	Sigma
1,4-Diazobicyclo[2.2.3]octan (Dabco)	Sigma
2-(p-Toluidino)naphtalene-6-sulfonsäure Natriumsalz (TNS)	Sigma
2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure (HABA)	Sigma
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Merck/Roth/ICN
2-Propanol, p. a.	Merck
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
5,5'-Dithiobis-[2-nitrobenzoesäure] (DTNB)	Merck
Aceton, reinst	Riedel-DeHaën
Acrylamid/Bisacrylamid 4K Lösung 29:1 Mix	Applichem
$\alpha$ -D(+)-Glucose	Roth
Adenosintriphosphat (ATP)	ICN
Agarose	QBiogene
Ammoniumchlorid, p. a.	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma
Anhydrotetracyclin (aTc)	Acros Organics
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Bacto Pepton, enzymatisch verdaut	Difco Laboratories
Bacto-Agar	Difco Laboratories
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories
BafilomycinA1 (BafA1)	Calbiochem
Benzamidin	Sigma
Bestatin	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol, zur Synthese	Merck
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva
Calciumchlorid, getrocknet ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck
Coomassie Brilliant Blue R 250, für die Elektrophorese	Merck
Corticosteron	Sigma
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Roth
Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	Roth
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	Roth
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	Roth
Desthiobiotin	Sigma
Dextran, Tetramethylrhodamin markiert	Molecular Probes
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie (DMSO)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p. a. ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck

Dithiothreitol (DTT)	Sigma
E64	Sigma
Essigsäure, 99-100%	Riedel-DeHaën
Ethanol, p. a.	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumsalz, p. a.	Serva
fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL
Glutaminsäure, Natriumsalz	Sigma
Glutamin	Sigma
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma
Glycerin, doppelt destilliert, p. a.	Serva
Glycin, p. a.	Roth
Glycylglycin	Sigma
Harnstoff, p. a.	Roth
HPLC-H <sub>2</sub> O	J.T.Baker
humanes Transferrin, Rhodamin markiert	Molecular Probes
Trypsin, immobilisiert an Agarosekugeln	Sigma
Insulin	Sigma
Isopropanol, reinst	Riedel DeHaën
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Merck
Kaliumacetat, reinst	Riedel DeHaën
Kaliumchlorid, p. a. (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, p. a. (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Leupeptin	Roche Diagnostics
Luziferin	BD Pharmingen
Magermilchpulver	Zentralküche
Magnesiumchlorid, reinst (MgCl <sub>2</sub> )	Riedel DeHaën
Magnesiumsulfat, p. a. (MgSO <sub>4</sub> )	Merck
MEM, Zellkulturmedium	Gibco
Methanol, p. a.	J. T. Baker
Methotrexat (Mtx)	Calbiochem
Mowiol 40 - 88	Aldrich
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
NADPH Tetranatriumsalz	Appllichem
Natriumacetat, wasserfrei, p. a.	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat, p. a. (NaHCO <sub>3</sub> )	Riedel DeHaën
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumselenit, p. a.	Sigma
Nervenwachstumsfaktor (NGF)	Almone Labs
para-Formaldehyd, reinst	Merck
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Roth
Percoll	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ), 85%	Riedel DeHaën

Polyethylenglycol 4000 (PEG)	Merck
Poly-L-Lysin	Sigma
Progesteron	Sigma
Putrescin	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA), lyophilisiert, pH 7,0, standard grade Fraktion V	Serva
Saccharose	Merck
Salzsäure (HCl) 37%, p. a.	Merck
SeaKem ME Agarose, reines Agarosepulver aus Agar	FMC BioProducts
Sucrose	Sigma
Transferrin	Sigma
Trichloressigsäure (TCA), p. a.	Roth
Triiodothyronin	Sigma
Triton® X-100, für Szintillationstechnik	Serva
Trypsin aus Rinderpankreas	Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma
Tween 20®	Sigma
Uridin	Serva
Xylen Cyanol FF	Sigma
Zitronensäure Monohydrat	Merck

### 9.1.2. Standards

#### DNA-Standard:

Lambda DNA/ <i>EcoRI/HindIII</i>	Eigene Herstellung
Größen: 21226, 5148, 4973, 4277, 3530, 2027, 1904, 1580, 1330, 983, 831, 564 und 125 bp	

#### Proteinstandards:

Molekulargewichtsstandard (26,8 kDa-180 kDa), vorgefärbt	Fluka
Molekulargewichtsstandard (6,5 kDa-175 kDa), vorgefärbt	New England Biolabs
Molekulargewichtsstandard (14,4 kDa - 97,4 kDa)	Biorad
Molekulargewichtsstandard (14,4 kDa - 116 kDa)	MBI Fermentas

### 9.1.3. Enzyme

Restriktionsenzyme: <i>Aat</i> II, <i>Acc</i> I, <i>Bam</i> H I, <i>Eco</i> R I, <i>Eco</i> R V, <i>Hind</i> III, <i>Nar</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Kas</i> I, <i>Mun</i> I <i>Pst</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Sac</i> II, <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I	Biolabs
<i>Bam</i> H I, <i>Bgl</i> II, <i>Eco</i> 47 III, <i>Eco</i> R I, <i>Eco</i> R V, <i>Hind</i> III, <i>Nhe</i> I,	Boehringer Mannheim
	MBI Fermentas
Alkalische Phosphatase aus Kälberdärmen (1 U/μl)	Boehringer Mannheim
Luziferase	BD Pharmingen
Immobilisiertes Trypsin	Sigma
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas



Thioredoxin Reductase, <i>E.coli</i>	IMCO/Biotrend
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Trypsin	Sigma

#### 9.1.4. Häufig verwendete Puffer und Medien

PBS	140 mM NaCl 7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> autoklaviert
Tween <sup>®</sup> 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
2YT-Platten (1 l)	16 g Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid 15 g Bacto-Agar autoklaviert
2YT-Medium (1 l)	16 g Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid autoklaviert

#### 9.1.5. Antikörper

Anti <i>Strep</i> -tag <sup>®</sup> II	<i>Strep</i> -tag <sup>®</sup> II polyklonales Antiserum (Kaninchen) gegen den <i>Strep</i> -tag <sup>®</sup> II Verdünnung in Westernblotanalysen 1 : 5000 Verdünnung in Immunfluoreszenzanalysen 1 : 500 IBA GmbH
Anti GFP	Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern (Maus) Klon 7.1 und 13.1, die gegen rekombinantes GFP gerichtet sind. Verdünnung in Westernblotanalysen 1 : 5000 Boehringer Mannheim
Anti VAMP2	Monoklonaler Antikörper (Maus) Klon 69.1 gegen ein N-terminales Peptid aus Ratten VAMP2 Verdünnung in Westernblotanalysen 1 : 2000 Synaptic Systems
Anti SNAP-25	Monoklonaler Antikörper (Maus) Klon 71.2 gegen die ersten 20 Aminosäuren von Ratten SNAP-25 Verdünnung in Westernblotanalysen 1 : 2000 Synaptic Systems

Anti EEA1	<p>Monoklonaler Antikörper (Maus) gegen die Aminosäuren 3-281 des early endosome antigene 1 (EEA1), ein 180 kDa großes, hydrophiles, peripheres Membranprotein, welches in frühen Endosomen auftritt.</p> <p>Verdünnung in Immunfluoreszenzanalysen 1 : 400</p> <p>BD Transduction Laboratories</p>
Anti 6C4	<p>Hybridoma Überstand, gegen Lysobisphosphatidinsäure (LBPA) – ein Marker für späte Endosomen)</p> <p>Verdünnung in Immunfluoreszenzanalysen 1 : 100</p> <p>Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. Gruenberg, Universität Genf</p>
POD anti mouse	<p>Peroxidase gekoppelter, affinitätsgereinigter Antikörper (Ziege) gegen das Fc-Fragment von Maus IgG</p> <p>Verdünnung in Westernblotanalysen: 1:2000</p> <p>Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.</p>
POD anti rabbit	<p>Peroxidase gekoppelter, affinitätsgereinigter Antikörper (Ziege) gegen die leichte Kette des F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes von Kaninchen IgG</p> <p>Verdünnung in Westernblotanalysen: 1:5000</p> <p>Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.</p>
Rhodamin anti rabbit	<p>Rhodamin markierter, affinitätsgereinigter Antikörper (Ziege) gegen die leichte Kette des F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes von Kaninchen IgG</p> <p>Verdünnung für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: 1:1000</p> <p>Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.</p>
Rhodamin anti mouse	<p>Affinitätsgereinigter Antikörper (Schaf) gegen Maus-Immunglobuline, konjugiert mit 5(6)-Carboxy-rhodamin 101-N-hydroxysuccinimidester</p> <p>Verdünnung für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: 1:10 - 1:50</p> <p>Roche Diagnostics</p>

### 9.1.6. Bakterienstämme

#### 9.1.6.1. *E. coli* DH5 $\alpha$ :

Ein rekombinationsdefizienter *E. coli*-Stamm, der sich besonders für die Präparation sehr reiner Plasmid-DNA eignet.

Genotyp: *supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

#### 9.1.6.2. *E. coli* TG1:

Dieser Bakterienstamm wird sowohl zur Transformation von Plasmid-DNA als auch zur Expression der rekombinanten BoNT/D-Derivate verwendet. *E. coli* TG1 trägt das *lacI<sup>q</sup>*-Gen. Dieses hat einen mutierten Promotor, der zur Produktion von zehnmal mehr *lac*-Repressor als beim Wildtyp führt. Der *lac*-Repressor bindet an den *lac*-Promotor und verhindert so die Proteinexpression. Durch Zugabe von IPTG zum Medium wird der *lac*-Repressor gebunden und löst sich vom *lac*-Promotor. Dadurch wird eine hocheffiziente Proteinexpression ermöglicht. Geringe IPTG-Mengen können den Gehalt an *lac*-Repressor so reduzieren, dass Transkription auf niedriger Stufe stattfindet. Dieses Prinzip erlaubt

eine gute Kontrolle über den Grad der Proteinexpression. TG1 ist ein *EcoK*<sup>-</sup> Abkömmling vom JM101-Stamm, der transformierte DNA weder modifiziert noch schneidet.

Genotyp: *supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F'* [*traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15*]

### 9.1.7. Plasmide

#### 9.1.7.1. pQE-3:

Das Plasmid pQE-3 (Qiagen; 3416 bp) ist ein Standardexpressionsvektor mit einer Größe von 3416 Bp. In pQE-Vektoren klonierte Gene werden durch einen T5-Promotor, welcher von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt wird, kontrolliert. Zur effizienten Repression des T5-Promotors besitzt der pQE-3-Vektor zwei *lac*-Operatoren, an welche der Repressor binden kann. Durch IPTG wird der *lac*-Repressor inaktiviert und die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Für eine hohe Translationsrate besitzen die pQE-Vektoren eine synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBS) im optimalen Abstand zum Startcodon stromaufwärts vom Polylinker. Ein  $\beta$ -Lactamasegen wird als Selektionsmarker verwendet.

#### 9.1.7.1.1. pBN 31:

Die L-Kette von BoNT/D mit His<sub>6</sub>-Tag wird im pQE-3-Vektor exprimiert. Hierzu wurde der Polylinker des pQE-3-Vektor mit *EcoR* I und *Pst* I geschnitten, wobei auch die RBS mit entfernt wurde. Anschließend wurde mittels PCR an der das BoNT/D-Gen enthaltenden Bakteriophagen-DNA das Gen der L-Kette mit stromaufwärts gelegener synthetischer RBS, ein Startcodon und eine stromabwärts gelegene *EcoR* V-Erkennungssequenz amplifiziert und in pQE-3 kloniert. In einem zweiten Schritt wurde der Vektor mit *EcoR* V linearisiert und ein Doppelstrang Oligonukleotid für den His<sub>6</sub>-Tag eingesetzt. Es handelt sich um den Klon pBN 31, den Dr. T. Binz zur Verfügung stellte.

#### 9.1.7.1.2. pBPCLuc0:

Dieses Plasmid wurde von Dr. T. Binz zur Verfügung gestellt. Es kodiert ein 5' verlängertes Luziferasegen aus *photinus pyralis*, einen SV40 Promotor und eine SV40 Polyadenylierungsstelle (Bohlinger, 1992).

#### 9.1.7.1.3. pBN 3:

Dieser pQE-3 Vektor enthält die leichte Kette von BoNT/A und wurde von Dr. T. Binz zur Verfügung gestellt (Vaidyanathan *et al.*, 1999).

#### 9.1.7.1.4. pGFP-BoNT/D<sub>VA</sub> Strep

Dieser Vektor codiert das Fusionsprotein GFP-BoNT/D E230A - *Strep-tag*<sup>®</sup>II, d.h. das GFP ist N-terminal mit der proteolytisch inaktiven leichten Kette des volle Länge BoNT/D verknüpft. Das Plasmid wurde von A. Rummel zur Verfügung gestellt.

### 9.1.7.2. pASK-IBA3:

Der pASK-IBA3 Vektor (IBA GmbH; 3266 bp) wurde zur Expression von Fremdproteinen in *E. coli* synthetisiert (Skerra, 1994) und benutzt zur Transkriptionskontrolle einen *tetA*-Promotor/Operator. Der *tet*-Repressor wird stromabwärts vom  $\beta$ -Lactamasegen auf demselben Plasmid codiert und erlaubt eine empfindliche Regulation der Proteinexpression. Der natürliche Induktor ist das Antibiotikum Tetracyclin (Tc). Daher wird das synthetische Anhydrotetracyclin (aTc), welches mit höherer Affinität an den *tet*-Repressor bindet, weniger antibiotisch wirkt und schon in kleinen Konzentrationen (200  $\mu$ g/l Kultur) aktiv ist, als Induktor eingesetzt. Des Weiteren besitzt der pASK-IBA3 Vektor am 3'-Ende des Polylinkers ein Gen für das *Strep-tag*<sup>®II</sup> Affinitätspeptid, welches spezifisch an Streptavidin oder die modifizierte StrepTactin<sup>®</sup>-Matrix für Affinitätsaufreinigungen bindet.

#### 9.1.7.2.1. pBoNT/D E230A:

Das gesamte BoNT/D Gen wurde in einen in der multiplen Klonierungsstelle modifizierten pASK-IBA3 (pSBN-1) Vektor kloniert. Das aktive Zentrum der leichten Kette ist mutiert (E230A), so dass die LC nicht mehr katalytisch wirksam ist. Zwischen dem LC- und HC-Gen wurde eine zusätzliche *Nco* I Schnittstelle eingefügt. Ebenso wurde zwischen HC und dem *Strep-tag*<sup>®II</sup> eine IGase Schnittsequenz eingefügt (Bade, Diplomarbeit, 1999).

### 9.1.7.3. pET15b $\Delta$ Bgl II-Sph I $\Psi$ WT DT:

Ausgangsvektor für dieses Plasmid ist ein pET 15b Vektor (Novagen; 5708 bp) mit einem aminoterminalen His<sub>6</sub>-tag, gefolgt von einer Thrombin Erkennungssequenz und der multiplen Klonierungsstelle (MCS). Ein  $\beta$ -Lactamasegen wird als Selektionsmarker eingesetzt.

Das Plasmid enthält das gesamte Gen des Diphtherietoxins mit einer das katalytische Zentrum inaktivierenden Mutation (E148S) (Wilson *et al.*, 1990). Außerdem wurde im pET15b Vektor eine Deletion zwischen der *Bgl* II und der *Sph* I Erkennungssequenz durchgeführt. Das Plasmid wurde zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. R. J. Collier (Harvard Medical School, Boston).

### 9.1.7.4. pDHFR in pCR2.1-TOPO

Dihydrofolatreduktase aus der Maus (mDHFR) wurde in einen pCR2.1-TOPO Vektor kloniert (4469 bp) und von Prof. Dr. N. Pfanner, Institut für Biochemie, Freiburg (von Ahsen *et al.*, 2000) zur Verfügung gestellt.

### 9.1.7.5. pBcl-2 in pBlueskript SK+

Das Gen für murines Bcl-2 (mBcl-2) wurde über *Pst* I in einen pSK+ (Blueskript) Vektor kloniert (2376 bp). Das erhaltene Plasmid wurde von Dr. Ch. Borner, Universität Fribourg, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

### 9.1.8. Oligonukleotide:

Die nicht an die Template-DNA bindenden Basen sind kursiv gedruckt.

# SBN-380; pBN-31 und pBoNT/D E230A

5'-*TCT CGG ATC* CTA TCT ACC TGT ATT TGC AAA TAT-3'

fett gedruckt: *Bam*H I Erkennungssequenz

# SBN A; pBN-31 und pBoNT/D E230A

5'-*CTC CTG CAG CCA TGG* ATC TAC TAT TTT TTG TTA ATC TTA AAC-3'

fett gedruckt: *Nco* I Erkennungssequenz; unterstrichen: *Pst* I Erkennungssequenz

#LC-BELT Rv; pBoNT/D E230A

5'-*TCTCGTTCGACACCACCACCATAAGGTAATCTATTATTTTAACTTTA*-3'

fett gedruckt: *Sal* I Erkennungssequenz

#HC-BELT Fw; pBoNT/D E230A

5'-*TCTCCCATGGTTCGACTATTTAAATTCTTATTATTATTTGGAA*-3'

fett gedruckt: *Nco* I Erkennungssequenz; unterstrichen: *Sal* I Erkennungssequenz

#BONT/D DM P/G Rv; pBoNT/D E230A

5'-*CTCTCGGCGCCTCCTATATAGCCAATTATTACTG*-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#BONT/D P632G Rv; pBoNT/D E230A

5'-*CTCTCGGCGCCTCCTATATATGGAATTATTACTG*-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#BONT/D P632G Fw; pBoNT/D E230A

5'-*CTCTCGGCGCCTTAAATATAGGAAATTCAG*-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#BONT/D P628G Rv; pBoNT/D E230A

5'-*TCTCTGACGTCTGATATTTATCCAATGTA*-3'

fett gedruckt: *Aat* II Erkennungssequenz

#BONT/D P628G Fw; pBoNT/D E230A

5'-*TCTCTGACGTCTCAGTAATAATTGGCTATATAGGACCTGCC*-3'

fett gedruckt: *Aat* II Erkennungssequenz

#Tripl-Rv; pBoNT/D E230A

5'-*CTCTCTCTCGAGTAAAAAAGCTACACCAGCTGTT*-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz

#Tripl-Fw; pBoNT/D E230A

5'-*CTCTCTCTCGAGGGATTT(GC)CA(GC)AGTTTACGATC(GC)CTGCACTCGGTGTATTTACC*-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz; unterstrichen: *Pvu* I Erkennungssequenz

#Chim-D-Rv-2; pBoNT/D E230A

5'-*CTCTCGGAGCTCCACCACCACCACTATTGAAATA*-3'

fett gedruckt: *Sal* I Erkennungssequenz

#BONT/D H/A Rv; pBoNT/D E230A

5'-*TTCCTATCGATAAGATTAATTAATTCTGTTTTAG*-3'

fett gedruckt: *Cla* I Erkennungssequenz

#BONT/D H/A Fw; pBoNT/D E230A

5'-*TTCCTATCGATAGTGCTAATATTATTCTAGTTGGTGAAGT*-3'

fett gedruckt: *Cla* I Erkennungssequenz

#Tripl DKD/AAA Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCCGCGG**TATCAGTAATAATTCCATATATAG-3'

fett gedruckt: *Sac* II Erkennungssequenz

#Tripl DKD/AAA RV; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCTACCGCGG**ATATTGCAGCCAATGTATCTTTCTTCATAATA-3'

fett gedruckt: *Sac* II Erkennungssequenz

#BoNT/D D622 A RV; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCCGCGG**ATATTTTATCCAATGTATCTTTC-3'

fett gedruckt: *Sac* II Erkennungssequenz

#BoNT/D (D618T616) A RV; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGACGTCT**GATATTTTA(GT)CCAATG(CT)ATCTTTCTTCATAAATTTGTAG-3'

fett gedruckt: *Aat* II Erkennungssequenz

#BoNT/D K619A RV; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGACGTCT**GATATTGCATCCAATGTATCTTTCTTCATA-3'

fett gedruckt: *Aat* II Erkennungssequenz

#BoNT/D Aat II FW; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGACGTCT**CAGTAATAATTCCATATATAGG-3'

fett gedruckt: *Aat* II Erkennungssequenz

#DKE/AAA Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCTGCTGCAGC**ACTTCCTGAGTATTTTTTATAT-3'

fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#DKE/AAA Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGCTGCAGC**AAATATAAAAAGTCAAGTTGAAAAT-3'

fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#Luc LCD Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCC**ATGACATGGCCAGTAAAAGATTTT-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#KKD/AAA Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGCTGCAGC**CATAATATTTGTAGTAAAATCCT-3'

fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#KKD/AAA Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGCTGCAGC**AAATTGGATAAAATATCAGATGATGT-3'

fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#YY/AA Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCTCGAGG**CTAAAAAGCCTCAGGAAGTGATAAAGAAAAT-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz

#YY/AA XhoI Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCTCGAGAT**CTATTTTAGCTTTGATTGCAT-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz; unterstrichen: *Bgl* II Erkennungssequenz

#F/A Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCAATTGA**AGGCTAAACCTGCTTGAACACCT-3'

fett gedruckt: *Mun* I Erkennungssequenz

#F/A MunI Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCAATTGGG**GCGAATGAAGTAGTT-3'

fett gedruckt: *Mun* I Erkennungssequenz

#RW/AA Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCTCGAG**CAAGCAGTTAAGAGAGCGAAAGATTCATATCAATGGATG-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz

#RW/AA *Xho*I Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCTCGAG**ACAATTTTCTATAGTTTTAATAATTT-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz

#D/G Fw; pBoNT/D E230A

5'-TCTCTCG**GGCGC**CCTAAAAGCAAAAGTAAATGAGAGT-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#D/G *Kas*I Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGC**CCTACTTCACCAACTAGAATAAT-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#I/C Rv 776; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTGACGT**CTAAACTATTTTTAAATTTTC-3'

fett gedruckt: *Aat* II Erkennungssequenz

#I/C Fw 776; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTGACGT**CAAATGTTTCGGAAGCAATGAATAATA-3'

fett gedruckt: *Aat* II Erkennungssequenz

#R/C Rv 687; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTGTATA**CTACTATAAAAAGGTAAATACACCG-3'

fett gedruckt: *Acc* I Erkennungssequenz

#R/C Fw 687; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTAGTATA**CAAGAATGCGAGAAAATTATTAAACTATAGAA-3'

fett gedruckt: *Acc* I Erkennungssequenz

#K/C Fw 745; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTCTCGAG**TATAAAAAATACTCAGGAAGTG-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz

#K/C Rv 745; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTCTCGAG**ATCTATACAAGCTTTGATTGCATCTGCC-3'

fett gedruckt: *Xho* I Erkennungssequenz

#V/C 593 Rv; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTGCTAG**CGAAGGTAAAAATGTGTATATCTTAT-3'

fett gedruckt: *Nhe* I Erkennungssequenz

#V/C 593 Fw; pBoNT/D E230A

5'-**CTCTCTGCTAG**CTGAAAAATGTAATAAAGGTGTTCAAGCAGG-3'

fett gedruckt: *Nhe* I Erkennungssequenz

#HCD Cys Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCC**CGGGTCAGAAAGTGTAGTAGATTTATT-3'

fett gedruckt: *Sac* II Erkennungssequenz

#HC-LC-D Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGT**CGACATTAATGATTCAAAAATTTTGAGC-3'

fett gedruckt: *Sal* I Erkennungssequenz

#HC-D delta Cys; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCC**ATGGATGATTCAACATCTATTAAAGTTAAAAATAATAGATT-3'

fett gedruckt: *Nco* I Erkennungssequenz

#S875 Del Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGTT**CAAAAATTTTGAGCTTACAAAAC-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#T847 Del Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**TGTATTTTCAAAACTCTCATTAC-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#I720 Del Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**ATTACTACTCAATTTAATCATATA-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#F667 Del Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**AATCCCTCTAATAAAAAAGCTA-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#N641 Del Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**AATATAGGAAATTCAGCATTAAAG-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#Y546 Del Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**AATAATCAACATATTTAGTAATATC-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#P638 Del Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**CCTGCCTTAAATATAGGAAATTC-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#F584 Del Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**AATGTGTATATCTTATTGCTATA-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#P801 Del Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGGCGCCGGT**AGGGAGCATATTTTTAAATAAGTA-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#N857C Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGTATA**CGAAAAAATATTTAAAAGGCATTGTA-3'

fett gedruckt: *Acc* I Erkennungssequenz

#N857C Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCGTATA**CTTCTAATTCTTTATTTAAAAGATATAATTAAT-3'

fett gedruckt: *Acc* I Erkennungssequenz

#G676C Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCAGCGCT**GGTATAGTAAACTCTGGAAAT-3'

fett gedruckt: *Eco47* III Erkennungssequenz

#G676C Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCAGCGCT**CTGTGTATTTACCTTTTATAGTTCTATTC-3'

fett gedruckt: *Eco47* III Erkennungssequenz

#N477C Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCAGATCT**CTTGTGAAATGCTATCTTTATC-3'

fett gedruckt: *Bgl* II Erkennungssequenz

#N477C Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCAGATCT**TTTGAATGTAAAATTATTACAGATGAGACTAAT-3'

fett gedruckt: *Bgl* II Erkennungssequenz



#F724C Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCTCTAGACAACCAATTTGATACCATC**-3'

fett gedruckt: *Xba* I Erkennungssequenz

#F724C Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCTCTAGA**ATTACTACTCAATGTAATCATATAAATTATCAAATG-3'

fett gedruckt: *Xba* I Erkennungssequenz

#I787C Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCTCTGCAGA**ATTTATTTATATTATTCATTGCTTCC-3'

fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#I787C Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCTCTGCAG**AAGAATGTTCTGTAACATACTTATT-3'

fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#K492C Fw; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCTCTAGAT**GAAATCTATTTTAGATGGGC-3'

fett gedruckt: *Xba* I Erkennungssequenz

#LCD-Thr Rv; pBoNT/D E230A

5'-**TCTCTCCCATGG**AGCTTCCTCGTGGTACTAATCTTAAACATACTTTTGTAAA-3'

fett gedruckt: *Nco* I Erkennungssequenz

#Chim-DT-RV; pET15bΔ*Bgl* II-*Sph* IΨWT DT

5'-**CTCTCCCCGGG**GCTTTTGATTTCAAAAAATAGCG-3'

fett gedruckt: *Sma* I Erkennungssequenz

#Chim-DT-FW-2; pET15bΔ*Bgl* II-*Sph* IΨWT DT

5'-**CTCTCGGAGCT**CCCCGCGTATTCTCCGGG-3'

fett gedruckt: *Sac* I Erkennungssequenz

#Luc RV; pBPCLuc0

5'-**TCTCTCGGC**CCCAATTTGGACTTTCCGCCCTT-3'

fett gedruckt: *Kas* I Erkennungssequenz

#Luc Fw; pBPCLuc0

5'-**TCTCTGAATTC**GCAATTAAGGAGATAATAGGTATGGGCTCCTTCAACTCCCTGAGCTC-3'

fett gedruckt: *Eco*R I Erkennungssequenz

#Luc Rv-*Sma*I; pBPCLuc0

5'-**TCTCTCCCCGGG**CAATTTGGACTTTCCGCC-3'

fett gedruckt: *Sma* I Erkennungssequenz

#LCA BoNT/D Rv

5'-**TCTCTCCCATGG**AGGCCTTATTGTATCCTTTATC-3'

fett gedruckt: *Nco* I Erkennungssequenz

#LCA BoNT/D Fw pQE

5'-**TCTCTCGAATTC**GCAATTAAGGAGATA-3'

fett gedruckt: *Eco*R I Erkennungssequenz

#LCA Cys Rv

5'-**TCTCTCCCCGGG**TAGCAACTTATAAAATTCAAACAA-3'

fett gedruckt: *Sal* I Erkennungssequenz

#LCA Rv *Pst*I

5'-**TCTCTCTCTGC**AGGGCCTTATTGTATCCTTTATC-3'

fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#DHFR-Fw

5'-**TCTCTGAATTCGCAATTAAGGAGATAATAGGTATGGTTCGACCATTGAACTG**-3'fett gedruckt: *EcoR* I Erkennungssequenz

#DHFR-Rv

5'-**TCTCTCCTGCAGGTCTTTCTTCTCGTAGACTTC**-3'fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

#LCD Fw PstI

5'-**TCTCTCCTGCAGATGACATGGCCAGTAAAAGATT**-3'fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz; unterstrichen: *Msc* I Erkennungssequenz

#Bcl-2 Fw

5'-**TCTCTGAATTCGCAATTAAGGAGATAATAGGTATGGCGCAAGCCGGGAGA**-3'fett gedruckt: *EcoR* I Erkennungssequenz

#Bcl-2 Rv

5'-**TCTCTCCTGCAGCTTGTGGCCAGGTATGCA**-3'fett gedruckt: *Pst* I Erkennungssequenz

# Ex-2

5'-TAGGCGTATCACGAGGC-3'

bindet stromaufwärts der MCS von pQE-3

# Ex-3

5'-TGAGGTCATTACTGGATCTA-3'

bindet stromabwärts der MCS von pQE-3

# Sma 9 RW 2974-2951

5'-**CTCTCCCGGGTTGTAAAATCCATTCTATATTGCC**-3'fett gedruckt: *Sma* I-Erkennungssequenz

# SBN-140 ; ab bp 532 (pBN-31)

5'-**TCTCAGATCTAAGTTTGAAAATGGTAGTTGGAA**-3'fett gedruckt: *Bgl* II Erkennungssequenz

# SBN-206; ab bp 730 (pBN-31)

5'-**TCTCAGATCTACATCTAATCAAAGTTCAGCTGT**-3'fett gedruckt: *Bgl* II Erkennungssequenz

# SBN-300; ab bp 1012 (pBN-31)

5'-**TCTCGGATCCATAGCGAAAAGACCTAATAATATT**-3'fett gedruckt: *Bam*H I Erkennungssequenz

# Sma 4 RW 1972-1949

5'-**CTCTCCCGGGATTTCCCCTTAATGCTGAATTTTC**-3'fett gedruckt: *Sma* I-Erkennungssequenz

# Sma 6 RW 2293-2270

5'-**CTCTCCCGGGATCACTTCCTGAGTATTTTTTATA**-3'fett gedruckt: *Sma* I-Erkennungssequenz

# Sma 8 RW 2638-2612

5'-**CTCTCCCGGAATACTAT TGAAATATTCATTAATTAT**-3'fett gedruckt: *Sma* I-Erkennungssequenz

# Sma 10 RW 3325-3303

5'-**CTCTCCCGGGCAAAGGATTTCCCAATAATCTT**-3'fett gedruckt: *Sma* I-Erkennungssequenz

# IBA Forward  
 5'-GAGTTATTTTACCACTCCCT-3'  
 bindet stromaufwärts der MCS von pASK-IBA3

# IBA Reverse  
 5'-CGCAGTAGCGGTAAA CG-3'  
 bindet stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle (MCS) von pASK-IBA3

### 9.1.9. Weitere Materialien

Deckgläschen rund, Ø 12 mm	Assistent
Nitrocellulosemembran Protran BA83 Ø 2 µm	Schleicher & Schuell
Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand	Omnilab
Zellhomogenisator, 1 ml Fassungsvermögen	Braun
Zellhomogenisator, 15 ml Fassungsvermögen	Braun
Whatman-3MM-Papier	Whatman
Röntgenfilme Biomax II	Kodak

### 9.1.10. Lösungen und Medien zur Präparation von Rückenmarksneuronen

Stammlösung	Konzentration	Herstellung
BSA	1 mg/ml	100 mg BSA in 100 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
NGF	20 µg/ml	0,2 mg NGF in 20 ml BSA-Stammlösung (1 mg/ml) lösen
Transferrin	10 mg/ml	0,1 g Transferrin in 10 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
Putrescin	3,22 mg/ml	3,22 mg Putrescin / in 1 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
Insulin	1 mg/ml	1 mg Insulin in 970 µl H <sub>2</sub> O (bidest.) geben, 30 µl Eisessig zugeben, durch vorsichtiges Schütteln lösen, sterilfiltrieren
Triiodothyronin	20 µg/ml	1 mg Triiodothyronin in 1 ml NaOH 1 mol/l lösen, 49 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) zugeben, sterilfiltrieren
Progesteron	20 µg/ml	1 mg Progesteron in 1 ml Ethanol (abs.) lösen, 49 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) zugeben, sterilfiltrieren
Corticosteron	20 µg/ml	1 mg Corticosteron in 1 ml Ethanol (abs.) lösen, 49 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) zugeben, sterilfiltrieren
Natriumselenit	20 µg/ml	0,2 mg Natriumselenit in 10 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren
FUDR mit Uridin	2 mg/ml FUDR/ 5 mg/ml Uridin	2 mg FUDR und 5 mg Uridin in 1 ml H <sub>2</sub> O (bidest.) lösen, sterilfiltrieren

#### N3-Lösung:

1,0 ml	BSA-Stammlsg.
1,0 ml	Transferrin-Stammlsg.
1,0 ml	Putrescin-Stammlsg.
200 µl	Insulin-Stammlsg.
10,0 ml	Triiodothyronin-Stammlsg.
3,1 ml	Progesteron-Stammlsg.
1,0 ml	Corticosteron-Stammlsg.
100 µl	Natriumselenit-Stammlsg.
ad 20 ml	mit H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen, 1 ml Aliquots bei -20°C lagern

Ausgangsmedium (MEM 0):

MEM-Pulvermedium (für 1 l Medium, Gibco) wurde in 800 ml H<sub>2</sub>O bidest. aufgelöst. Nach Zugabe von 2,2 g NaHCO<sub>3</sub>, 29,5 mg FUDR (30 µg/ml f.c.) und 73,26 mg Uridin (75 µg/ml f.c.) wurde der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und das Volumen mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l aufgefüllt. Das Medium wurde sterilfiltriert und bei 4°C maximal 4 Wochen gelagert.

Minimal Essential Medium 1 (MEM 1):

100 ml	MEM 0
10 ml	Fötale Kälberserum (FCS)
2 ml	N3 (Zusammensetzung siehe oben)

Minimal Essential Medium 1 mit erhöhter Konzentration von FUDR und Uridin (MEM 1FU):

50 ml MEM 1 + 0,5 ml der FUDR / Uridin-Stammlösung (FUDR 2 mg/ml, Uridin 5 mg/ml)

Dulbecco's PBS (mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, Aufbewahrungslösung)

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,44 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	132 mg/l
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
D-Glucose	5,00 g/l

Der pH-Wert liegt bei pH 7,5, die Osmolarität vor der Glucosezugabe bei ca. 295 mosmol.

Dulbecco's PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, Trypsinisierungslösung)

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,20 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,44 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g/l
D-Glucose	5,00 g/l

Der pH-Wert liegt bei pH 7,5, die Osmolarität vor der Glucosezugabe bei ca. 295 mosmol.

**9.1.11. Firmen**

Acros Organics	Schwerte, Deutschland
Aldrich	Steinheim, Deutschland
Alamone Labs	Jerusalem, Israel
Amersham Pharmacia Biotech	Braunschweig, Deutschland
Applichem	Darmstadt, Deutschland
Assistent	Deutschland
Beckman	München, Deutschland
Becton Dickinson (BD)	Heidelberg, Deutschland
Berthold	Bad Wildbach, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
Biorad	Richmond, USA
Boehringer Mannheim	Mannheim, Deutschland
Braun	Melsungen, Deutschland
Calbiochem	Darmstadt, Deutschland
Difco Laboratories	Detroit, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fluka	Neu-Ulm, Deutschland
FMC BioProducts	Vallensbaek, Dänemark
FMI GmbH	Seeheim, Deutschland
GibcoBRL	Karlsruhe, Deutschland
IBA GmbH	Göttingen, Deutschland

---

ICN	Eschwege, Deutschland
Intas	Göttingen, Deutschland
Jackson Immunoresearch Laboratories, dianova	Hamburg, Deutschland
Jobin-Yvon	Grasbrunn, Deutschland
J. T. Baker	Deventer, Holland
Kendro	Hanau, Deutschland
Kodak	Stuttgart, Deutschland
MBI Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Molecular Probes, MoBiTec	Göttingen, Deutschland
MWG Biotech	Ebersberg, Deutschland
New England Biolabs	Beverly, USA
Novagen	Darmstadt, Deutschland
Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Omnilab	Gehrden, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Perkin Elmer	Weiterstadt, Deutschland
Pierce Perbio Science	Bonn, Deutschland
Promega	Madison, USA
QBIOgene	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Riedel-DeHaen	Seelze, Deutschland
Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt	Nürnberg, Deutschland
Savant	Frankfurt, Deutschland
Schleicher & Schuell	Dassel, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Shimadzu	Kyoto, Japan
Sigma	München, Deutschland
Sorvall Instruments	Bad Homburg, Deutschland
Synaptic Systems	Göttingen, Deutschland
Technelysium	Helensdale, Australien
USB	Braunschweig, Deutschland
Whatman	Maidstone, England

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

### Steffen Bade

Diplom-Chemiker

\* 2. Mai 1973 in Hannover

verheiratet

1 Kind, Alter: 3 Jahre

## Berufliche Tätigkeiten

- 2000 - 2002 Betreuung des chemischen Praktikums für Studierende der Human- und Zahnmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)
- 2001 Wissenschaftliche Anleitung einer Austauschstudentin im Rahmen des Research Exchange Programms der International Federation of Medical Student Association (IFMAS) vertreten durch den Deutschen Famulantenaustausch e.V. (dfa)
- Seit Oktober 1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische Chemie der MHH zum Zwecke der Promotion
- WS 1998 Wissenschaftliche Hilfskraft an der MHH im Bereich Forschung und Lehre

## Hochschulausbildung

- 1999 Diplom im Fachbereich Chemie der Universität Hannover, Note „Gut“  
Zusatzprüfung im Fach Biochemie, Note „Sehr gut“
- Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie, MHH in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter Anleitung von Prof. Dr. H. Niemann und Prof. Dr. T. Scheper zum Thema:  
*„Biotechnische Herstellung neuroselektiver Transportermoleküle“*
- 1993 - 1999 Studium der Chemie (Dipl.) an der Universität Hannover

## Grundwehrdienst

- 1992/93 Peilzentrale/Fernmeldeaufklärung Heer 1 in Diepholz

## Schulbildung

- 1992 Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,9
- 1985 - 1992 Gymnasium Bad Nenndorf
- 1983 - 1985 Orientierungsstufe Bad Nenndorf
- 1980 - 1983 Grundschule Haste

## PUBLIKATIONEN

### Originalpublikationen in „peer-reviewed“ Zeitschriften:

Binz T, **Bade S**, Rummel A, Kollwe A, and Alves J (2002). Arg<sup>362</sup> and Tyr<sup>365</sup> of the Botulinum Neurotoxin Type A Light Chain Are Involved in Transition State Stabilization. *Biochemistry* **41**(6):1717-23.

Vaidyanathan VV, Yoshino K, Jahnz M, Dorries C, **Bade S**, Nauenburg S, Niemann H, Binz T (1999). Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem* **72**(1):327-37.

### Veröffentlichte Abstracts:

**Bade S**, Rummel A, Bigalke H, Alves J, Binz T (2002). New insights into the translocation process of botulinum neurotoxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(Suppl.2): R13.

Binz T, **Bade S**, Rummel A, Bigalke H, Alves J (2002). Mechanism of substrate hydrolysis of botulinum neurotoxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(Suppl.2): R19.

Heyn J, **Bade S**, Binz T, Bigalke H (2002). Clostridial Neurotoxins: Translocation through membranes of erythrocyte ghosts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(Suppl.2): R61.

Rummel A, **Bade S**, Bigalke H, Alves J, Binz T (2002). Molecular characterisation of the ganglioside binding site of clostridial neurotoxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(Suppl.2): R119.

**Bade S**, Rummel A, Bigalke H, Binz T (2002). Botulinum Neurotoxin Type D enables Transport of GFP and Luciferase into the Cytosol. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(Suppl.1): R5.

Rummel A, **Bade S**, Alves J, Bigalke H, Binz T (2002). Identification of the ganglioside binding site in botulinum neurotoxins serotype A and B. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(Suppl.1): R9.

**Bade S**, Bigalke H, Binz T (2001). BoNT/D enables transport of GFP into the cytosol. *Biol Chem* **382**(Spec. Supple.): S123.