

# **Rezeptorvermittelte Translokation von Clostridien Neurotoxinen durch die Plasmamembran**

Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation  
von

Apothekerin  
Niloofer Khadjeh Nasir Tousi  
geboren am 22. März 1966 in Teheran

Hannover 2003

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hannover, den 30. April 2003

Referent: Prof. Dr. W. Müller  
Institut für Physiologische Chemie  
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Otto  
Fraunhofer-Institut für  
Toxikologie und Experimentelle Medizin ITEM  
Hannover

Tag der Promotion: 23. Juni 2003

## DANKSAGUNGEN/WIDMUNGEN

Ich möchte allen danken, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Bigalke danke ich für die Überlassung des Themas und für die fachliche Unterstützung während der gesamten Promotion.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich für die Übernahme der Arbeit und die überaus freundliche Unterstützung während des Promotionsverfahrens.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Toxikologie gilt mein Dank für die nette Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Tina Hottopp-Hergesell und Frau Ulrike Fuhrmann für die Schlachthoffahrten, die Präparation der chromaffinen Zellen und ihre tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur bedanken. Mein Dank gilt Frau Karin Akternkamp und Frau Sandra Hagemann in der Analytik, ganz besonderes Herrn Dr. Torsten Binscheck danke ich für die intensive und engagierte Betreuung und allseitige Beistand und Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank auch Herrn Dr. Binz und seinen Mitarbeitern, Herrn Steffen Bade und Herrn Andreas Rummel, für das Verfügungsstellen von rekombinanten Proteinen und polyklonalen Antikörper.

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie und meinen Freunden, die mir mit Worten und Taten immer zur Seite standen.

## Abstrakt

Das Nervensystem wird von einer Reihe von Toxinen unterschiedlichen Herkunft angegriffen. Eine Gruppe von diesen Toxinen gehört zur Familie der Clostridien Neurotoxinen (CNT). Die Clostridien Neurotoxine, Tetanus (TeNT) und die sieben serologische Botulinum Neurotoxinen (BoNT/A-BoNT/G) sind für die zwei tödlich verlaufenden Erkrankungen (Tetanus, „Wundstarrkrampf“ und Botulismus) verantwortlich. BoNT hemmt die Acetylcholinausschüttung an den neuromuskulären Synapsen, wodurch es zu einer schlaffen Lähmung der Skelettmuskulatur kommt. Dem entgegen verhindert TeNT die Freisetzung von inhibitorischen Neurotransmittern GABA und  $\gamma$ -Aminobuttersäure in die Interneuronen. Es kommt zu einer spastischen Paralyse in Begleitung von Krämpfen. Clostridien Neurotoxine werden als ein einkettiges inaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa intrabakteriell hergestellt. Dieses Protein kann durch Proteasen in zwei Ketten gespalten werden. Das Di-chain-Toxin besteht aus eine schwere Kette (H) mit ~100 kDa Molekulargewicht, und eine leichte Kette (L) von ~50 kDa Molekulargewicht. Beide Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die schwere Kette kann durch Papain wiederum in zwei funktionale Untereinheiten gespalten werden. Die C-terminale Domäne ( $H_C$ ) ist für die neurospezifische Bindung, und der N-terminale Bereich ( $H_N$ ) für die Translokation der leichten Kette durch Membran ins Zytosol verantwortlich. Die leichte Kette (L) ist das aktive Zentrum und für die proteolytische Aktivität der CNT innerhalb der Zelle zuständig. Die CNT sind  $Zn^{2+}$ -metalloproteasen. Die spalten innerhalb der Zellen einer der SNARE-Proteine (soluble NSF attachment protein receptor). Diese Proteine sind an der Andockung und Fusion von small synaptic Vesikel (SSV) und präsynaptische Plasmamembran beteiligt. Jedes Toxin spaltet spezifisch einer von den SNARE-Proteinen. TeNT, BoNTs B, D, F und G spalten Vesikel-assoziiertes Membranprotein (VAMP; wird auch synaptobrevin genannt); BoNTs A, E und  $C_1$  spalten Synaptosomen-assoziiertes Protein von 25 kDa (SNAP-25); BoNT/ $C_1$  spaltet außerdem syntaxin.

Durch drei Stufenprozess wird die Aufnahme und die toxische Aktivität von CNT erklärt: Bindung an Zelloberfläche, Translokation in das Zytosol und Spaltung der Substrate.

In dieser Arbeit wurde die Translokation und die Wirkung von Clostridientoxine durch die Membran von chromaffinen Zellen als *in vitro* Modell untersucht. Tetanus und Botulinumneurotoxinen Typ A und B binden erst selektiv an negativ geladenen Oberflächen, Polysialogangliosiden, der präsynaptischen Membran, besonders an  $GD_{1b}$  (TeNT),  $GT_{1b}$  und  $GD_{1a}$  (BoNT/A), die nur in das ZNS vorkommen. Der gangliosidbindende Bereich ist auf den C-terminalen Teil (34 Aminosäuren für TeNT und die 30 AS für BoNT/A) von schwerer Kette lokalisiert. Es wird vermutet, dass es sich bei der Bindungsstelle für Clostridientoxine um einen Doppelrezeptor handelt, dessen einer Teil ein Gangliosid ist, während der andere Teil aus einem von neuronalem Gewebe exprimierten Protein, an dem CNT mit  $H_N$ -Teil binden können, besteht. Wie aus dieser Arbeit zu sehen ist, ist diese Bindungsstelle vor allem in sauren pH-Wert (<5) für die Toxine erkennbar (Verfügbarkeit der Bindungsstelle) und für TeNT und BoNT unterschiedlich.

Die Neurotoxine zeigen eine Homologie von 30-50% in ihre Aminosäuresequenz und durch die kristallographischen Untersuchungen zeigen die ähnlichen drei-

dimensionalen Strukturen auf. Nach der Bindung an Zelloberfläche wird das Toxin in Endosom über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Vakuolare ATPase ist beteiligt an spezifischem vesikulären Transport, wie in Prozess der pH-Gradient. Nach der Ansäuerung des endosomalen Kompartiments kommt zu einer Konformationsänderung des amphiphilen/transmembranen Segments der schweren Kette, das wiederum die Transportkanäle für die leichte Kette bilden. In Zytosol wird das Toxin durch das Enzym Thioredoxin-Reduktase in die leichte und schwere Kette reduziert. Die L-Kette besitzt  $Zn^{2+}$ -metalloproteolytische Aktivität und spaltet einer der SNARE-Proteine. Es kommt zur Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung. Bafilomycin, welches die Protonen-transportierende ATPase hemmt und dadurch die Ansäuerung der Vesikelunterbindet, verhindert die Blockade der Exozytose. Dieser Schritt wurde in chromaffinen Zellen näher untersucht. Intakte chromaffine Zellen sind unter physiologischen Bedingungen gegenüber Tetanustoxin unempfindlich und nur gering sensibel gegenüber Botulinumtoxin Typ A. Um die Zellen gegenüber von CNT sensibilisieren zu können, werden die Zellmembranen mit Gangliosiden angereichert. Somit gilt dieses Zellsystem als gutes Werkzeug zur Untersuchung der pH-abhängigen Translokation von Clostridientoxinen und die Rolle deren Proteinfragmente. Zunächst wurden die Zellen mit Phosphatpuffer (pH-Wert = 5.0) und dem jeweiligen Neurotoxin (TeNT und Botulinumtoxinen Typ A und Typ B) inkubiert. Unter diesen experimentellen Bedingungen gelangte das Toxin unter Umgehung des endosomalen Kompartiments vom extrazellulären Raum direkt ins Zytosol. In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass durch Zusatz von Bafilomycin  $A_1$  die Wirkung der CNT aufgehoben wird. Die Wirkung von TeNT und BoNT/B auf die chromaffinen Zellen erwies sich als temperatur- und energieabhängig. Bei BoNT/A war aber die Hemmung der Noradrenalinausschüttung temperaturunabhängig. Mit rekombinant (rec.) hergestellten Fragmente konnte zwischen Bindung und Transport diskriminiert werden. Dazu wurden folgende Konstrukte verwendet: Ein rekombinant hergestelltes  $LH_N$ -Fragment von TeNT mit Doppelmutation in der leichten Kette (Austausch von zwei Aminosäuren H (Histidin)<sup>233</sup> in V (Valin)<sup>233</sup> und E (Glutaminsäure)<sup>234</sup> in Q (Glutamin)<sup>234</sup>), das nicht mehr in der Lage ist Synaptobrevin II zu spalten, sowie ein rec. $LH_N$ -Fragment mit intakter leichten Kette. Beiden Fragmenten fehlt der  $H_C$ -Teil der schweren Kette, der Teil, der für die Bindung an Gangliosiden zuständig ist. Rekombinant hergestellte  $LH_N$ -Fragmente, denen der gangliosiderkennende Bereich ( $H_C$ -Teil) fehlt, hemmen in chromaffinen Zellen beim niedrigen pH-Wert die Katecholaminfreisetzung nicht. Werden sie dagegen durch Elektroporation in die Zellen gebracht, blockiert das intakte rec. $LH_N$ -Fragment die Exozytose. Die Versuche zeigten, dass beide rekombinant hergestellte  $LH_N$ -Fragmente in der Lage sind, die Wirkung des Holotoxins kompetitiv zu hemmen. Außerdem wurde eine Aufhebung der Wirkung der Toxine auf die Neurotransmitterausschüttung durch Zusatz des Protonenpumpenhemmers Bafilomycin  $A_1$ , erzielt. Diese Effekte waren vor allem im sauren Milieu zu beobachten. Die Aufhebung der Toxinwirkung durch Bafilomycin  $A_1$  und die kompetitive Hemmung der TeNT durch seine rekombinant hergestellten  $LH_N$ -Fragmente bestätigen die Vermutung, dass ein Membranrezeptor für die Aufnahme der Toxine in neuronale Zellen verantwortlich ist. Da das  $H_N$ -Fragment der schweren Kette bei Tetanus und Botulinumtoxin nicht identisch ist, kommen unterschiedliche Rezeptoren für deren Aufnahme in Nervenzellen in Frage.

Schlagworte: Clostridientoxine, Tetanus und Botulinum Neurotoxinen, chromaffine Zellen.

## Abstract

Nerve terminals are specific sites of action of very large number of toxins produced by many different organisms. One of them is the clostridial neurotoxin (CNT) family. They are composed of tetanus neurotoxin (TeNT) and seven serotypes of botulinum neurotoxins (BoNT/A-BoNT/G). CNTs are responsible for two deadly neuroparalytic syndromes in human (tetanus and botulism). BoNTs block the release of acetylcholine at the neuromuscular junction to cause flaccid paralysis, while TeNT blocks the release of neurotransmitters such as glycine and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the inhibitory interneurons of the spinal cord, resulting in spastic paralysis. Clostridial neurotoxins are all produced as single inactive polypeptide chains of 150 kDa that are cleaved by tissue proteinases into two chains. A heavy (H) chain of ~100 kDa and a light (L) chain of ~50 kDa linked by a single disulfide bond. The H chain can be further cleaved into two chains by papain. The C-terminal chain,  $H_C$ , binds to the target cell surface and the N-terminal domain,  $H_N$ , is involved in translocating the toxin across the membrane. The L chain is responsible for the intracellular activity of CNTs. Clostridial neurotoxins act inside nerves and block neurotransmitter release via their  $Zn^{2+}$ -metalloproteolytic activity directed specifically on SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) proteins. These proteins are involved in multiple steps leading to the docking and fusion of small synaptic vesicles (SSVs) with the presynaptic plasma membrane. Each neurotoxin attacks a specific target component: TeNT, BoNTs B, D, F and G specifically cleave the vesicle-associated membrane protein (VAMP; also called synaptobrevin); BoNTs A, E and  $C_1$  cleave a synaptosomal associated protein of 25 kDa (SNAP-25) by specific hydrolysis; BoNT/ $C_1$  cleaves syntaxin.

The toxic action of CNT is composed of three steps: cell surface binding, translocation across membranes, and substrate cleavage.

The present study examines the kinetic of TeNT, BoNTs A and B in chromaffin cells as *in vitro* membrane model. Thus, these cellular systems represent valuable tools to study the pH-dependent translocation of clostridial toxins and the role different fragments play.

The first step of CNTs internalization starts with  $H_C$  binding to gangliosides. The C-terminal domain of TeNT binds with 34 amino acid sequence to gangliosides of the di- and trisialo series  $GD_{1b}$  and BoNT/A with 30 amino acid of  $H_C$ -fragment to  $GT_{1b}$  and  $GD_{1a}$ . In the "double receptor" model proposed for this step, binding of gangliosides with  $H_C$  and with N-terminal domain ( $H_N$ ) of H to a putative protein receptor, which appears at the presynaptic side of the synapse during exocytosis and only at low pH. We found that this integral membrane protein is different for TeNT and BoNTs and it is responsive only at low pH (<5). The neurotoxins share a homology in the amino acid sequence of 30-50% and recent crystallographic analyses of BoNT/A and B show similar three-dimensional structures. Hereby, we provide evidence for the existence of analogue ganglioside binding sites in BoNT/A and B. After entering neurons via receptor-mediated endocytosis are CNTs then located in the endosomal compartment. To attack their substrate in the cytosol, they must cross the hydrophobic barrier of the vesicle membrane. The acidification of the vesicle lumen by a proton pumping ATPase in the vesicle membrane leads to conformational changes in the  $H_N$ -fragment of toxin. Subsequently, the CNTs are cleaved by the thioredoxin reductase into their two chains, the LC and H. LC is a

Zn<sup>2+</sup>-metalloprotease, which attacks and cleaved one of the SNARE proteins. So transmitter release is inhibiting. Bafilomycin, an inhibitor of the vesicular H<sup>+</sup>-ATPase, prevents translocation of CNTs and thereby the block of transmitter release. This step was investigated in more detail using chromaffin cells. In an experimental set up using chromaffin cells we have mimicked the intraendosomal conditions. Since chromaffin cells lack receptors for clostridial neurotoxins, these toxins will not block secretion of epinephrine under physiological conditions, i.e. when intact cells were exposed to the toxin, although exocytosis of the hormone is controlled by neurotoxin sensitive SNAREs. We mimicked, in a reverse manner, the conditions that govern the translocation through the endosomal membrane.

Preincubation of the cells with ganglioside increased the binding capacity. Exocytosis is inhibited, however, when the cells exposed to CNTs at low pH (<5) similar to the pH in endosomes. The translocation into chromaffin cells was only slightly inhibited by bafilomycin treatment, suggesting that TeNT reached the cytosol and bypassed the endosomal compartment. The effect of TeNT and BoNT/B in contrast to BoNT/A (hit and run drug) in chromaffin cells strongly depends on temperature while proteolysis *in vitro* does not.

Tetanus toxin, recombinant (rec.) L-H<sub>N</sub>-active and -inactive and rec.L were applied to chromaffin cells in buffer of low pH (5.0). Only the whole toxin was capable to inhibit the hormone release indicating that the H<sub>N</sub> domain alone is insufficient to mediate translocation of the L chain. The active rec.L-H<sub>N</sub>, a fragment of TeNT, which does not contain the two receptor-binding domains, ganglioside- and protein-recognizing sequences, blocked exocytosis when administered to chromaffin cells by electroporation, a competition at the level of disulfid bond reduction (the thioredoxin reductase) can be ruled out. However, both inactive rec.L-H<sub>N</sub> (two mutation in the light chain, exchange from H (Histidin)<sup>233</sup> in V (Valin)<sup>233</sup> und E (Glutaminsäure)<sup>234</sup> in Q (Glutamin)<sup>234</sup>, this LC ist not able to bind ZN<sup>2+</sup>) and active rec.L-H<sub>N</sub> can prevent the effects of TeNT under the same conditions. The inactive rec.L-H<sub>N</sub> are not capable of interacting with VAMP, because L but not H<sub>N</sub> is inactivated. In contrast to this finding the effect of another clostridial neurotoxin, BoNT/A, maintains in the presence of the inactive rec.L-H<sub>N</sub>. Apparently, interaction of L-H<sub>N</sub>, with a yet unidentified binding site that becomes available only at low pH is essential for the delivery of the L chain into the cytosol. It remains to be shown whether this binding site is involved in the translocation process at the endosomal membrane. It is conclude that a H<sub>N</sub> site is involved in translocation of CNTs. This site is different from membrane bound receptors, is accessible at low pH only and might be responsible for the different routes by which TeNT and BoNTs are navigated in neurons.

Keywords: Clostridial neurotoxins, Tetanus and botulinum neurotoxin, chromaffin cells.

INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Struktur und Wirkung von Clostridien Toxinen.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>Der Vesikelfusionskomplex .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Proteine, die am Membranfusionsprozess beteiligt sind, können in drei Klassen aufgeteilt werden:.....	7
<b>1.3</b>	<b>Angriffspunkte.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4</b>	<b>Chromaffine Zellen als Modell.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>PROJEKTDESCHEIBUNG/FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Zusammensetzung der Lösungen: .....</b>	<b>18</b>
3.1.1	Lösungen für die chromaffine Zellen .....	18
3.1.2	Lösungen für die Proteinpräparation .....	19
3.1.3	Lösungen für Gelelektrophorese .....	19
3.1.4	Lösungen für Proteinbestimmung.....	20
<b>4</b>	<b>GERÄTE UND STOFFE .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Aufnahme von Clostridien Neurotoxinen in intakte chromaffine Zellen ..</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Elektroporation.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung und Quantifizierung der Radioaktivität:.....</b>	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>Gelelektrophorese und Proteinkonzentrationsbestimmung.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5</b>	<b>Präparation von Proteinen (Proteinexpression).....</b>	<b>21</b>
<b>4.6</b>	<b>Toxine und Toxinfragmente.....</b>	<b>21</b>
<b>4.7</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>Zellkultur (als Modell diente chromaffine Zellen).....</b>	<b>23</b>
5.1.1	Präparation chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark vom Rind und die Kulturbedingungen.....	23
<b>5.2</b>	<b>Aufnahme von Clostridien Neurotoxinen in intakte chromaffine Zellen ..</b>	<b>23</b>
5.2.1	Anreicherung mit Gangliosiden.....	23
5.2.2	Toxinaufnahme aus dem Phosphat Puffer (pH 5.0 und pH 7.2) und Puffer niedriger Ionenstärke (155).....	24



<b>5.3</b>	<b>Elektroporation der chromaffinen Zellen .....</b>	<b>24</b>
<b>5.4</b>	<b>Freisetzungsexperimente.....</b>	<b>24</b>
<b>5.5</b>	<b>Herstellung und Gewinnung rekombinanten Toxinen mit Hilfe Plasmid beimpften <i>E. coli</i>-Stämmen .....</b>	<b>25</b>
5.5.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen für eine Transformation durch Hitzeschock (56) .....	26
5.5.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	26
5.5.3	Aufbewahrung transformierter Klone.....	26
5.5.4	Induktion der Proteinexpression von His <sub>6</sub> -tag-Fusionsprotein in <i>E. coli</i> M 15 pREP4 .....	26
5.5.5	Ernte und Zellyse .....	27
5.5.6	Affinitätsreinigung.....	27
<b>5.6</b>	<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....</b>	<b>28</b>
5.6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	30
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1</b>	<b>Einschleusung der Toxine durch Elektroporation.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2</b>	<b>Aufnahme und die Wirkung von Clostridien Toxinen in Puffer niedriger Ionenstärke .....</b>	<b>33</b>
<b>6.3</b>	<b>Wirkung der Clostridien Toxinen an chromaffinen Zellen in Abhängigkeit des Gangliosidgehalts der Zellmembran und von dem pH-Wert des Inkubationsmediums .....</b>	<b>35</b>
<b>6.4</b>	<b>Wirkung von rekombinant hergestellten leichten Ketten von Clostridien Toxinen auf chromaffine Zellen in sauren pH-Wert.....</b>	<b>39</b>
<b>6.5</b>	<b>Wirkung den Clostridien Toxinen an chromaffinen Zellen in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert, der zu inkubierten Lösungen.....</b>	<b>41</b>
<b>6.6</b>	<b>Wirkung von ATP-abhängigen Protonenpumpenhemmer Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Hemmung der Exozytose durch die Clostridien Toxinen.....</b>	<b>44</b>
<b>6.7</b>	<b>Wirkung von rekombinant hergestelltem H<sub>N</sub>-Fragment des Tetanustoxins gebunden an zweifach mutierter leichten Kette und von Tetanustoxin bei verschiedenen pH-Werten .....</b>	<b>62</b>
<b>6.8</b>	<b>Wirkung auf die Hemmung der Exozytose durch Tetanus Toxin unter Zusatz von rec.L-HN/TeNT-Intakt mit und ohne Gangliosiden in sauren Puffer</b>	<b>71</b>
<b>6.9</b>	<b>Dosiswirkungskurve mit BoNt/A und unter Zusatz von rec.L-H<sub>N</sub>/BoNT/A74</b>	
<b>6.10</b>	<b>Wirkung von Clostridien Toxinen unter Zusatz von rec.H<sub>C</sub>-TeNT und Gangliosiden .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>

<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>104</b>

## GLOSSAR

**Acetylcholin (ACh)** Ein Neurotransmitter, der an neuromuskulären und bestimmten zentralen Synapsen freigesetzt wird.

**adrenerge Übertragung** Eine synaptische Übertragung, die von einem Neuron hervorgerufen wird, das Noradrenalin (Norepinephrin) oder Adrenalin (Epinephrin) als Transmitter freisetzt.

**Agonist** Wirkstoff, der die Wirkung eines Neurotransmitters, Hormons oder anderen Signalmoleküls nachahmt.

**Aktionspotential** Eine kurzfristige elektrische Alles-oder-Nichts-Depolarisation, die aktiv über Axone und einige Dendriten fortgeleitet wird. Dieses elektrische Signal überträgt Information von der Triggerzone eines Neurons zu den axonalen Endigungen. Die Amplitude eines Aktionspotentials beträgt etwa 100 mV. Sie wird durch einen regenerativen Mechanismus aufrechterhalten, der eine unabgeschwächte Fortleitung garantiert.

**Aktive Zone** Spezialisierter Ort an der cytoplasmatischen Membranseite der präsynaptischen Endigung, an dem Neurotransmitter freigesetzt wird. Die exozytische Verschmelzung der transmitterhaltigen Vesikel mit der Membran erfolgt im Bereich der aktiven Zone.

**Andocken** Anheftung Transmitter enthaltender synaptischer Vesikel an Freisetzungsorten der aktiven Zonen in der präsynaptischen Endigung.

**Antagonist** Wirkstoff, der die Wirkung eines Signalmoleküls hemmt.

**Calcium (Ca<sup>2+</sup>)** Ein für die Funktion des Nervensystems sehr wichtiges Element. Der Einstrom von Calciumionen durch regulierte Ionenkanäle in der Membran beeinflusst viele neuronale Stoffwechselprozesse und löst die Ausschüttung von Neurotransmittern aus.

**Carbachol** Ein cholinerges Agonist an muskarinische und nikotinische Rezeptoren.

**Carbogen** Ein Gasgemisch aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>.

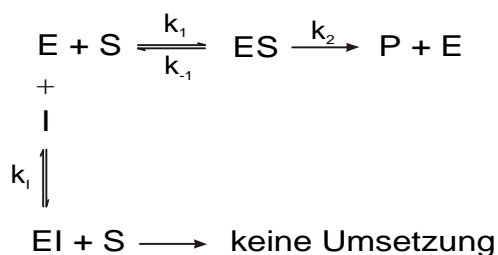
**Endplattenpotential** Der *exzitatorische postsynaptische Potential* von Muskelzellen, das durch Transmitterausschüttung eines *Motoneurons* hervorgerufen wird und aus dem gleichzeitigen Fluss von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> durch den ACh-Rezeptor der Muskelzelle resultiert. Ein einzelnes Motoneuron erzeugt ein synaptisches Potential von rund +30 mV.

**Exozytose** Der Vorgang, durch den synaptische Vesikel Neurotransmitter ausschütten, indem sie mit der Plasmamembran der Zelle verschmelzen. An den aktiven Zonen wird die Exozytose durch Proteine erleichtert, die sowohl mit den synaptischen Vesikeln als auch mit der Membran der Nervenendigungen assoziiert sind.

**GABA (γ-Aminobuttersäure)** Wichtigster hemmender Transmitter im Zentralnervensystem.

**Katecholamine** Moleküle mit einem Catecholring und einer Aminogruppe, zum Beispiel *Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin*.

**Kompetitive Inhibitor** ist eine Substanz, die direkt mit dem normalen Substrat um die Substratbindestelle eines Enzyms konkurriert. Das allgemeine Modell für die Kompetitive Hemmung lautet:



Art der Hemmung	Michaelis-Menten-Gleichung	Lineweaver-Burk-Gleichung	Effekt des Inhibitors
kompetitiv	$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{aK_M + [S]}$	$\frac{1}{V_0} = \frac{a}{V_{\max}} \frac{K_M}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$	erhöht $K_M$

**Miniaturendplattenpotential** Das präsynaptische motorische Axon kann spontan (in Abwesenheit eines Aktionspotentials) den Inhalt eines einzelnen *synaptischen Vesikels* freisetzen. Solche Freisetzungereignisse rufen spontane synaptische Miniaturpotentiale hervor. Miniaturendplattenpotentiale weisen alle Eigenschaften normaler synaptischer (Endplatten-)Potentiale auf. Das synaptische Potential, das von einem *Aktionspotential* hervorgerufen wird, resultiert aus dem synchronen Auftreten vieler Miniaturendplattenpotentiale.

**Motoneuron** Einer der drei funktionellen Haupttypen von Neuronen. Motoneuronen bilden Synapsen mit Muskelzellen, übertragen Informationen vom Zentralen Nervensystem und setzen sie in Muskelbewegung um.

**noradrenerge Übertragung** Eine synaptische Übertragung, die von einem Neuron hervorgerufen wird, das Noradrenalin (Norepinephrin) als Transmitter freisetzt.

**Rezeptor, muskarinischer ACh-** Der muskarinische ACh-Rezeptor gehört zu einer großen Familie *metabotroper Rezeptoren*, die *Second-Messenger-Kaskaden* im postsynaptischen Neuron aktivieren.

**Rezeptor, nikotinischer ACh-** Der nikotinische ACh-Rezeptor ist ein Beispiel für einen *ionotropen Rezeptor*.

**Second Messenger** Substanzen, die in der Zelle als Reaktion auf die Bindung eines Hormons oder Transmitters an Rezeptoren in Zellmembran erzeugt werden.

**Sekretion** Die Ausschüttung von in Vesikeln gespeichertem Material durch Exozytose. Dabei verschmilzt die Vesikelmembran mit der Außenmembran der Zelle. Es gibt zwei Sekretionsformen, die konstitutive und die regulierte.

**Synapse** Spezialisierte Struktur zur Kommunikation zwischen zwei Neuronen bzw. zwischen einem Neuron und einer Muskelzelle. Synapsen lassen sich je nach Mechanismus der synaptischen Übertragung in *chemische* und *elektrische Synapsen* unterteilen.

**Synaptische Vesikel** Membranöse Organellen mit einer hohen Konzentration an Neurotransmittern, die während der synaptischen Übertragung durch Exozytose freigesetzt werden. Da die Exozytose durch einen raschen  $Ca^{2+}$ -Einstrom ausgelöst wird, stellt dieser Vorgang eine spezialisierte Form der regulierten Sekretion dar. Es gibt zwei Gruppen synaptische Vesikel: a) Die kleinen Vesikel kommen häufig in der

aktiven Zone vor und enthalten niedermolekulare Neurotransmitter, ATP und andere negativ geladene Substanzen. Diese Vesikel enthalten neben Transportern zur Konzentrierung des Neurotransmitters auch andere Transmembranproteine (*Synaptophysin*, *Synaptotagmin* und *Synaptobrevin*), die bei Vesikelfusion und Exozytose eine Rolle spielen. b) Die großen Vesikel enthalten eine oder mehrere Typen von Neuropeptiden, ATP und in noradrenergen Zellen zudem einen niedermolekularen Neurotransmitter. Diese große Vesikel verschmelzen in der Regel nur in Bereichen innerhalb der aktiven Zonen mit der Membran der synaptischen Endigungen.

**Zentralnervensystem** Eine der beiden anatomischen Untergliederung des Nervensystems. Das ZNS umfasst das Gehirn und das Rückenmark.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	Steigung
A	Ampicillin
ACh	Acetylcholin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ARA C	Cytosine- $\beta$ -D-arabinoside Hydrochlorid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Baf	Bafilomycin A <sub>1</sub>
BoNT	Botulinum Neurotoxin
bp	Basenpaare
CNT	Clostridienneurotoxine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Enzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Elektroporation
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FUDR	(+) 5-Fluoro-2'-desoxyuridin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<sup>3</sup> H-NA	levo-(7- <sup>3</sup> H) Noradrenalin
HA	Hämagglutinin
HABA	2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
I	Inhibitor

IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
K	Kanamycin
kDa	kilodalton
$K_M$	Michaelis-Konstante
LD <sub>50</sub>	Dosis, die für 50% der Tiere tödlich ist
M	molar
MG	Molekulargewicht
Ni-NTA-Agarose	Nickel-Nitrilotriacetic acid-Agarose
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
NTNH	nontoxic-nonhämagglutinating (nicht toxisch nicht hämagglutinierend)
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
O/N	Über-Nacht-Kulturen (Over Night Culture)
P	Produkt
PBS	Isotonischer Phosphatpuffer
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (potentia hydrogenii)
PIPES	1,4-Piperazindinethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rec.	rekombinant hergestellte Peptide oder Proteine
RSA	Rinderserumalbumin (BSA)
RT	Raumtemperatur
S	Substrat ([S] = Substrat-Konzentration)
SC	Single Chain
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <b>sodium-dodecyl-sulfate</b> )
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SNAP 25	Synaptosomal associated protein of 25 kD
$\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ -SNAPs	<u>s</u> oluble <u>N</u> SNF <u>a</u> ttachment protein (ist nicht gleich SNAP 25)

SNARE	SNAP-receptor
t-SNARE´s	target-SNARE´s
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TeNT	Tetanus Neurotoxin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
v-SNARE´s	vesicle-SNARE´s
VAMP	<b>v</b> esicle <b>a</b> ssociated <b>m</b> embrane <b>p</b> rotein
V	Volt
$V_0$	Anfangsgeschwindigkeit
$V_{max}$	maximale Geschwindigkeit
ZNS	Zentralnervensystem



TOXINVERZEICHNIS UND DEFINITION

a) Gesamttoxin (nativ):

BoNT/A-G	Botulinum Neurotoxin, die sieben Serotypen von A bis G
DC Toxin	zweikettiges Toxin (Di-Chain)
DC BoNT/A-B	zweikettige Botulinum Neurotoxine Typ A und Typ B
DC TeNT	zweikettiges TeNT

b) Rekombinant hergestellte Toxinfragmente<sup>1</sup>:

rec.H <sub>C</sub>	rec.C-terminaler Teil der schweren Kette
rec.H <sub>C</sub> -TeNT	rec.C-terminaler Teil der schweren Kette von TeNT
rec.H <sub>N</sub>	rec.N-terminaler Teil der schweren Kette
rec.LC	rec.leichte Kette
rec.LC-BoNT/A-B	rec.leichte Kette von BoNT/A-B
rec.LC-TeNT	rec.leichte Kette von TeNT
rec.L-H <sub>N</sub>	rec.leichte Kette gebunden an dem N-terminalen Teil der schweren Kette
rec.L-H <sub>N</sub> /BoNT/A	rec.leichte Kette mit N-terminalem Teil der schweren Kette von Botulinum Neurotoxin Typ A
rec.L-H <sub>N</sub> /TeNT	rec.leichte Kette mit N-terminalem Teil der schweren Kette von Tetanus Toxin
rec.L-H <sub>N</sub> /TeNT-Mutant	rec.zweifach Mutierte leichte Kette (Austausch von zwei Aminosäuren) gebunden an dem N-terminalen Teil der schweren Kette von Tetanus Toxin
SC	Single Chain

---

<sup>1</sup> Alle Fragmente wurden durch Induktion der Expression von Genen in *E. coli* M 15 [pREP4] rekombinant hergestellt (siehe Kapitel 5.5).

## 1 Einleitung

Neuronale Strukturen, wie z. B. Ionenkanäle, Transmitterrezeptoren etc. sind bevorzugte Angriffspunkte von Toxinen unterschiedlicher Herkunft. Eine Gruppe von Toxinen, die Clostridien Neurotoxine, hemmen hochspezifisch die Freisetzung von Neurotransmittern (u. a. Acetylcholin) aus den Neuromuskeln und autonome Ganglien (92, 178, 239). Acht serologisch definierte Toxintypen sind beschrieben. Alle zeigen metalloproteolytische Aktivität (3, 63, 99, 117, 172, 219, 221, 222, 222, 236, 265, 286).

Die Clostridien Neurotoxine, *Tetanus-* und *Botulinumtoxine*, sind etwa 1 Million fach toxischer als Cyanid und somit die stärksten bekannten biologischen Gifte. Die Maus LD<sub>50</sub> liegt bei ca. 5 pg/Tier.

*Clostridium tetani* ist ein anaerob wachsendes Bakterium. Es kommt in Sporenform ubiquitär vor. Bei einer Wundinfektion vermehrt sich das Bakterium in tiefen, sauerstoffarmen und schlecht durchblutenden Wunden unter leicht sauren Bedingungen. Das Tetanustoxin wird bei Autolyse des Bakteriums freigesetzt. Das Exotoxin gelangt über den Blutweg an periphere Nervenendigungen, wird hier aufgenommen und retrograd in das Rückenmark transportiert (30, 75, 96, 229, 274). Es verlässt das Motoneuron und gelangt in präsynaptische Nervenendigungen von Interneuronen. Hier hemmt das Toxin die Exozytose der inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glycin (5, 12). Dies führt zu einer spastischen Lähmung der Skelettmuskulatur. Die charakteristischen Symptome des Tetanus sind Kontraktionen der Kau- bzw. der mimischen Muskulatur, der Nacken- und Rückenmuskulatur und in schweren Fällen der gesamten quergestreiften Muskulatur (37). Die Erkrankung endet häufig letal, weil eine kontrollierte Atmung nicht mehr möglich ist. Die Letalität beträgt dabei ca. 50%.

*Clostridium botulinum* vermehrt sich ebenfalls anaerob und verursacht eine meldepflichtige Erkrankung (*Botulismus*), die vor allem nach dem Genuss ungenügend konservierter Dosenahrung, Fleisch und Fischwaren (proteinreiche Nahrung) auftritt (100). Es ist auch für die selten auftretende Neugeborenen- und Wundbotulismus verantwortlich (9, 11, 166). Die pre-Form des Toxins wird durch den Intestinaltrakt aufgenommen. Ähnlich anderer Proteine ist Botulinumneurotoxin sensitiv gegenüber den proteolytischen und denaturierenden Bedingungen im Gastrointestinaltrakt. Daher ist Botulinumtoxin an nichttoxische Proteine gebunden. Dieser Komplex ist resistent gegenüber den Verdauungssäften (48, 111, 169). Er wird auch Progenitor Toxin genannt.

In Darm bewirkt der schwach alkalische pH-Wert die Trennung des toxischen Teils vom nicht toxischen Teil. Einige Botulinumneurotoxinassoziierte Proteine haben hämagglutinierende (HA) Aktivität. Weiterhin ist ein nicht toxisches nicht hämagglutinierendes (NTNH) Protein Bestandteil des Komplexes. Bemerkenswert ist, dass die 100 Aminosäuren der NH<sub>2</sub>-terminalen Seite der NTNH-Teil zu aktiver Seite von Botulinumneurotoxin homolog ist (43).

Verschiedene *Clostridium botulinum* Stämmen produzieren sieben Neurotoxinserotypen: BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C<sub>1</sub>, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F und BoNT/G (92, 239). Von den sieben Serotypen spielen nur die BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E und BoNT/F bei einer menschlichen Intoxikation eine Rolle. Andere Serotypen, wie BoNT/C<sub>1</sub> bei Vögeln, führen bei Tieren zu einer Intoxikation (84). Das enteral resorbierte und von peripheren Nervenendigungen aufgenommene Toxin führt zu einer lang anhaltenden Hemmung der Acetylcholinausschüttung aus

präsynaptischen Vesikeln und somit zu einer Unterbrechung der Impulsübertragung vom Nerven auf die Muskulatur. Es kommt zu einer schlaffen Lähmung der quergestreiften Muskulatur (207). Die Letalitätsrate liegt bei ca. 25-70%.

Die hemmende Wirkung von Clostridien Neurotoxinen ist Folge einer: 1. Reduzierung der Frequenz aber nicht die Amplitude von weckenden Miniaturendplattenpotential, 2. Verringerung der Zahl von Vesikeln, die zur Fusion mit präsynaptischer Membran und für die Freisetzung der Neurotransmitter (NT) zuständig sind, 3. Sie haben weder Einfluss auf die Synthese und Speicherung von Acetylcholin noch auf die  $Ca^{2+}$ -Homeostase, 4. Die Frequenz des Aktionspotentials ist herabgesetzt aber nicht aufgehoben. Die Neurotransmitterfreisetzung auf präsynaptische Seite ist viel weniger und der Empfang auf postsynaptische Seite langsamer (89, 90).

Therapeutischer Einsatz: Trotz seiner hohen Toxizität wird Botulinumtoxin Typ A wegen seiner lang anhaltenden spasmolytischen Wirkung lokal zur Behandlung von Strabismus (Schielen), Blepharospasmus (Lidkrampf), Hemispasmus Facialis und bei komplexeren Dystonien (z. B. Torticollis spasmodicus) als peripheres Muskelrelaxans eingesetzt (2, 41, 73, 197). Weitere Anwendungsgebiete des Toxins, die sich erst in der Erprobungsphase befinden, sind Hyperhidrose (übermäßiges Schwitzen), Migräne und spannungsbedingter Kopfschmerz sowie die Faltenbekämpfung. Für die Standardisierung des eingesetzten BoNT/A in therapeutischen Bereich sorgt eine Routinekontrolle, ein *in vitro* Bioassay (70, 71, 94, 150, 160).

Tetanustoxin kann wegen weit verbreiteter Immunisierung der Menschen nicht direkt genutzt werden, aber einzelne Fragmente von TeNT können als Teil rekombinant hergestellter Pharmaka z. B. für eine spezifische Aufnahme in neuronalen Zellen eingesetzt werden (81).

## 1.1 Struktur und Wirkung von Clostridien Toxinen

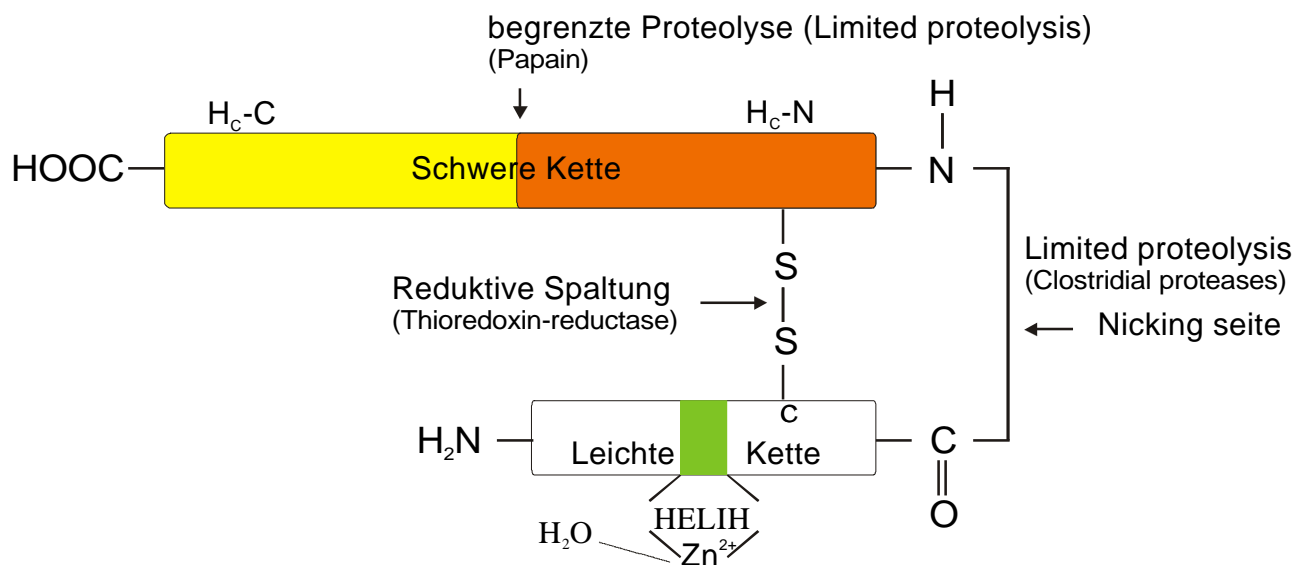


Abbildung 1, Schematische Struktur von Clostridien Toxinen.

Die Neurotoxine Tetanus (TeNT) und Botulinum Neurotoxin (BoNT) zeigen betreffend ihrer Struktur und Wirkungsweise viele Gemeinsamkeiten (93, 116, 134, 170). Sie gehören zu den so genannten „AB-Toxinen“. Diese bestehen aus zwei separaten Peptiden oder Ketten mit unterschiedlichen Funktionen, Kette A (aktiver Teil = Leichte Kette) und Kette B (Navigationsteil = schwere Kette) (57, 58, 69, 104, 272).

Pathogene Stämme von *Clostridium tetani* als auch von *Clostridium botulinum* liegen intrabakteriell als ein einkettiges, inaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa, das „Single Chain Toxin“ (SC) genannt wird, vor. Dieses Toxin wird durch bakterielle Proteasen an einer bestimmten „nicking site“ proteolytisch gespalten (Abbildung 1). Nicking ist notwendig, um die Toxine zu aktivieren. Dadurch entsteht ein zweikettiges Protein, das „Di-Chain Toxin“. Dies besteht aus einer leichten Kette (light chain, LC) mit 50 kDa Molekulargewicht, die eine  $Zn^{2+}$ -metalloproteolytische Aktivität besitzt, und einer schweren Kette (heavy chain, HC) mit 100 kDa Molekulargewicht (132, 206, 215, 236, 278, 286). Beide Ketten werden über eine nicht kovalente Protein-Protein-Interaktion, einer Disulfidbrücke und hydrophoben Wechselwirkungen zusammengehalten (64, 122, 131, 217). Die Disulfidbrücke ist essentiell für die Toxizität der Clostridien Neurotoxine.

Die schwere Kette kann durch Papain in zwei funktionale Untereinheiten: 1. C-terminaler Teil oder  $H_c$ -C-Fragment, der für die neurospezifische Bindung an Polysialogangliosiden und 2. N-terminaler Teil oder  $H_c$ -N-Fragment, der für die Translokation der leichten Kette durch Membran ins Zytosol (50 kDa) zuständige Fragmente, zerschnitten werden (Abbildung 1 und 2) (36, 118, 125, 135, 136, 234, 259, 260). Die Untereinheiten werden durch einen kleinen Protein-Protein-Kontakt zusammengehalten. Die schwere Kette ist für die hohe neuronale Spezifität, also Bindung, Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Transport, des Toxins verantwortlich (30, 130, 136, 273). Die Spannungsabhängige Region in Membran „PYXGXAL“ könnte in die schwere Kette allen Neurotoxinen gefunden werden (97).

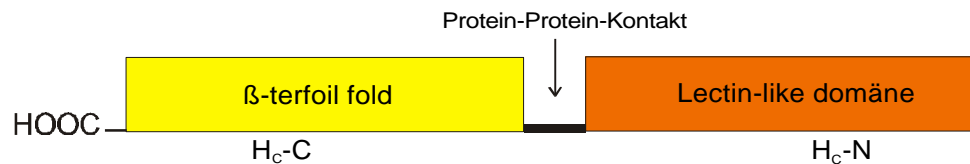


Abbildung 2, Schematische Darstellung von den zwei Untereinheiten der schweren Kette. H<sub>C</sub>-C-Teil zuständig für die neurospezifische Bindung (gelb) und H<sub>N</sub>-C-Fragment zuständig für die Translokation (orange).

Nach der rezeptorvermittelten Endozytose und Translokation gelangen die Neurotoxine ins Zytosol. Dort wird die leichte Kette durch das Enzym Thioredoxin-Reduktase von der schweren Kette getrennt. Die leichte Kette (LC) ist ein kompaktes Kügelchen, das aus  $\alpha$ -helikalen Fragmenten,  $\beta$ -Schleifen und Strängen besteht. In der LC aller CNT ist eine hochkonservierte Aminosäuresequenz (*HELXHXXH*, X ist eine beliebige Aminosäure) vorhanden, die ein  $Zn^{2+}$ -Bindungsmotiv darstellt (Abbildung 1). Dies ist das katalytische Zentrum und für die proteolytische Wirkung verantwortlich (42). Strukturelle Veränderungen in katalytische Schleife steigern den Zugang zu aktive Seite. Physikochemische Messungen zeigen, dass die Clostridien Neurotoxinen pro Mol leichte Kette 1 Mol Zinkatom enthalten. Wenn das Zink durch Chelatbildner wie EDTA gebunden wird, verlieren die Clostridien Neurotoxinen ihre proteolytische Aktivität (10, 62, 240). Durch die Inkubation des zinkfreien Toxins in einen zinkhaltigen Puffer erlangt das Toxin seine ursprüngliche Aktivität. Das Zinkatom ist an zwei Histidin-Resten und ein Glutaminsäure-Rest aus dem „*HELXHXXH-Motiv*“ gebunden (116, 117, 139, 142, 218, 222). Diese Struktur ist ähnlich der von Thermolysin (222). Der 4. Ligand ist ein Wassermolekel, das verantwortlich für die Bindung des Peptids an das Substrat und die Hydrolyse ist.

Bei TeNT kann das  $Zn^{2+}$  durch andere zweiwertige Kationen wie  $Ni^{2+}$  oder  $Co^{2+}$  ausgetauscht werden, ohne dabei auf die Wirkung des Toxins aus zu wirken (258). Der größte Unterschied zwischen BoNT/A und TeNT liegt an die Lage dessen Loops, das Segment, das für die Bindung an Rezeptoren verantwortlich ist (siehe Abbildung 51) (134). Das Zinkatom liegt bei TeNT im Vergleich zu BoNT/A näher an die leichte Kette (164, 176). Außerdem ist die Position der Beltregion, die sich um leichte Kette wickelt, bei TeNT, BoNT/A und BoNT/B unterschiedlich (257). Im BoNT/A wird der Zugang der katalytischen Domäne durch Translokationsdomäne und deren Belt, die diesen Teil umgibt, verdeckt, dies ist bei BoNT/B weniger der Fall (135). Ein Vergleich mit BoNT/B zeigt, dass das Belt hier ein andere Position hat (241, 257). Die Beltregion ist bei BoNT/B und BoNT/E kürzer als bei BoNT/A (s. dreidimensionale Struktur von BoNT/A, Abbildung 51).

Die leichte Kette verhindert als Protease die Exozytose der Transmitter durch die Spaltung einer der SNARE-Proteine (7, 27, 28, 29, 59, 60, 61, 86, 88, 126, 128, 159, 167, 192, 195, 249, 250, 272, 287).

Die einzelnen Ketten sind nach ihrer Trennung nicht mehr toxisch, weil die HC keine proteolytische Aktivität besitzt, und die LC keine Zellmembranen durchdringen kann (217).

Nach dem Eintritt in den Blutkreislauf und Diffusion ins Gewebe binden Clostridien Neurotoxinen (CNT) sehr spezifisch an Rezeptoren auf der präsynaptischen Membran von Motoneuronenendigungen. Im Gegensatz zu BoNT wird TeNT durch retrograden Transport im Axon der Motoneurone durch mikrotubulieabhängige

Bewegung ins Rückenmark transportiert, wo es sich im Ventralhorn von grauer Substanz anreichert (30, 75, 96, 167, 196, 251, 272). Von dort gelangt es über einen transsynaptischen Transport in das Interneuron.

Ein Mehr-Stufenmodell wird für die Aufnahme von Clostridien Neurotoxinen in den neuronalen Zellen diskutiert (Abbildung 3) (171, 174, 228, 237, 238):

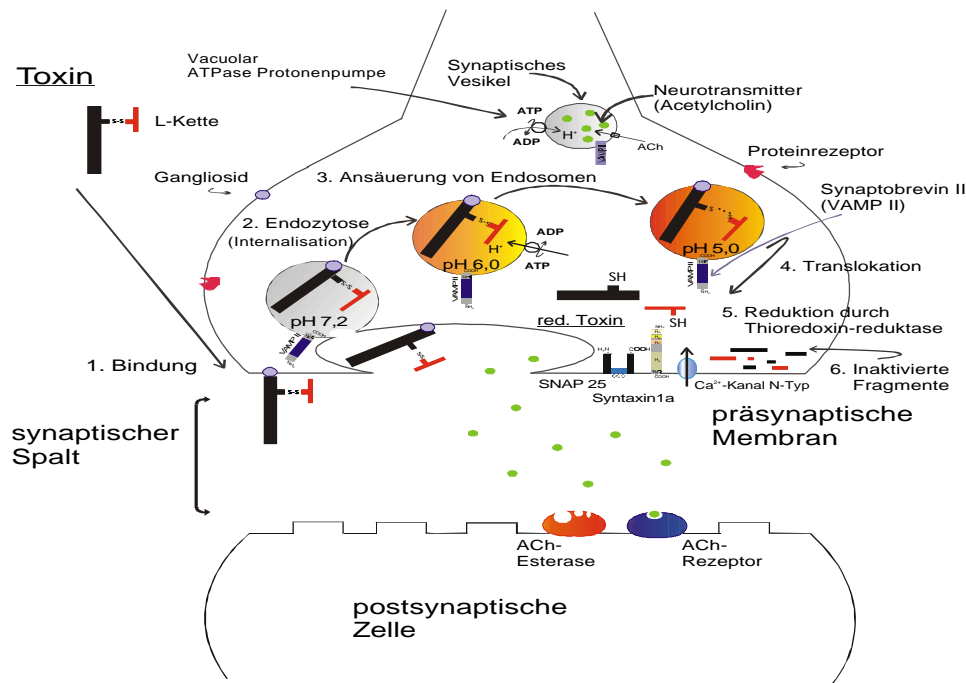


Abbildung 3, Schematische Darstellung von Neurotransmitterfreisetzung und die Wirkung von Clostridien Neurotoxinen in einer Nervenzelle. Der Mehrstufenprozess: 1. Bindung an negativgeladenen Zellenoberflächenempfänger (wie Polysialogangliosiden) auf der präsynaptischen Membran, 2. internalization (Membran-Versetzung) der CNT in ein Endosom über Empfänger-vermitteltes Endozytose, 3. ATP-abhängige Ansäuerung von Endosomen, 4. Translokation aus dem Endosom ins Zytosol, 5. reduktive Spaltung durch das Enzym Thioredoxin-Reduktase, 6. Abspaltung des jeweiligen Substrates (SNARE-Proteine), 7. Hemmung der ACh-freigabe des Axons und schließlich Paralyse, 8. Inaktivierung des Toxins durch Abspaltung in kleinen Fragmenten (31, 32).

### 1.1.1 Plasmamembranbindung

Polysialoganglioside sind Bindungsstellen für die Clostridien Neurotoxinen (24, 95, 109, 119, 123, 124, 129, 156, 184, 209, 211, 263, 264, 268, 291, 292). Sie sind saure Glykolipide, die verstärkt in der Plasmamembran von Nervenzellen vorkommen, dies erklärt die spezifische Bindung der CNT an diese Zellen (33). Die C-terminale Hälfte der schweren Kette zeigt eine hohe Affinität für di- und Trisialoganglioside (34 Aminosäure, gezeigt für Tetanus) (95, 232). Die Ganglioside lassen sich nach der Anzahl der Neuraminsäure-Reste unterscheiden (152, 154). TeNT und BoNT/A binden an unterschiedliche Gangliosid-Typen. Die inhibitorische Wirkung des TeNT wird im Wesentlichen durch GD<sub>1b</sub> vermittelt und die von BoNT jedoch über GD<sub>1a</sub> und GT<sub>1b</sub>, deshalb konkurrieren die Toxine nicht um die Ganglioside (152, 154). Die Affinität ist *in vitro* in Lösungen niedriger Ionenstärke erhöht (24, 54). Die Toxinbindung kann

durch Neuroamidasen, die die Neuraminsäurereste von den Gangliosiden entfernen, nahezu aufgehoben werden. Da die Bindung von TeNT und BoNT/A an die Nervenzellen unter physiologischen Bedingungen proteasesensitiv ist, wird ein weiterer Toxinrezeptor in der Plasmamembran von Nervenzellen vermutet, der aber für die beide Toxine verschieden sein soll (54, 193).

### 1.1.2 Rezeptorvermittelte Endozytose

Alle Indizien zeigen, dass CNT nicht direkt die neuronale Zellmembran durchdringen. Nach der Bindung an der Zelloberfläche und Bildung des Toxin-Rezeptor-Komplexes werden sie durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Dieser Vorgang ist abhängig von der Exozytose in die Nervenzellen (228). Von diesem Zeitpunkt an befinden sich die Toxine in einem Kompartiment, in dem sie nicht von Antikörper erkannt und neutralisiert werden können (228).

### 1.1.3 Ansäuerung von Endosom und 1.1.4 Translokation

Um zum Wirkort zu gelangen, muss das Toxin das Vesikel verlassen. Die Translokation durch Vesikelmembran findet vermutlich bei niedrigem pH-Wert, statt. Durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe werden die Protonen ( $H^+$ ) in das Vesikel transportiert, dadurch sinkt der pH-Wert ab. Das bewirkt eine Konformationsänderung des Toxins und der hydrophobe Teil des  $H_N$ -Fragments lagert sich über Porenbildung in die Membran ein (39, 40, 44, 134, 158, 165, 175, 202, 280). Ob die Pore allerdings die Translokation ermöglicht, ist nicht geklärt (16, 200, 227, 234). TeNT und BoNT wirken nicht, wenn die endosomale Ansäuerung durch Substanzen wie, Bafilomycin  $A_1$  oder Chloroquin verhindert wird (148, 280).

### 1.1.5 Aktivierung

Im Zytosol wird das Toxin durch das Enzym Thioredoxin-Reduktase in leichte und schwere Kette reduziert. Dieses universelle Redoxsystem kommt ubiquitär vor und soll die Zelle vor freien Radikalen schützen. In chromaffinen Zellen und im Gehirn konnte die Reduktion von Clostridien Toxinen nachgewiesen werden (55, 74, 106, 121). Erst die freie leichte Kette entfaltet die proteolytische Aktivität.

### 1.1.6 Paralyse (Blockade der Transmitterfreisetzung)

Abhängig vom Toxintyp wird selektiv eines der Proteine im SNARE-Komplexes (siehe Vesikelfusionskomplex und Abbildung 4), der während der Fusion von Vesikel- und Plasmamembran gebildet wird, von der leichten Kette proteolytisch gespalten (97). Dies führt zur Hemmung der Exozytose.

Anschließend wird das Toxin im Zytosol durch unspezifische zelluläre Proteasen in inaktive Fragmente zerlegt, wodurch eine Regeneration der Exozytose in den präsynaptischen Nervenenden eingeleitet wird (Abbildung 3) (74, 154).

Die Clostridientoxine bleiben in den Zellen über einen längeren Zeitraum aktiv. Eine Halbwertszeit von 3 bis 4 Tagen wurde in neuronaler Zellkultur beobachtet (153). Die gleiche Halbwertszeit wurde für LC von TeNT und LC von BoNT/A in chromaffinen Zellen nachgewiesen (153). Da der Metabolismus sehr langsam verläuft, halten die Symptome des Botulismus oder des Wundstarrkrampfes über Wochen.

## 1.2 Der Vesikelfusionskomplex

Impulsübertragung vom Nervenende auf die Muskulatur oder auf die postsynaptische Nervenbahnen geschieht durch die Depolarisation des präsynaptischen Nervs. Die Depolarisation führt zu Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Öffnung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (1, 22, 46). Dies bewirkt die Fusion von mit Neurotransmitter gefüllten small synaptic vesicle (SSV) mit präsynaptischer Membran an der „aktiven Zone“ (20, 67, 80, 97, 115, 157, 177, 199, 243, 254). Diesen Vorgang nennt man Exozytose.

Die Membranfusion wird durch eine komplexe Maschinerie von Fusionsproteinen betrieben. Derzeit werden verschiedene Modelle für die Funktion der Fusionsproteine diskutiert. Einerseits wird die Ausbildung eines ringförmigen Proteinkanals zwischen den beiden gegenüberliegenden zu fusionierenden Membranen, welcher die Diffusion von Phospholipiden durch Protein-Phospholipid-Interaktion erleichtert, sich füllt und dabei die Fusionspore ausbildet, und andererseits einem Modell, bei dem die Fusionsproteine die Aktivierungsenergie absenken und die räumliche Organisation der Fusionsstellen übernehmen wird, vorgeschlagen (8, 145, 169).

1.2.1 Proteine, die am Membranfusionsprozess beteiligt sind, können in drei Klassen aufgeteilt werden:

a.) Die Familie der SNAREs (soluble NSF attachment protein receptors):

Mit der *SNARE-Hypothese* (*SNAP-rezeptor-Hypothese*) wird die Annäherung und Verschmelzung des Vesikels mit der Plasmamembran erklärt (97, 102, 203). Proteine an der Vesikelmembran „vesikel-SNARE´s“ (*v-SNARE´s*) interagieren mit Proteinen, die an der Plasmamembran „target-SNARE´s“ (*t-SNARE´s*) lokalisiert sind („*SNARE-Komplex*“, Abbildung 4) (204). Drei SNARE-Proteine, die an der Bildung von SNARE-Komplex beteiligt sind, sind den SNAP-25 (synaptosomal associated Protein von 25 kDa), Syntaxin mit 35 kDa und Synaptobrevin II/VAMP (vesikel assoziiertes Membranprotein) von 13 kDa. SNAP-25 und Syntaxin sind *t-SNARE´s*, Synaptobrevin II oder VAMP ist ein *v-SNARE´s* (47, 242, 253). Alle drei Proteine zeigen untereinander ein charakteristisches durch eine regelmäßige Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Aminosäureseitenengruppen die Ausbildung von untereinander wechselwirkenden  $\alpha$ -helikales Peptidmotiv (SNARE-Motiv), so genannten coiled-coils, auf. Das SNARE-Motiv ist ein Abschnitt von 60 Aminosäuren Länge (26, 174, 235, 288). Dies bildet das Kernstück des ternären SNARE-Komplexes, den sogenannten „core-Komplexes“. Die Interaktionen zwischen den einzelnen  $\alpha$ -Helices der SNARE-Proteine in „core-Komplex“ findet über in Schichten organisierten hydrophoben Wechselwirkungen statt. Nur im Zentrum des core-Komplexes, in der als O-Layer bezeichneten schicht befindet sich eine ionische Wechselwirkung. Er wird durch zwei Glutamine der beiden SNAP-25 Helices und einem Glutaminrest aus Syntaxin sowie einem Argininrest von Synaptobrevin II gebildet. Diese zentrale ionische Schicht wird aufgrund der bei der Beschreibung der Kristallstruktur neuronalen SNARE-Komplexes eingeführten Zählung der Schichten von -7 bis +8 als O-Layer bezeichnet. Zudem zeigt die Kristallstruktur Bereiche, in denen Wechselwirkungen mit zweiwertigen Metallionen stattfinden, weshalb die direkte Regulation der calciumregulierten Neurotransmitterfreisetzung durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an denSNARE-Komplex nicht ausgeschlossen wurde.

Das in der vesikulären Membran lokalisierte *v-SNARE* und die in der aktiven Zone liegenden *t-SNARE*-Proteine bilden einen schwer löslichen Komplex im Verhältnis



1:1:1 (101, 256, 271). Bei der Komplexbildung bildet sich eine „coiled-coil-Struktur“ aus, indem sich die drei Proteine ineinander mit einem linkshändigen superhelikalen Twist verschlingen (47, 189, 236). Hierdurch könnte es zu einer Verkürzung des Komplexes kommen (101). Durch die Annäherung des Vesikels an die Plasmamembran kommt es zu Lipid-Lipid-Verschmelzung mit nachfolgender Fusion (97, 102, 203). Der gebildete ternäre SNARE-Komplex liegt in zwei isomeren Formen, *cis* und *trans*, vor (Abbildung 3). Dabei scheint nur der *trans*-SNARE-Komplex zu einer Fusion fähig zu sein. Der existiert in zwei Formen, den losen (loose state) und den festen Zustand (tight state), die untereinander im Gleichgewicht stehen. Der feste Zustand ist thermisch sehr stabil und zeigt Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau und Neurotoxinen und ist jedoch selbst in Gegenwart von 2%iger SDS-Lösung (sodium-dodecyl-sulfat) erst bei einer Temperatur von 60°C Dissoziierbar, was auf eine außergewöhnliche Stabilität der Struktur des ternären SNARE-Komplexes und das Vorliegen eines energetischen Minimums hindeutet (103, 194, 201, 266). Aufgrund dieser Eigenschaft wird der ternäre SNARE-Komplex auch als SDS-resistenter Komplex bezeichnet. Deshalb spalten CNT ihre Substrate nur in der nichtkomplexierten Form (34, 173, 188, 256, 271). Hier können die SNARE-Proteine sich zwar ebenfalls zu einem ternären Komplex zusammenlagern (losen Zustand), zeigt der jedoch keine oder eine verringerte Stabilität in Gegenwart von SDS (243, 261). Auch einzelne Mutationen von AS, welche an den Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Helices beteiligt sind, können Einfluss auf die Stabilität des SNARE-Komplexes haben.

Weiterer zytosolische Faktor ist NSF (N-ethylmaleimide sensitive fusion protein). Ein homohexamere ATPase. Durch deren Chaperonwirkung in Zusammenspiel mit den NSF-Adapterproteinen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -SNAPs (soluble NSF attachment protein) führt NSF zu Recycling von *v*- und *t*-SNARE-Proteinen nach der Membranfusion und Aktiviert des vesikulären SNARE-Komplexes. Für die eigentliche Membranfusion werden NSF und  $\alpha$ -SNAP nicht benötigt (14, 102, 162, 212, 231, 244, 245, 261, 277, 285).

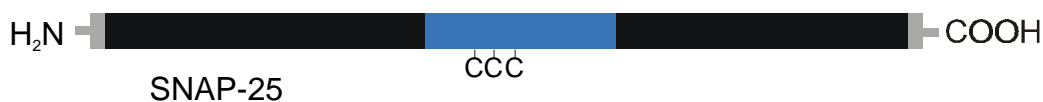
a.1) Die Syntaxin-Familie umfasst derzeit 17 Mitglieder (18, 38). Syntaxin 1 existiert in zwei Isoformen 1A und 1B (17, 78). Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer Lokalisation im Gehirn. Syntaxin 1 (35 kDa) besitzt wie Synaptobrevin II eine C-terminale Transmembrandomäne, welche das Protein in der präsynaptischen Membran verankert und ein SNARE-Motiv. Der N-Terminus besitzt im Gegensatz zu Synaptobrevin eine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur und besteht aus drei mit  $H_{ABC}$  bezeichneten  $\alpha$ -helikalen Domänen. Diese können mit der das SNARE-Motiv enthaltenden  $H_3$ -Domäne Wechselwirken, weshalb dem N-Terminus eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird (187). Eine weitere Regulation beruht auf der Interaktion von  $H_{ABC}$ -Domänen sowie eines Teils der  $H_3$ -Domäne mit Munc-18-1/nSec1 (17, 113). Syntaxin ist bevorzugt in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran lokalisiert und ist mit  $Ca^{2+}$ -Kanälen assoziiert, kommt jedoch auch auf synaptischen Vesikeln vor (21, 141, 226, 233, 266, 284).



a.2) Synaptobrevin II/VAMP reagiert mit SNAP-25 und Syntaxin 1 durch seine zentrale Domäne (45, 68, 270). Die liegt zwischen 30 und 96 Aminosäuren und zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Prolin aus, weshalb es unstrukturiert ist. Es wird vermutet, dass diese Interaktion wichtig für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phase der Neurotransmitterfreisetzung ist (49, 163).



a.3) SNAP-25 besitzt zwei durch einen cysteinreichen, unstrukturierten Bereich getrennte SNARE-Motive und hat im Gegensatz zu Syntaxin und Synaptobrevin keine Transmembrane Region. Ist über drei mit Palmitinsäure veresterte Cysteine in der Molekülmitte in der präsynaptischen Membran verankert (Abbildung 4 und 5) (107, 186, 283). Wenn SNAP-25 durch BoNT/A und BoNT/E gespalten wird, wird die calciumabhängige Interaktion von monomeren sowie komplexiertem SNAP-25 mit Synaptotagmin geschwächt oder verhindert (13, 87, 138).



b.) Sec1/Munc-18 (ca. 65 kDa): Auch als SM-Protein bezeichnet, integriert mit der Syntaxin Familie. Dies findet nur mit monomeren Syntaxin und nicht in Gegenwart von SNAP-25 oder dem core-Komplex statt, weil sich die Bindungsdomänen überlappen (78). Das Syntaxin 1 kann nicht gleichzeitig an SNARE- und SM-Protein binden. Die Interaktion findet vermutlich nacheinander statt.

c.) Rab-Proteine (20-25 kDa): Sind kleine GTPasen. Zeigen Ähnlichkeiten mit *ras*-Proteinen. Nach dem Andocken des gefüllten Vesikels an die aktive Zone einer Synapse wird die Exozytose durch Depolarisation der Plasmamembran ausgelöst. Spannungsabhängige Calciumkanäle werden hierbei geöffnet. Calcium strömt in die Zelle ein, und die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration bewirkt eine Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran (113, 120, 122, 246, 282, 293). Es kommt zu einer Entleerung des Vesikelinhaltes in den Extrazellulärraum. Unkontrollierte Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran wird durch das vesikuläre Protein, Synaptotagmin, unterdrückt.

d.) Synaptotagmin besitzt ein Molekulargewicht zwischen 45 und 90 kDa. Synaptotagmine sind über einen aminoterminalen Transmembrananker auf synaptischen Vesikeln lokalisiert. Sie besitzen zwei Calcium- und Phospholipid-bindende  $\text{C}_2$ -Domäne, welche mit  $\text{C}_2\text{A}$  und  $\text{C}_2\text{B}$  bezeichnet werden. Die  $\text{C}_2$ -Domäne können mehrere Calciumionen binden, weshalb es vermutet wird, dass die Synaptotagmine Calciumsensoren für die Membranfusion sind. Wenn Membran saure Phospholipide enthalten, bindet die  $\text{C}_2\text{A}$ -Domäne in Gegenwart von Calcium an Membran. Synaptotagmin ist ein Abstandshalter, der die Annäherung des Vesikels an die Plasmamembran verhindert (179, 180, 181). Erst durch Bindung von Calcium an Synaptotagmin kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins. Nun kann sich der Komplex kontrahieren und das Vesikel an die Membran

heranziehen. Calcium ist also ein wichtiger Regulator der kontrollierten Exozytose (205, 276).

Synaptotagmin wird als Rezeptor in Nervenendigungen für BoNT/B diskutiert (179, 180, 181, 216). Das N-terminale Ende des Synaptotagmins ragt nach einer Fusion eines Vesikels mit der Plasmamembran in den synaptischen Spalt hinein (267). Während des „Recycling“ von Vesikel kann an Synaptotagmin gebundenes Toxin in das Nervenende aufgenommen werden.

Der Exozytose folgend wird die Vesikelmembran wieder internalisiert und mit dem Protein Clathrin verhüllt. Das Vesikel entfernt sich von der aktiven Zone. Die Clathrinhülle wird im Zellinneren abgestoßen und das Vesikel nimmt ATP-abhängig Protonen auf, wodurch sich sein Inhalt ansäuert (32, 158). Das Vesikel erreicht das endosomale Kompartiment und regeneriert. Das Vesikel kann nun wieder mit Neurotransmitter aufgefüllt werden. Dieser Zyklus läuft innerhalb kurzer Zeit ab (ms) (19, 53, 79, 114, 230, 253, 255).

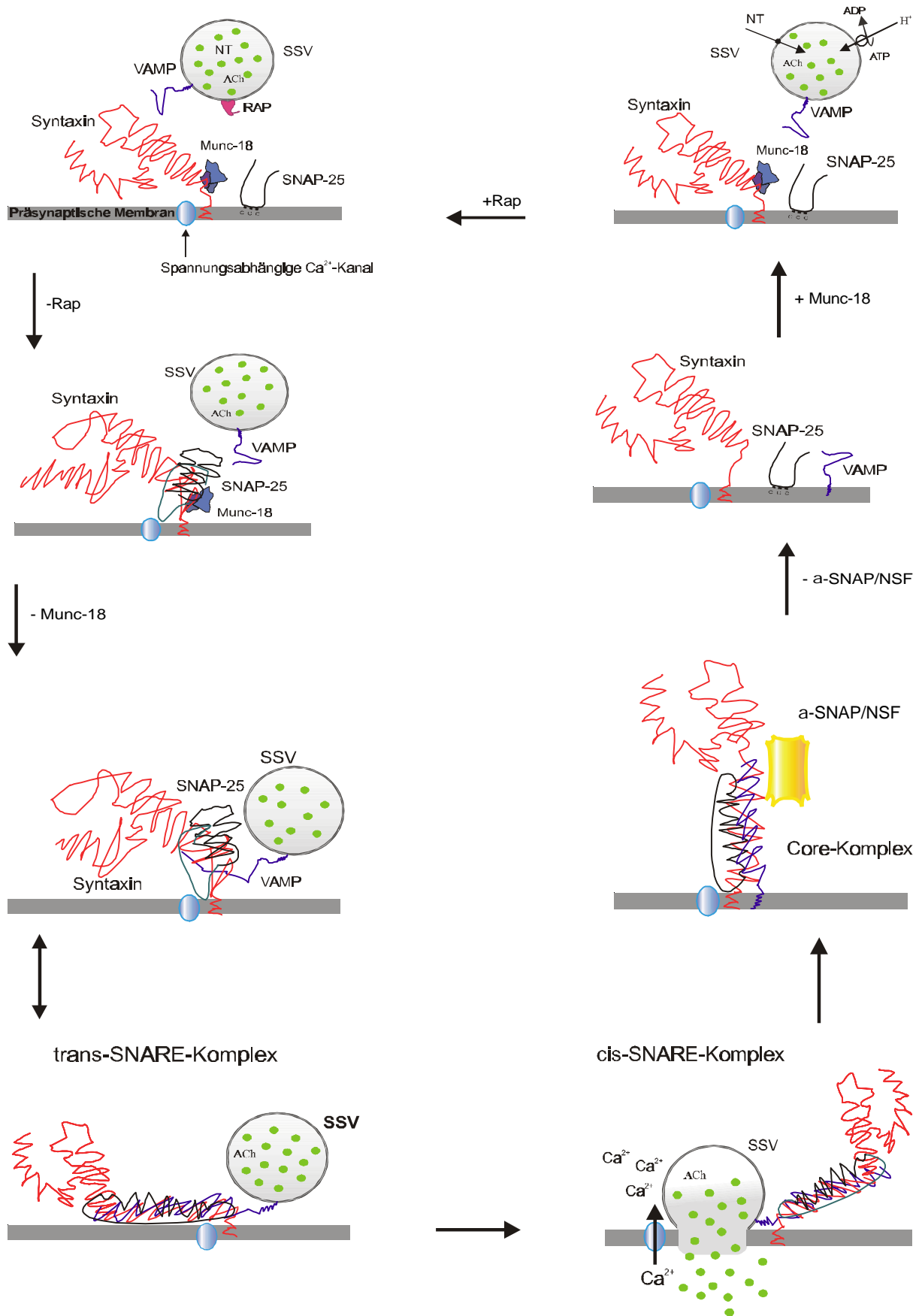


Abbildung 4, Der Exozytose-Endozytose Zyklus von synaptische Vesikel am Nervenende.

### 1.3 Angriffspunkte

Nicht alle SNARE-Proteine, die an der Fusion von Vesikel mit der Plasmamembran beteiligt sind, werden von den Clostridien Neurotoxinen gespalten. Die CNT spalten meist nur einem einzigen Mitglied der SNARE-Proteine (7, 34, 35, 60, 101, 102, 110, 161, 163, 172, 173, 174, 198, 210, 288).

BoNT/A und BoNT/E spalten das Protein SNAP-25 an seiner C-terminale Seite und trennen 9 bzw. 26 Aminosäuren ab (26, 72, 91, 178, 198, 220, 223, 269). Der N-terminale Teil von SNAP-25 wird nicht von BoNT/A reduziert.

Obwohl BoNT/A und BoNT/E beide das selbe Substrat angreifen, unterscheiden sie sich in Wirkungsdauer deutlich von einander (142). Man nimmt an, dass das entstehende Spaltprodukt (SNAP-24) mit Syntaxin und VAMP einen Komplex bildet, der nicht mehr funktionell ist. SNAP-25 und SNAP-24 konkurrieren miteinander. Die Wirkung bleibt also bestehen, obwohl BoNT/A nicht mehr anwesend ist. Dies erklärt die lange Wirkungsdauer des Toxins (*Hit and Run Drug*) (91).

Spaltprodukte:	BoNT/A	SNAP-24 kDa-Fragment
Spaltprodukte:	BoNT/E	SNAP-22 kDa-Fragment

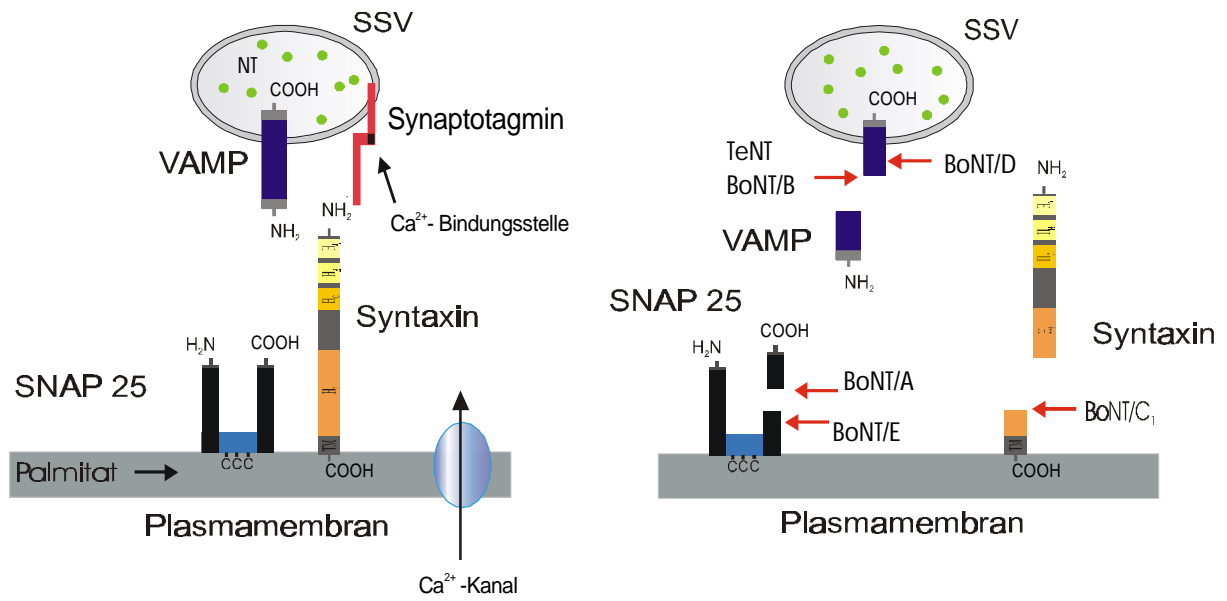
BoNT/C<sub>1</sub> spaltet Syntaxin in der Nähe der transmembranen Domäne und SNAP-25 in der Nähe der BoNT/A Spaltungsstelle (Abbildung 5) (35, 82, 134, 185, 224, 247, 279, 281).

TeNT, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F und BoNT/G spalten *Synaptobrevin 2*, das mit seinem C-terminalen Teil durch die Membran eines synaptischen Vesikels reicht (50, 51, 52, 85, 108, 112, 146, 190, 191, 193, 210, 213, 220, 225, 235, 288, 289, 290). Die Toxine greifen an unterschiedlichen Stellen an ihrem Substrat an, bis auf BoNT/B und TeNT, diese spalten *Synaptobrevin 2* an identischer Stelle (Tabelle 1 und Abbildung 5) (83, 220).

Zusammenfassung:

Toxin Typ	Intrazelluläres Substrat	Spaltstelle ( <i>Ratte</i> )
TeNT	VAMP	H <sub>2</sub> N-....GASQ <sup>76</sup> FETS....-COOH
BoNT/A	SNAP-25	H <sub>2</sub> N-....EANQ <sup>197</sup> RATK....-COOH
BoNT/B	VAMP	H <sub>2</sub> N-....GASQ <sup>76</sup> FETS....-COOH
BoNT/C <sub>1</sub>	Syntaxin 1A	H <sub>2</sub> N-....DTKK <sup>254</sup> AVKY....-COOH
	Syntaxin 1B	H <sub>2</sub> N-....DTKK <sup>253</sup> AVKY....-COOH
BoNT/C <sub>1</sub>	SNAP-25	H <sub>2</sub> N-....EANQ <sup>197</sup> RATK....-COOH
BoNT/D	VAMP 1	H <sub>2</sub> N-....RDQK <sup>61</sup> LSED....-COOH
	VAMP 2	H <sub>2</sub> N-....RDQK <sup>59</sup> LSED....-COOH
BoNT/E	SNAP-25	H <sub>2</sub> N-....QIDR <sup>180</sup> IMEK....-COOH
BoNT/F	VAMP 1	H <sub>2</sub> N-....ERDQ <sup>60</sup> KLSE....-COOH
	VAMP 2	H <sub>2</sub> N-....ERDQ <sup>58</sup> KLSE....-COOH
BoNT/G	VAMP 1	H <sub>2</sub> N-....ETSA <sup>83</sup> AKLK....-COOH
	VAMP 2	H <sub>2</sub> N-....ETSA <sup>81</sup> AKLK....-COOH

Tabelle 1, Tetanus und Botulinum Toxine und deren Spaltstelle im Substrat (214, 223, 262).



### SNARE-Proteine

### CNT-Angriffspunkte

Abbildung 5, Schematische Darstellung der SNARE-Proteinen und deren Schnittstellen beim Einwirken von Clostridien Neurotoxinen (147, 210).

#### 1.4 Chromaffine Zellen als Modell

Das Mark der Nebenniere ist eine von der Nebennierenrinde unabhängige endokrine Drüse. Es enthält spezialisierte Zellen, die chromaffinen Zellen. Während der Embryogenese entwickeln sich die chromaffinen Zellen aus den selben Stammzellen wie die sympathischen Neuronen. Das Nebennierenmark kann als ein Teil des sympathischen Nervensystems angesehen werden. Werden Zellen kultiviert, bilden sie axonartige Fortsätze aus. Die Zellen enthalten in ihrer Plasmamembran spannungsabhängige Calciumkanäle und Rezeptoren (für Acetylcholin, GABA und Dopamin), sie synthetisieren und speichern Hormonmischungen, deren Hauptbestandteile Adrenalin und Noradrenalin sind. Die Sekretion von Katecholaminen und Neuropeptiden wird wie in Neuronen durch Depolarisation und darauf folgende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hervorgerufen. Wegen dieser Gemeinsamkeiten mit neuronalen Zellen und da die Exozytose in diesem Zelltyp bereits sehr gut charakterisiert ist, stellen die chromaffine Zellen ein gutes Modellsystem zur Untersuchung der neuronalen Exozytose dar (147, 252). Chromaffine Zellen können nahezu homogen und in großer Anzahl gewonnen werden und sind *in vitro* lange lebensfähig.

Chromaffine Zellen fehlen die für die Bindung von Clostridien Neurotoxinen notwendigen Rezeptoren (Ganglioside, die mehr als einen Neuraminsäure-Rest enthalten), daher sind sie im Gegensatz zu Nervenzellen unempfindlich gegenüber extrazellulär angebotenen Toxinen. Eine Möglichkeit, die Toxine und andere Makromoleküle in die Zellen einzuschleusen, ist die Elektroporation. Hierbei wird das Membranpotential der Zellen, die einem elektrischen Feld ausgesetzt sind, kurzfristig erhöht. Wenn ein Schwellenwert überschritten wird, bilden sich kurzfristig Poren in der Membran. Zellfunktionen, wie z. B. die Exozytose, werden durch die Elektroporation nicht beeinflusst (15). Weiterhin ist es möglich, die Toxine durch chemisch induzierte Poren in die Zellen zu schleusen. Als Porenbildner werden Streptolysin O und Digitonin eingesetzt (4, 27, 28, 29). Nachteil ist hier im Vergleich zu elektroportierten Zellen, dass die chemisch permeabilisierten Zellen ihre zytosolische Bestandteile durch die permanenten Poren verlieren und die Zellen innerhalb von 1-2 Stunden absterben.

Durch Anreicherung des Mediums mit Gangliosiden können chromaffine Zellen für Clostridien Neurotoxinen empfindlich gemacht werden. Die Ganglioside lagern sich in die Plasmamembran der Zellen ein und binden die Toxine, die daraufhin in die Zelle aufgenommen und aktiviert werden. Nach reduktiver Spaltung wird die LC frei und ist damit aktiv. Die LC spaltet auch in chromaffinen Zellen enthaltene Substrate. Dadurch wird die Exozytose von Katecholaminen gehemmt (151, 156).

Die Clostridien Neurotoxine spalten also sowohl in chromaffinen Zellen als auch in neuronalen Zellen die gleichen Proteine, die an der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit Plasmamembran beteiligt sind.

## 2 Projektbeschreibung/Fragestellung

Ziel des Projekts war die Charakterisierung des Überganges der Clostridientoxine vom Endosom ins Zytosol, der „Translokation“.

Hierzu muss zwischen den Einzelschritten von Bindung bis Wirkung diskriminiert werden. Die Freisetzung von Noradrenalin dient als Sonde. Unterbleibt sie, ist einer der Schritte gehemmt. Mittels verschiedener Hemmstoffe können die einzelnen Schritte charakterisiert werden.

1. Rezeptorbindung (Ganglioside, Proteinrezeptoren): In ersten Teil des Projekts werden Freisetzungsexperimente an chromaffinen Zellen durchgeführt, die mit Gangliosiden angereichert wurden, bevor sie mit einem Toxin inkubiert werden. Wir vermuten, dass die Aufnahme des Toxins über die Ganglioside durch eine rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt. Die Wirkung des Toxins sollte unter Bedingungen ausbleiben, unter denen die Endozytose unterdrückt wird.

In früheren Experimenten könnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der Ganglioside auf der Plasmamembran für die Aufnahme der Toxine notwendig ist (153). Daher verhinderte die Behandlung der gangliosidangereicherten Zellen mit Neuraminidase die Wirkung von TeNT und BoNT/A. Um diese Befunde zu untermauern und die Wirkung von TeNT, BoNT/A und BoNT/B zu modifizieren, wurde die Aufnahme der Clostridientoxine unter einer Reduzierung des Energiehaushalts der Zellen (Temperatur) untersucht.

2. Translokation der Toxine vom Endosom ins Zytosol: Verharren die Toxine im Endosom, so sollte die Hemmung der Exocytose unterbleiben. Dieser Schritt wurde ebenfalls auf seine Temperatur- und Energieabhängigkeit untersucht.

Nach Bindung der CNT an neuronalen Zelloberflächen und rezeptorvermitteltes Endozytose, kommt es durch Anstieg des pH-Werts in Endosom zu Veränderungen der Konformation der Translokationsdomäne im Neurotoxin.

Für die Konformationsänderung ist der niedrige pH-Wert absolut notwendig. Alle bisherigen Untersuchungen zeigen, dass CNT die SSV-Membran nur nach einer Ansäuerung des Endosoms durchdringen können. Möglicherweise kommt es bei niedrigem pH-Wert zu einer Konformationsänderung des amphiphilen/transmembranen Segments, das wiederum die Transportkanäle für die leichte Kette bildet. Die Translokation vom Endosom ins Zytosol soll mit Hemmstoffen wie Bafilomycin, welches die Protonenpumpe in der endosomalen Membran hemmt charakterisiert werden. Die vakuolare ATPase ist beteiligt an dem Austausch von Protonen,  $H^+$  gegen  $Na^+$ . Dadurch wird der Inhalt der Endosome angesäuert.

Weiterhin werden Freisetzungsexperimente an chromaffinen Zellen durchgeführt, die in Anwesenheit von Toxin in einem sauren Milieu inkubiert wurden. Dieses Modell imitiert die Verhältnisse im Endosom, wobei die extrazelluläre Umgebung dem intraendosomalen Kompartiment entspricht. Der Transportweg durch die Plasmamembran entspricht in diesem Modell dem Weg durch die endosomale Membran.

Unter diesen experimentellen Bedingungen sollte das Toxin unter Umgehung des endosomalen Kompartimentes vom extrazellulären Raum direkt ins Zytosol gelangen.



Es sollte untersucht werden, ob die oben beschriebenen Bedingungen, die die rezeptorvermittelte Endozytose modifizieren, auch die Wirkung von TeNT unterdrücken, wenn es aus dem sauren Milieu aufgenommen wird.

3. Alle CNT zeigen drei funktionelle Domänen, eine katalytische, eine Translokations- und eine Bindungs-Domäne (siehe Abbildung 6).

Um die Funktion der einzelnen Domänen zu untersuchen, wurden sie durch rekombinante DNA-Technologie in einem *E. coli*-Expressionssystem hergestellt. Die H<sub>N</sub>-Untereinheit der schweren Kette konnte nur gebunden an die leichte Kette exprimiert werden. Die Wirkung der rekombinant hergestellten Fragmente wurde an elektroporierten chromaffinen Zellen geprüft. Bei Expression der leichten Kette oder Fragmente, die die leichte Kette enthielten, sollte die Exozytose blockiert sein.

In letzten Teil des Projekts wurden Freisetzungsexperimente an chromaffinen Zellen durchgeführt, die in sauren Milieu mit dem gesamten Toxin und verschiedenen Toxinfragmenten, wie H<sub>N</sub>/TeNT (N-terminales Teil von Tetanus Toxin) gebunden an Intakte LC, H<sub>N</sub>/TeNT mit doppelmutierten LC (durch Doppelmutation ist die LC inaktiviert) und H<sub>C</sub>-Teil des Tetanus Toxins, inkubiert werden. Es sollte Interaktionen der Fragmente mit dem Holotoxin untersucht werden.

Der intrazelluläre Transport von CNT und verschiedenen Fragmenten konnte in dem hier verwendeten System *in vitro* gezeigt werden.

Schematische Darstellung von Gesamttoxin und seinen Fragmente:

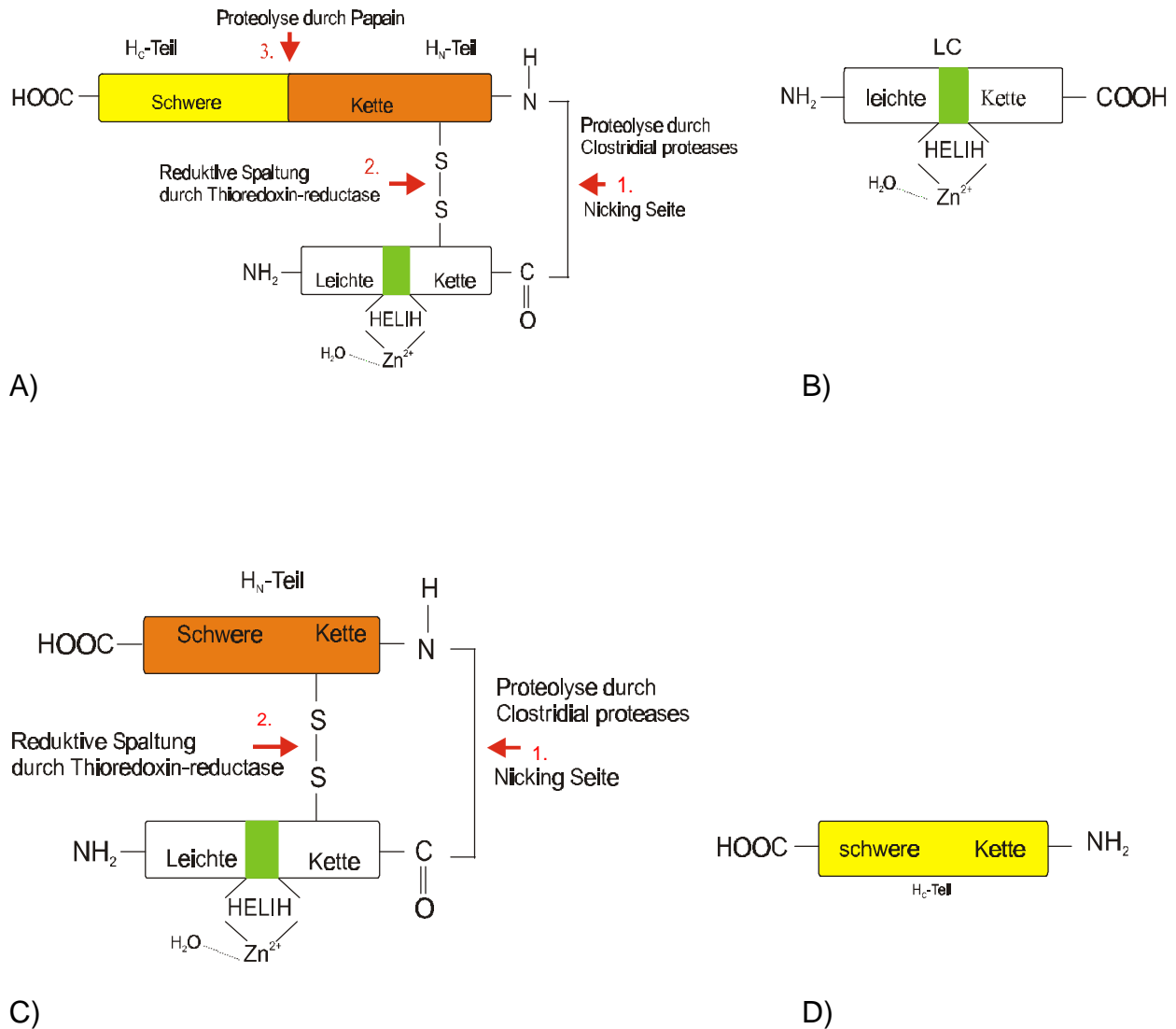


Abbildung 6, A) zeigt das Holotoxin (TeNT), die rote Pfeile zeigen: 1. Nicking: Durch bakterielle Enzyme werden die leichte Kette und schwere Kette proteolytisch gespalten. Erst danach ist das Toxin aktiviert. 2. Die Abspaltung der leichten von der schweren Kette durch das Enzym Thioredoxin-Reduktase. Hierdurch wird die leichte Kette aktiviert. 3. Zeigt die ungefähre Spaltungsstelle in der schweren Kette durch Papain. H<sub>C</sub>-Fragment ist für die spezifische Bindung der CNT an den Nervenzelloberflächen zuständig (Bindung an Gangliosiden), und H<sub>N</sub>-Fragment ist für die Translokation der Toxine innerhalb der Zelle verantwortlich. B) zeigt die rec.LC am Beispiel von TeNT. C) zeigt die rec.H<sub>N</sub>-Fragment gebunden an die LC. D) zeigt das rec.H<sub>C</sub>-Fragment der schweren Kette.

### 3 Materialien

#### 3.1 Zusammensetzung der Lösungen:

##### 3.1.1 Lösungen für die chromaffine Zellen

Puffer I (Perfusionslösung für die Zellpräparation)

NaCl 150 mM, KCl 5 mM, Glucose 10 mM, Hepes 10 mM; pH 7.4

Puffer II

Collagenase Lösung 0,06 %

Puffer III

Trypanblau 0,04%

Puffer IV

NaCl 0,9 % (physiologische Kochsalzlösung)

Puffer V (Kulturmedium)

DMEM, aufgestockt mit Glucose 6 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 4,5 g/l, und Zusatz von 10% fetalem Kälberserum sowie Antibiotika (Penicillin 100 I.U./ml / Streptomycin 100 µg/ml), Zytostatika (Ara C 10<sup>-5</sup> M, FUDR 10<sup>-5</sup> M, und Uridin 10<sup>-5</sup> M) und Ciprofloxacin 10 µg/ml

Puffer VI (Puffer niedrige Ionenstärke zur Verstärkung der Bindung Toxin/Ganglioside)

NaCl 5 mM, KCl 2,4 M, CaCl<sub>2</sub> 2,2 M, MgSO<sub>4</sub> 0,6 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 M, Glucose 5,6 mM, Hepes 25 mM, Saccharose 220 mM, RSA 0,2%; pH 7.3

Puffer VII (Phosphatpuffer für chromaffine Zellen)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 74,199 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 66,67 mM, NaCl 0,135 M, KCl 2,4 mM, RSA 0,2%; pH 5.0, pH 6.0, pH 7.2, pH 8.0

Puffer VIII (Puffer für Freisetzungsexperiment intakter Zellen)

NaCl 126 mM, KCl 2,4 M, CaCl<sub>2</sub> 2,2 M, MgSO<sub>4</sub> 0,6 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 M, Glucose 5,6 mM, Natriumascorbat 1 mM, Hepes 25 mM, RSA 2%; pH 7.3

Puffer IX (weitere Puffer für Freisetzungsexperiment intakter Zellen)

Carbachollösung 4 µl/ml und SDS 0,2%

Puffer X

Bafilomycin A<sub>1</sub> [20 µM]

### 3.1.2 Lösungen für die Proteinpräparation

#### Puffer XI (2YT-Medium)

Bacto-Trypton 16 g, Bacto-Yeast-Extract 10 g, NaCl 5,0 g, Aqua dest 969 g

#### Puffer XII (Agar-platten)

Bacto-Trypton 1,6 g, Bacto-Yeast-Extract 2 g, NaCl 0,5 g, Bacto-Agar 1,5 g, Kanamycin und Ampicillin g/L, Aqua dest 94,4 g

#### Puffer XIII (Sonication Puffer)

NaCl 0,3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M; pH 8.0

#### Puffer XIV (Imidazol Lösung)

NaCl 0,3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,051 M, Imidazol 0,25 M; pH 8.0

#### Puffer XV

Tris/HCl 100 mM; pH 8.0

#### Puffer XVI

Desthiobiotin 10 mM, Tris/HCl 100 mM; pH 8.0

#### Puffer XVIII

HABA 1 mM, Tris/HCl 100 mM; pH 8.0

#### Puffer XVII (Dialyse Puffer)

Hepes 2,385 g, Kaliumglutamat 27,78 g; pH 7.2

### 3.1.3 Lösungen für Gelelektrophorese

#### Puffer XIX

Tris/HCl 1,5 M; pH 8.8

#### Puffer XX

Tris/HCl 0,5 M; pH 6.8

#### Puffer XXI

Acrylamid 30,0 g, Bis- Acrylamid 0,8 g, mit Aqua dest auf 100 ml auffüllen

#### Puffer XXII

SDS 10%-Lösung (w/v)

#### Puffer XXIII (Färbelösung)

Cromassie Brilliant Blue R 250 0,25 g; Methanol/Aqua dest (1:1) 90 ml; Eisessig 10 ml

Puffer XXIV (Entfärber)

Essigsäure (98%) 10%, Methanol 40%, Aqua dest 50% (v/v)

Puffer XXV (Sample Puffer 2x konzentriert)

Tris-HCl 0,15 g, Glycerol 85% 2ml, SDS 0,4 g,  $\beta$ -Mercaptoethanol 1 ml, Bromphenolblau 0,00029 g

Puffer XXVI (SDS-PAGE-Running-Puffer oder Laemmli-Laufpuffer 10x Konzentriert)

Tris/HCl 0,192 M, Glycin 1,918 M, SDS 0,0347 M, mit Aqua dest auf 1 L auffüllen

### 3.1.4 Lösungen für Proteinbestimmung

Puffer XXVII

Roti-Nanoguant-Farblösung

Puffer XXVIII

RSA-Lösung: 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,01 mg/ml.

## 4 Geräte und Stoffe

### 4.1 Aufnahme von Clostridien Neurotoxinen in intakte chromaffine Zellen

Ganglioside: Sigma, München; FIDIA Research Laboratories, Albano, Italien.

### 4.2 Elektroporation

„Gene Pulser<sup>®</sup>“ und Elektroporationsküvetten 4 mm: Bio Rad, Richmond.

### 4.3 Bestimmung und Quantifizierung der Radioaktivität:

$\beta$ -Counter: LS 5000CE, Beckmann; Szintillationsgefäße, Ponymials: Packard a Conbera Company; Szintillationsflüssigkeit: Baker Chemicals, Deventer Holland; Carbachol: Sigma;  $^3\text{H}$ -Noradrenalin 0,25 ml, 0,925 Mq: DuPont NEN<sup>TM</sup> Lufe Science Products, Inc., Dreieich.

### 4.4 Gelelektrophorese und Proteinkonzentrationsbestimmung

Netzgerät: Model 200/2.0 Constant Voltage Power Supply, Mini Protean II-Kammer und Molekulargewichtsmarker: Bio Rad, Richmond; High Resolution Color Scanner JX-325 Sharp, ImageMaster; Ammoniumperoxydisulfat (APS), N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin (TEMED), Natriumdodecylsulfat (SDS), Trypsin, aus Rinderpankreas, Acrylamid und Bis-Acrylamid: Sigma, München; Bromphenolblau: Serva, Heidelberg; Roti<sup>®</sup>-Nanoquant: Carl Roth, Karlsruhe; Glycin: Baker Chemicals, Deventer; Holland; 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris), 2-Mercaptoethanol, Methanol, Coomassie Brilliant Blue R 250, für die Elektrophorese und Aktivkohle: Merck, Darmstadt.

### 4.5 Präparation von Proteinen (Proteinexpression)

Bacto-Agar, Bacto Pepton, enzymatisch verdaut und Bacto Hefeextrakt, Difco Laboratories: Becton Dickinson, USA; 2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure (HABA), Ampicillin, Kaliumglutamat, Kanamycin, Natriumsalz, Pepstatin A, Benzamidin und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF): Sigma, München; Calciumchlorid, getrocknet: Merck, Darmstadt; Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG) dioxanfrei: Carl Roth Karlsruhe; Glycerin und Imidazol: Serva; Heidelberg; Essigsäure 98%: Riedel-DeHaën, Seelze; 1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES): Roche Diagnostics, Mannheim; Nickel-Agarose: Bio Rad, Richmond; Photometer: Perkin-Elmer 55 IS; Proteinschüttler, Certomat S: B. Braun Biotech International; UV/VIS Spectrometer; Ultraschalgerät: Branson/Sonifer 250; GSA-Rotor und SS-34-Rotor, RC-5C, Sorvall Instruments.

### 4.6 Toxine und Toxinfragmente

Botulinum Typ A und Typ B Neurotoxinen: Arbeitsgruppe von Herrn Dr. J. Frevert, BioTeCon, Potsdam; Tetanustoxin: Abteilung Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover; *E. coli*-Stämme für die Herstellung rekombinanten leichten Ketten und Teile der schweren Kette von Clostridientoxinen, Abteilung Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover (Herrn Prof. H. Niemann, Herrn Dr. T. Binz, Herrn A. Rummel).

#### 4.7 Zellkultur

Primaria Kulturschalen: Firma Falcon Division, Heidelberg; Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin): Gibco BRL, Eggenstein; Collagen R vom Rattenschwanz, Collagenase von Cl. Histolyticum (500 U/mg), Trypan Blue, 0,4% Solution, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) und Albumin bovine, Fraktion V (RSA), pH 7.0: Serva, Heidelberg; Bafilomycin A<sub>1</sub> und Zytostatika ((+)-5-Fluoro-2'-desoxyuridin (FUdR), Cytosine-β-D-arabinoside Hydrochlorid (Ara C), Uridin): Sigma, München; Foetal Calf Serum (FCS), hitzeinaktiviert: Biochrom; Ciprofloxacin Hydrochlorid: Bayer Leverkusen; Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth, Karlsruhe; Ethanol 70% vergällt mit Butanol; D(+)-Glucose, Kaliumcarbonat, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogencarbonat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Kaliumhydroxid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumcitrat-Dihydrat, Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Saccharose und Salzsäure 37%: Merck, Darmstadt; Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid: Riedel-DeHaën, Seelze; Neodisher GK (Toxin-neutralisationspulver), Dr. Weigert; Neubauerzählkammer; Bottle Top Filter, 0,22 µm: Falcon; Braunol 2000 (Povidon-Iod): Firma B. Braun Biotech International; 7x-PF-O-MATIC (Phosphate-free automatic washer detergent): ICN; Thomapor<sup>®</sup>-Siebgewebe aus Polyester: Reichelt Chemietechnik GmbH & Co; Autoklav (Sauer); Automatic Sarpette (Sarstedt); Heißluftsterilisator (Heraeus); Inkubator (Heraeus): 37°C, 10% CO<sub>2</sub>; Schüttelwasserbad (GFL); Laminar-Air-Flow-Werkbank, Class 100 (Gelaire); Mikroskop (Olympus); Zellzentrifuge (Biofuge primo R).

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur (als Modell diente chromaffine Zellen)

#### 5.1.1 Präparation chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark vom Rind und die Kulturbedingungen

Die chromaffine Zellen wurden wie von *Livett (1984)* und *Marxen (1991)* beschrieben, präpariert.

Die Nebennieren werden den frisch geschlachteten Rindern entnommen. Im Schlachthof noch werden die Nebennieren vom umliegenden Fettgewebe frei präpariert und unter leichtem Druck mit einem eiskalten Puffer I (20 ml) aus einer Einwegspritze durch die adreno-lumbale Vene gespült. Anschließend werden die Organe in Plastiktüten gegeben, auf Eis gelegt und ins Labor transportiert. Im Labor werde mit sterilisierten Geräten unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank gearbeitet. Zur Oberflächendesinfektion werden die Nebennieren in Polyvinylpyrrolidon-Jodlösung (Braunol 2000) getaucht. Nach Entfernung des noch verbleibenden Fettgewebes werden die Nebennieren erst mit ca. 40 ml 37°C warmem Puffer I retrograd gespült und anschließend zweimal mit 3-6 ml 0,06% Collagenase in Puffer I gefüllt. Beim zweiten Mal wird die Vene mit einer Gefäßklemme verschlossen, die Organe in ein Becherglas gegeben und 1 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 30 min. wird 3-6 ml Collagenaselösung nachgespritzt. Die Nebennieren werden dann aufgeschnitten und das anverdaute Mark mittels steriler Pinzette und Schere herausgetrennt und möglichst fein mit der Schere zerkleinert. Das gewonnene Markgewebe wird in der restlichen Collagenaselösung im Wasserbad 1 h bei 37°C inkubiert (Schüttelwasserbad, Stufe 70). Das weitgehend dissoziierte Mark wird durch ein Nylonnetz in ein großes Zentrifugenröhrchen filtriert und 7 min. bei 850 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet mittels feuerpolierter, steril gestopfter Pasteurpipette resuspendiert, zweimal mit 35 ml Puffer I unter Zusatz von 0,5% RSA gewaschen und anschließend in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen werden nach Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer gezählt. Die durchschnittliche Zellausbeute beträgt  $1-2 \times 10^8$  chromaffine Zellen pro Nebenniere.

Die Zellen werden auf collagenbeschichteten Kulturschalen in monozellulär Schicht ausgesät. Die Zelldichte beträgt für eine 100 mm Petrischale  $1-2 \times 10^7$  Zellen, für eine 35 mm Kulturschale  $1,3 \times 10^6$ , und für die eine 4er- oder 24er-Multiwellplatte  $3,5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität.

Da die Organe auf dem Schlachthof unsteril entnommen werden, wird dem Kulturmedium ein Antibiotikumgemisch (Penicillin 100 IE/ml, Streptomycin 100 µg/ml und Ciprofloxacin 1 mg/ml) zugesetzt. Zytostatika (ARAC  $10^{-5}$  M, FUDR  $10^{-5}$  M und Uridin  $10^{-5}$  M) sollten das Wachstum von Begleitzellen unterdrücken. Die Exozytose wird durch diese Zusätze nicht beeinträchtigt (*144*). Die Kulturen werden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C, 90% Luft und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 5.2 Aufnahme von Clostridien Neurotoxinen in intakte chromaffine Zellen

#### 5.2.1 Anreicherung mit Gangliosiden

Unter Zusatz von 250 µg/ml Gangliosidgemisch (= 2,1 mg GM<sub>1</sub>; 4,0 mg GD<sub>1a</sub>; 1,6 mg GD<sub>1b</sub>; 1,9 mg GT<sub>1b</sub> und 0,4 mg Nebenganglioside) im Kulturmedium werden



die chromaffine Zellen für 24 h inkubiert. Die Ganglioside reichern sich in der Plasmamembran an, wo die Toxine dann binden können (156).

#### 5.2.2 Toxinaufnahme aus dem Phosphat Puffer (pH 5.0 und pH 7.2) und Puffer niedriger Ionenstärke (155)

Die mit Gangliosidgemisch angereicherten Zellen werden 14 h mit 250 µl/Kavität toxinhaltigem Puffer, entweder Phosphatpuffer (Puffer VI) oder Puffer niedriger Ionenstärke (Puffer VII) behandelt. Nach der Toxinaufnahme werden die Zellen über 48 h in Kulturmedium inkubiert .

### 5.3 Elektroporation der chromaffinen Zellen

Die gewonnene Zellsuspension (Zellzahl=  $5 \times 10^5$ ) wird direkt nach der Präparation mit den Toxinen versetzt und in die Porationsküvetten zur Elektroporation aufgefüllt. Die Elektroporation erfolgt durch eine Entladung eines Kondensators. Es wird eine Spezialküvette mit Metallplatten an seinen Seitenflächen benutzt. Das elektrische Feld fällt potentiell ab. Es wird über der Zellmembran der einzelnen Zellen eine Potentialdifferenz erzeugt und bei Überschreitung eines Schwellenwertes von etwa 1 V öffnet sich die Zellmembran (127). Unter diesen Bedingungen beschränkt sich die Poration auf die Zellmembran, denn die Poration kleineren Zellkompartimenten erfordert eine höhere Feldstärke (15). Das Toxin passiert die porierte Membran einzig und allein durch Diffusion.

Clostridien Neurotoxinen sind, wie alle Proteine ein amphoterer Molekül mit einem isoelektrischen Punkt von 6.0 (272). Der pH-Wert der Porationslösung beträgt 7,4. Bei diesem pH-Wert ist das Protein elektrisch geladen. Die Bewegung im elektrischen Feld soll die Aufnahme von Molekülen in elektroporierten Zellen verstärken = Elektroosmose (65).

Nach der Elektroporation werden die Küvetten für 10 min. auf Eis gestellt. Die Zellen werden anschließend auf einer 24er Multiwellplatte in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/Kavität ausgesät. Um Zelltrümmer zu entfernen, wird am nächsten Tag ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Nach drei Tagen Erholphase wird der Freisetzungsversuch durchgeführt.

Technische Daten: Mit einem Bio Rad Gene Pulser® wurde die Elektroporation durchgeführt. Für diese Studie wurden Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 4 mm und Füllvolumen von 800 µl angesetzt. Die Kapazität des Kondensators betrug 960 µF, die angelegte Feldstärke 250 V/cm. Die Zeit, in der die Feldstärke auf 1/e abgefallen ist, betrug etwa 14 ms.

### 5.4 Freisetzungsexperimente

Die Wirkung den Clostridien Neurotoxinen wird mit Hilfe von Freisetzungsexperimenten bei Raumtemperatur (RT) untersucht (151).

Die chromaffinen Zellen werden entweder über Nacht (14 h), oder für ein Minimum von 2 h mit  $^3\text{H}$ -Noradrenalin in Kulturmedium inkubiert. Die Zellen speichern über den Katecholamintransporter Noradrenalin in ihren Vesikeln. Durch Zugabe von Carbachol (4 µg/ml) wurden die Zellen stimuliert. Sezerniertes  $^3\text{H}$ -Noradrenalin wird bestimmt.

Durchführung des Experiments:

- a) Inkubation der Zellen mit  $^3\text{H}$ -Noradrenalin in Kulturmedium über Nacht oder für ein Minimum von 2 h bei  $37^\circ\text{C}$
- b) Nachinkubation in Kulturmedium für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$
- c) Zweimal waschen mit Puffer VIII 250  $\mu\text{l}$ /Kavität für je 5 min. bei RT
- d) Einmal waschen mit Puffer VIII 500  $\mu\text{l}$ /Kavität für 5 min. bei RT
- e) Inkubation mit Puffer VIII 500  $\mu\text{l}$ /Kavität für 8 min. bei RT
- f) Sammeln der Überstände zur Bestimmung der basalen  $^3\text{H}$ -Noradrenalinausschüttung (400  $\mu\text{l}$ ) = **1. Fraktion =  $F_1$**
- g) Stimulation mit Carbachol in Puffer VIII [500  $\mu\text{M}$ ], 500  $\mu\text{l}$ /Kavität für 8 min. bei Raumtemperatur
- h) Sammeln der Überstände zur Bestimmung der stimulierten  $^3\text{H}$ -Noradrenalinausschüttung (400  $\mu\text{l}$ ) = **2. Fraktion =  $F_2$**
- i) Lyse der Zellen mit 0,2% SDS-Lösung 500  $\mu\text{l}$ /Kavität für 2-3 min. bei Raumtemperatur
- j) Sammeln der Überstände zur Bestimmung des gespeicherten  $^3\text{H}$ -Noradrenalins (450  $\mu\text{l}$ ) = **3. Fraktion =  $F_3$**
- k)  $F_1$ ,  $F_2$  und  $F_3$  wurden mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivitätsmenge im  $\beta$ -Counter ermittelt.

Aus der Summe der Radioaktivitäten der letzten drei Fraktionen wird die Gesamtradioaktivität berechnet, die vor der basalen NA-Ausschüttung in den Zellen enthalten war:

$$G = F_1 + F_2 + F_3$$

Die basale und stimulierte Freisetzung werden auf die Gesamtaktivität bezogen. Die Basalrate wird sodann von der stimulierten Freisetzung subtrahiert:

$$S = (F_2 / G - F_1 / G) \times 100$$

So erhält man die bereinigte stimulierte Freisetzung.

Die durch die Toxine bedingte Hemmung wird aus dem Verhältnis der stimulierten Freisetzung toxinbehandelten Zellen zu nicht mit Toxinen behandelten Zellen ermittelt:

$$\text{Hemmung} = (1 - S_{\text{Zellen + Toxin}} / S_{\text{Zellen - Toxin}}) \times 100$$

Alle Versuche wurden dreifach angesetzt und jeweils den Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=3$ ) ermittelt.

## 5.5 Herstellung und Gewinnung rekombinanten Toxinen mit Hilfe Plasmid beimpften *E. coli*-Stämmen

Transformation und Transfektion sind die einfachsten Verfahren, um neu kombinierte DNA in Wirtszellen einzuführen. Bei einer Klonierung in *E. coli* bedeutet Transformation die Aufnahme von plasmid-DNA und Transfektion die Aufnahme von

phagen-DNA. Da das gramnegative *E. coli* nicht in der Lage ist Fremd-DNA in ausreichender Menge von außen aufzunehmen, wird die Zellwand von *E. coli* durch Behandlung mit unphysiologisch hohen Konzentration an zweiwertigen Metallkationen destabilisiert und so die Aufnahmefähigkeit der Zellen für plasmid-DNA gesteigert. Auf diese Weise werden die Zellen kompetent gemacht. Die Effizienz einer Transformation kann durch einen Hitzeschock oder einen kurzen starken Stromstoß erhöht werden.

#### 5.5.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für eine Transformation durch Hitzeschock (56)

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

#### 5.5.2 Transformation von *E. coli*

Eine DNA-Lösung, z. B. ein Ligationsansatz mit etwa 20 ng Vektor-DNA oder 7-10 ng ringförmige Plasmid-DNA, wird mit 100 µl kompetenten *E. coli*-Bakterien gemischt und 30 min. auf Eis stengelassen. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock (5 min., 37°C), nach dem die Bakterien 10 min. lang auf Eis abgekühlt werden. Nach Zugabe von 300 µl 2YT-Medium wird der Ansatz 30 min. bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können die transformierten Bakterien die auf dem transformierten Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz ausbilden, bevor sie auf einer 2YT-Agarplatte ausplattiert werden, die das für die Selektion notwendige Antibiotikum enthält. Die transformierten Zellen wachsen bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht zu Kolonien heran.

#### 5.5.3 Aufbewahrung transformierter Klone

##### 5.5.3.1 Anlegen von *E. coli* Glycerinkulturen

Für die Herstellung von *E. coli* Glycerinkulturen werden zunächst 2 ml 2YT-Medium mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden 800 µl dieser Kultur mit 800 µl 87%igem Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

#### 5.5.4 Induktion der Proteinexpression von His<sub>6</sub>-tag-Fusionsprotein in *E. coli* M 15 pREP4

*E. coli* M 15 [pREP4] wird für die Expression von rekombinanten TeNT-Fragmenten verwendet. Dies basiert auf dem *E. coli*-Stamm K-12. Die Zellen enthalten schon das Repressions-Plasmid pREP4, welches neben einer Kanamycin-Resistenz noch für den *lac*-Repressor codiert, wodurch die für die effiziente Repression von auf pQE-Vektoren codierten Genen notwendige hohe Konzentration an *lac*-Repressor zur Verfügung steht. Das Plasmid pREP4 trägt den Selektionsmarker APH.

Genotyp: Nal<sup>s</sup> Str<sup>s</sup> rif<sup>s</sup>, lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> ercA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup>.

2 ml 2YT-Medium mit Antibiotikazusatz werden mit transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wird aus dieser Vorkultur eine 200 ml Kultur aus 2YT-Medium mit Antibiotikum so

angeimpft, dass sie bei 600 nm eine Extinktion von 0,06-0,07 erreicht. Diese Kultur wächst bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6-0.7, bevor die Expression des His<sub>6</sub>-tag-Fusionsproteins durch Zugabe von Isopropyl-β-thio-D-Galactopyranosid-Lösung (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 0,02-1 mM induziert wird. Vor und während der Induktion werden 2 ml Aliquote aus der Kultur entnommen, um später auf einem SDS-Polyacrylamidgel den zeitlichen Verlauf der Expression verfolgen zu können. Nach 1-3 h Induktion der Proteinexpression wird die Bakteriensuspension 20 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Resuspendierungspuffer (Puffer XIII) aufgenommen. Als Schutz vor Zerstörung des rekombinanten Proteins werden Proteasehemmer, wie Benzamidin 5 mM, Pepstatin A 0,1% (w/v) und PMSF 1 mM, zum resuspendierten Pellet zugesetzt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wird die Suspension bei -20°C eingefroren.

### 5.5.5 Ernte und Zellyse

Nach dem Auftauen werden die Zellen im Eisbad mit Ultraschall aufgebrochen. Um eine zu starke Wärmeentwicklung zu vermeiden, wird die Bakteriensuspension zwischen den Pulsen 30 s im Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zelltrümmer 20 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Zytosolische Proteine, unter ihnen auch das rekombinante Protein, verbleiben dabei im Überstand. Für eine Kontrolle wird das Pellet in 10 ml Puffer XIII aufgenommen. Ein Aliquot dieser Probe wird mit 2x Probenpuffer für Proteingele versetzt und bei -20°C gelagert. Aus dieser Kontrolle wird nach Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels ersichtlich, ob das exprimierte Protein durch die Bildung von Einschlusskörpern oder ungenügenden Zellaufschluss in das Pellet gelangt ist, oder ob es sich in löslicher Form im Zytosol befand und durch die Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden konnte.

### 5.5.6 Affinitätsreinigung

#### 5.5.6.1 Proteine mit His<sub>6</sub>-tag

Proteine können durch Klonierung N- und C-terminal leicht um die Aminosäuresequenz HisHisHisHisHisHis, abgekürzt His<sub>6</sub>, erweitert werden. Die His<sub>6</sub>-Aminosäuresequenz bildet hochaffine Chelatkomplexe mit zweifach positiv geladenen Schwermetallionen wie Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup> aus. Unter Verwendung von über den chelatisierenden Linker Nitrilotriacetic acid (NTA) an Agarose immobilisierten Ni<sup>2+</sup> kann das Protein gereinigt werden. Dabei bindet das Protein über jeweils 2 Histidinreste an ein Ni<sup>2+</sup>-Ion, wodurch ein oktaedrischer Komplex entsteht. Durch die Verwendung von 6 Histidinresten, die an drei benachbarte Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen) binden, kann das Protein von anderen histidinreichen Proteinen durch Elution mit einem Gradienten getrennt werden. Die Elution kann durch Verdrängung mit Imidazol oder durch Protonierung der leicht basischen Histidinreste erfolgen.

Durch den His<sub>6</sub>-tag-Fusionsanteil kann das rekombinante Protein selektiv und reversibel an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen) gebunden werden. Dazu wird der Überstand nach der Zentrifugation auf die mit 5 ml Äquilibriumspuffer (Puffer XIII) vorbereitete Säule überführt. Nicht gebundene Proteine und andere Verunreinigungen werden zuerst mit 6 ml Sonicationpuffer entfernen. Anschließend wird die Säule mit 6 ml 20 mM Imidazol enthaltendem Sonicationpuffer gewaschen, wodurch Histidincluster enthaltende Proteine entfernt werden. Die Elution erfolgt in 6 Fraktionen mit jeweils 500 µl 100 mM Imidazol in Sonicationpuffer. Vom Säulendurchfluss, den Waschfraktionen sowie den Elutionen werden jeweils 5 µl mit

dem gleichen Volumen an 2x Gelladepuffer versetzt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

#### 5.5.6.2 Strep-tag<sup>®</sup>-II-Fusionsprotein

Strep-tag<sup>®</sup>-II (WSHPQFEK) ist ein Oligopeptid, die von Streptavidin gebunden werden. Strep-tag<sup>®</sup>-II kann am N-Terminus, zwischen zwei Proteinen, als auch am C-Terminus eingesetzt werden. Durch Zufallsmutagenese ist der Streptavidin-Komplex so modifiziert worden, dass die  $K_D$  von Strep-tag<sup>®</sup>-II nur noch 1  $\mu$ M beträgt. Der modifizierte Komplex heißt Strep-Tactin<sup>®</sup> und bindet auch den ersten Strep-tag mit höherer Affinität als Streptavidin. Strep-Tactin<sup>®</sup> ist auf Sepharose-Kügelchen immobilisiert und wird als Säulenfüllmaterial zur Proteinaufreinigung eingesetzt. Durch strukturverwandte Moleküle des Biotins, dem natürlichen Bindungspartner des Streptavidins, wie z. B. Iminobiotin, Diaminobiotin oder Desthiobiotin kann das gebundene Protein eluiert werden. Die Stärke der Wechselwirkung von Desthiobiotin mit Strep-Tactin<sup>®</sup> liegt zwischen dem von Diaminobiotin und Biotin, so dass zum einen die Elution des gebundenen Proteins in kleinen Fraktionen möglich ist, und zum anderen das Säulenmaterial durch Zugabe von 2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure (HABA) regeneriert werden kann. 1 mM HABA-Lösung ist gelb; durch das Verdrängen des Desthiobiotins vom Strep-Tactin<sup>®</sup> durch das HABA-Molekül wird dieses zum Hydrazon-Isomer reduziert und zeigt eine rote Farbe, anhand deren Intensität der Regenerationsgrad der Säule bestimmt werden kann. Durch einfaches Waschen mit 100 mM Tris/HCl wird auch das HABA entfernt und die Säule ist wieder benutzbar.

Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen werden vereint, in einen Dialyseschlauch gefüllt und dreimal etwa 6 Stunden bei 4°C gegen Puffer XVII dialysiert. Nach der Dialyse wird die Konzentration der Proteine bestimmt.

## 5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen (137).

Das 0,75 mm dicke Gel setzt sich zusammen aus 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. Zur Herstellung der Gele werden die in Tabelle 2 aufgelisteten Lösungen gemischt und zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten gegossen.

Gelzusammensetzungen:	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5,7%
Puffer XIX	2,5 ml	0,625 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
AA/Bis	4,125 ml	0,830 ml
H <sub>2</sub> O	3,275 ml	3,480 ml
TEMED	15 $\mu$ l	10 $\mu$ l
APS 40%	15 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Tabelle 2, Zusammensetzung der SDS-Gele.

Nach dem Gießen wird das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation bei Raumtemperatur wird das

Isopropanol entfernt, um nachfolgend das 5,7% Sammelgel zu gießen. Nach Einfüllen von Sammelgel wird ein 15-zähliger Kamm aus 0,75 mm starkem Teflon 1 cm tief in das Gel gesteckt, um die Taschen zu formen.

Aufgereinigte Proteine werden die mit dem gleichen Volumen an Puffer XXV versetzt und entweder 2 min. im kochenden Wasserbad denaturiert oder für 30 min. bei RT inkubiert.

Zwei Gele werden senkrecht in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Dabei entsteht zwischen ihnen das Pufferreservoir für die Kathode. Sowohl dieses Reservoir als auch das für die Anode werden mit Laemmli-Laufpuffer (Puffer XXVI) gefüllt. Anschließend werden die Taschen des Sammelgels mit den Proben und einem Molekulargewichtsstandard beladen. Die Elektrophorese wird bei 20 mA pro Gel durchgeführt, bis der Farbmaler des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hat. Das Gel wird dann 30 bis 45 min. in Puffer XXIII gefärbt und anschließend mehrere Stunden lang in Puffer XXIV entfärbt und in Geltrockner getrocknet (Abbildungen 7 und 8).

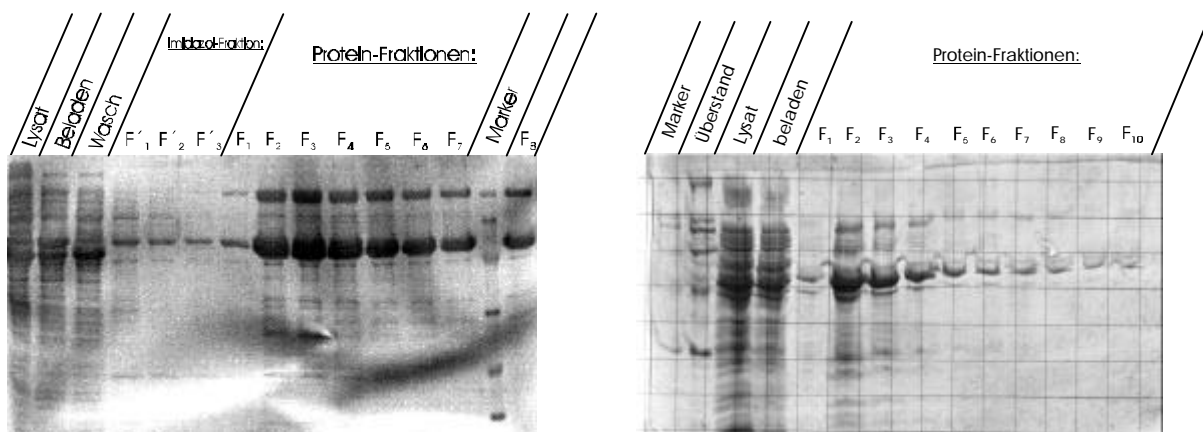


Abbildung 7, rekombinant hergestellte leichte Kette von TeNT (links) und BoNT/B (rechts)

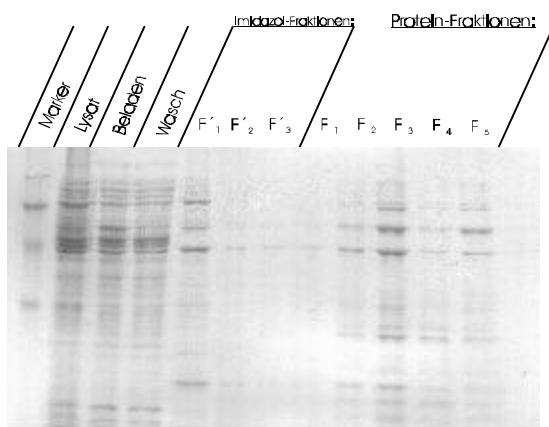


Abbildung 8, rekombinant hergestellte leichte Kette von BoNT/A

### 5.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

5.6.1.1 Proteinbestimmungsmethode nach Bradford: Die Konzentration wird durch Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Assay ermittelt. Hier wird die Extinktion der entsprechend verdünnter Probelösung nach der Färbung mit Coomassie Blue gegen Wasser bei 590 nm und 450 nm gemessen. Die Auswertung errechnet sich aus dem Quotienten  $E_{590}/E_{450}$  gegenüber einer entsprechenden Kalibrationsgeraden. Zum Vergleich wird RSA (mg/ml) als Kalibrationsprotein eingesetzt.

5.6.1.2 Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Proteine durch einen SDS-Gellauf mit einer RSA-Standardreihe. Von den zu bestimmenden Proteine werden 2-4 Proben mit einem Volumen zwischen 0,5 und 5  $\mu$ l sowie je 10  $\mu$ l einer RSA-Standardreihe auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wird das Gel mit Coomassie Blue R250 gefärbt, und luftblasenfrei zwischen zwei 0,5 mm starke Kunststoffplatten gelegt und mit einem Sharp JX-325 High Resolution Color Scanner gescannt. Die einzelnen Proteinbanden des Bildes werden mit der Contour Band-Funktion des Programms ImageMaster<sup>™</sup> 1-D (Pharmacia Biotech) detektiert und integriert. Durch lineare Regression wird aus den  $OD \times mm^2$ -Werten und die bekannten RSA-Konzentrationen eine Eichreihe erstellt, aus welche, unter der Annahme der gleichen Coomassie-Färbbarkeit von RSA und dem zu bestimmenden Protein, die Konzentration des zu untersuchenden Proteins errechnet wird (Abbildung 9).

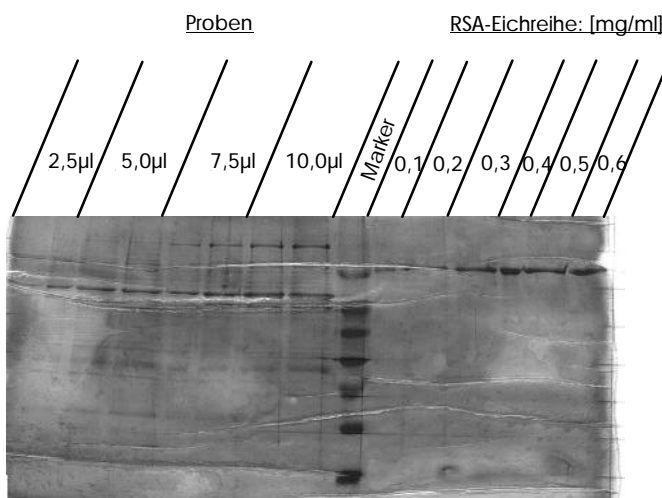


Abbildung 9, Densitometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Einschleusung der Toxine durch Elektroporation

Diese Methode wurde gewählt, um auch Toxinfragmente, die keine Ganglioside auf der Zellmembran erkennen können ins Zytosol einzuschleusen. Dadurch hat man einen direkten Zugang zu den Substraten. So können in einem und demselben System unter gleichen Bedingungen die Wirkung der Toxine und seiner Fragmente miteinander verglichen werden. Als Maß für die Aufnahme der Toxine wurde der Grad der Exozytosehemmung herangezogen (Abbildung 10).

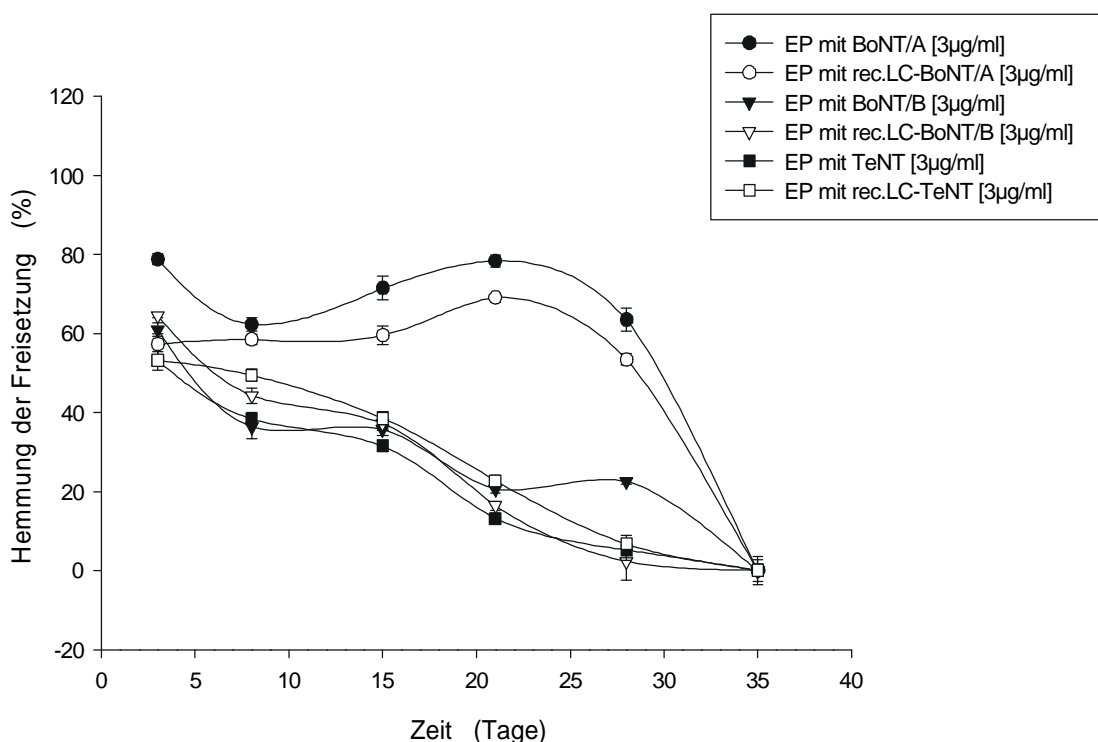


Abbildung 10, Zeitverlauf der Hemmung der Katecholaminsekretion durch native Toxine oder rekombinante leichte Ketten von Clostridientoxinen in elektroporierten chromaffinen Zellen. Zum Zeitpunkt Null wurde die Zellen in Gegenwart der jeweiligen Toxine elektroporiert. Zu den angegebenen Zeiten (Abszisse) wurde ein Freisetzungsversuch durchgeführt. Die Ordinate zeigt die Freisetzung von  $^3\text{H}$ -Noradrenalin in Prozent der gespeicherten Gesamtradioaktivität in Abhängigkeit der Zeit an (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.



Die frisch präparierte Zellsuspension wurde in Gegenwart von DC/TeNT, DC/BoNT Typ A und Typ B oder LC/TeNT, LC/BoNT Typ A und Typ B elektroporiert und anschließend kultiviert. Kontrollzellen wurden ohne Zusatz von Toxinen im DMEM elektroporiert. Nach 14 Stunden wurde das Medium komplett ausgetauscht, um die Zelltrümmer zu entfernen. Die Freisetzungsexperimente wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen durchgeführt.

Abbildung 10 zeigt die Hemmung der Exozytose durch unterschiedliche Toxine bzw. Toxinfragmente in Abhängigkeit der Zeit. Es zeigte sich, dass die Exozytose durch das Gesamttoxin und die rekombinate leichte Kette der jeweiligen Toxine gleicher Massen gehemmt wird und die Hemmung mit dem Fortschreiten der Zeit abnimmt.

BoNT/A, sowohl das Holotoxin als auch die rekombinante leichte Kette, ist am wirksamsten. Die Hemmung der Freisetzung von <sup>3</sup>H-Noradrenalin ist selbst nach 30 Tagen über 50%. Die unterschiedlich lange Wirkungszeit der Toxine deutet auf unterschiedlichen Abbau hin (74).

## 6.2 Aufnahme und die Wirkung von Clostridien Toxinen in Puffer niedriger Ionenstärke

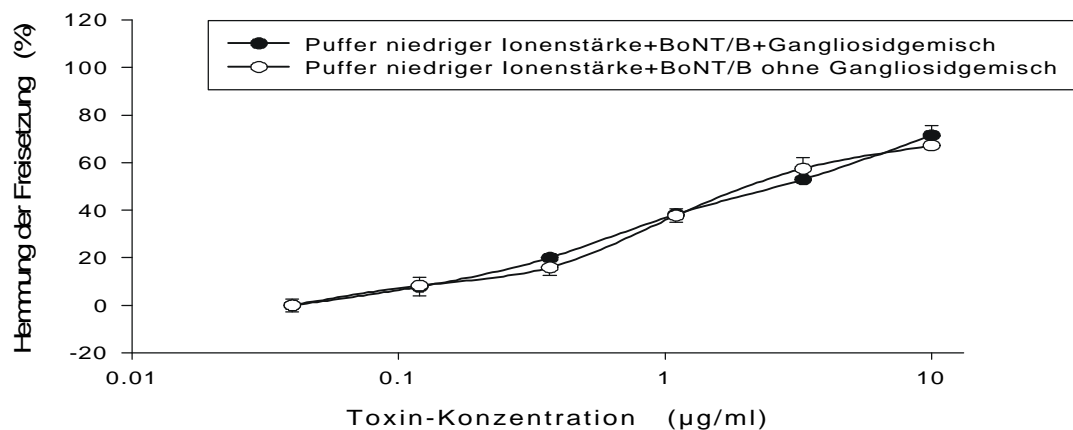
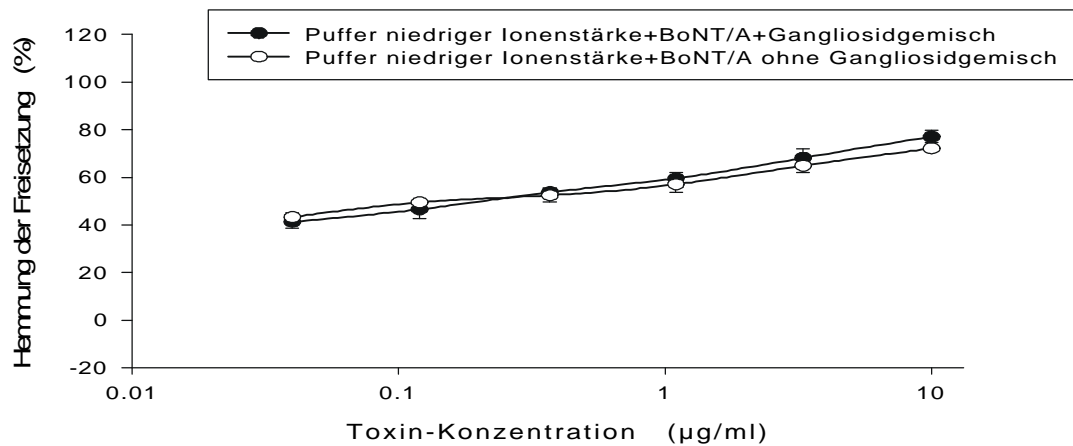
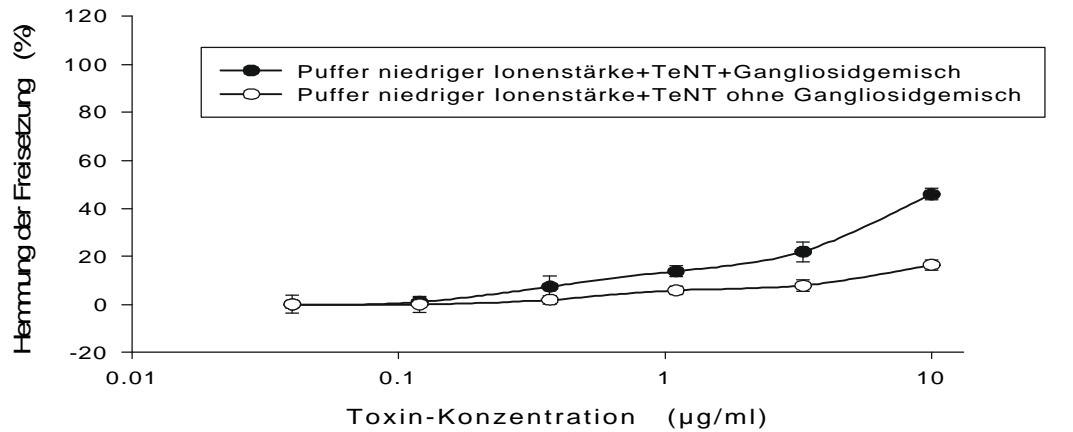


Abbildung 11, Wirkung von CNT auf die Hemmung der Exozytose in chromaffinen Zellen in Puffer niedriger Ionenstärke (pH = 7.3). Die Ordinate zeigt die Freisetzung von  $^3\text{H-NA}$  in Prozent der Gesamtaktivität, bezogen auf nicht mit Toxin behandelte Kontrollzellen (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

In einen ersten Ansatz wurden chromaffine Zellen in Gegenwart von Gangliosiden mit TeNT, BoNT/A und BoNT/B inkubiert. Um eine Wirkung der Toxine zu erreichen, mussten sie in einen Puffer niedriger Ionenstärke (Puffer VI) appliziert werden. Hierdurch wird die Interaktion mit Gangliosiden verstärkt und die Wirkung von Toxinen gesteigert. In diesen experimentellen Ansatz bindet das Toxin zuerst an das Gangliosid, wird über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und muss aus dem Endosom ins Zytosol transportiert werden. Es wurde bereits in früheren Experimenten gezeigt, dass in Ionenarmer Puffer die Bindung zwischen CNT und Ganglioside gefördert wird. Die Clostridien Neurotoxinen sind hydrophile Proteine, die bevorzugt mit den hydrophilen Polysialogangliosiden auf der Plasmamembran reagieren. Puffer niedriger Ionenstärke begünstigt solche hydrophile Interaktionen und dadurch kann des leichten inhibitorischen Effekts von Toxinen in dieser Lösung erklärt werden (155).

Die Abbildung 11 zeigt die Wirkung der CNT auf chromaffine Zellen. Wenn die Toxine in Puffer niedriger Ionenstärke gelöst werden, ist TeNT nur in Gegenwart von Gangliosiden wirksam<sup>2</sup>.

Botulinum Toxinen Typ A und B wirken auch ohne zusätzliche Ganglioside. Die Wirkung wird durch exogene Ganglioside nicht verstärkt<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup> Kultivierte Chromaffine Zellen enthalten geringen Mengen von GD<sub>1a</sub>. Daher sind sie unempfindlich gegenüber extrazellulär angebotem Tetanustoxin. Tetanus bindet *in vitro* vorwiegend an die Ganglioside des Typs GT<sub>1b</sub> und GD<sub>1b</sub>, mit wesentlich geringer Affinität an GD<sub>1a</sub> und GM<sub>1</sub>.

<sup>3</sup> Die Bindung von Botulinumtoxin erfolgt überwiegend an die Ganglioside GT<sub>1b</sub>, sowie GD<sub>1a</sub>.

### 6.3 Wirkung der Clostridien Toxinen an chromaffinen Zellen in Abhängigkeit des Gangliosidgehalts der Zellmembran und von dem pH-Wert des Inkubationsmediums

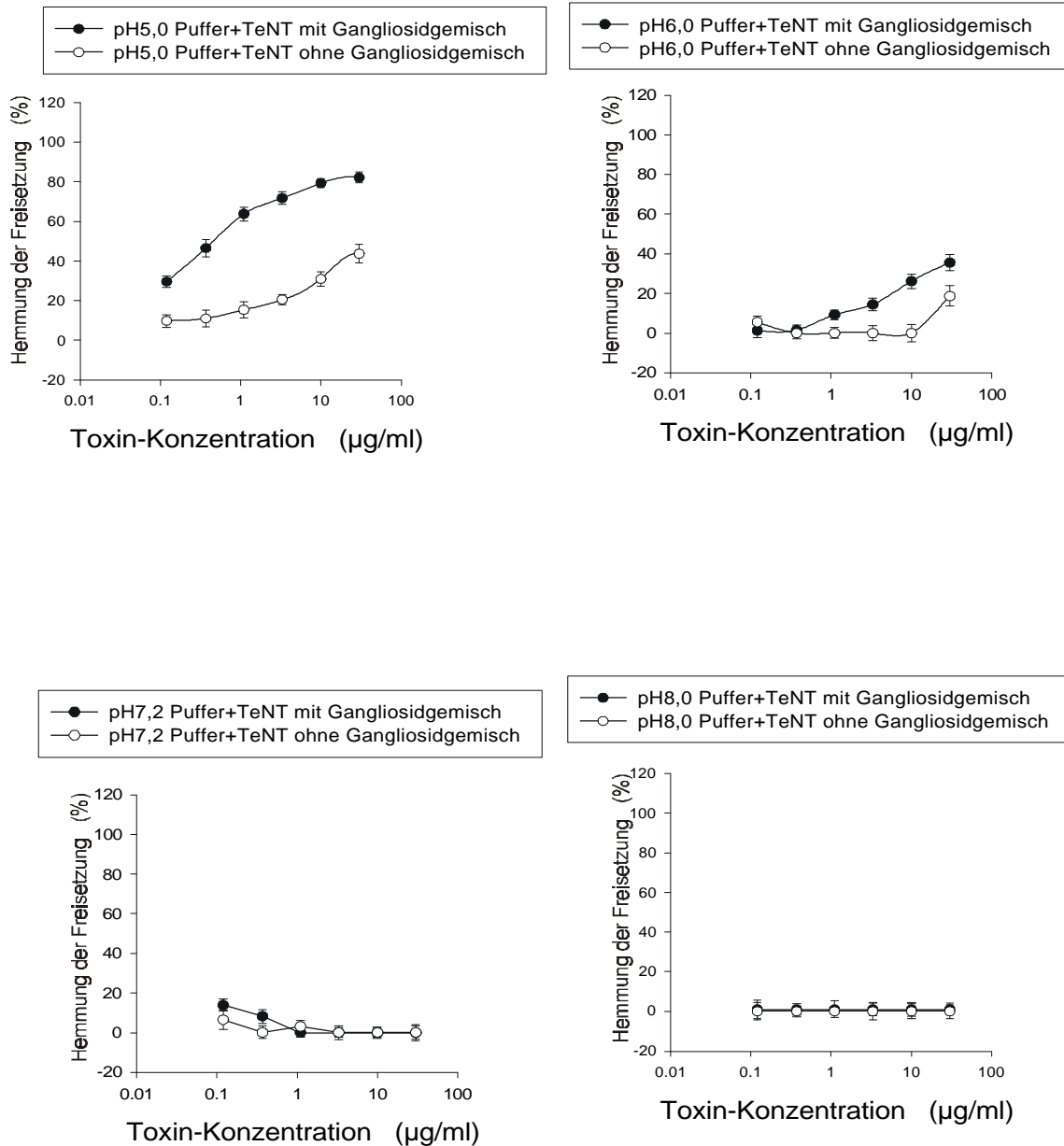


Abbildung 12, Die zur Hälfte mit 250µg/ml Gangliosiden vorbehandelten chromaffinen Zellen wurden mit pH 5.0-, pH 6.0-Puffer und Tetanus Toxin versetzt (Abbildung 12a-12b). Keine Hemmung der Exozytose nach der Behandlung der Zellen mit Tetanus Toxin in pH 7.2- und pH 8.0-Puffer (Abbildung 12c-12d). 48 Stunden nach dem Versuchansatz wurde das Freisetzungsexperiment durchgeführt. Auf der Ordinate ist die Menge an Freigesetzte <sup>3</sup>H-NA in Prozent der Gesamtradioaktivität aufgetragen, wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst (Mittelwert ± SD, n=3).

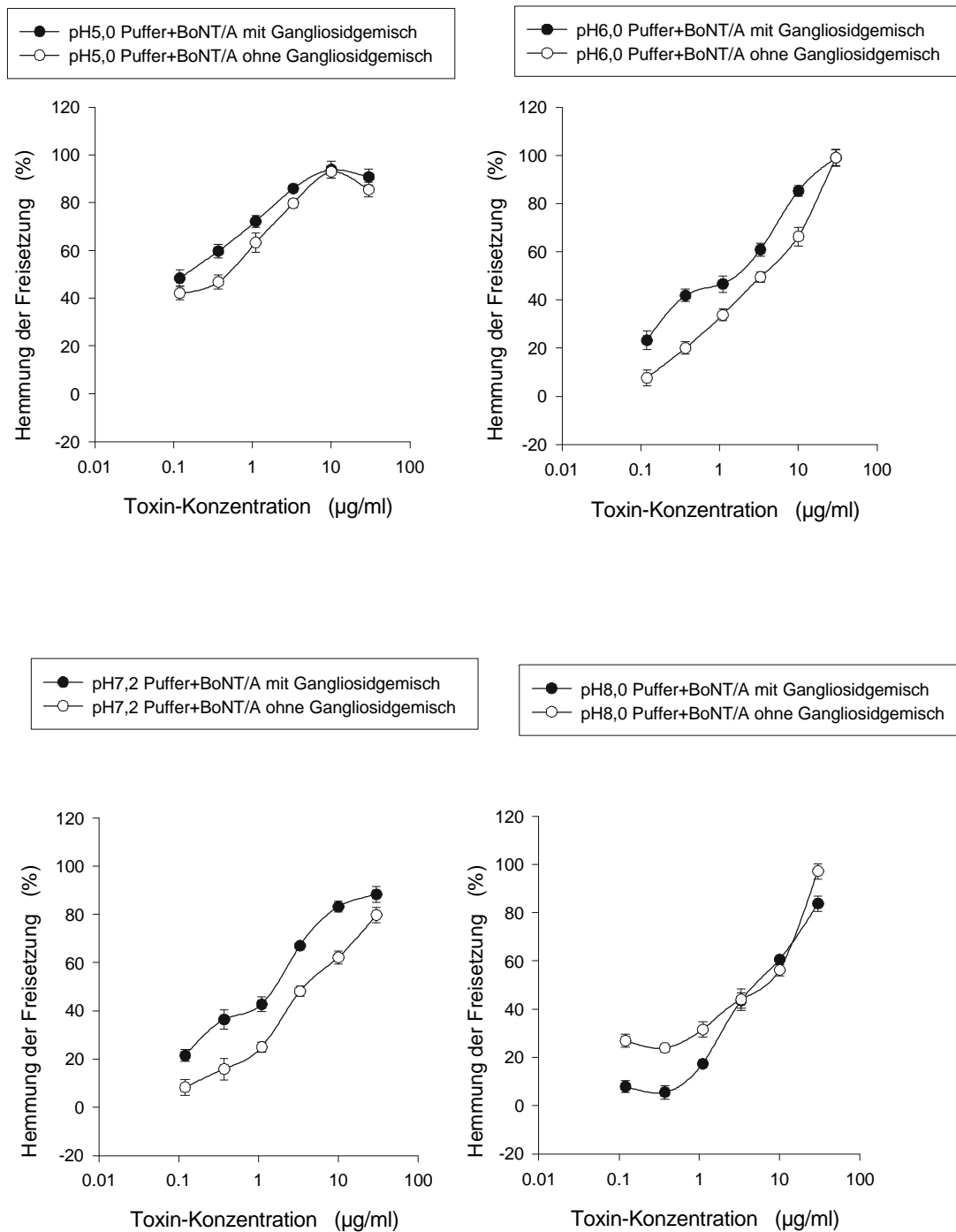


Abbildung 13, Chromaffine Zellen wurden zur Hälfte mit Gangliosiden (24 h) behandelt und dann mit BoNT/A in Puffer VII (pH-Wert=5.0, 6.0, 7.2 und 8.0) über Nacht (14 h) versetzt. Die Ordinate zeigt die Freisetzung von  $^3\text{H}$ -NA in Prozent der Gesamtaktivität. Stimulation mit 500µM Carbachollösung, wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3).

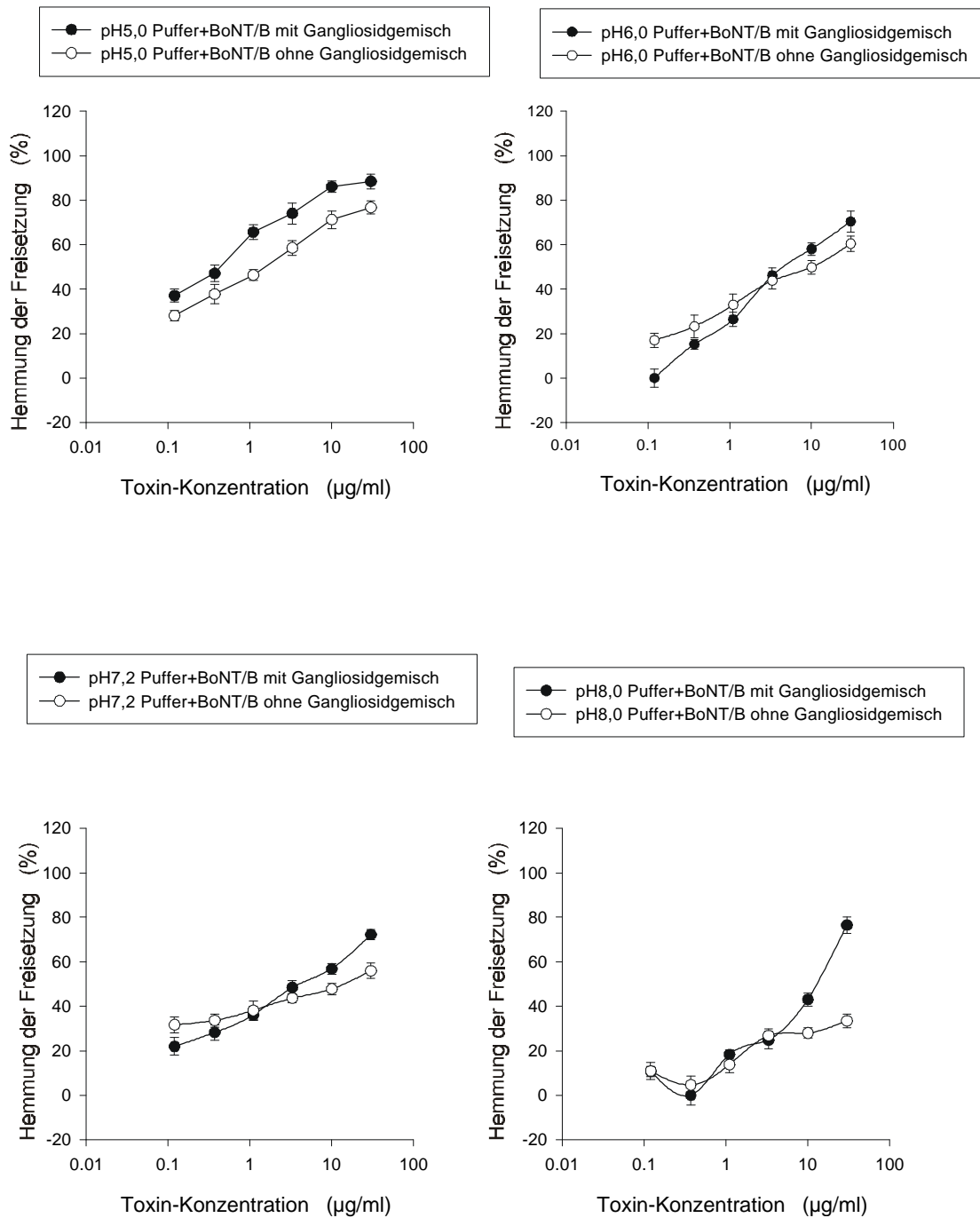


Abbildung 14, Wirkung des in Phosphatpuffer (pH = 5.0, 6.0, 7.2 und 8.0) aufgenommenen BoNT/B Toxins auf die Exozytose bei chromaffinen Zellen. Die Zellen wurden zuvor zur Hälfte mit Gangliosiden für 24 h behandelt. Die Ordinate zeigt die Freisetzung des gespeicherten  $^3\text{H}$ -NA nach einer Stimulation mit 500 µM Carbachol (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

Nach rezeptorvermittelte Endozytose befinden sich die Toxine in Vesikeln. Um zum Substrat zu gelangen, müssen sie die endosomale Membran überwinden (Translokation). Da die endosomale Membran ein Teil der recycelten Plasmamembran darstellt, sollte sich die Translokation an der Plasmamembran widerspiegeln, wenn hier Bedingungen geschaffen werden, wie sie im Endosom vorherrschen.

Hierzu wurden chromaffine Zellen mit Toxin bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Ein Teil der Kulturen wurde zusätzlich mit Gangliosiden vorbehandelt. Anschließend wurden die chromaffine Zellen für 14 h mit Puffer VII (Phosphat-Puffer mit: pH5.0, pH6.0, pH7.2 und pH8.0) und Clostridientoxinen inkubiert. Danach wurde der Puffer gegen Kulturmedium ausgetauscht und für weitere 48 h in DMEM inkubiert. Diese so genannte Erholungsphase dient der Regeneration des Exozytoseapparates (15). Die Hemmung der Exozytose wurde durch die freigesetzte Menge an  $^3\text{H}$ -NA ermittelt.

In diesen Experimenten ist die Wirkung von Tetanustoxin sehr stark von pH-Wert des Puffers abhängig. Die Hemmung kann durch Ganglioside verstärkt werden. Tetanustoxin entfaltet seine maximale Wirkung bei saurem pH-Wert. Je höher der pH-Wert, desto geringer ist die Wirkung des TeNT (Abbildungen 12). Bei physiologischem pH verstärkt zugesetzte Ganglioside die Wirkung nicht.

Auch bei den Botulinumtoxin Typ A und Typ B wird die maximale Wirkung in sauren pH-Wert erreicht, aber die Abnahme der Wirkung bei ansteigenden pH-Werten ist bei den beiden Toxinen nicht so signifikant wie bei Tetanustoxin. Die Anwesenheit der Ganglioside spielt keine große Rolle bei ihrer Aufnahme in die Zellen. Dies ist besonders auffallend bei BoNT/A. Das gleiche Ergebnis zeigten schon die Experimente bei niedriger Ionenstärke. Die chromaffine Zellen enthalten physiologischer Weise in geringer Menge Gangliosid-Typ  $\text{GD}_{1a}$ , welches Botulinum Neurotoxin Typ A binden kann, aber kein TeNT bindet (Abbildungen 13 und 14).

### 6.4 Wirkung von rekombinant hergestellten leichten Ketten von Clostridien Toxinen auf chromaffine Zellen in sauren pH-Wert

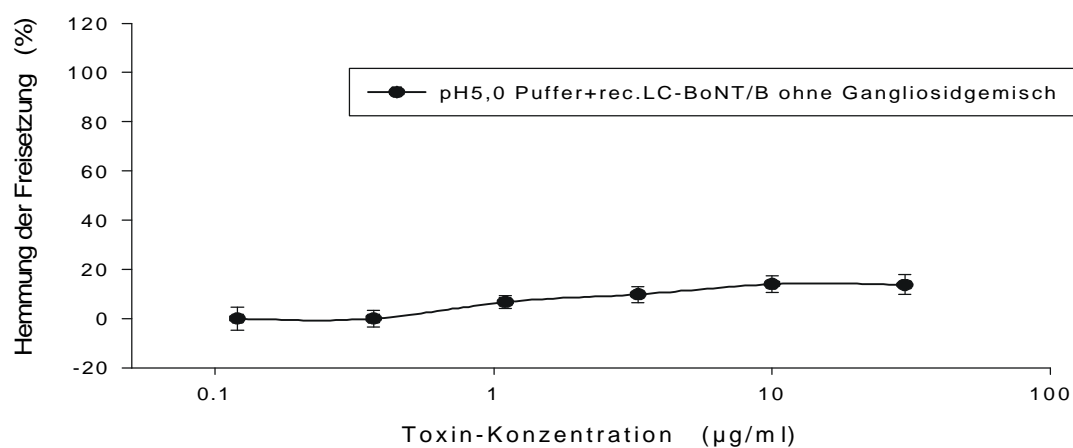
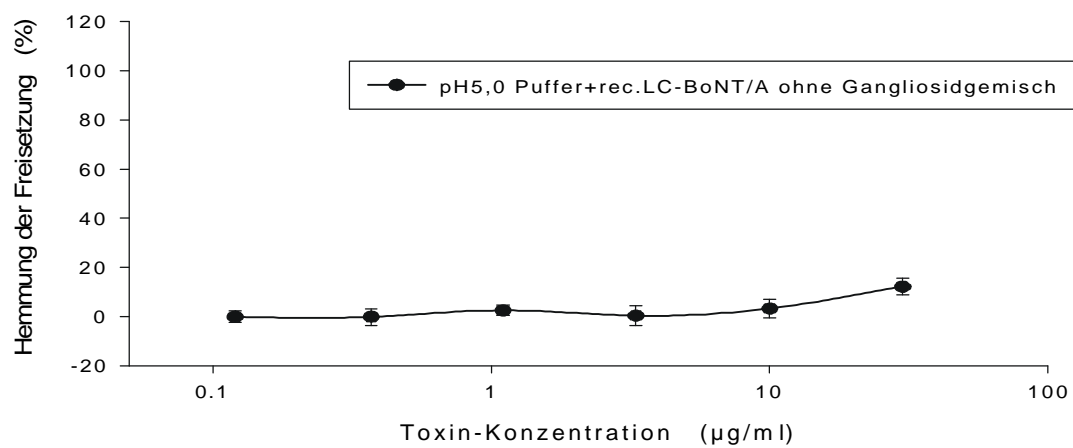
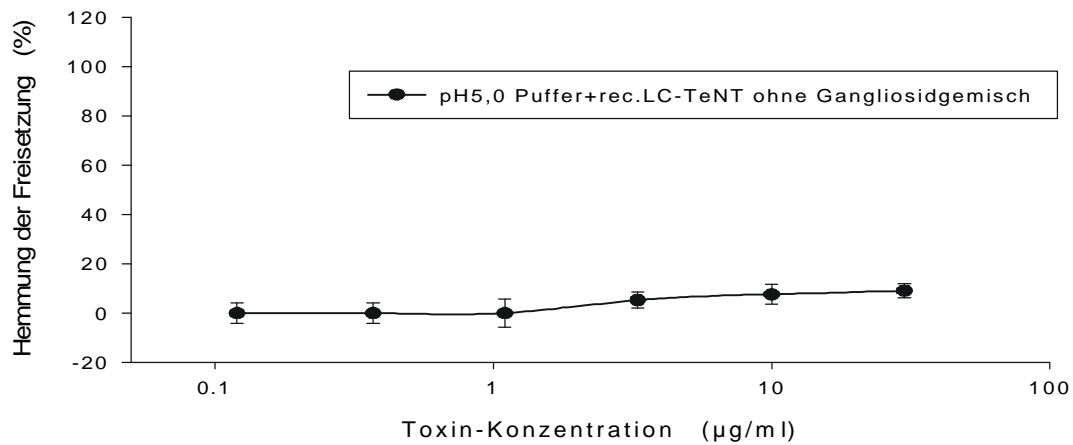


Abbildung 15, Hemmung der Freisetzung beim Einsatz von rekombinanten leichten Ketten der Neurotoxinen in saurem pH-Wert (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.



In den Folgenden Experimente wurde untersucht, ob die verstärkte Wirkung bei pH 5.0 auf einer unspezifischen Protein-Plasmamembran-Interaktion berührt. Daher wurden chromaffine Zellen mit rekombinanten leichten Ketten der Toxine inkubiert. Diese Fragmente enthalten keine Bindungs- ( $H_C$ ) und Translokationsdomäne ( $H_N$ ). Die Fragmente hemmen die Exozytose genau wie die Holotoxine, wenn sie durch EP in die Zellen eingebracht werden, also das Zytosol auf direkten Weg erreichen (siehe Abbildung 10).

Die Zellen wurden nicht vorher mit Gangliosiden behandelt, weil die  $H_C$ -Teile der schweren Kette, die für die Bindung der Toxinen an die Ganglioside zuständig ist, bei hier eingesetzten Fragmente fehlte. Die chromaffine Zellen wurden für 14 h mit den entsprechenden rekombinanten leichten Ketten von Clostridien Toxinen in Puffer VII (pH 5.0) behandelt und vor den Freisetzungsversuchen für 48 h in Kultur Medium inkubiert.

Dieser Versuch zeigt (Abbildung 15), dass für die Wirkung der Toxine an chromaffinen Zellen die schwere Kette essentiell sei. Die schwere Kette ist notwendig, um die LC durch die Plasmamembran zu schleusen. Im Gegensatz zu den Dichain-Toxinen, die in sauren pH-Wert bis zu 60% die Exozytose hemmen, zeigen die rekombinant hergestellten leichten Ketten in diesem pH-Wert keinen Effekt. Die Daten zeigen, dass die Aufnahme der Toxine in die Zelle bei sauren pH spezifisch über die schwere Kette erfolgt.

## 6.5 Wirkung den Clostridien Toxinen an chromaffinen Zellen in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert, der zu inkubierten Lösungen

Um die Energieabhängigkeit der rezeptorvermittelten Aufnahme und die Translokation zu klären, wurden folgende Versuche durchgeführt.

Wenn die Toxine in Puffer niedriger Ionenstärke die Zellen angeboten werden, ist in deren Weg von Aufnahme bis zu Wirkung mehrere Schritte enthalten: 1. Bindung, 2. Internalisation, und bei pH 5.0 Experimenten nur 3. Translokation, 4. Reduktion durch Thioedoxin-Reduktase und 5. Proteolyse eines Substrates enthalten (Abbildung 51a und 51b).

Bei diesen Versuchen werden außer den Faktoren pH-Wert und Ganglioside der Einfluss einen weiteren wichtigen Faktor, das Temperatur, auf die Hemmung der Exozytose durch die Toxine in Betracht gezogen.

Durchführung des Experiments (Flussdiagramm, siehe Abbildung 16): Die mit 250 µg/ml Gangliosidgemisch (einer Mischung aus Typen: GM<sub>1</sub>; GM<sub>2</sub>; GM<sub>3</sub>; GD<sub>1a</sub>; GD<sub>1b</sub>; GT<sub>1b</sub>) für 24 h inkubierten chromaffinen Zellen wurden für 14 h mit Puffer VII (Phosphatpuffer, pH 5.0) oder Puffer VI (Puffer niedriger Ionenstärke, pH 7.3) und Clostridientoxinen bei der entsprechenden Temperatur behandelt. Nach 14 h wurde der Puffer gegen Kulturmedium ausgetauscht und für weitere 48 h bei entsprechenden Temperaturen inkubiert (Regenerationsperiode). Anschließend wurden die Zellen mit <sup>3</sup>H-NA beladen und für drei Stunden bei 37°C inkubiert, dies gilt auch für die Zellen, die zuvor die ganze Zeit bei RT behandelt wurden. Die Hemmung der Exozytose wurde an Hand der freigesetzten Menge an <sup>3</sup>H-NA ermittelt.

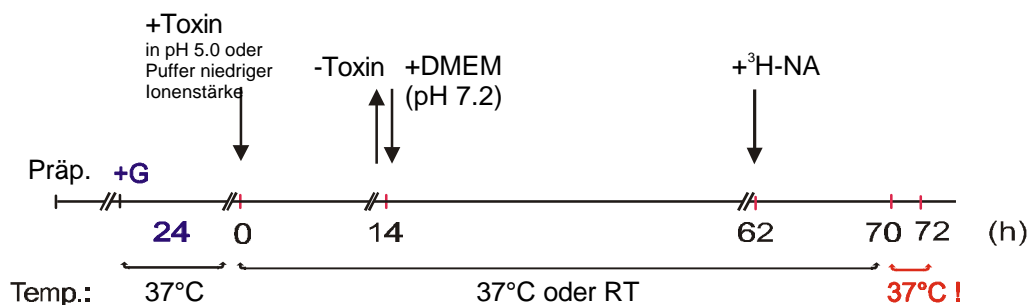


Abbildung 16, Schematische Darstellung der Versuchsansätze (Erklärung im Text).

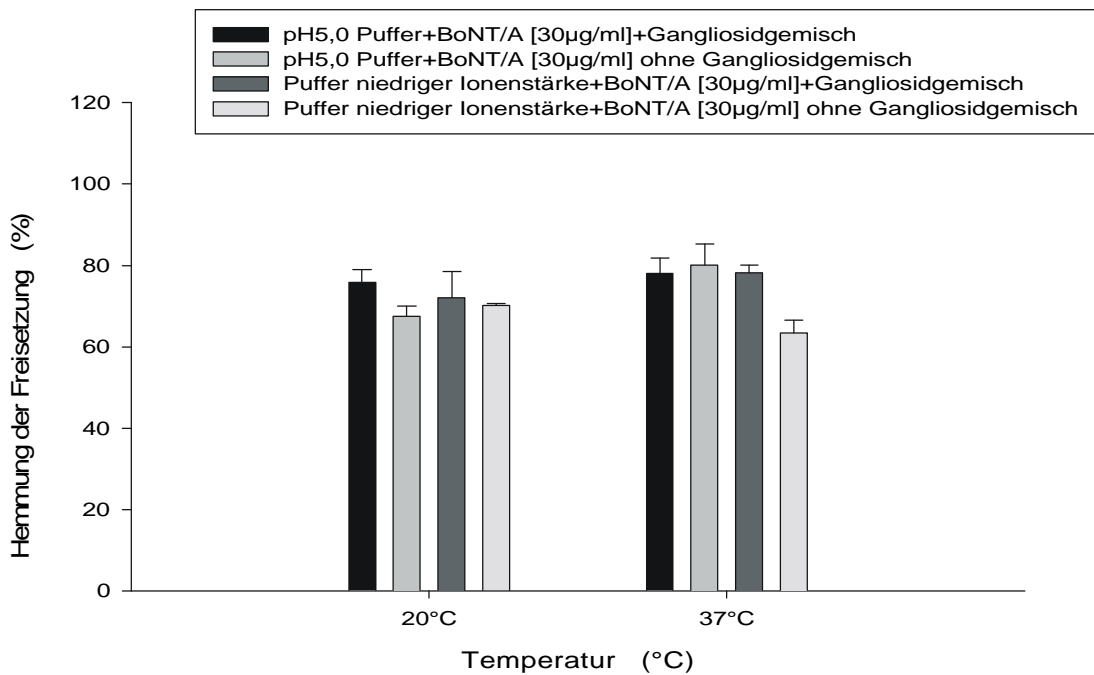
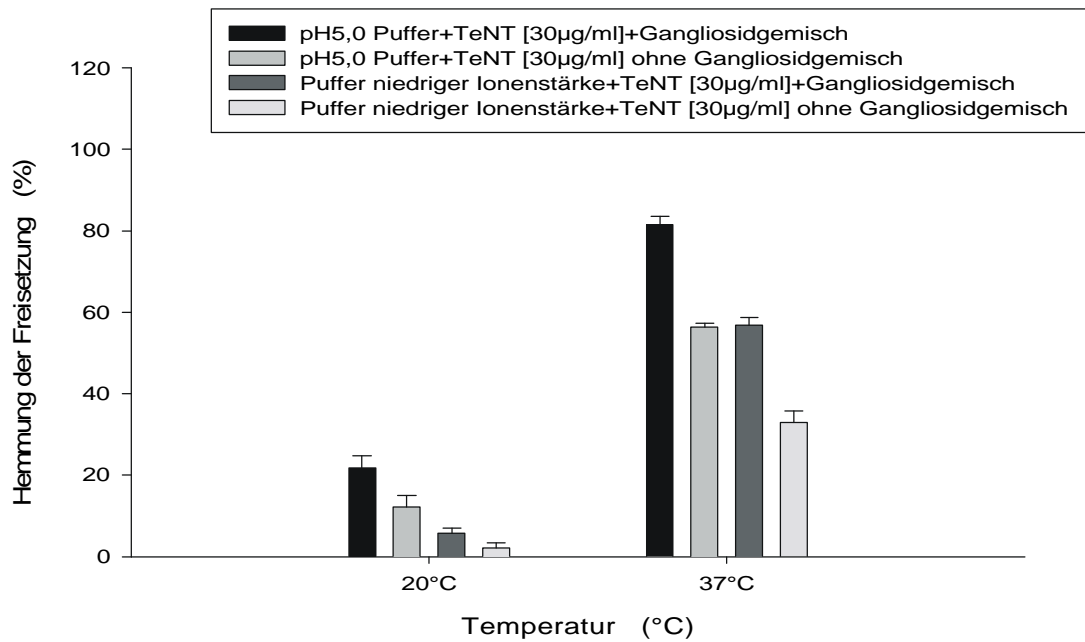


Abbildung 17, Wirkung von TeNT (oben) auf die Katecholaminfreisetzung in Abhängigkeit der Temperatur und des pH-Werts. Hemmung von Exozytose durch BoNT/A (unten) in Abhängigkeit der Temperatur und des pH-Werts. Die Ordinate zeigt die Menge an freigesetzte <sup>3</sup>H-NA. Die chromaffine Zellen wurden in unterschiedlichen Temperaturen (Abszisse) und pH-Werten mit Toxin behandelt (Mittelwert ± SD, n=3).

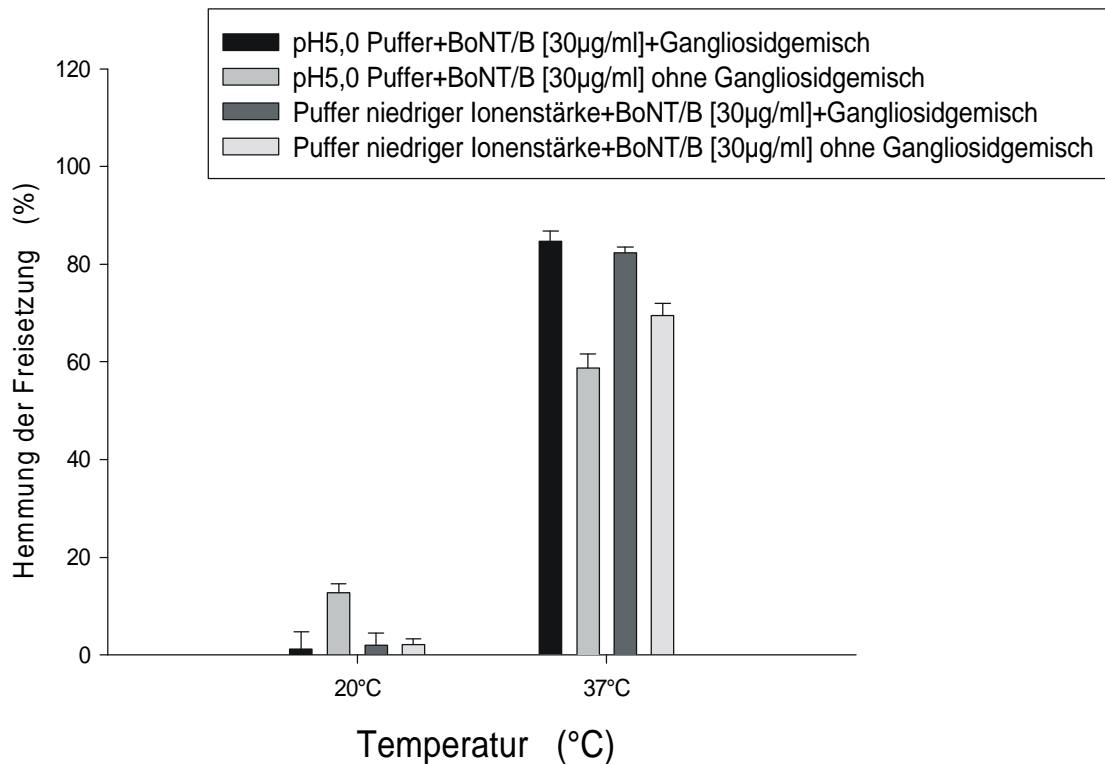


Abbildung 18, Einfluss von Temperatur, pH-Wert und Ganglioside Typ auf die Exozytose unter Zusatz von BoNT/B. Auf die Ordinate wird die Hemmung der Freisetzung von <sup>3</sup>H-NA durch BoNT/B gezeigt (Mittelwert ± SD, n=3).

Die Endozytose ist abhängig von der Exozytose. Die fusionierte Membranpatch werden eingeschnürt und recycelt, unabhängig ob während der Membranexposition einen extra zellulären Rezeptor besetzt wird oder nicht. Dies geschieht innerhalb wenige Sekunden (205, 276). Daher sollte die rezeptorvermittelte Endozytose bei allen CNT gleichartig ablaufen, unabhängig davon, ob ein Toxinrezeptor besetzt ist oder nicht. Allerdings nur TeNT und Botulinumtoxin Typ B zeigen eine dosis- und temperaturabhängige Hemmung der Exozytose (Abbildungen 17(oben)-18) und BoNT/A hemmt die Noradrenalin ausschüttung temperaturunabhängige (Abbildung 17(unten)) (228). Dies kann dadurch erklärt werden, dass 1. die drei Stunden Inkubationszeit mit <sup>3</sup>H-NA bei 37°C für restliches BoNT/A, das selbst nach waschen der Zellen sich immer noch in Medium befindet, ausreicht um SNAP-25 zu spalten; 2. oder und SNAP-25 Eigenwirkung.

Bei TeNT spielt außer Temperatur, den pH-Wert des Puffers eine wesentliche Rolle auf die hohe seiner Toxizität.

## 6.6 Wirkung von ATP-abhängigen Protonenpumpenhemmer Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Hemmung der Exozytose durch die Clostridien Toxinen

Die Translokation von Clostridien Neurotoxinen ins Zytosol findet nur nach der Ansäuerung des Vesikels durch den Einwärtstransport von Protonen mittels der ATP-abhängigen Protonenpumpe statt. Diesen Schritt kann durch Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub> unterbunden und somit die Blockade der Exozytose verhindert werden (158, 280).

Bafilomycin A<sub>1</sub> wird aus *Streptomyces griseus* gewonnen. Er ist ein Enzyminhibitor, spezifisch die für vakuolare H<sup>+</sup>-ATPase (v-ATPase), die in tierischen und pflanzlichen Zellen und Mikroorganismen vorkommt.

Um eine Eigenwirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die chromaffine Zellen und die Freisetzung von Noradrenalin auszuschließen, wurden die Zellen mit Bafilomycin A<sub>1</sub> [10 nM/ml in Kulturmedium] für 30 min. vorbehandelt und anschließend entweder mit rec.LC oder den gesamten Toxinen elektroporiert. Nach 14 h wurde das Medium komplett ausgetauscht und nach 48 h die Freisetzungsversuche durchgeführt.

Es zeigt sich, dass Bafilomycin A<sub>1</sub> in einer Konzentration von 10 nM keinen Einfluss auf die Wirkung von Clostridien Toxinen und deren Hemmung der Exozytose hat, wenn die Toxine das endosomale Kompartiment nicht durchlaufen, also direkt durch Poren in das Zytosol gelangen. Eine Eigenwirkung auf die Exozytose wurde ebenfalls nicht beobachtet (Abbildungen 19-20). Wie in vorherigen Versuchen auch gezeigt wurde, hemmen die rec.LC und die Holotoxine gleichwertig die Katecholaminfreisetzung, wenn sie die Zellen vor der Elektroporation zugesetzt werden.

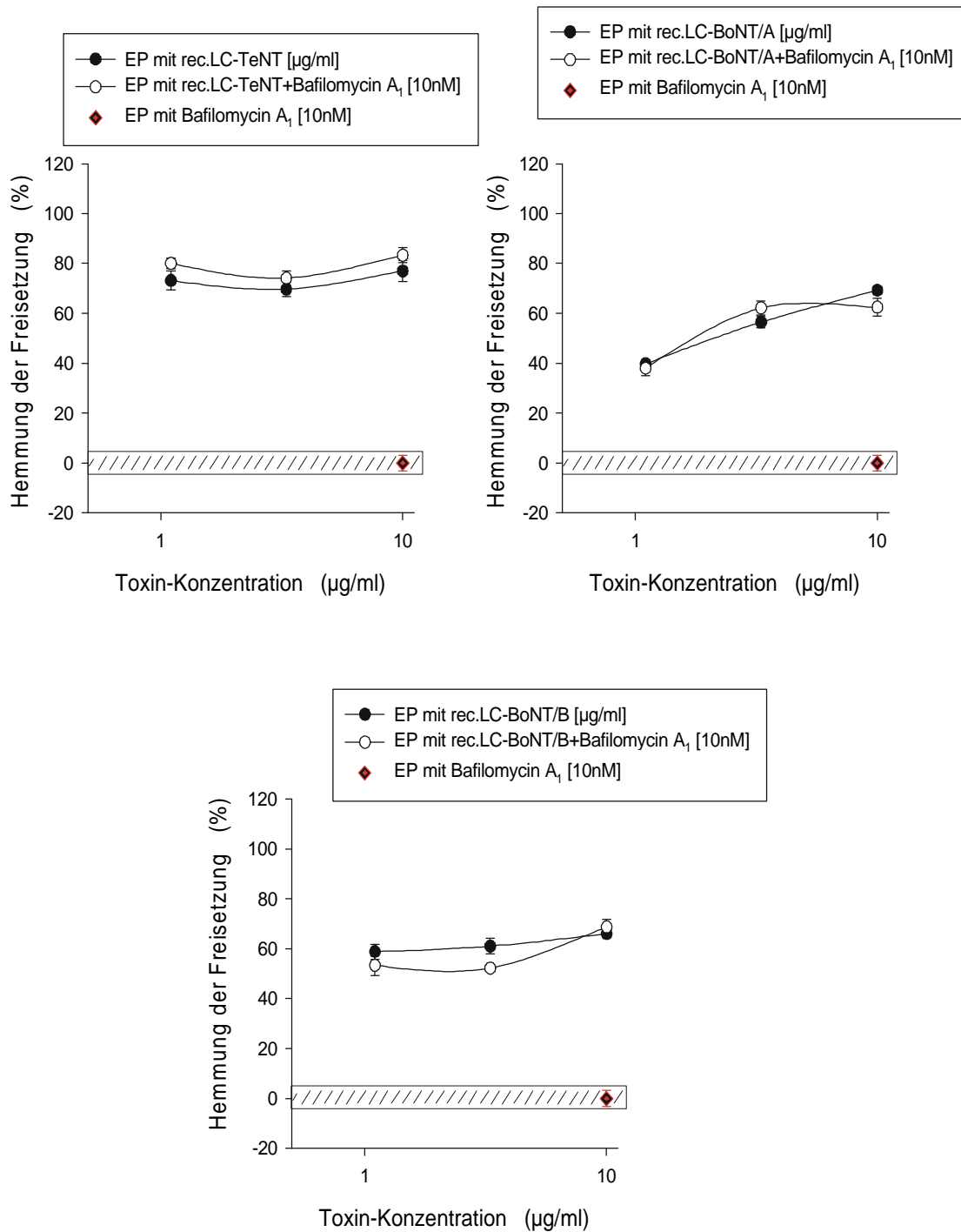


Abbildung 19, Hemmung der Katecholaminfreisetzung nach der Elektroporation mit zuvor mit Bafilomycin A<sub>1</sub> behandelten Zellen durch rekombinant hergestellte leichte Ketten von Clostridien Neurotoxinen. Auf die Abszisse sind die Konzentration von Toxinen auftragen, auf die Ordinate die durch Toxin hervorgerufene Hemmung der Exozytose (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

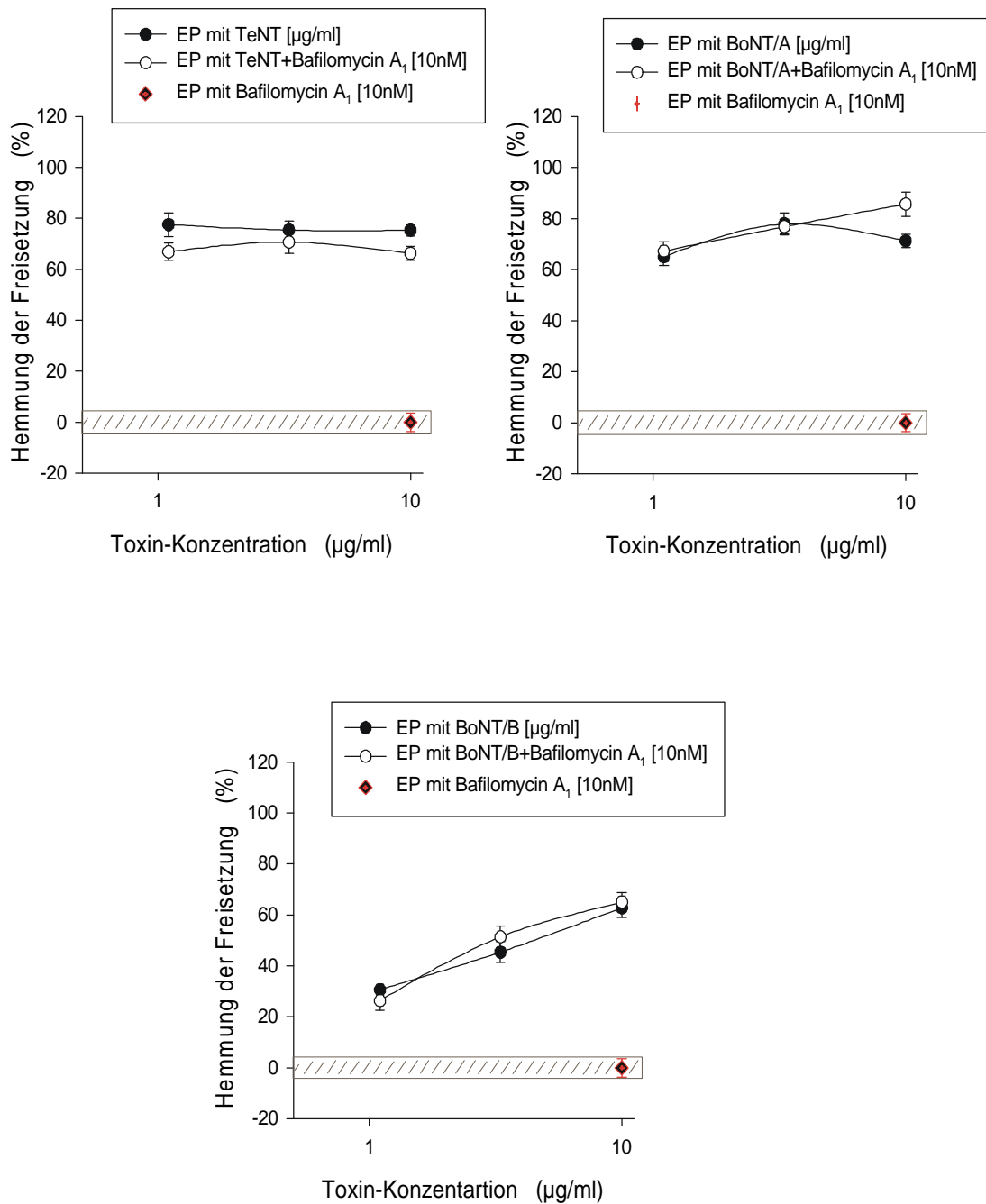


Abbildung 20, EP mit den DC-TeNT und -BoNT/A, die Zellen wurden vorher mit Bafilomycin A<sub>1</sub> [10nM] 30 min. lang behandelt (oben). Hemmung der Freisetzung der gespeicherten <sup>3</sup>H-Noradrenalin nach der Elektroporation der 30 min. lang mit Bafilomycin A<sub>1</sub> vorbehandelten Zellen mit DC-BoNT/B (unten). Die Ordinate stellt die Freisetzung von <sup>3</sup>H-NA in Prozent der insgesamt in den Zellen enthaltener Radioaktivität dar (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

Eigenwirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Exo- und Endozytose. Der Dosisbereich ohne Eigenwirkung (siehe Tabelle 3):

Baf-Konzentration [nM]:	3,3	10	30	90
Überlebensrate der Zellen (%)	~ 98	~ 95	~ 50	~ 10

Tabelle 3, Eine optimale Wirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Aufhebung der Hemmung der Exozytose durch CNT wurde bei einer Konzentration von 10nM erzielt. In dieser Konzentration zeige Bafilomycin A<sub>1</sub> selbst keine Eigenwirkung auf die freigesetzte Menge an Noradrenalin.

In den folgenden Versuchen wurde die Wirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Bindung und Translokation von Clostridientoxinen in den Zellen zum einen in Puffer niedriger Ionenstärke sowie in Phosphatpuffer, pH 5.0 untersucht (Abbildungen 21-26).

Die Hypothese war, dass in Anwesenheit von Gangliosiden und bei niedrigem pH-Wert (wie in vorherigen Versuchen auch gezeigt wurde, Abbildungen 12, 13 und 14) diffundieren die Toxine ins Zytosol und umgehen die rezeptorvermittelte Endozytose. Deshalb sollte einen Zusatz an Bafilomycin A<sub>1</sub> keinen Einfluss auf die Hemmung der Exozytose durch die CNT haben.

Aber die Versuche zeigen zu unserer Überraschung, dass in Anwesenheit von Bafilomycin A<sub>1</sub> die Wirkung der Toxine auf die Ausschüttung von <sup>3</sup>H-Noradrenalin ausblieb.

Um fest zu legen, ab wann die Wirkung von Toxinen durch den Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub> aufgehoben werden, wurde in die erste Versuchsreihe (Abbildungen 21-26) die chromaffine Zellen mit einer variablen Bafilomycin A<sub>1</sub>-Konzentration (siehe Abszisse [nM]) und einer konstanten Menge von Toxin [30 µg/ml] behandelt. In die zweite Versuchsreihe wurden die Zellen einer variablen Konzentration an Toxinen (siehe Abszisse [µg/ml]) und einer konstanten Menge an Bafilomycin A<sub>1</sub> [10nM] zugesetzt (Abbildung 27-32).

Bei allen Versuchen wurde eine Kontrolle mitlaufen lassen. Diese Kontrolle in den ersten Versuchsreihen war das Toxin, das im entsprechenden Puffer die chromaffine Zellen angeboten wurde. In den zweiten Versuchsreihen war die Bafilomycin A<sub>1</sub> (in den beiden Puffern), dass die Zellen angeboten wurde.



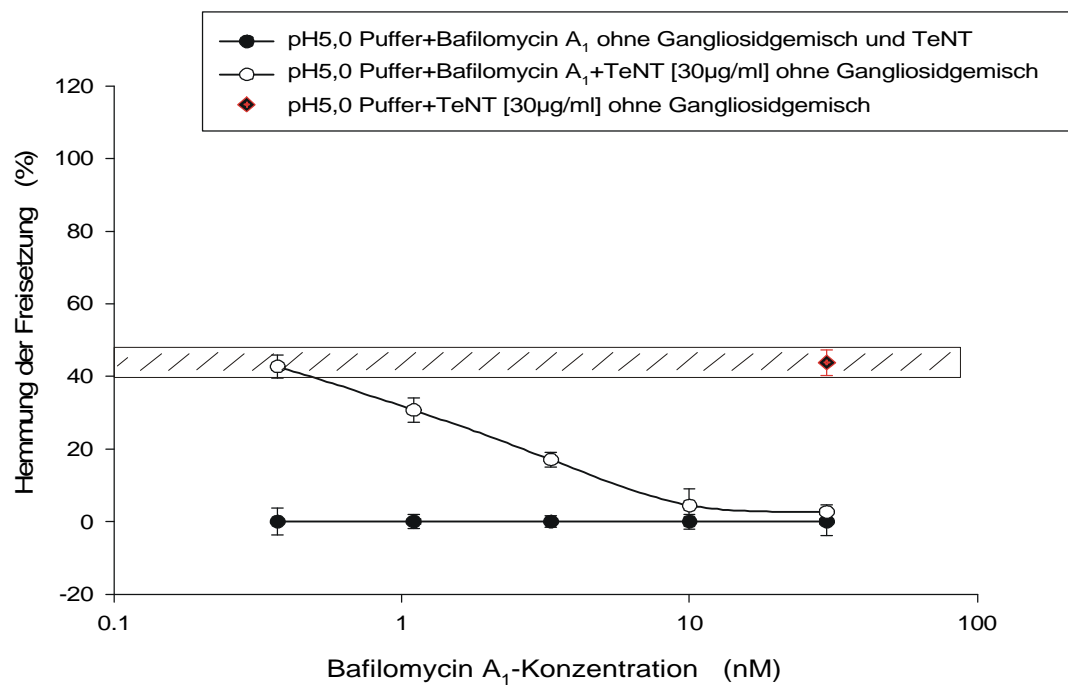
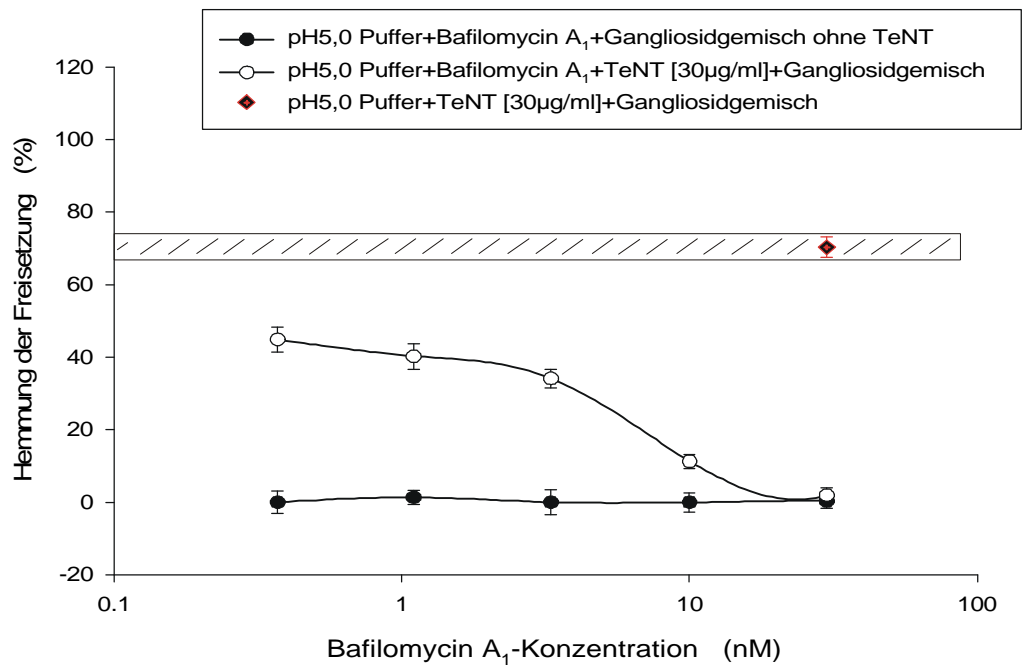


Abbildung 21, Hemmung der Exozytose in sauren pH-Wert und Bafilomycin A<sub>1</sub> mit und ohne Ganglioside unter Zusatz von TeNT. Die Abszisse zeigt die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> in nM. Die Konzentration von TeNT ist hier konstant [30µg/ml] (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

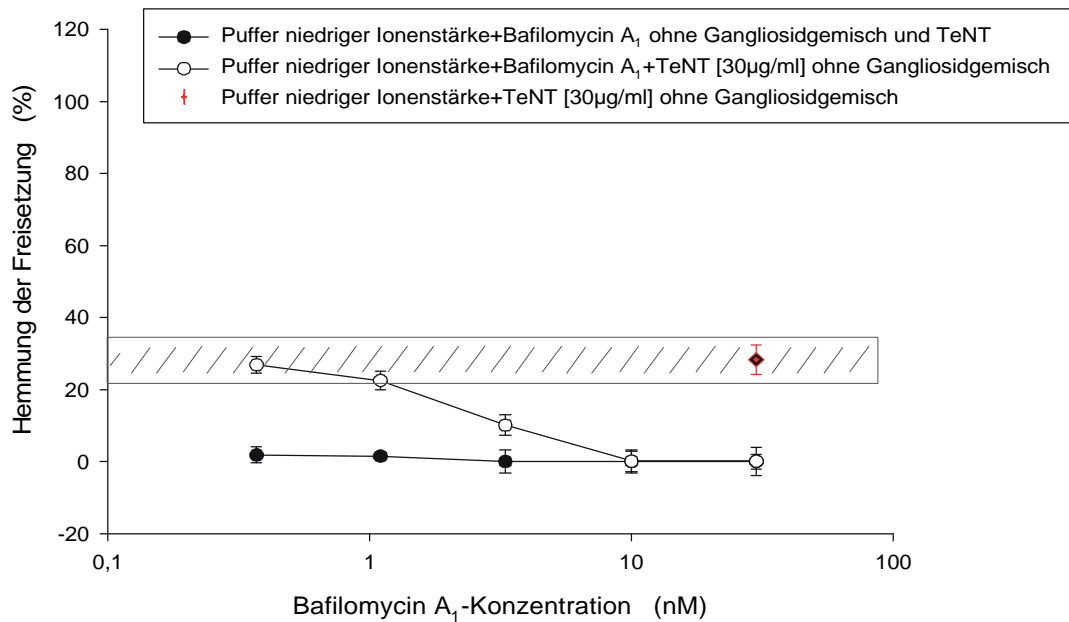
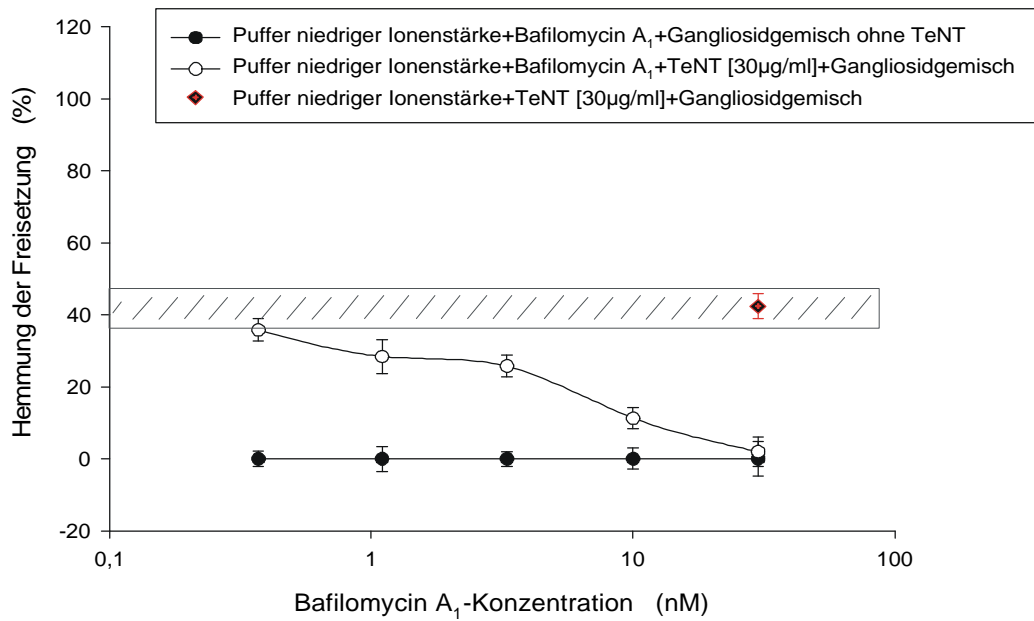


Abbildung 22, Hemmung der Freisetzung in Puffer niedriger Ionenstärke mit Bafilomycin A<sub>1</sub>, Ganglioside und TeNT. Die Abszisse zeigt die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> in nM. Die Konzentration von TeNT ist hier konstant [30 µg/ml] (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

In diesen Versuchen wird gezeigt, dass die Wirkung von TeNT, auch wenn die Menge an Toxin hier sehr hoch ist (überall konstanter Zusatz von 30 µg/ml), in den Zellen durch Anwesenheit von Bafilomycin A<sub>1</sub> unabhängig von der Art des Puffers in einer Konzentration von 10 nM fast vollständig aufgehoben wird (Abbildungen 21 und 22).

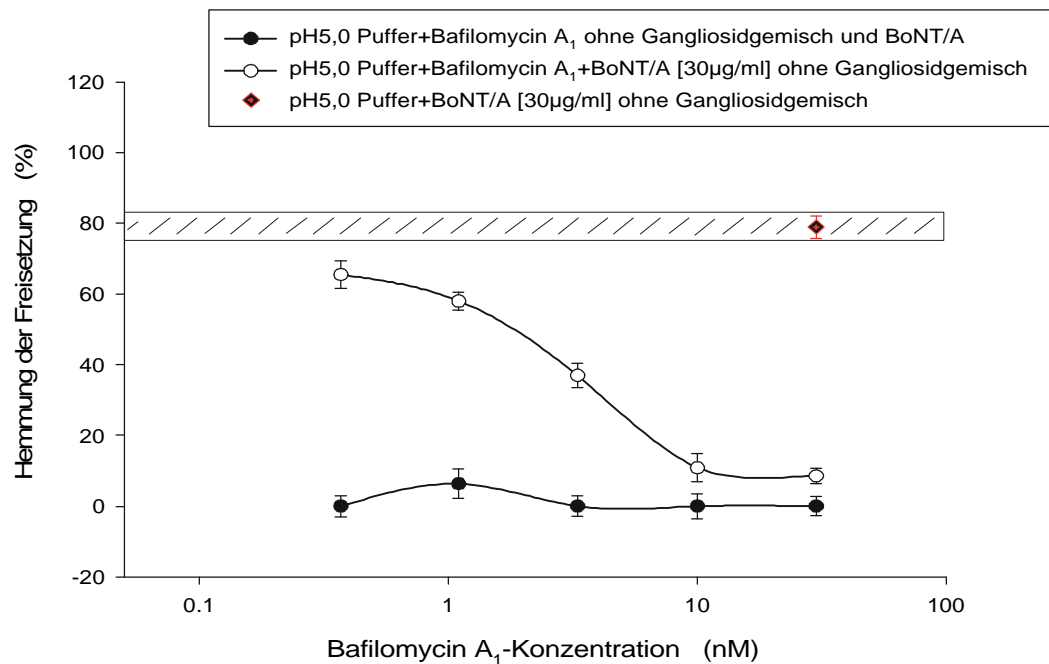


Abbildung 23, Wirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> alleine und in Anwesenheit von BoNT/A auf die Hemmung der Exozytose bei pH 5.0 Puffer. Die Abszisse zeigt die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> in nM, die Konzentration von BoNT/A ist hier konstant [30 µg/ml] (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

Die Hemmung der Exozytose durch Botulinum Toxin Typ A in die Zellen wird wie bei TeNT durch den Protonenpumpenhemmer Bafilomycin A<sub>1</sub> bei einer Konzentration von [10 nM] ganz aufgehoben. Überall wurde dieselbe Menge an BoNT/A [=30µg/ml] zugesetzt (Abbildungen 23 und 24)<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> Der Versuch mit BoNT/A und Bafilomycin A<sub>1</sub> in Anwesenheit von Gangliosiden hat aus technischen Gründen nicht geklappt, aber wir gehen davon aus, dass ähnliche Ergebnisse zu erwarten sind, wie dies die Entsprechende Versuche von Tetanus und Botulinumtoxin Typ B zeigen (s. die dazugehörige Abbildungen).

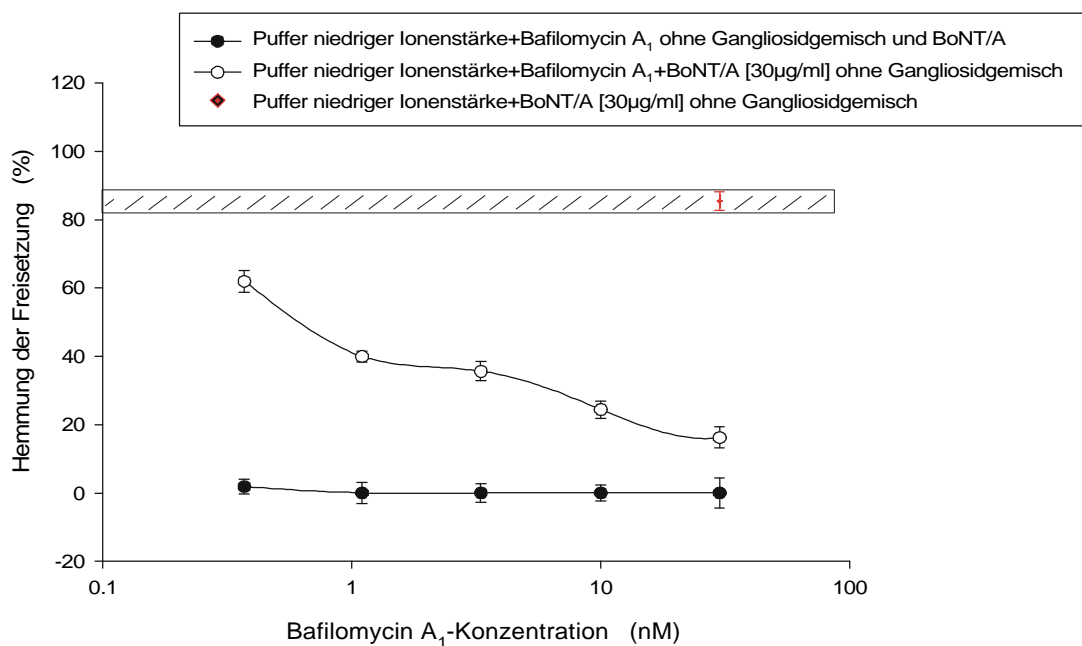
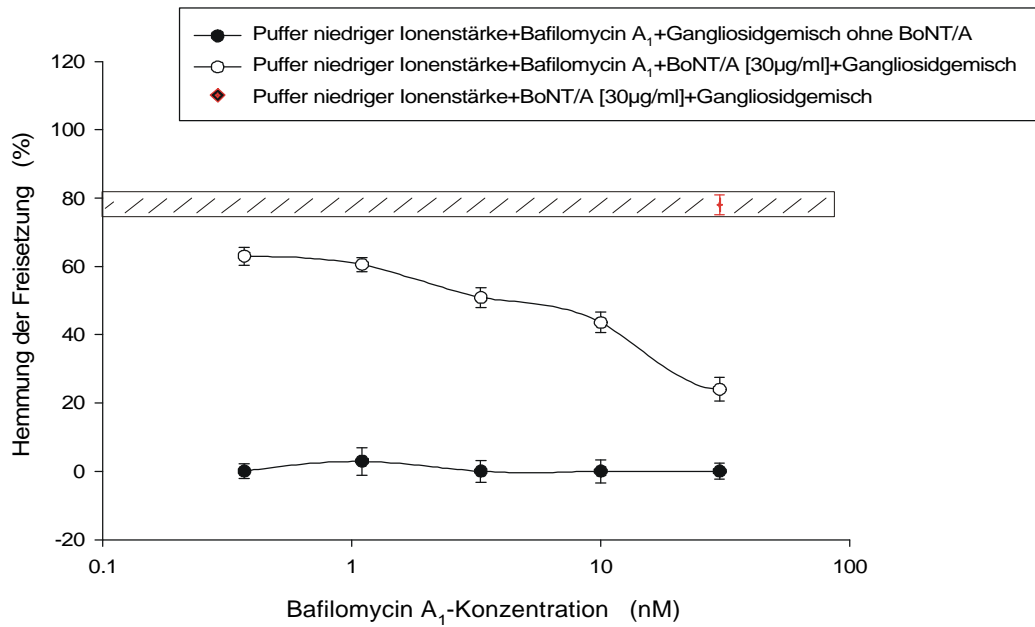


Abbildung 24, Einwirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Hemmung der Exozytose durch BoNT/A in Puffer niedriger Ionenstärke mit einem pH-Wert von 7.2. Die Abszisse zeigt die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> in nM, die Konzentration von BoNT/A ist hier konstant [=30 µg/ml] (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

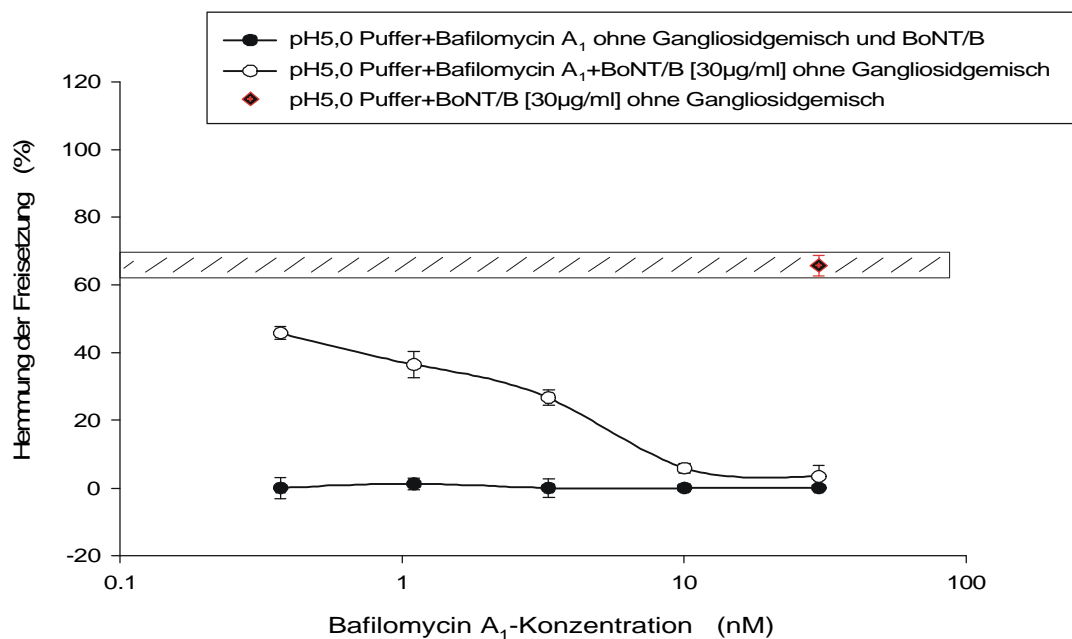
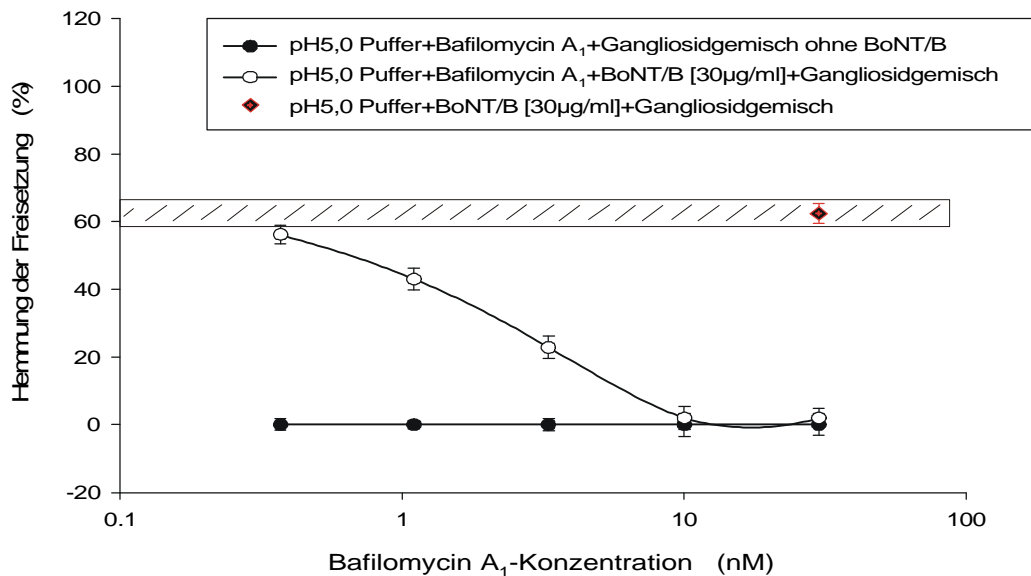


Abbildung 25, Einfluss von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Hemmung der Exozytose durch BoNT/B in sauren pH-Wert. Die Abszisse zeigt die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> in nM, die Konzentration von BoNT/B ist hier konstant [30 µg/ml]. Die Ordinate gibt die Freisetzung in % in Bezug auf Kontrollzellen an, die ohne Toxin und Bafilomycin A<sub>1</sub> behandelt wurden (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

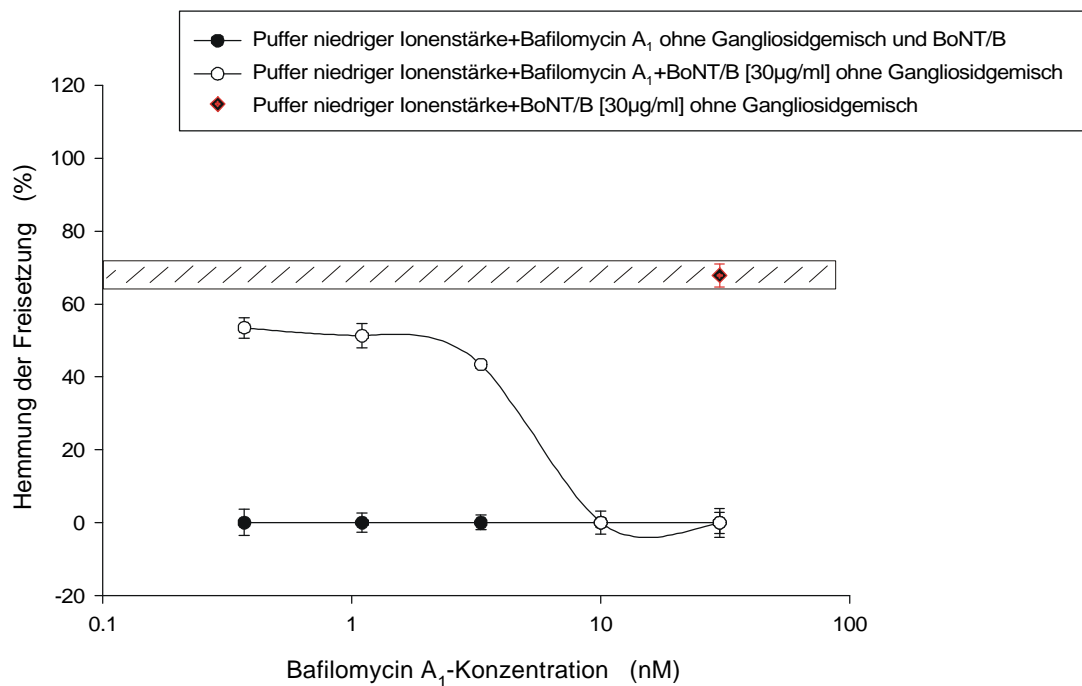
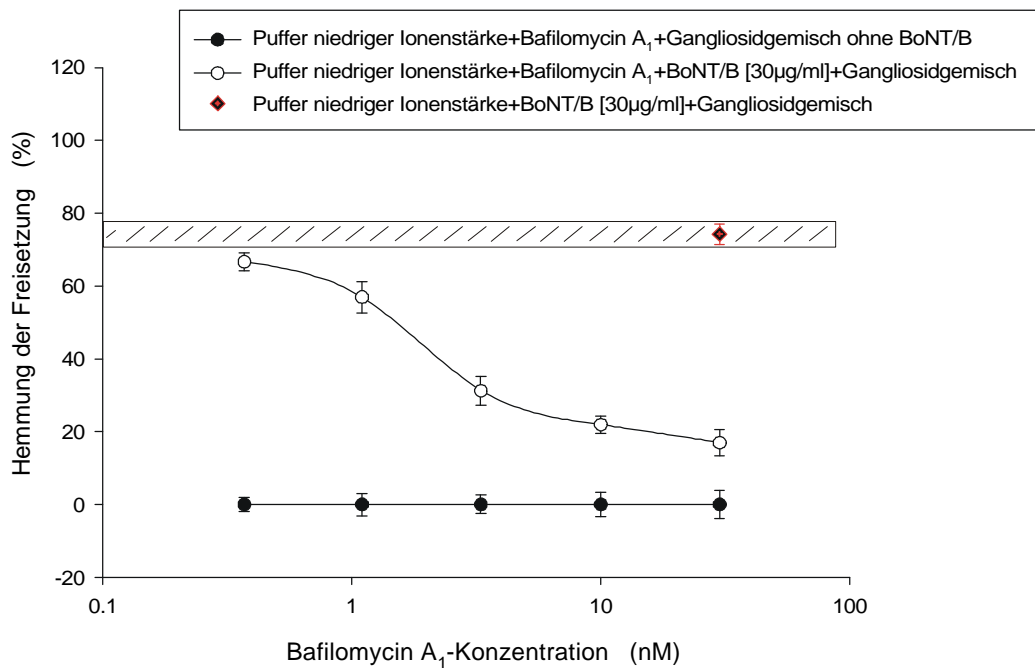


Abbildung 26, Hemmung der Freisetzung durch BoNT/B in Anwesenheit von Bafilomycin A<sub>1</sub> in Puffer niedriger Ionenstärke. Die Abszisse zeigt die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> in nM, die Konzentration von BoNT/B ist hier konstant [=30 µg/ml]. Die Ordinate gibt die Freisetzung in % in Bezug auf Kontrollzellen an, die ohne Toxin und Bafilomycin A<sub>1</sub> behandelt wurden (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

In diesen Experimenten (Abbildungen 25 und 26) wird der Einfluss von dem spezifischen ATP-abhängigen Protonenpumpenhemmer Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Wirkung von Botulinum Neurotoxin Typ B gezeigt. Wie aus den Versuchen zu sehen ist, hemmt Bafilomycin A<sub>1</sub> allein nicht die Freisetzung die in den Vesikeln gespeicherten <sup>3</sup>H-Noradrenalin. In Gegenwart niedriger Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> [10 nM] wird die Wirkung von Clostridientoxinen gehemmt. Hierbei scheint die Art der eingesetzten Puffer keine Rolle zu spielen.

Aus diesen Versuchen (Abbildungen 21-26) könnte die optimale Menge an Bafilomycin A<sub>1</sub>, die notwendig ist um die Wirkung von CNT auf zu heben, ermittelt. In den nächsten Versuchen wurde eine variable Menge an Toxin mit einer konstanten Konzentration an Bafilomycin A<sub>1</sub> [=10 nM] die chromaffine Zellen zugesetzt (Abbildungen 27-32).

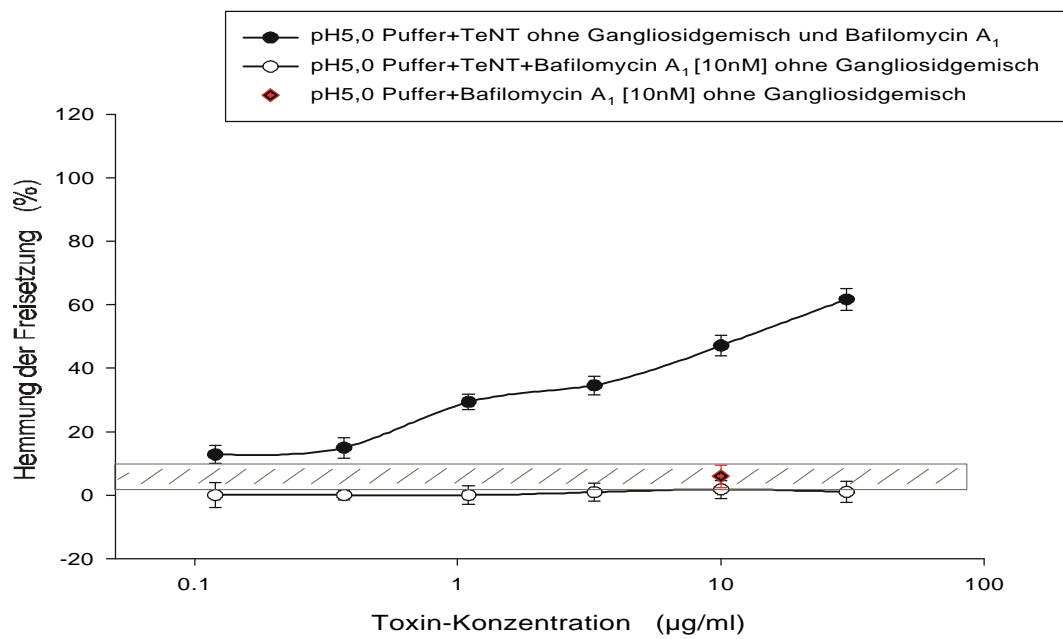
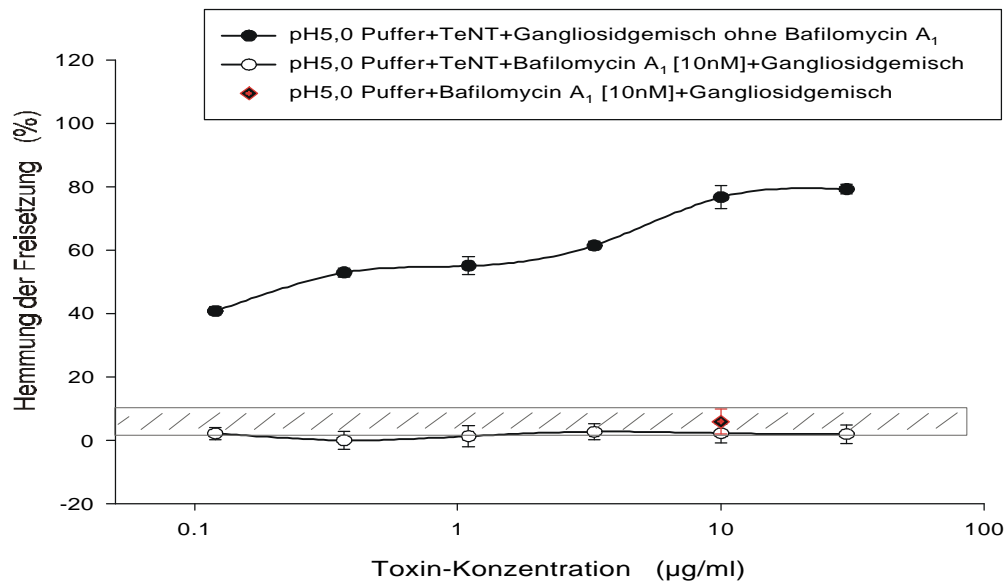


Abbildung 27, Hemmung der Exozytose durch TeNT in sauren pH-Wert mit und ohne Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub> und Gangliosiden. Die Ordinate zeigt die Freisetzung in Prozent der gespeicherten Katecholamine (Mittelwert ± SD, n=3) und die Abszisse zeigt die Konzentration von TeNT in µg/ml. Die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> ist hier konstant [10 nM]. Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.



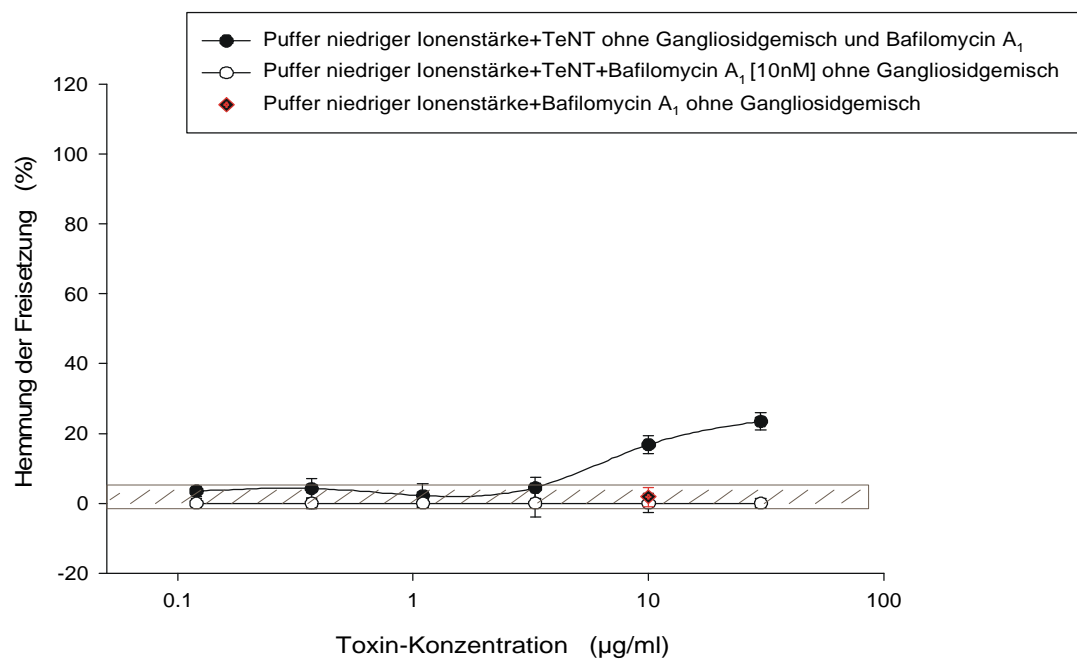
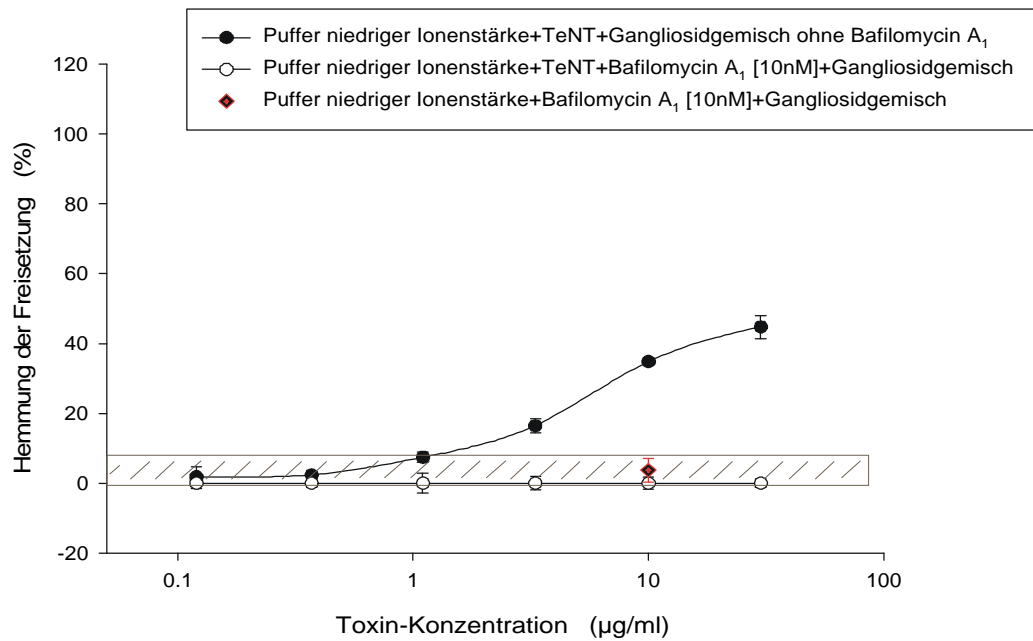


Abbildung 28, Wirkung von TeNT auf die Exozytose mit und ohne Einsatz von Gangliosiden und Bafilomycin A<sub>1</sub> in Puffer niedriger Ionenstärke. Die Ordinate zeigt die Freisetzung in Prozent der gespeicherten Katecholamine (Mittelwert ± SD, n=3) und die Abszisse zeigt die Konzentration von TeNT in µg/ml. Die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> ist hier konstant [10 nM]. Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

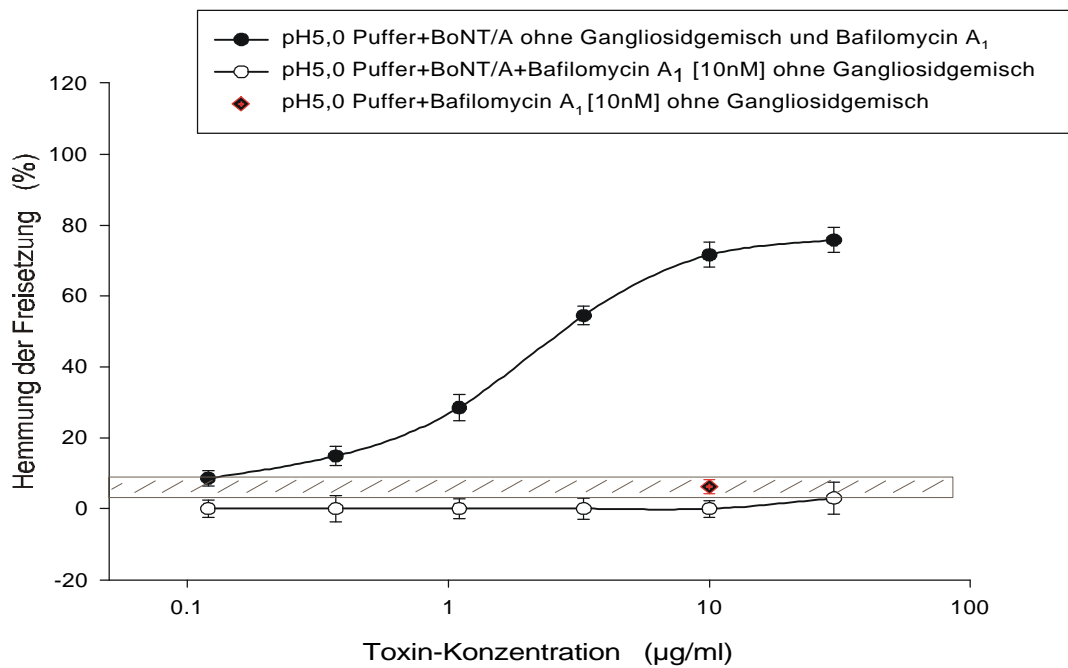
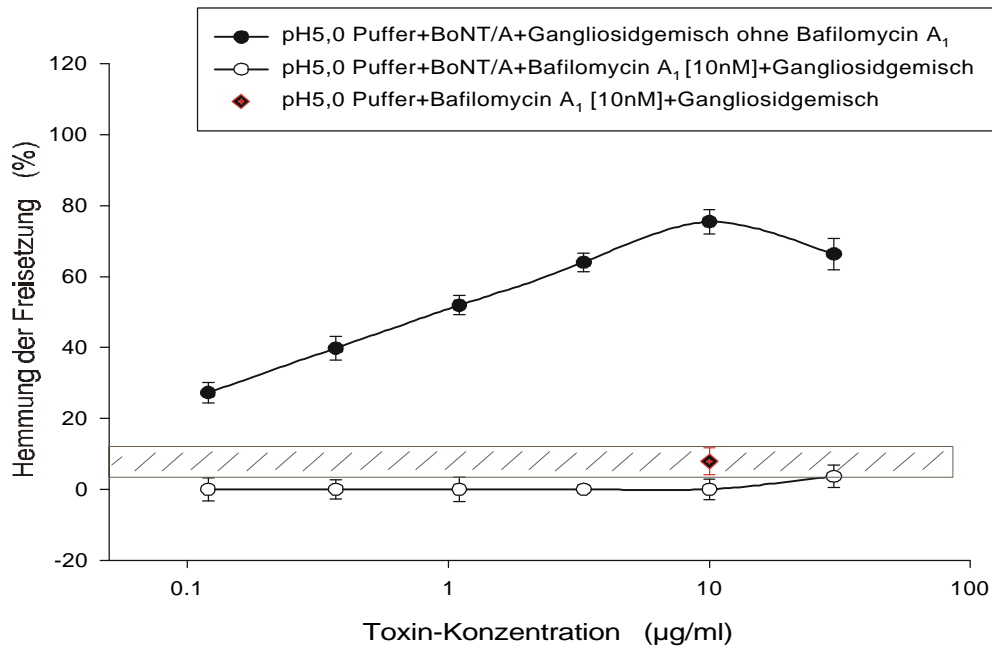


Abbildung 29, BoNT/A-Wirkung auf die Hemmung der Freisetzung unter Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub> mit und ohne Gangliosiden in Saurem Medium. Die Ordinate zeigt die Freisetzung in Prozent der gespeicherten Katecholamine (Mittelwert ± SD, n=3) und die Abszisse zeigt die Konzentration von BoNT/A in µg/ml. Die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> ist hier konstant [10 nM]. Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

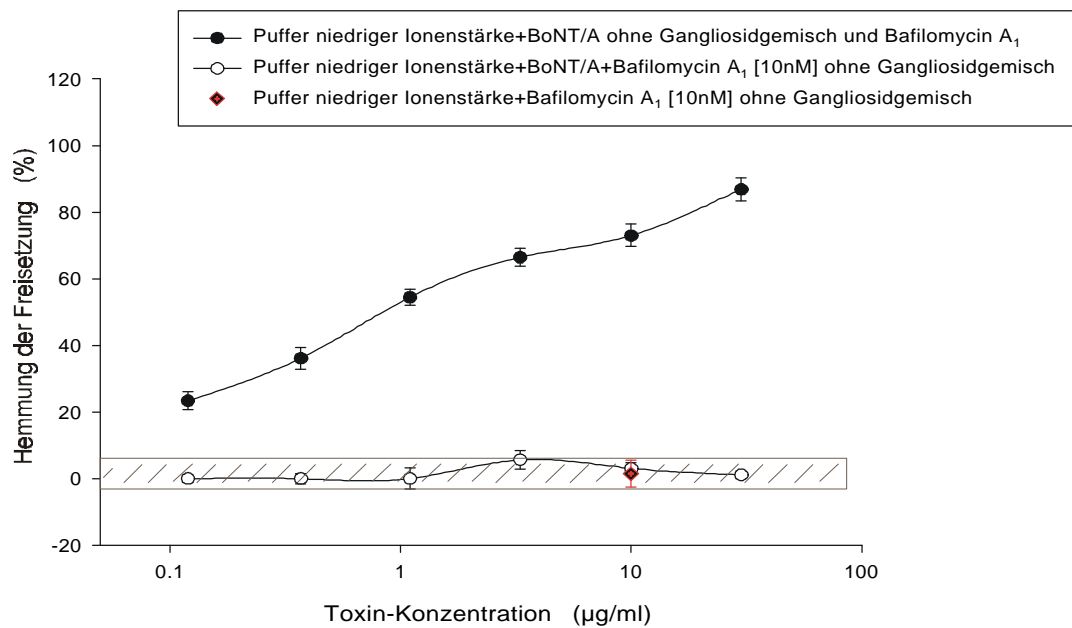
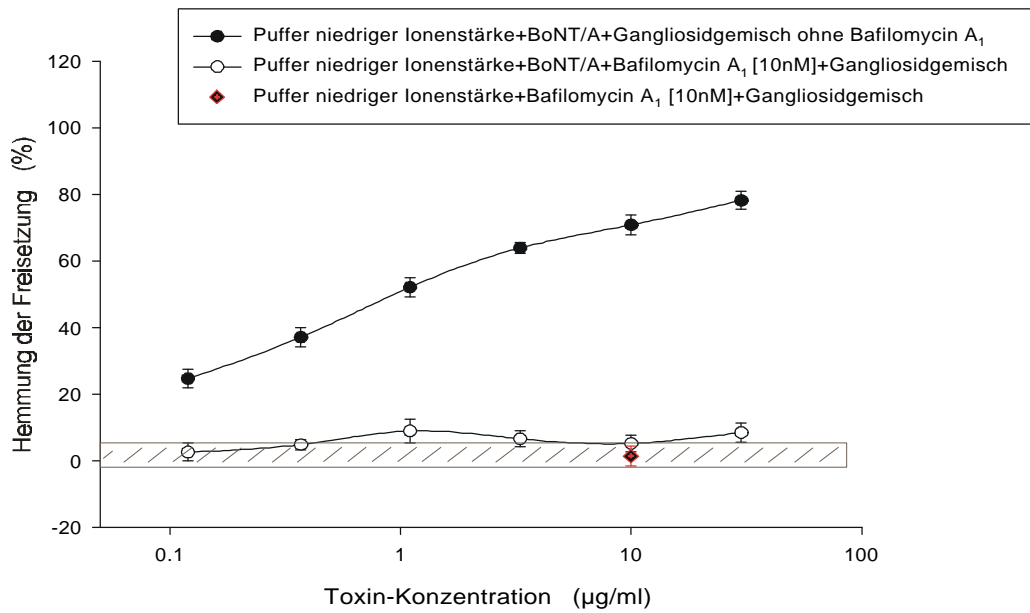


Abbildung 30, Hemmung der <sup>3</sup>H-Noradrenalin Freisetzung durch BoNT/A bei Anwesenheit von Bafilomycin A<sub>1</sub> und mit oder ohne Gangliosiden in Puffer niedriger Ionenstärke. Die Ordinate zeigt die Freisetzung in Prozent der gespeicherten Katecholamine (Mittelwert ± SD, n=3) und die Abszisse zeigt die Konzentration von BoNT/A in µg/ml. Die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> ist hier konstant [=10 nM]. Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

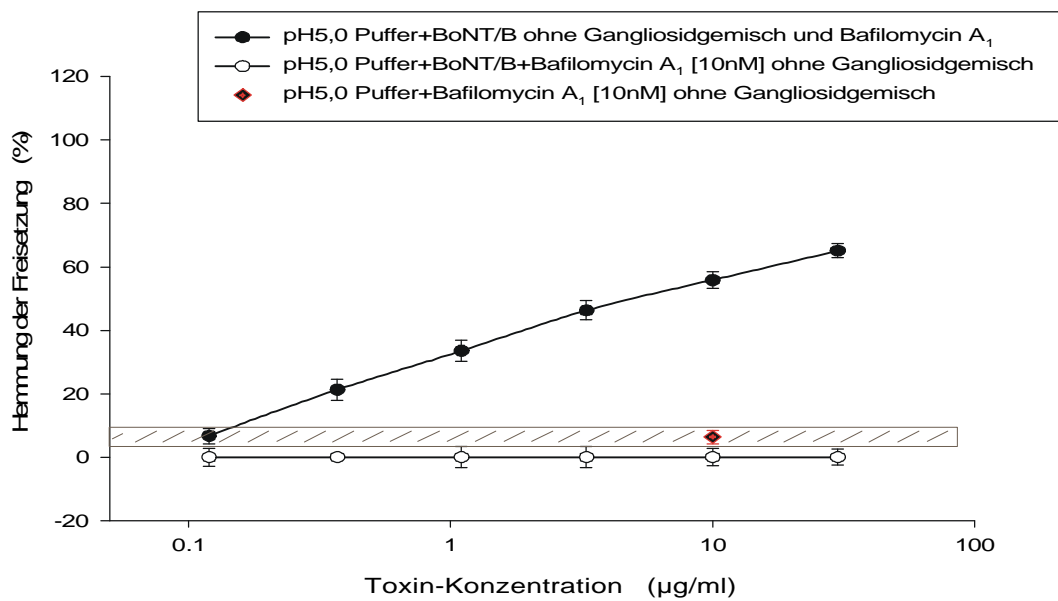
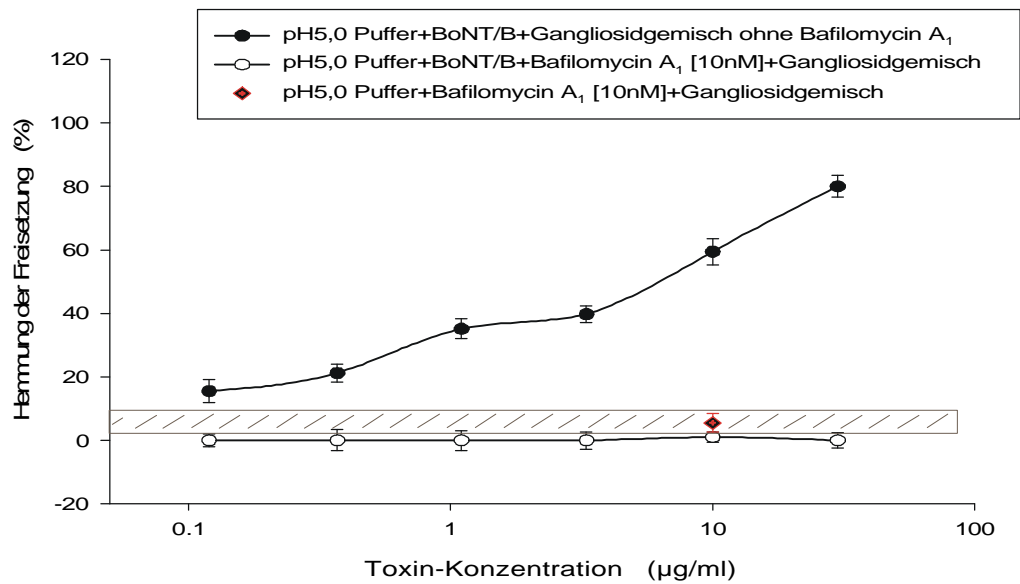


Abbildung 31, Exozytose Hemmung durch BoNT/B in sauren pH-Wert mit und ohne Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub> und Gangliosiden. Die Ordinate zeigt die Menge an freigesetzten <sup>3</sup>H-NA in Prozent der gesamt gespeicherten Radioaktivität in den Zellen (Mittelwert ± SD, n=3) und die Abszisse zeigt die Konzentration von BoNT/B in µg/ml. Die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> ist hier konstant [10 nM]. Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

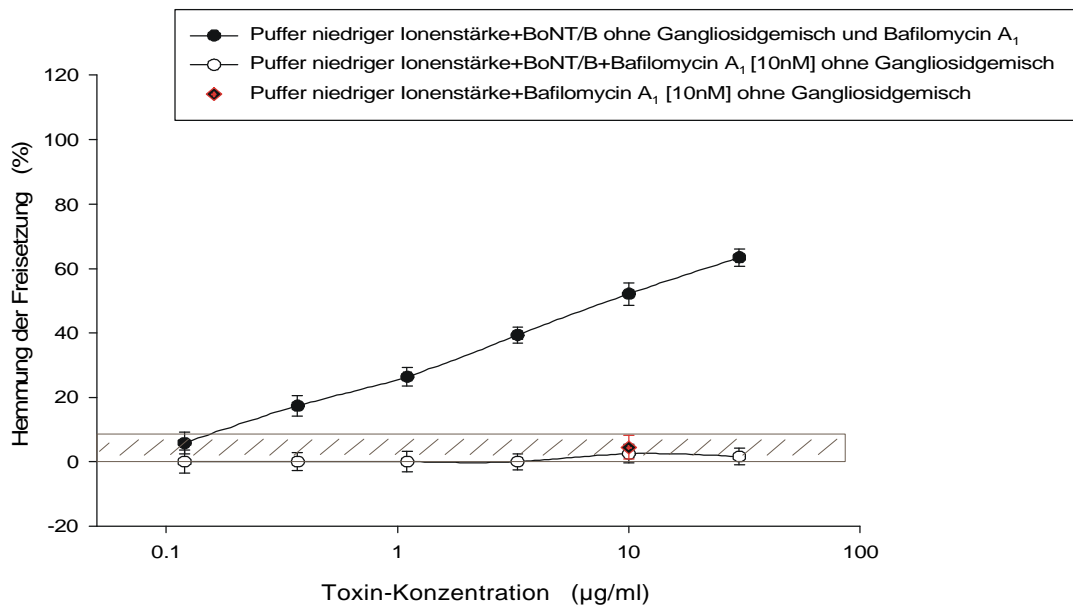
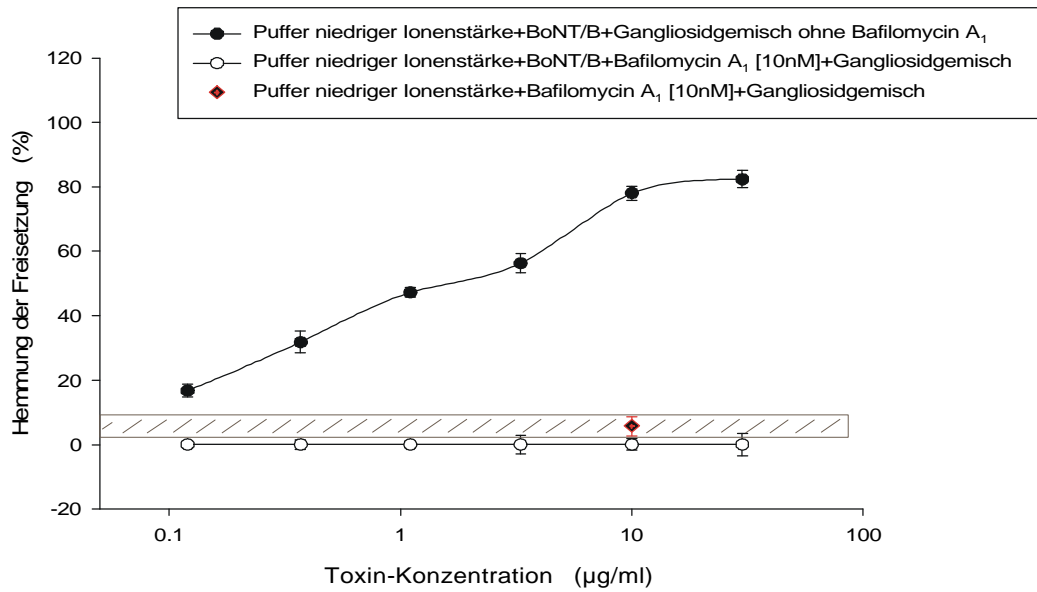


Abbildung 32, Hemmung der Freisetzung in Puffer niedriger Ionenstärke durch BoNT/B ohne und mit Zusatz von Gangliosiden und Bafilomycin A<sub>1</sub>. Die Ordinate zeigt die Menge an freigesetzten <sup>3</sup>H-NA in Prozent der gesamt gespeicherten Radioaktivität in den Zellen (Mittelwert ± SD, n=3) und die Abszisse zeigt die Konzentration von BoNT/B in µg/ml, die Konzentration von Bafilomycin A<sub>1</sub> ist hier konstant [10 nM]. Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

Um den Einfluss des spezifischem  $H^+$ -ATPase-Hemmers, Bafilomycin  $A_1$ , auf die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung durch den Clostridien Toxinen fest zu stellen, wurden Folgendes vorgegangen (Abbildungen 21-32).

Die mit chromaffinen Zellen ausgesäten Platten wurden zur Hälfte mit dem Gangliosidgemisch 250  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Nach 24 h wurde den Zellen mit einer Mischung aus Neurotoxinen unter Zusatz von einer konstanten Menge an Bafilomycin  $A_1$  [=10 nM] und den entsprechenden Puffer VI, Puffer VII für 14 h behandelt. Danach wurde der Puffer komplett gegen DMEM ausgetauscht. Die Zellen über 48 h erholen lassen und anschließend die Hemmung der Exozytose durch die Menge an freigesetzten Neurotransmitter festgestellt. In der Erholungsphase wurde in das Medium eine 3,3 nM/ml Menge an Bafilomycin  $A_1$  zugesetzt. Damit wollte ich eine Nachwirkung von eventuell noch vorhandenen Toxinen auf die Zellen vermeiden.

Wie aus dem ersten Teil dieser Versuche zu sehen war, hemmt Bafilomycin  $A_1$  in einer Konzentration von 10 nM die Wirkung von Clostridientoxinen ganz auf. Dieser Effekt ist unabhängig vom pH-Wert der eingesetzten Lösung und der Anwesenheit von Gangliosiden.

Diese Versuche zeigen, dass die Clostridientoxine und Bafilomycin  $A_1$  miteinander um eine Bindungsstelle konkurrieren.

### 6.7 Wirkung von rekombinant hergestelltem H<sub>N</sub>-Fragment des Tetanustoxins gebunden an zweifach mutierter leichter Kette und von Tetanustoxin bei verschiedenen pH-Werten

Das mutierte rekombinante L-H<sub>N</sub> Fragment von Tetanus unterscheidet sich in der leichten Kette in zwei Aminosäuren „V<sup>233</sup> und Q<sup>234</sup>“ von der nativen leichten Kette des Tetanustoxins (Abbildung 33) (143). Durch diese Mutation sollte die leichte Kette nicht mehr aktiv sein, da die Fähigkeit Zn<sup>2+</sup> zu binden verloren geht. Um dies zu prüfen, wurden beide Proteinen (rekombinant hergestellten L-H<sub>N</sub>/TeNT und natives TeNT) durch Elektroporation in chromaffinen Zellen eingeschleust. Die Toxinaktivität wurde durch die Messung von freigesetzten <sup>3</sup>H-Noradrenalins gemessen. Wie die Abbildung 34 zeigt, ist die rekombinant hergestellte Mutante im Vergleich zum nativen Toxin nicht in der Lage die Exozytose zu hemmen.

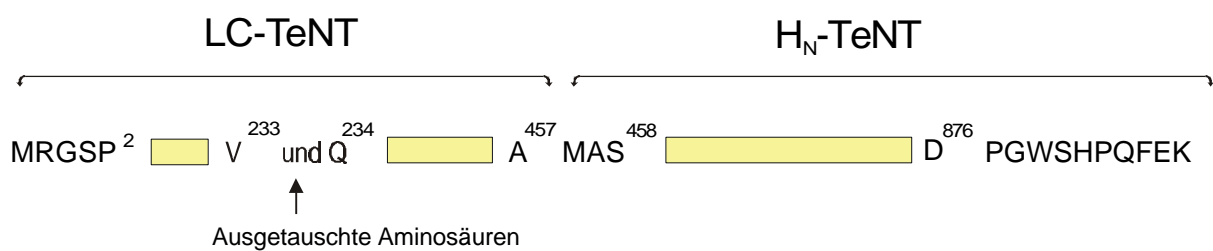


Abbildung 33, Schematische Struktur von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT. Inaktivierung der LC durch Austausch von H (Histidin)<sup>233</sup> in V (Valin)<sup>233</sup> und E (Glutaminsäure)<sup>234</sup> in Q (Glutamin)<sup>234</sup>.

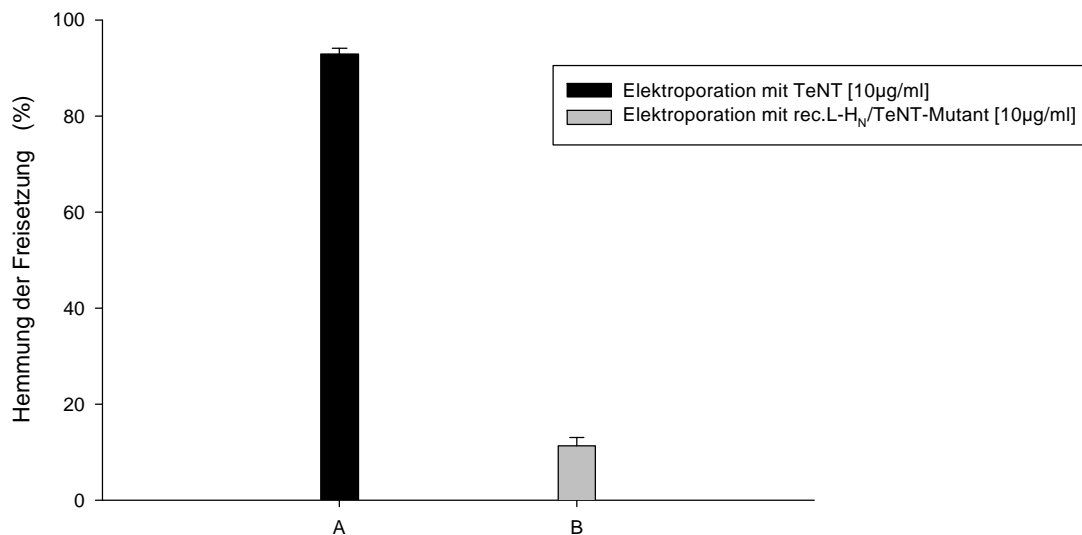


Abbildung 34, EP-Versuch mit nativen TeNT und rekombinant hergestellten H<sub>N</sub>-Teil von TeNT mit zweifach mutierten leichten Kette (Mittelwert ± SD, n=3).

Die Abbildung 34 zeigt, dass durch den Austausch von zwei Aminosäuren die leichte Kette von TeNT seine proteolytische Aktivität verliert. Dies bestätigt auch früheren Befunde (77, 132).

Wie schon in der Einleitung erwähnt, bindet TeNT mit seinem C-terminalen Teil (34 AS) der schweren Kette an Gangliosiden des präsynaptischen Teils von der Nervenzelle und gelangt durch Endozytose in Vesikeln. Nach der ATP-abhängigen Ansäuerung des endosomalen Kompartimentes kommt zur einen Konformationsänderung des N-Terminus von Toxin. Toxin gelangt ins Zytosol und nach der enzymatischen Spaltung in zwei Ketten gelang die leichte Kette an sein Substrat. TeNT spaltet sein Substrat, Synaptobrevin II, und verhindert somit die Fusion der Neurotransmitterhaltigen Vesikel mit präsynaptischer Membran.

In diesem Teil der Arbeit wird die für die Bindung und Transport von TeNT verantwortlichen Domänen untersucht.

In den nächsten Versuchen wurde die Wirkung von den Gesamtoxinen mit und ohne Zusatz von rec.LH<sub>N</sub>/TeNT-Mutant in den, zuvor zur Hälfte mit Gangliosidgemisch behandelten chromaffinen Zellen und in verschiedenen Puffern studiert (Abbildungen 35-40).



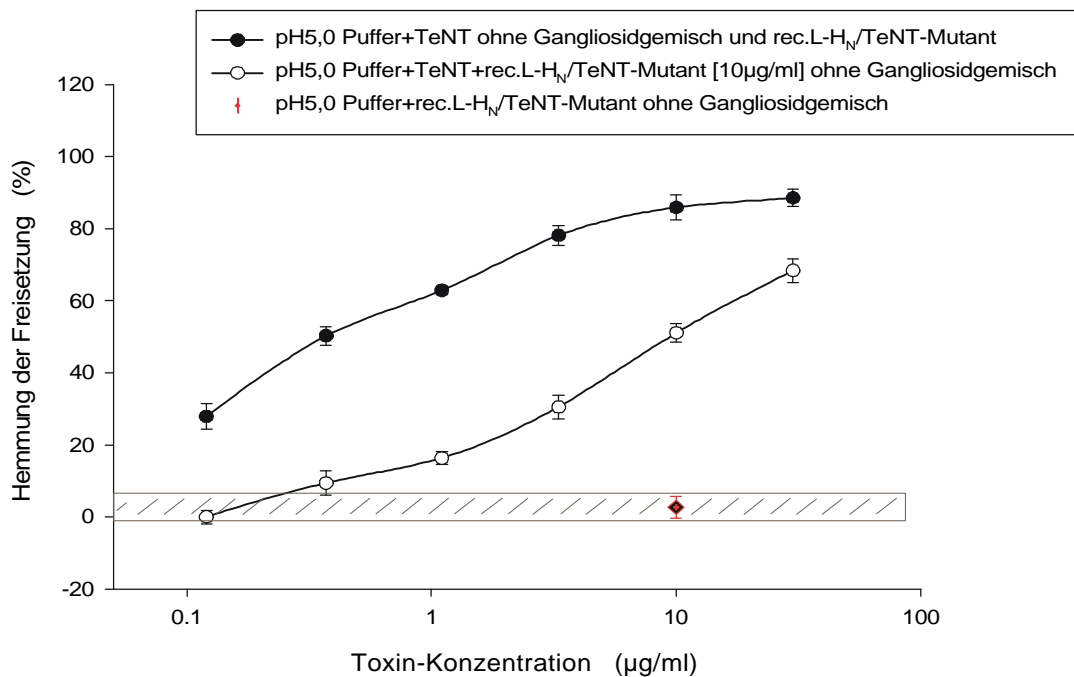
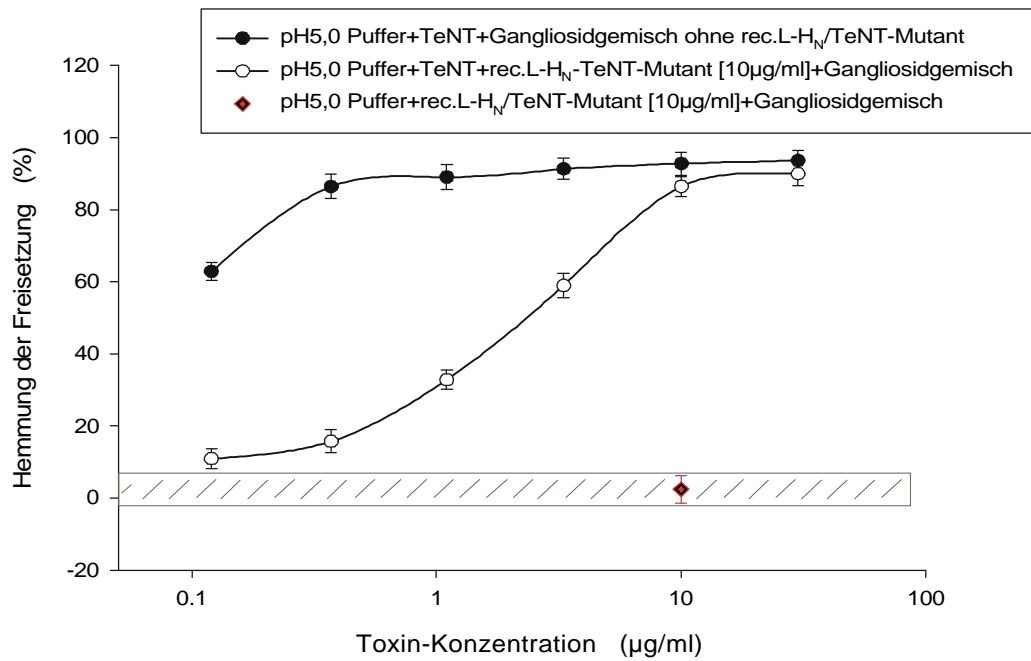


Abbildung 35, Kompetitive Hemmung der Wirkung von TeNT durch rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Doppelmutant in sauren Puffer. Die Ordinate zeigt die Menge an freigesetzten <sup>3</sup>H-NA in Prozent der gesamt gespeicherten Radioaktivität in den Zellen (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

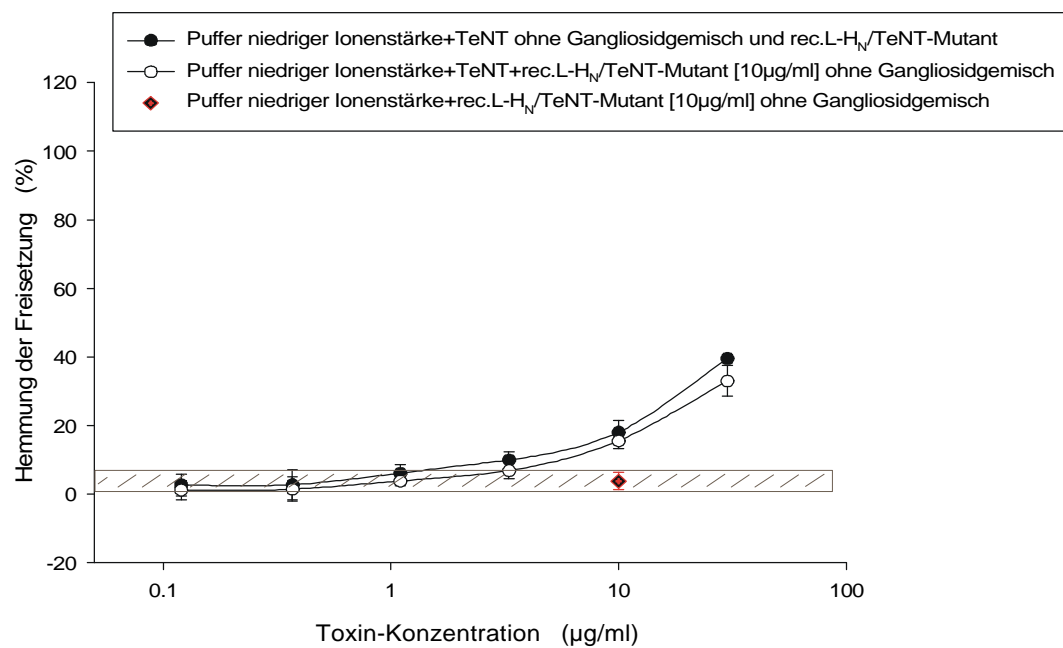
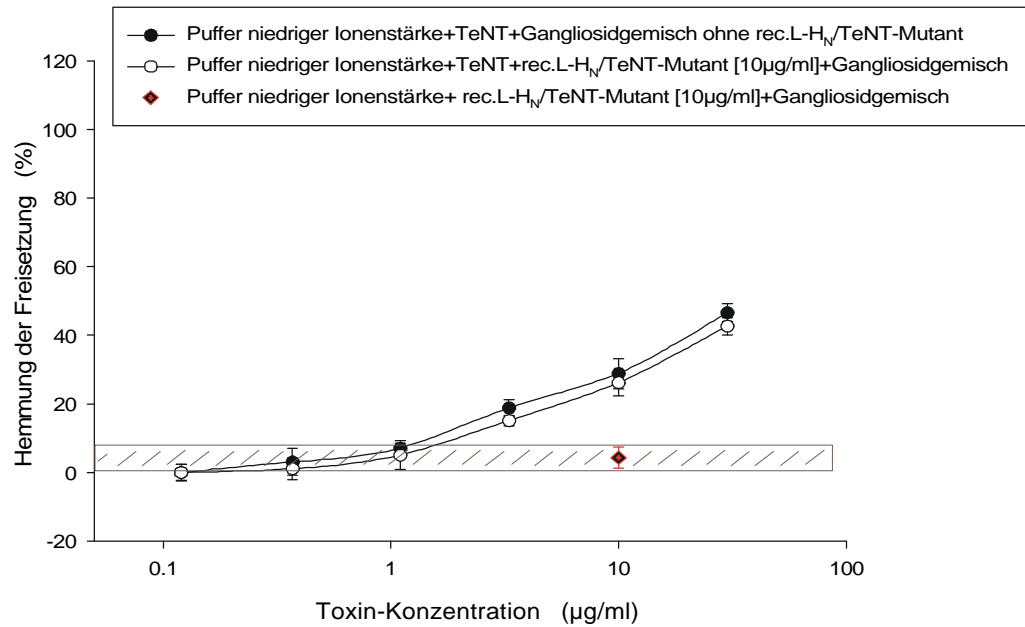


Abbildung 36, Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung durch TeNT unter Zusatz von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutant in Puffer niedriger Ionenstärke. Die Ordinate zeigt die Menge an freigesetzten <sup>3</sup>H-NA in Prozent der gesamt gespeicherten Radioaktivität in den Zellen (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

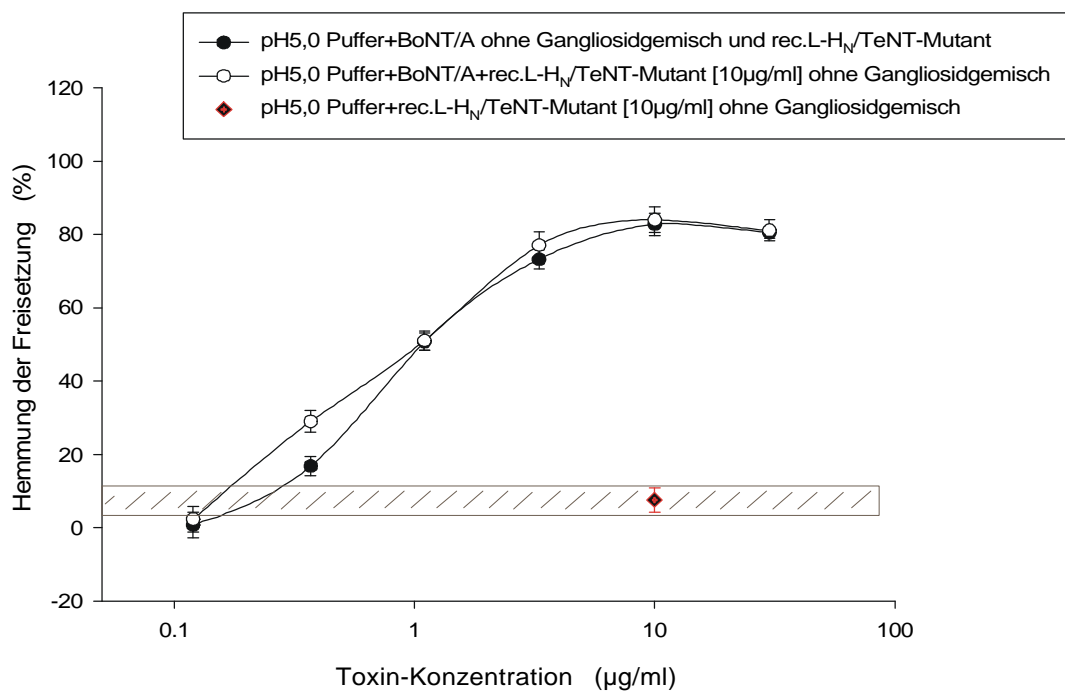
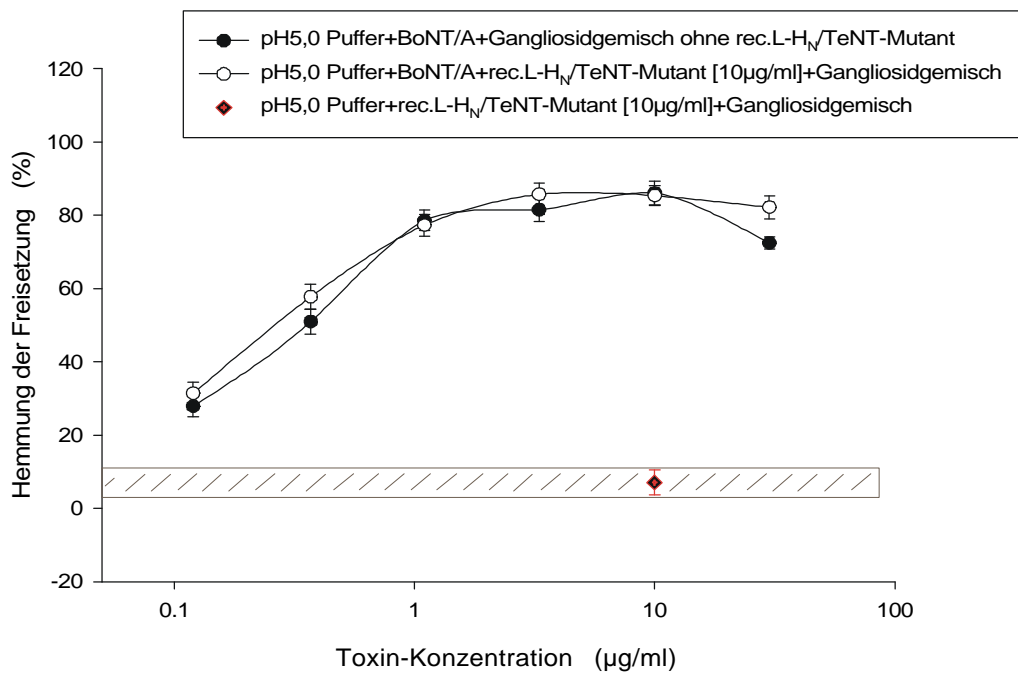


Abbildung 37, Wirkung von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutant auf die Hemmung der Freisetzung durch Botulinum Toxin Typ A in saurem pH-Wert (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

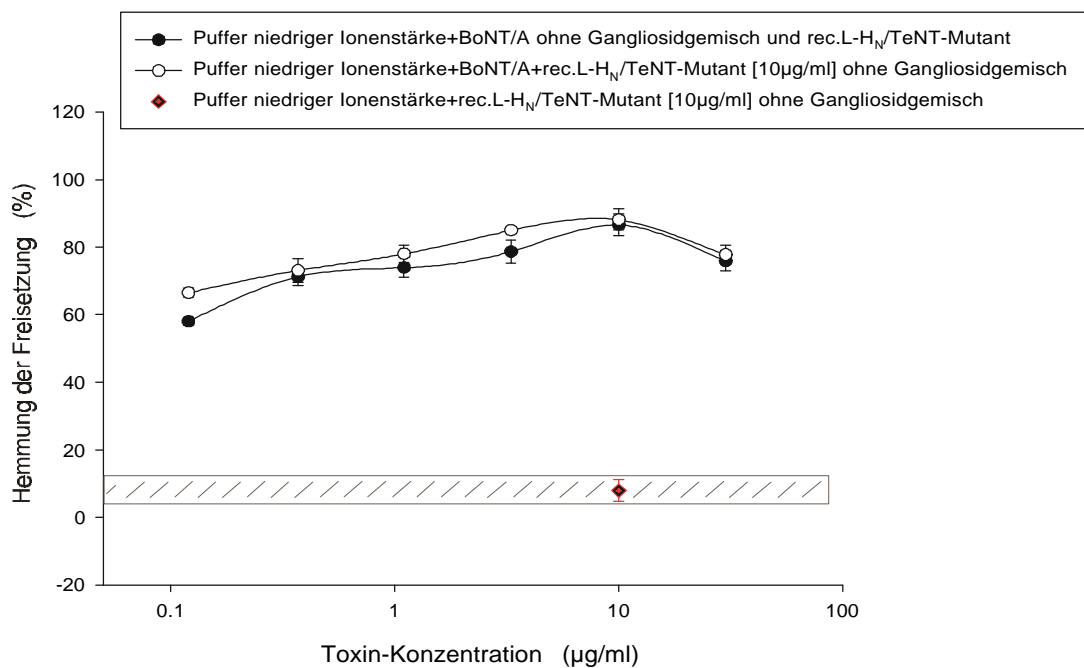
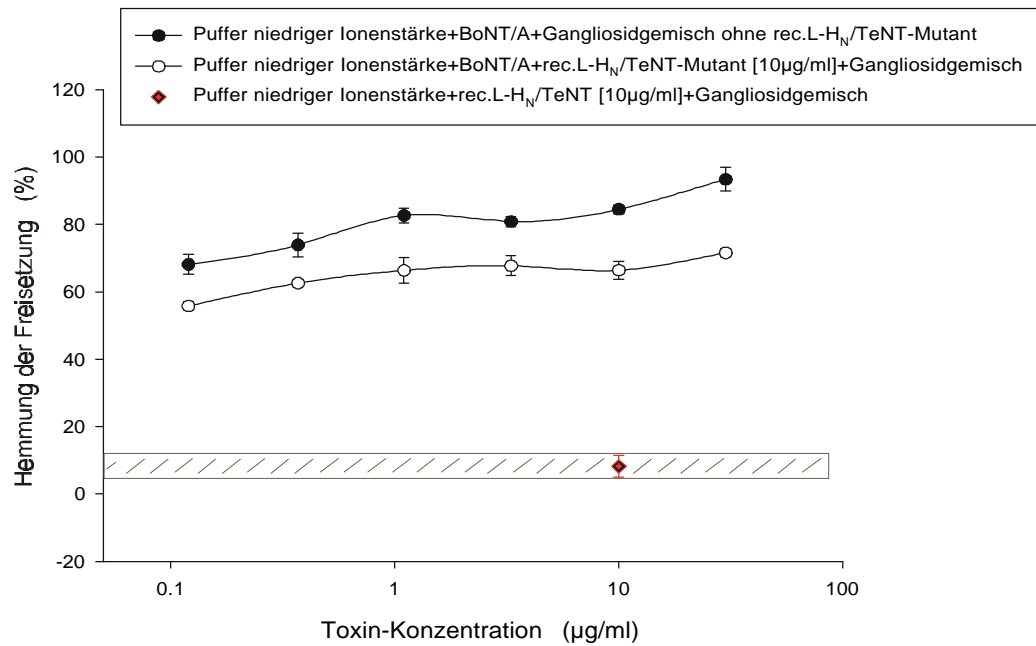


Abbildung 38, Einwirkung von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutant auf die Hemmung der Exozytose durch BoNT/A in Puffer niedriger Ionenstärke (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

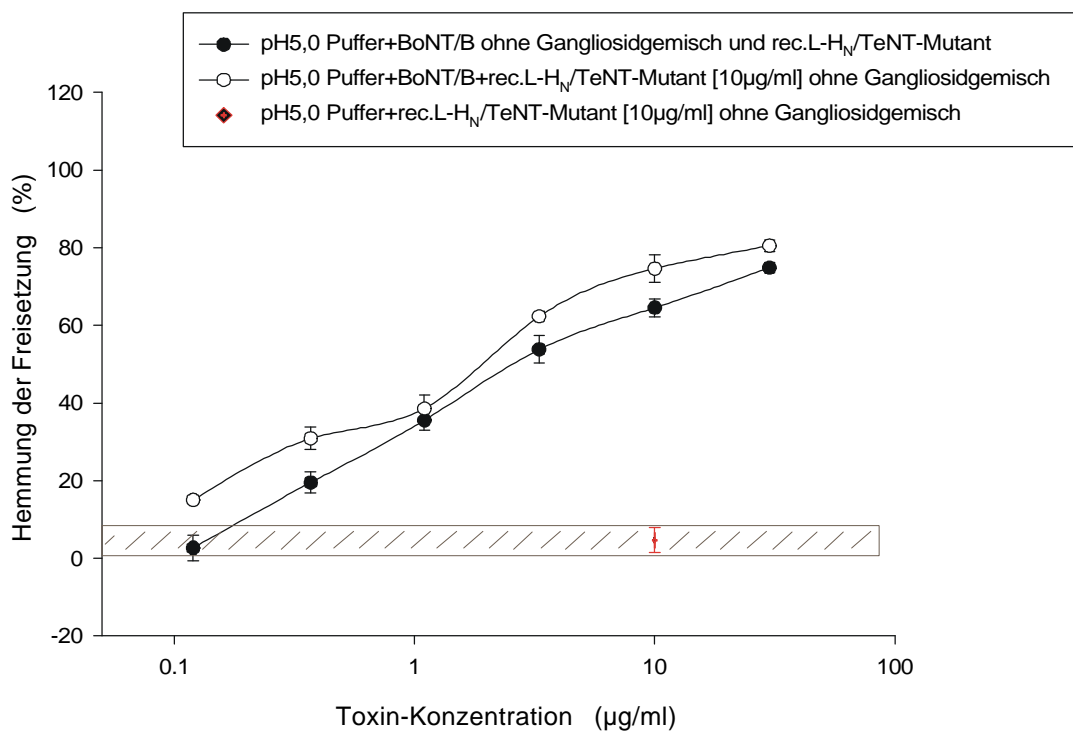
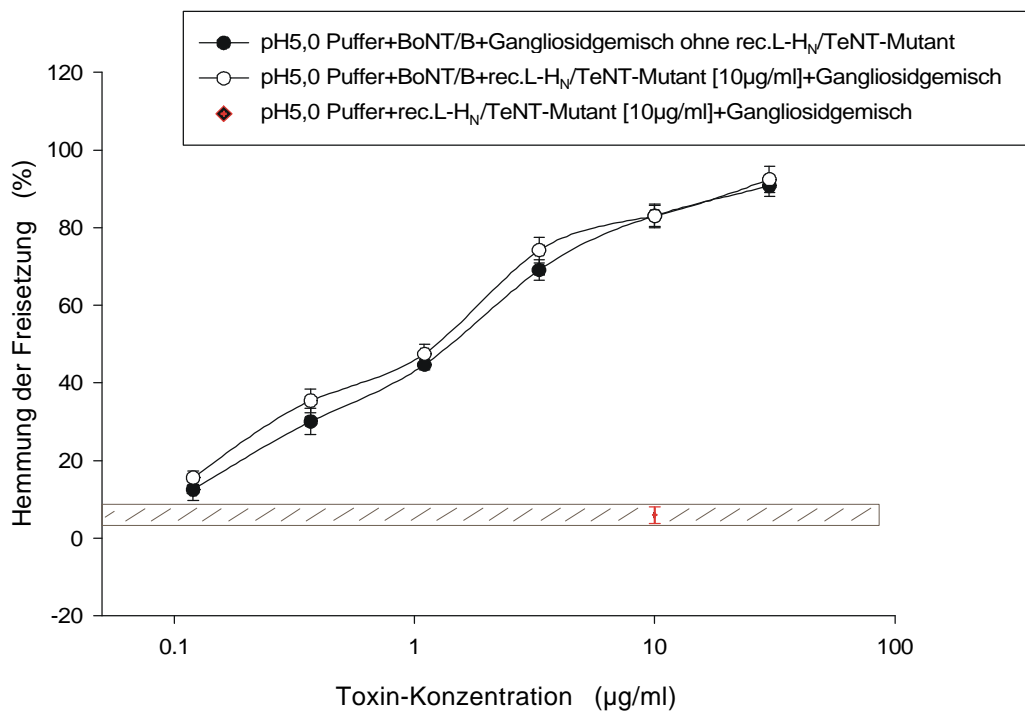


Abbildung 39, Hemmung der Freisetzung von <sup>3</sup>H-Noradrenalin durch BoNT/B unter Zusatz von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutant in saurem Medium (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

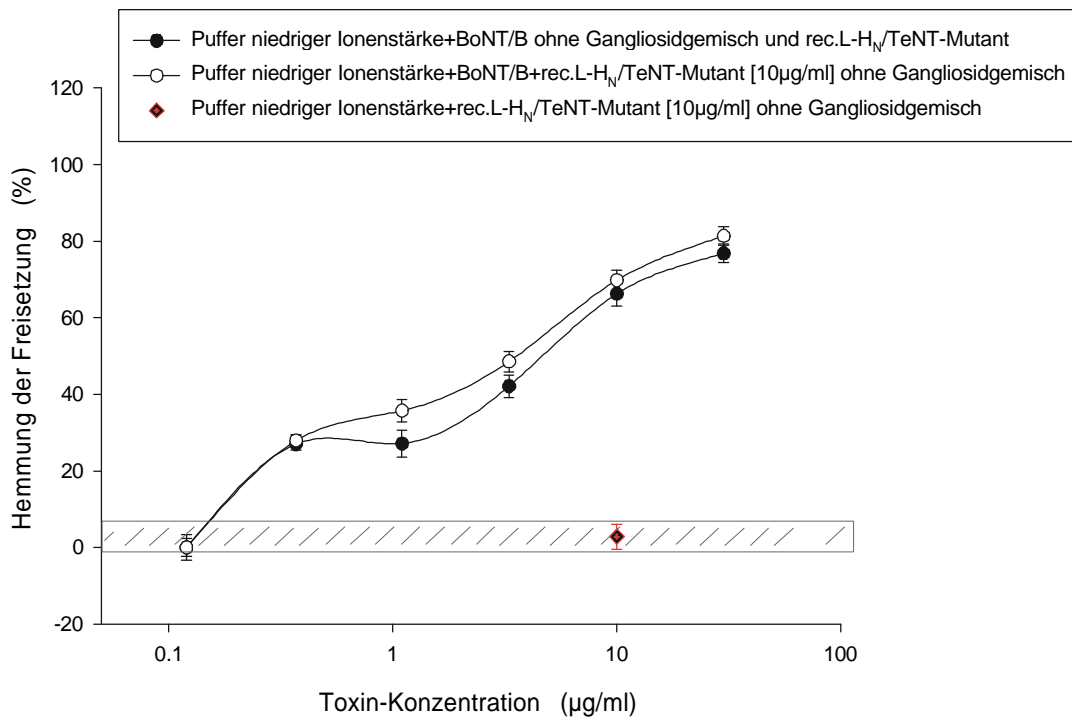
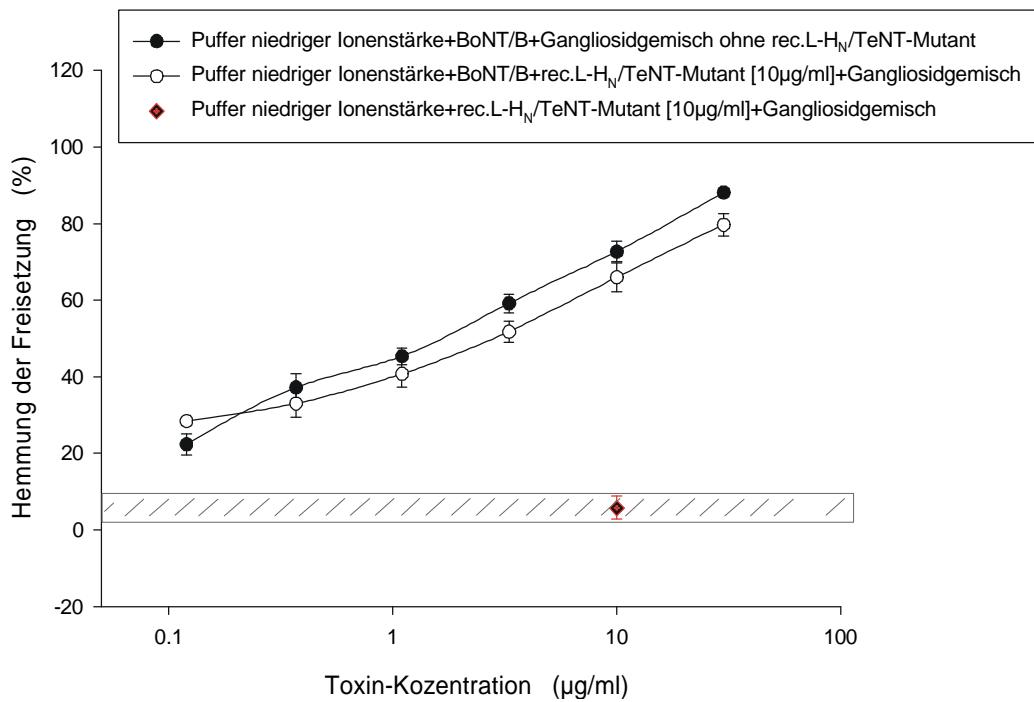


Abbildung 40, Wirkung auf die Freisetzung durch BoNT/B in Anwesenheit von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutant in Puffer niedriger Ionenstärke (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

Chromaffine Zellen wurden mit Gangliosiden [250 µg/ml] angereichert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit den entsprechenden Clostridien Neurotoxinen und Puffern (Phosphatpuffer, pH = 5.0 (VI) und Puffer niedriger Ionenstärke, pH = 7.3 (VII)) für 8 h inkubiert. Ein anderer Teil der Kulturen wurde mit den entsprechenden Clostridien Neurotoxinen und Puffern (VI, VII) unter Zusatz vom rekombinanten doppelmutierten L-H<sub>N</sub>-Teil des Tetanustoxins versetzt. Nach 15 h wurden die Puffer gegen DMEM ausgetauscht. Nach weitere 48 h wurde die Hemmung der Exozytose an Hand der freigesetzten Menge an Neurotransmitter festgestellt.

Wie die Abbildung 35 zeigt, wird die Blockade der Exozytose durch Tetanus Toxin in Anwesenheit von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutante aufgehoben. Diese Hemmung ist am deutlichsten in saurem Medium und Anwesenheit von Gangliosiden. Wie vorher erwähnt, in Ionenarmer Puffer ist die Bindung zwischen CNT und Ganglioside verstärkt. Deshalb ist keine Verdrängung hier zu sehen (Abbildung 36).

Diese Verdrängung durch rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutante kann erklärt werden indem, dass ein zweiter Proteinrezeptor für die Bindung der CNT in chromaffinen Zellen vorhanden ist. Da die Translation von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutante in die Zelle hindurch nicht stattfinden kann, weil der H<sub>C</sub>-Teil, der für die Bindung des Toxins an die Gangliosiden essentiell ist, bei diesem Fragment fehlt, kommt eine andere Bindungsstelle (Rezeptor) als Ganglioside in Frage. Durch die Bindung von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutante an diesen Rezeptor (Bindungsstelle) kommt zur einer Wirkungsminderung des TeNT.

Während dieser Effekt spezifisch für das Tetanustoxin war, wurde die durch Botulinumtoxine induzierte Blockade der Exozytose nicht beeinflusst (Abbildungen 37, 39 und 40).

Nur bei dem Versuch mit BoNT/A in Anwesenheit von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutante und Gangliosiden in Puffer niedriger Ionenstärke konnte eine Verdrängung um Faktor 9 erzielt werden (Abbildung 38 und Abbildung 53).

### 6.8 Wirkung auf die Hemmung der Exozytose durch Tetanus Toxin unter Zusatz von rec.L-HN/TeNT-Intakt mit und ohne Gangliosiden in sauren Puffer

Bei intaktem rekombinanten L-H<sub>N</sub>-Fragment des Tetanustoxins fehlt den C-terminalen Teil, der für die Bindung des Toxins an Gangliosiden zuständig ist. Bei diesem Fragment unterscheidet sich die leichte Kette nicht von nativem Toxin (Abbildung 41). Dem zur Folge sollte dieses Fragment in die Zelle genauso Aktiv sein wie das native Holotoxin.

Zunächst wurde die Aktivität von Tetanus Toxin und rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Intakt durch freigesetzte Menge an <sup>3</sup>H-Noradrenalin nach der Elektroporation bestimmt. Beide Proteine zeigen identische Aktivitäten (Abbildung 42).

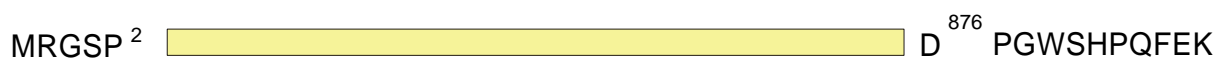


Abbildung 41, Schematische Struktur des rec.L-H<sub>N</sub>/Tetanus Toxins mit nicht mutierter leichter Kette.

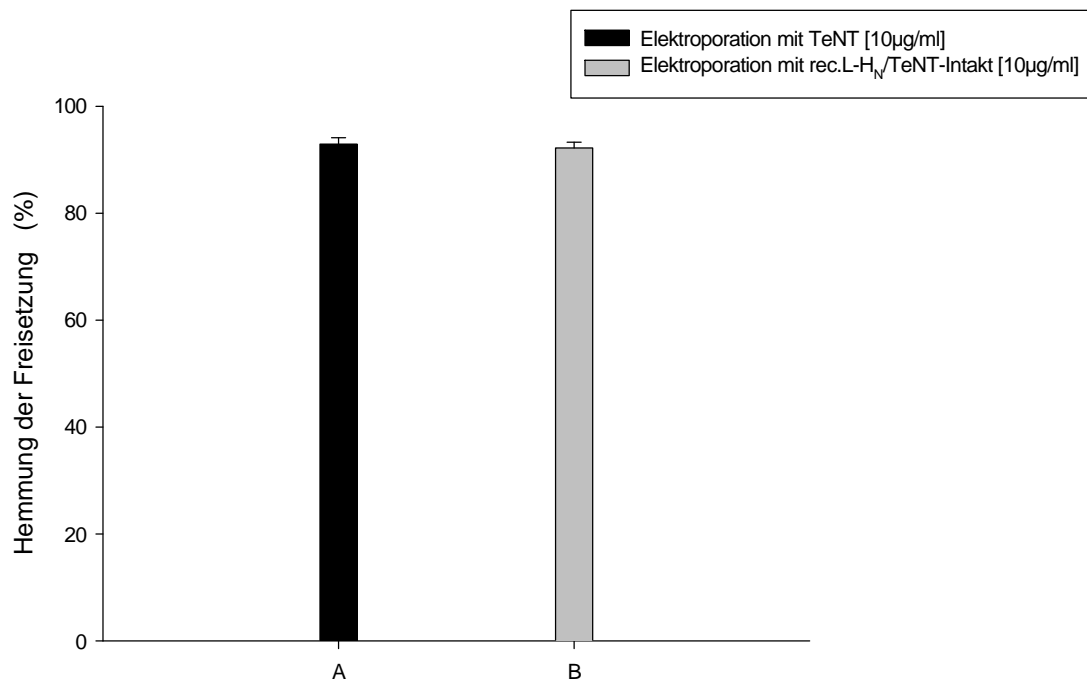


Abbildung 42, Freigesetzte Katecholamin nach der Elektroporation mit TeNT und rec.L-H<sub>N</sub>(2-876)/TeNT-S-Intakt [=10µg/ml] (S: Steht für Strep-tag<sup>®</sup>-II) (Mittelwert ± SD, n=3).



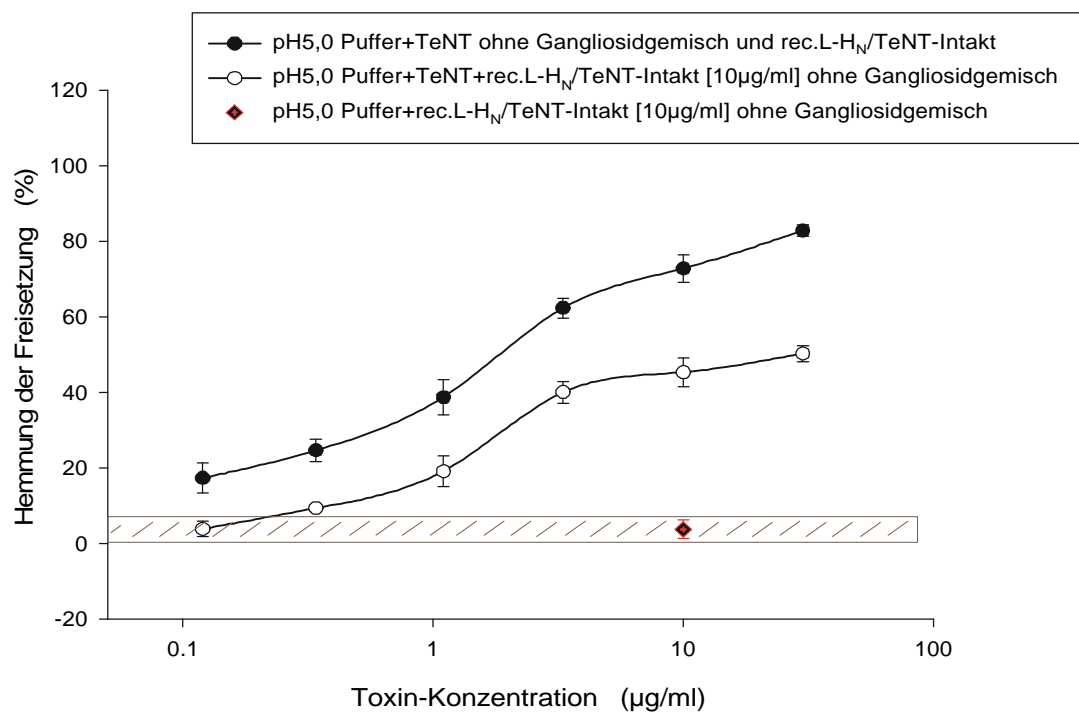
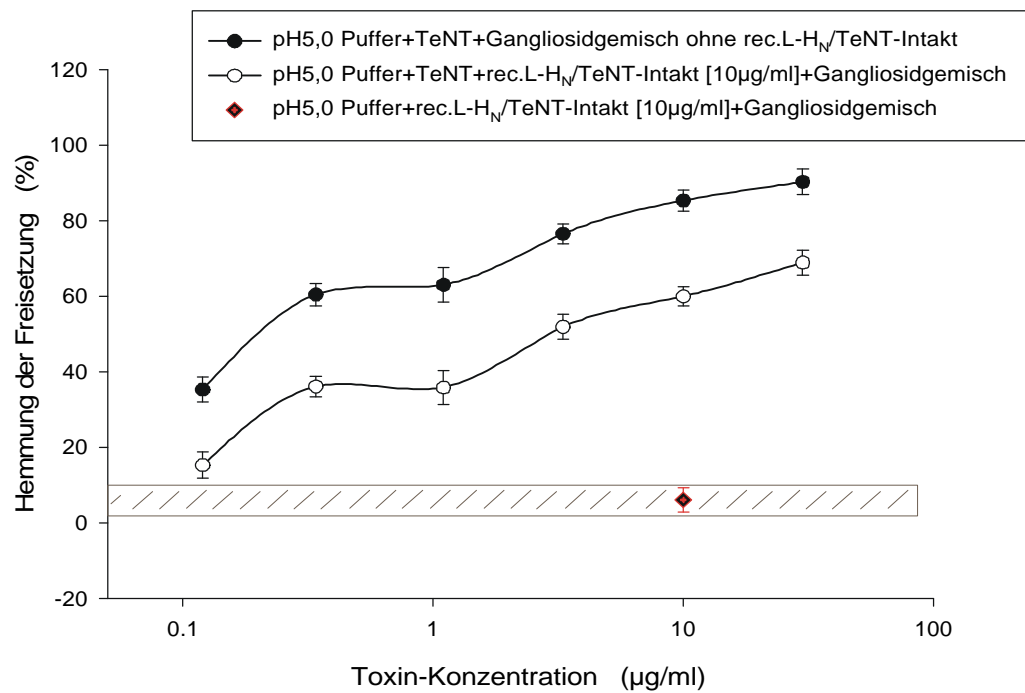


Abbildung 43, Wirkung des rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT mit intakter leichten Kette auf die Neurotransmitterfreisetzung durch das gesamte Tetanus Toxin in saurem Medium (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

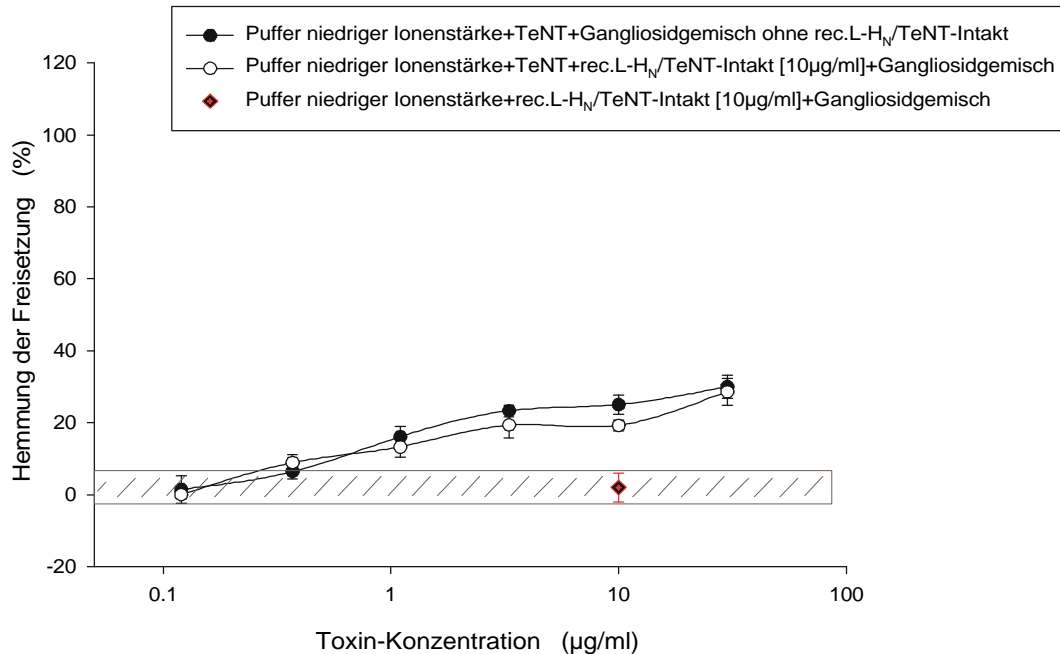


Abbildung 44, Einwirkung von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Intakt auf die Hemmung der <sup>3</sup>H-NA Freisetzung durch TeNT in Puffer niedriger Ionenstärke mit pH-Wert von 7.2 (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

In den Versuchen (Abbildungen 43 und 44) wurde die Hälfte die zu untersuchten chromaffinen Zellen mit 250 µg/ml Gangliosidgemisch versetzt und anschließend nach 14 h mit dem entsprechenden Clostridientoxin in saurem Medium (Puffern VI) oder Puffer niedriger Ionenstärke (Puffer VII) und unter Zusatz von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Intakt versetzt. Nach einer Inkubation von weiteren 48 h im Kulturmedium wurden die Freisetzungsversuche durchgeführt.

Aus obigen Versuchen kann man schließen, dass der Zusatz vom rekombinant hergestellten H<sub>N</sub>-Fragment des Tetanus Toxins mit intakter leichter Kette die Hemmung der Exozytose durch Tetanus Toxin in saurem Milieu, wie die rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Mutant aufhebt. Diese Hemmung kann nicht auf die Aufnahme von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT-Intakt in die Zelle und die enzymatische Eigenschaft seiner leichten Kette und Spaltung von VAMP ins Zytosol zurückgerufen werden. Mit einer kompetitiven Hemmung am Substrat weder durch intaktes noch durch mutiertes rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT ist zurechnen (206).

### 6.9 Dosiswirkungskurve mit BoNT/A und unter Zusatz von rec.L-H<sub>N</sub>/BoNT/A

Im Vergleich zu den letzten Versuchen, die mit rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT (zweifach mutierten und intakten leichten Kette) durchgeführt wurde, wurde hier mit rec.L-H<sub>N</sub>/BoNT/A gearbeitet. Hier fehlt auch der H<sub>C</sub>-Teil der schweren Kette (30 AS), der für die Bindung des Toxins an Gangliosiden essentiell ist. Zunächst wurde die Wirkung beider Proteinen (BoNT/A und rec.L-H<sub>N</sub>/BoNT/A) in elektroporierten Zellen durch Messung der freigesetzten Menge an <sup>3</sup>H-NA ermittelt. Das rekombinant hergestellte H<sub>N</sub>-Fragment mit intakter leichter Kette des Botulinum Toxins A hemmt wie erwartet die Katecholaminfreisetzung genauso wie das native Botulinum Toxin Typ A (Abbildung 45).

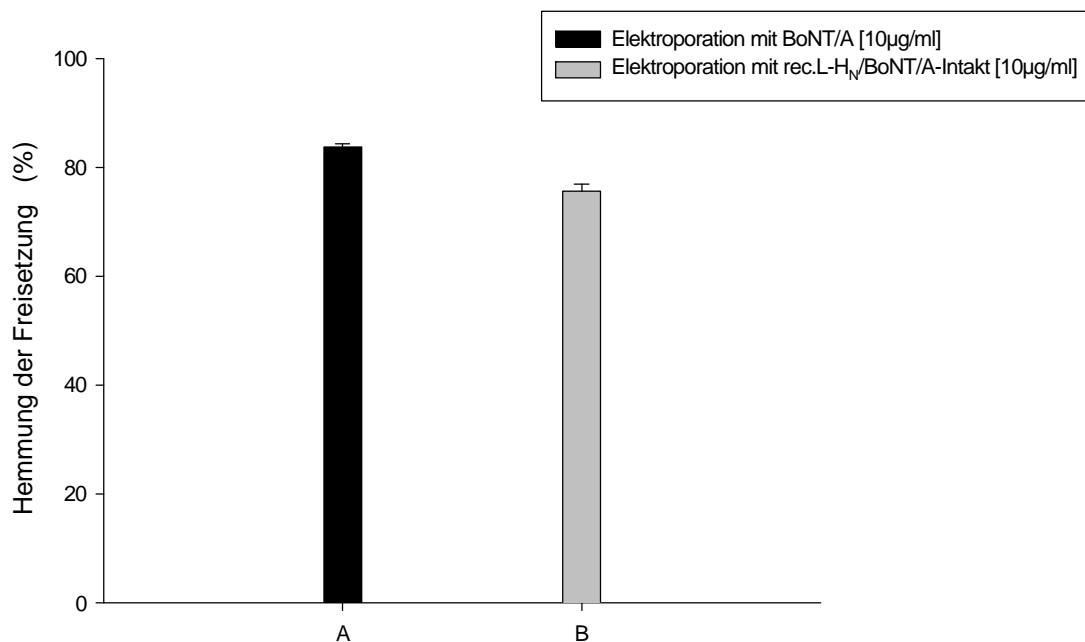


Abbildung 45, Elektroporation der chromaffinen Zellen mit nativem und rekombinant hergestelltem L-H<sub>N</sub>-Teil von Botulinum Toxin Typ A. 48 h nach der Elektroporation fand der Freisetzungsvorversuch statt (Stimulation mit 500 µM Carbachol). Die Ordinate zeigt die Freisetzung von <sup>3</sup>H-NA in Prozent der Gesamtradioaktivität (Mittelwert ± SD, n=3).

In darauf folgende Versuche wurde die Wirkung von Botulinumneurotoxin Typ A auf die Freisetzung von Noradrenalin aus chromaffinen Zellen in Anwesenheit von rec.L-H<sub>N</sub>/BoNT/A in saurem Milieu und Puffer niedriger Ionenstärke untersucht (Abbildung 46).

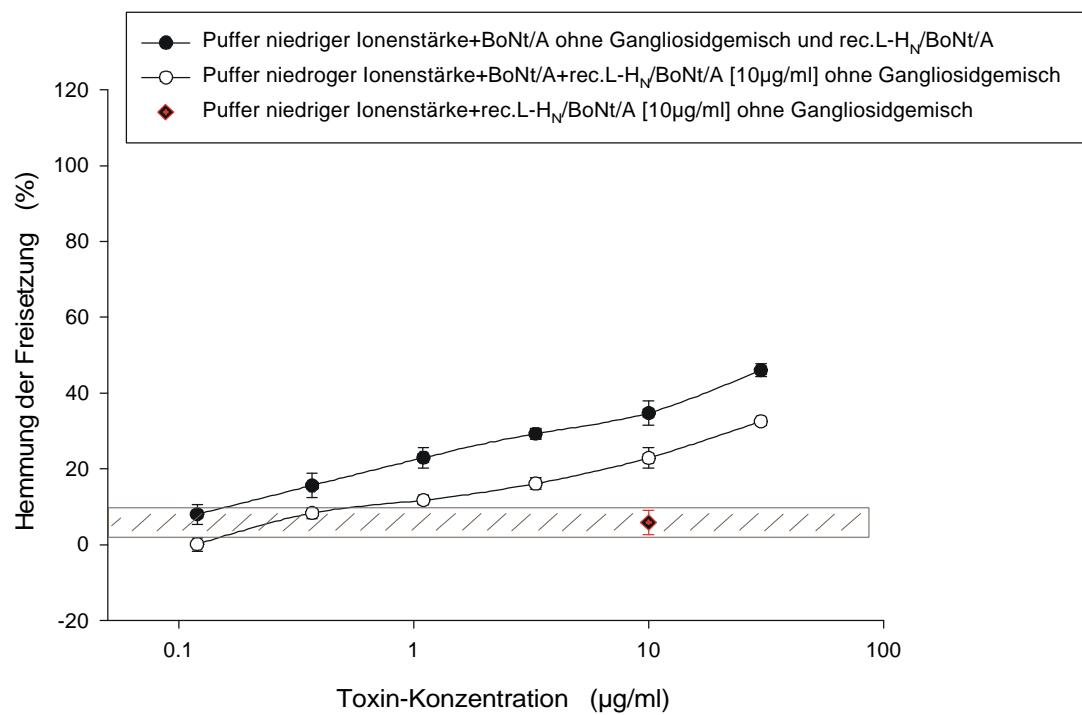
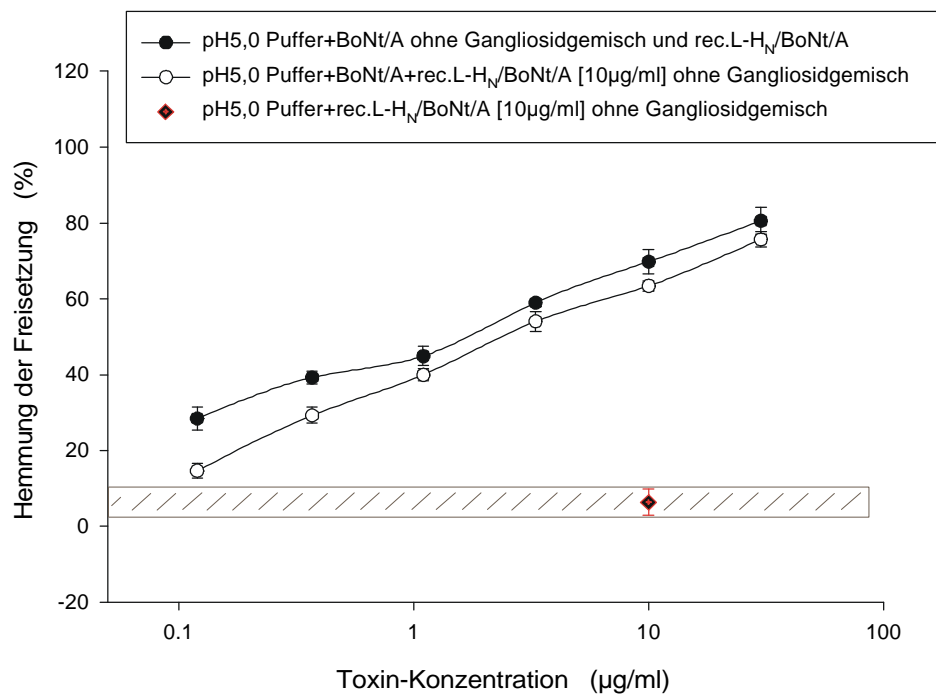


Abbildung 46, Einwirkung auf die Hemmung der Exozytose durch BoNT/A unter Einsatz von rec.L-H<sub>N</sub>/BoNT/A in saurem (oben) und Puffer niedriger Ionenstärke (unten); Beide Einsätze ohne Zusatz von Gangliosiden (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

Um Botulinumtoxin Typ A in chromaffinen Zellen einzuschleusen, braucht man die Zellen nicht mit Gangliosidgemisch zu behandeln, weil die Zellen physiologischer Weise in geringer Menge Gangliosid-Typ GD<sub>1a</sub>, welches Botulinum Neurotoxin Typ A bindet, enthalten. Die Zellen wurden in saurem Medium und Puffer niedriger Ionenstärke mit Botulinum Toxin A unter Zusatz vom rekombinanten H<sub>N</sub>-Teil mit Intakter leichten Kette versetzt. Nach etwa 14 h wurde der Puffer gegen Kultur Medium ausgetauscht und die Zellen über 48 h in DMEM erholen lassen. Die Hemmung der Exozytose wurde an Hand der freigesetzten Menge an <sup>3</sup>H-NA festgelegt.

Dieser Versuch zeigte nicht wie bei TeNT eine deutliche kompetitive Verdrängung auf die hemmende Wirkung von Botulinum Toxin Typ A durch den Zusatz des rekombinant hergestellten L-H<sub>N</sub>-Teils.

## 6.10 Wirkung von Clostridien Toxinen unter Zusatz von rec.H<sub>C</sub>-TeNT und Gangliosiden

Das H<sub>C</sub>-Fragment, C-terminus der schweren Kette von Clostridientoxinen ist für die spezifische Bindung und Internalisation an Neuronen zuständig. H<sub>C</sub> bindet an Gangliosiden. Um die Rolle von Gangliosiden bei der Internalisierung in chromaffinen Zellen zu untersuchen, wurde das rekombinant hergestellte H<sub>C</sub>-Fragment von TeNT nach der Clonierung und Expression von *His<sub>6</sub>-tag-Fusionsprotein* in *E. coli* M 15 pREP4 dem TeNT beigemischt und Zellen in sauren Medium angeboten. So war gewährleistet, dass das Fragment frei von der leichten Kette war (76).

Das rekombinant hergestellte HC-Teil von Tetanus Toxin hat selbst keine Wirkung auf die Neurotransmitterfreisetzung in den Zellen, denn wenn es per Elektroporation in die chromaffinen Zellen eingeschleust wurde, blieb die Hemmung der Exozytose aus (Abbildung 47). Dieses Ergebnis wurde erwartet, denn das Fragment fehlt die leichte Kette, die für die proteolytische Aktivität (Spaltung der SNARE-Proteine) in das Zytosol verantwortlich ist.

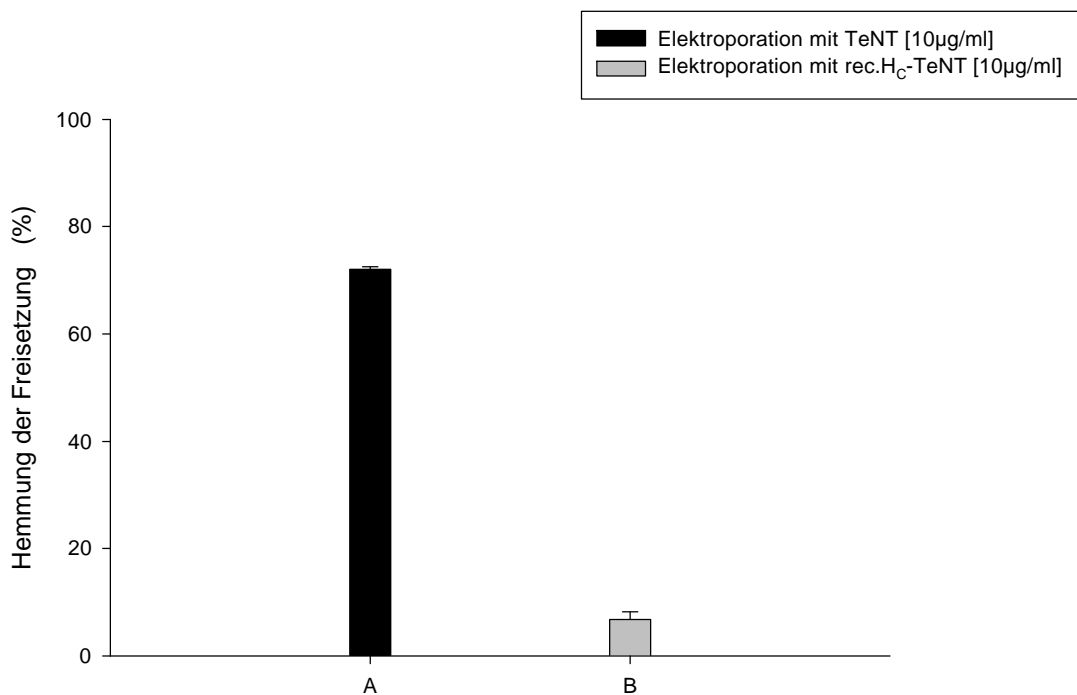


Abbildung 47, Hemmung der Freisetzung durch TeNT und rec.H<sub>C</sub>-Fragment von Tetanus Toxin nach der Elektroporation mit chromaffinen Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach der EP freigesetzt. Auf der Ordinate ist die Freisetzung von <sup>3</sup>H-NA in Prozent der Gesamtradioaktivität aufgetragen (Mittelwert ± SD, n=3).

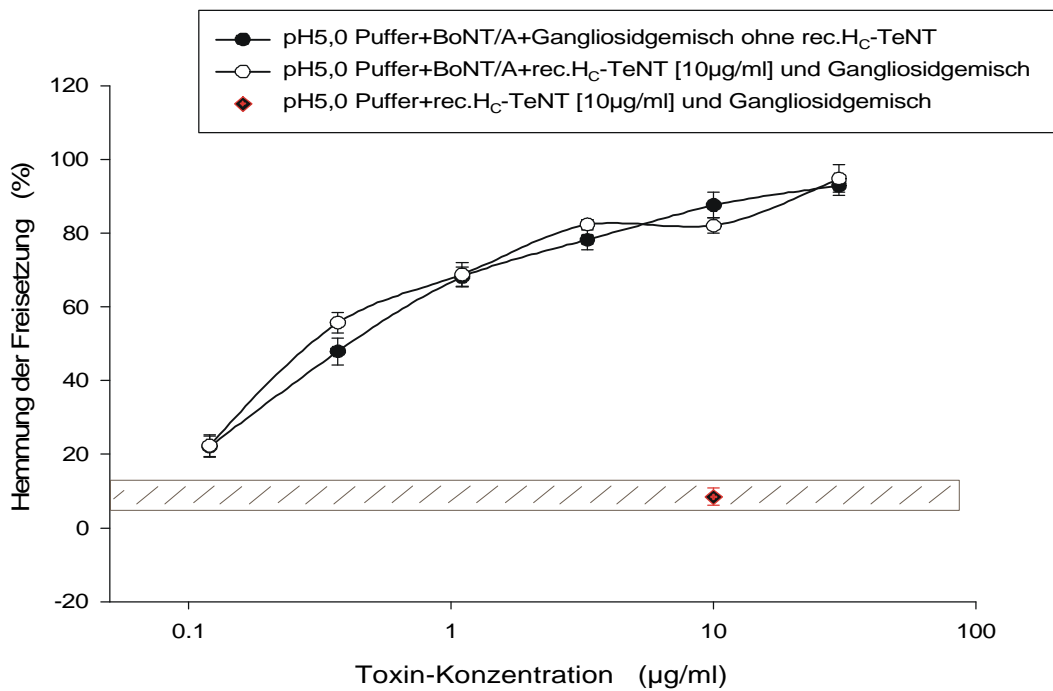
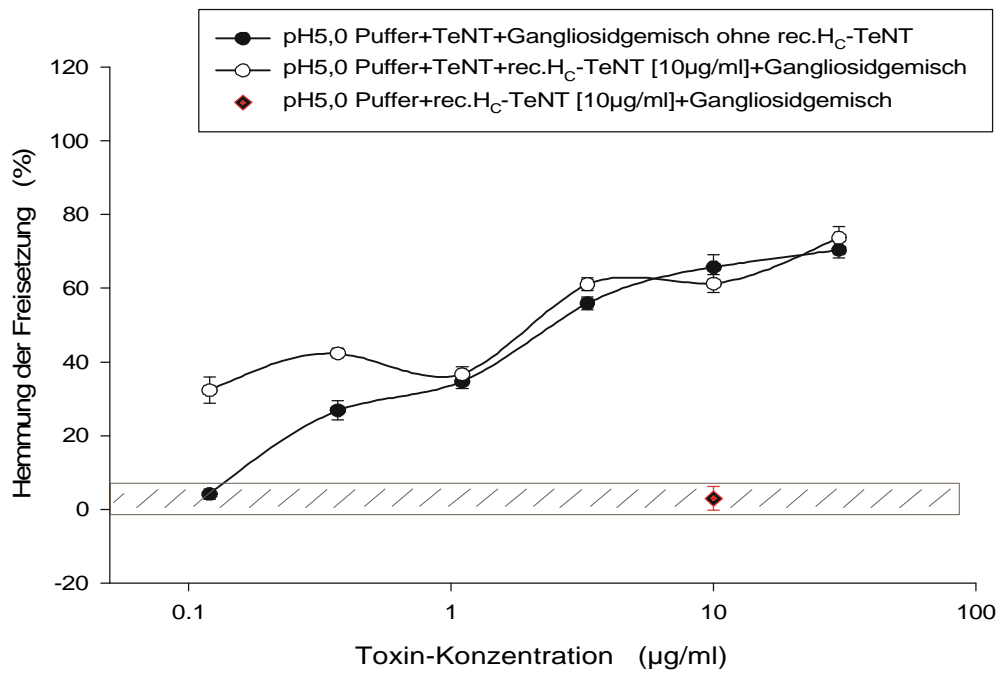


Abbildung 48, Einwirkung den Zusatz von rec.Hc-TeNT auf die Neurotransmitterfreisetzung durch TeNT (oben) und BoNT/A (unten) in saurem pH-Wert (Mittelwert  $\pm$  SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

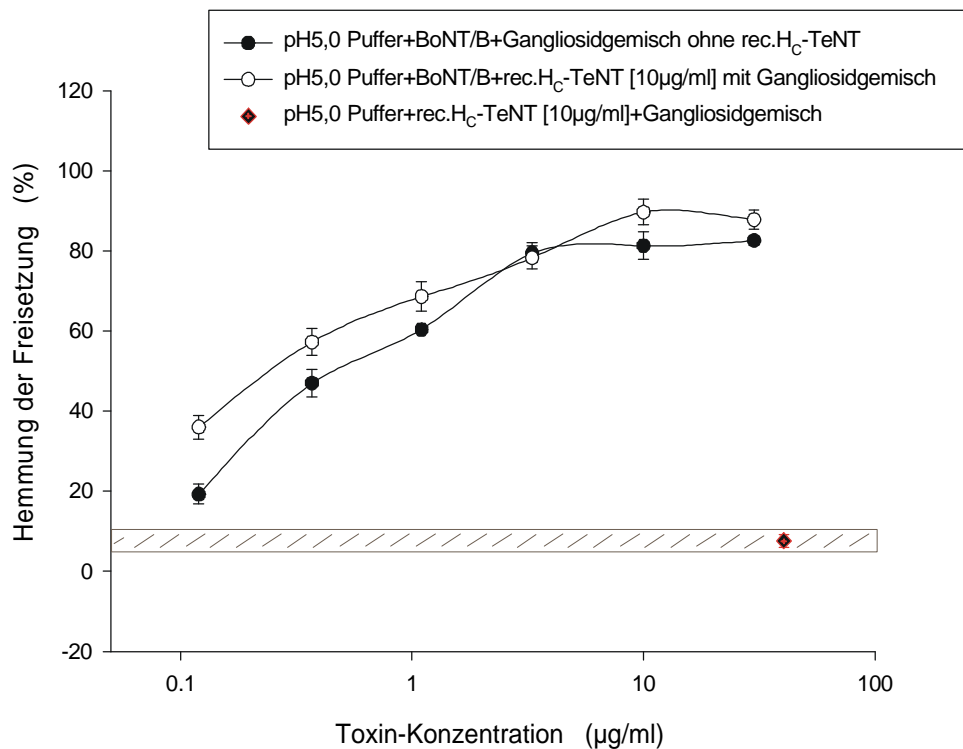


Abbildung 49, Hemmung der <sup>3</sup>H-NA durch BoNT/B in Anwesenheit von rec.H<sub>C</sub>-TeNT in saurem Medium (Mittelwert ± SD, n=3). Wenn keine Streuung sichtbar, ist sie kleiner als das Symbol selbst.

Nachdem durch EP Versuch gezeigt wurde, dass das Fragment selbst keinen Effekt auf Noradrenalinausschüttung hat, wurde in weiteren Versuchen die Wirkung den Clostridientoxinen durch Zusatz von rec.H<sub>C</sub>-TeNT in sauren pH-Wert auf die Exozytose in chromaffinen Zellen studiert (Abbildungen 48 und 49).

In darauf folgend wurde die pH-Schift Versuche durchgeführt. Hierzu wurden wieder die mit chromaffinen Zellen ausgesäten Platten 24 h vor Versuchansatz mit 250 µg/ml Gangliosiden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 14 h mit Clostridien Toxinen in sauren pH-Wert (Puffer VI) unter Zusatz von rec.H<sub>C</sub>-TeNT versetzt. Die Stimulation erfolgte 48 h später. Aus der Menge an freigesetzte <sup>3</sup>H-Noradrenalin wurde die Hemmung der Exozytose berechnet. Wie aus den Abbildungen 48 und 49 zu sehen ist, hat der Zusatz von H<sub>C</sub>-TeNT keinen Einfluss auf die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung durch die Holotoxinen.

In der Arbeit (s. unter Literatur, nr. 152) wurde die Blockade der Internalisation von gesamtem Toxin durch rec.H<sub>C</sub>-Fragment, eine Dosis-abhängiger Prozess gezeigt. Die Antagonistische Wirkung von H<sub>C</sub>-Fragment auf die Blockade der Exozytose durch Clostridien Neurotoxinen ist absolut von den jeweiligen Serotypen abhängig. Das isolierte H<sub>C</sub>-Fragment dient als Antagonisten, weil als isoliertes Fragment eine



andere Konformation zeigt als die im Aggregat mit H<sub>N</sub>-Teil in Gesamttoxin gebundener Teil.

Wie aus den Versuchen (Kapitel 6.3, Abbildungen 12) zu sehen ist, wird die Aufnahme von Toxinen an endosomalvergleichbaren Membranen (hier Membran von chromaffinen Zellen) ins Zytosol bei niedrigem pH-Wert erleichtert. Deshalb könnte bei meinen Versuchen die TeNT-induzierte Blockade der Katecholaminfreisetzung aus chromaffinen Zellen nicht durch eine kompetitive Hemmung in Anwesenheit von rec.H<sub>C</sub>-TeNT [10 µg/ml] wegen einem enormen Überschuss an Gangliosiden als Bindungsstellen gezeigt werden. Eine Verdrängung war nur bei einer niedrigen Konzentration an TeNT [zwischen 0,18 und 0,36] zu sehen (Abbildung 48, oben). Um dies auf die zelluläre Ebene besser zu zeigen, braucht man einen großen Überschuss an rec.HC-TeNT.

In den Versuchen, wo die chromaffine Zellen nicht mit Gangliosiden vorbehandelt waren, könnte keine Verdrängung des Holotoxins beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch in Puffer niedriger Ionenstärke würde keine Verdrängung erzielt (Ergebnisse nicht gezeigt).

## 7 Diskussion

Die Clostridien Neurotoxine binden spezifisch an den neuronalen Zellen. Sie hemmen die Neurotransmitterfreigabe, indem sie die Formation und die Baugruppe des SNARE-Komplexes reduzieren und destabilisieren. Die Substrate sind in Membran von kleinem und großem Vesikel der präsynaptischen Membran lokalisiert, die man soluble NSF attachment protein receptor (SNARE-Proteine) nennt. Die SNARE-Proteine regulieren die Neurotransmittersekretion, indem sie in mehreren Schritten zu Andockung und Fusion von SSVs mit präsynaptischer Plasmamembran führen. Der *Co-Faktor NSF* bindet an SNARE-Komplex und katalysiert durch Hydrolyse von ATP die Fusion und die Auflösung des Komplexes in seinen monomeren Komponenten. Die freiwerdende Energie wird für die Andockung des Vesikels benutzt. Als Folge dazu kommt durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das Nerventerminal zu Exozytose und Transmitterfreisetzung (147). Die Bindung von SSV an Zytosoloberfläche der aktiven Zone von präsynaptischen Membran ist eine Protein-Protein-Interaktion.

TeNT und BoNT unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer spezifischen Inhibition in zentrale bzw. periphere cholinerge Synapsen. TeNT unterbindet die Neurotransmitterfreisetzung in hemmenden Neuronen im Rückenmark, während die BoNT an der motorischen Endplatte wirken (275). Ihre Gemeinsamkeit ist, dass beide Toxine präsynaptisch wirken. TeNT und BoNT/B spalten beide das gleiche SNARE-Protein, Synaptobrevin II, an identische Stelle. Eine Ursache für den unterschiedlichen Transportweg ist in den Molekülstrukturen der schweren Kette der Clostridientoxine zu suchen.

Bindung, Transport und Wirkung der Clostridientoxine wurde in verschiedenen Systemen untersucht. Danach wird die toxische Aktivität von CNT in einen Mehrstufenprozess erklärt: 1. Oberflächenbindung an Nervenzellen, 2. Rezeptorvermittelte Aufnahme, 3. Ansäuerung des Endosoms, 4. Translokation durch Membran, 5. Aktivierung der Toxine durch Reduktion der Disulfidbrücke und 6. Spaltung der Substrate (Abbildung 3).

Um jeden Schritt zu untersuchen wurde chromaffine Zellen als Modell gewählt. Chromaffine Zellen enthalten in ihrer Plasmamembran spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und Rezeptoren für Acetylcholin, Dopamin und GABA, deshalb unterliegt die Exozytose von Noradrenalin in diesen Zellen eine vergleichbare Regulation wie die Neurotransmitterfreisetzung aus Nervenzellen.

Intakte chromaffine Zellen sind gegenüber Clostridien Neurotoxine entweder gar nicht (bei TeNT) oder nur wenig (bei BoNT/A) empfindlich. Um die Zellen gegenüber von CNT sensibilisieren zu können, werden die Zellmembranen mit Gangliosiden angereichert. Ganglioside sind keinen Rezeptor in streng pharmakodynamischen Sinne. Vielmehr handelt es sich um eine Bindungsstelle in pharmakokinetischen Sinne. Ein Kompartiment, die für die intrazelluläre Wirkung der Toxine ohne Bedeutung ist. Die Bindung der CNT an verschiedenen Gangliosidtypen ist unterschiedlich. In Puffer niedriger Ionenstärke ist die Bindung zwischen CNT und Ganglioside verstärkt. Die Clostridien Neurotoxine sind hydrophile Proteine, die bevorzugt mit den hydrophilen Polysialogangliosiden auf der Plasmamembran reagieren.

Neurotoxine binden erst an negativ geladenen Oberflächen der präsynaptischen Membran, wie an der Polysialogangliosiden und anderen sauren Lipide. Ganglioside

kommen ubiquitär in verschiedenen Organen vor, aber die CNT binden selektiv an Polysialogangliosiden, besonders an GD<sub>1b</sub> (TeNT), GT<sub>1b</sub> und GD<sub>1a</sub> (BoNT/A), die nur in das ZNS vorkommen (249). Der gangliosidbindende Bereich ist auf den C-terminalen Teil (34 Aminosäuren für TeNT und die 30 AS für BoNT/A) von schwerer Kette lokalisiert. Bislang würden die Ganglioside als einzige Toxinbindungsstrukturen beschrieben. Diese Domäne befindet sich bei BoNT/A und bei TeNT in einer Schleife, die auch beim Holotoxin von außen zugänglich ist. Die Bindung an Gangliosiden in diesen und anderen Systemen ist im Vergleich zu der Bindung an neuronalen Zellen um ein Vielfaches geringer, so dass vermutet wird, dass ein von Nervenzellen exprimiertes Protein einen weiteren Rezeptor für Clostridientoxine darstellt. So bindet BoNT/B an den N-terminalen Teil des Vesikelproteins Synaptotagmin, welches in das Vesikellumen hineinragt und erst nach der Exozytose auf der Außenseite der Nervenzelle zugänglich ist. Daher findet eine Initialisierung des Toxins nur statt, wenn die Nervenzellen stimuliert werden und Endozytose abläuft. Synaptotagmin könnte als Proteinrezeptor betrachtet werden, weil die Bindung der Clostridientoxine an die gesamte Außenmembran der Nervenzelle erfolgt (23, 66).

Ein Grund aber, warum Rezeptoren für die Aufnahme von CNT in Frage kommen können, ist die unterschiedliche Transportwege der TeNT und BoNT. Andere Experimentelle Befunde lassen vermuten, dass es sich bei der Bindungsstelle für Clostridientoxine um einen Doppelrezeptor handelt, dessen einer Teil ein Gangliosid ist, während der andere Teil aus einem von neuronalem Gewebe exprimierten Protein besteht. In der vorliegenden Arbeit werden die Funktionen der beiden Fragmente der schweren Kette (H<sub>N</sub> und H<sub>C</sub>) untersucht, da sie für Bindung und Transport des Toxins verantwortlich sind.

Die Neurotoxine zeigen eine Homologie in ihre Aminosäuresequenz von 30-50% und durch die kristallographische Untersuchungen zeigen die ähnliche drei dimensionale Strukturen auf. Nach der dreidimensionalen Struktur des BoNT/A können alle CNT in die „drei“ separate funktionale Domäne, die essentiell für deren spezifische Wirkung ist, unterscheiden werden. Dies wurde auf Grund von Strukturmodellen im Vergleich zu anderen porenbildenden Toxinen und nach berechneten Elektronenverteilungen formuliert. Danach wird drei abgrenzbaren Domänen mit jeweiligen Funktionen abgeleitet: 1. LC: Katalytischer, 2. H<sub>C</sub>: Bindungs- und 3. H<sub>N</sub>: für die Translokation durch Membran zuständige Membran-spannungsabhängiger Teil. Die Translokationsdomäne wickelt den enzymaktiven Teil wie ein Gurt (Abbildung 50).

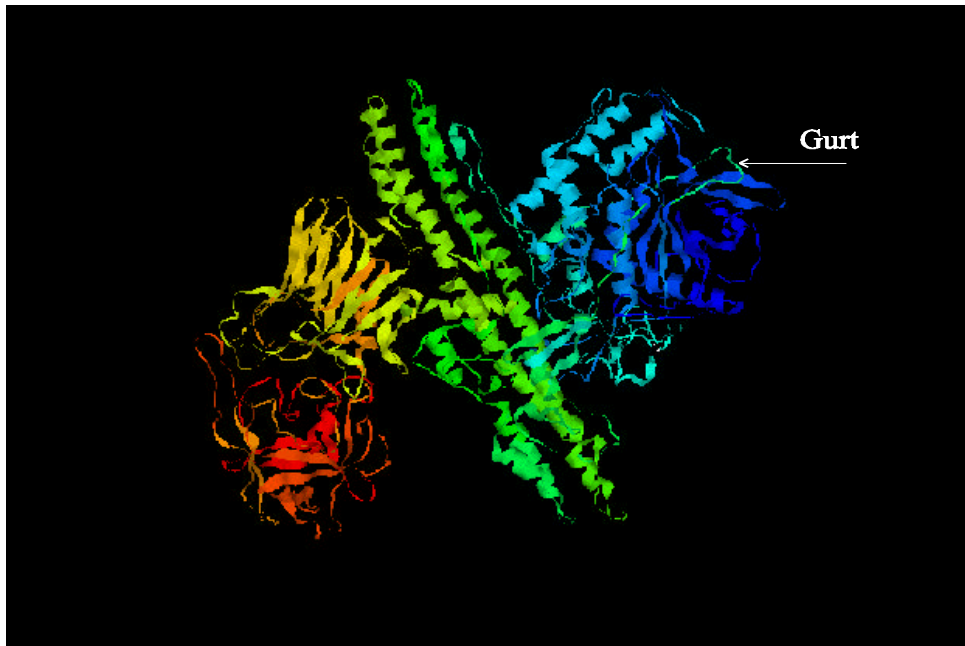


Abbildung 50, Repräsentation der dreidimensionalen Struktur von BoNT/A (133). Die drei funktionelle Domäne und das Gurt sind hier zu sehen. Von links nach rechts; *HELIX* in rot-orange-gelb zeigt die Bindungsdomäne (HC-Terminus); *HELIX* in grün, die Translokationsdomäne (H<sub>N</sub>-Terminus) und die *HELIX* in blau die katalytische Domäne (LC). Das Gurt (weiße Pfeil) umgibt die Leichte Kette und somit schirmt sie ab. Die Position der Beltregion, die sich um die LC wickelt ist bei TeNT, BoNT/A und BoNT/B unterschiedlich. Die aktive Zinkseite ist tief in das Protein vergraben und sieht wie ein großer offener Hohlraum, der ein sehr hohes negatives elektrisches Potential aufweist (98, 134).

Die schwere Kette vermittelt die Bindung und Internalisation des Toxins. H<sub>C</sub>-Teil besteht aus zwei funktionalen Untereinheiten, das H<sub>C</sub>-C-Fragment, ein Carboxyl-Teil, der eine Rolle bei der neurospezifischen Bindung an einem Rezeptor (Ganglioside) an den Nervenzellen spielt und H<sub>C</sub>-N-Fragment, ein Amino-Teil, der die Translokation der leichten Kette in das Zytosol umfasst, mit einem kleinen Protein-Protein-Kontakt zwischen denen (Abbildung 2). Die sind räumlich von dem katalytischen Teil und Translokationsdomäne getrennt.

Die CNT-Internalisation beginnt mit HC-Bindung an Ganglioside auf der präsynaptischen Membran (Abbildung 51a und 51b, 1. Schritt = Bindung). Für diesen Schritt ist ein „double receptor“ Modell vorgeschlagen: a) Bindung von H<sub>C</sub> an Gangliosiden kann die Zugänglichkeit des zweiten Rezeptors, ein in Membran integriertes Protein, begünstigen. b) Durch Gangliosidbindung kann auch das Toxin und Proteinrezeptor näher einander gebracht werden, oder durch Konformationsänderung kann zu einer verstärkten Interaktion zwischen Toxin und dem zweiten Rezeptor kommen.

In dieser Arbeit würde zunächst die Wirkung von rec.H<sub>C</sub>-Fragment auf die TeNT-induzierte Blockade der Katecholaminfreisetzung aus chromaffinen Zellen in saurem Medium untersucht. Es könnte keine kompetitive Hemmung in Anwesenheit von rec.H<sub>C</sub>-TeNT, wegen eines enormen Überschusses an Gangliosiden als Bindungsstellen erzielt werden. Um dies zu zeigen, braucht man einen großen Überschuss an rec.H<sub>C</sub>-TeNT, um alle vorhandenen Gangliosidbindungsstellen optimal zu sättigen (Abbildung 51a und 51b, f.). Außerdem ist das Holotoxin in

sauren pH in der Lage durch Umgehung von vesikulärem Transport direkt in das Zytosol zu gelangen. Versuche in Puffer niedriger Ionenstärke, wo die Bindung zwischen Toxin und Gangliosiden verstärkt ist, zeigten auch keine Verdrängung des Toxin-Effekts auf die Katecholaminfreisetzung durch das rec.H<sub>C</sub>-TeNT (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die HC-Domäne bei TeNT und BoNT/A zeigen strukturelle Homology auf. Ein Vergleich der TeNT-bindenden Gebietsstruktur zu der von BoNT/A deckt auffallende Unterschiede in bezug auf ihre Oberflächeneigenschaften auf. Der Unterschied im Rezeptoranerkennung liegt vielleicht an der unterschiedlichen Länge des C-terminalen Unterbereiches. Vergleich zwischen Botulinumtoxin Typ A und Typ B zeigt, dass die Bindungsdomäne bei BoNT/A von der Translokationsdomäne etwa 25° mehr weg kippt als bei BoNT/B. Hauptunterschied liegt in Abstand zwischen Bindungs-, Translokations- und katalytischer Teil.

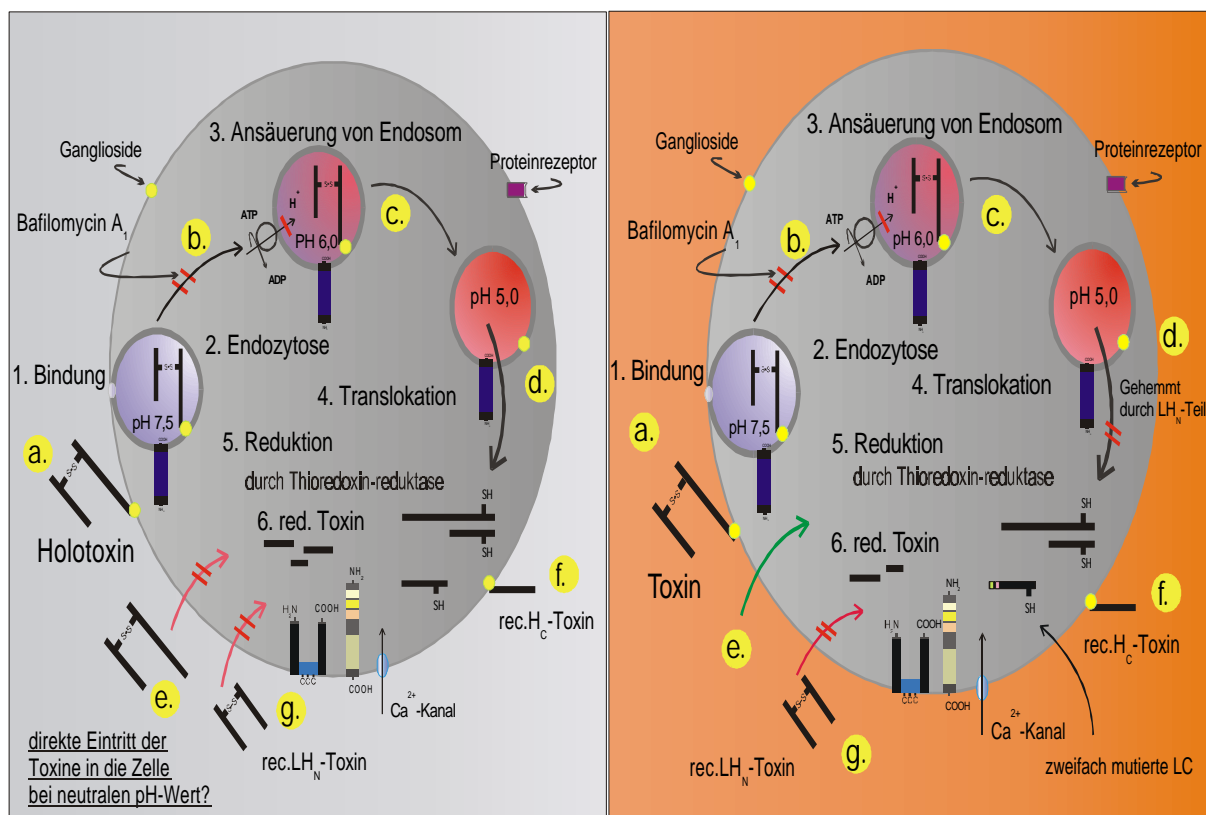


Abbildung 51, Schematische Darstellung meiner Versuchsansätze mit chromaffinen Zellen als Modell. Auf die linke Seite (51a) sieht man die Bedingungen der Toxin-aufnahme und -wirkung in neutralem Medium, und auf die rechte Seite (51b) in saurem pH-Wert.

Nach der Bindung an Zelloberfläche wird das Toxin in Endosom über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (oder Internalisation) (Abbildung 51). Vakuolare ATPase ist beteiligt an spezifischem vesikulärem Transport, wie in Prozess der pH-Gradient. Nach der Ansäuerung des endosomalen Kompartiments kommt zu einer Konformationsänderung des amphiphilen/transmembranen Segments der schweren Kette, das wiederum die Transportkanäle für die leichte Kette bilden (~30 Å). Für die Untereinheit (AS 659-681) des N-terminalen Fragments (H<sub>N</sub>) von BoNT/A wurden porenformende Eigenschaften für Lipidmembranen beschrieben

(183). Virale Proteine mit vergleichbaren Domänen verändern ebenfalls pH-abhängig ihre Struktur und durchqueren Membranen, sie sind jedoch nicht zur Translokation fähig. Für die Konformationsänderung ist der niedrige pH-Wert notwendig und liegt meist unter 6,0. Bei BoNT/B liegt bei 6,0. Bafilomycin A<sub>1</sub> blockiert den vakuolaren Typ von H<sup>+</sup>-ATPase Pumpe und somit verhindert Bafilomycin für die Entfaltung und Wirkung von Clostridientoxinen notwendige Ansäuerung des endosomalen Kompartiments. In Anwesenheit von Bafilomycin A<sub>1</sub> kann das Toxin das Vesikel nicht verlassen. Die Wirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> ist jedoch reversibel. Wie in pH-abhängigkeitsversuchen gezeigt wurde, gelangen die CNT durch Umgehung der vesikulären Exozytose in die chromaffinen Zellen und blockieren der Neurotransmitterfreisetzung, wenn die Toxine in saurem Medium die Zellen angeboten werden. Aus diesen Ergebnissen heraus sollte ein Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub> zum sauren Medium keinen Einfluss auf die Wirkung von CNT haben. Aber im Gegenteil unserer Erwartungen wurde die Katecholaminfreisetzung aus den chromaffinen Zellen bei einem Zusatz von 10 nM Bafilomycin A<sub>1</sub> in saurerer Lösung verhindert (Abbildung 51b, e.). Dabei wird im Gegensatz zu BoNT/A die Wirkung von BoNT/B und TeNT vollkommen aufgehoben. Dies kann an zwei Faktoren liegen: 1.) Während der Vorbereitung zu Freisetzungsvorsuchen wurden die Zellen mit <sup>3</sup>H-Noradrenalin ohne Zusatz von Baf. bei 37°C für 3 std. inkubiert. Diese kurze Zeit reicht vielleicht aus um BoNT/A sein Substrat zu spalten. 2.) Der gespaltene SNAP-25 ist selbst ein Hemmstoff der Fusion. Aus den Ergebnissen lässt sich vermuten, dass CNT und Bafilomycin A<sub>1</sub> beide an denselben Rezeptoren, die für die Aufnahme und Wirkung von Clostridientoxinen notwendig sind, binden. Allerdings um diese zu bestätigen bedarf es an einer Reihe weitere Versuche.

Für die Translokation von Clostridientoxinen aus dem Vesikel in das Zytosol scheint das H<sub>N</sub>-Fragment, der N-Terminus von HC, verantwortlich zu sein, auch wenn experimentell nur eine Porenbildung mit einer Durchlässigkeit für verschiedene Kationen nachgewiesen wurde. Es gibt die Hypothese, dass für die Translokation von Große Proteine wie die Clostridientoxine und ihrer Fragmente ebenfalls einen Zusammenhang mit der von H<sub>N</sub> verursachte Porenbildung steht. Dies wird auf der Basis von Berechnungen zur Elektronendichteverteilung (MOMENT Algorithmus zur Beschreibung hydrophober Bereiche, AS 595-614, 625-647 und 648-691) bei BoNT/A angenommen, ist experimentell jedoch nicht bestätigt (134, 140). Ist der pH-Wert auf der anderen Seite der Membran höher, löst sich das Toxin aus der Membran und diffundiert ins Zytosol. Es konnte an endosomalvergleichbaren Membranen gezeigt werden, dass es während der Penetration der Toxinmoleküle zur Leitfähigkeitsänderung kommt, wie sie auch bei der Kanalbildung beobachtet wird. Die geringen Leitfähigkeiten lassen jedoch auf recht kleine Poren schließen, zu klein, um den durchtritt des Toxins zu ermöglichen. Es scheint, dass die Leitfähigkeitsänderung lediglich ein Ausdruck der Toxin-Membran-Interaktion darstellt. Der Vergleich von Clostridientoxinen mit anderen porenformenden Toxinen ergab keine strukturellen Übereinstimmungen. Ähnlichkeiten wurden lediglich mit viralen Proteinen gefunden, die zwar keine Poren formen, aber auch Membranen durchdringen können, und deren Struktur ebenfalls pH-abhängig ist.

rec.L-H<sub>N</sub> Teil der schweren Kette allein fehlt die Bindungsdomäne (H<sub>C</sub>-Teil) und deshalb ist der nicht in der Lage sich an den Neuronen zu binden, und folglich soll kein Effekt auf die Blockade von Neurotransmitterfreisetzung haben (Abbildung 51a und 51b g.) (25). In meinen Versuchen, wo dieses Fragment per Elektroporation in die Zellen gebracht würde, kommt es zu einer Hemmung der <sup>3</sup>H-Noradrenalinfreisetzung aus den chromaffinen Zellen (siehe Seite 71, Abbildung 42).

Ein Vergleich der H<sub>N</sub>-Fragmente von BoNT/A, BoNT/B und TeNT zeigt Ähnlichkeiten, wobei es scheint, dass nur der Unterschied an der Ausdehnung der Schleife liegt. Die Schleifenregion umgibt das aktive Zentrum und das Zinkatom wie ein Gurt und schirmt es ab. Aus vorherigen Arbeiten weiß man, dass die H<sub>N</sub>-domäne bei BoNT/A und BoNT/B eine  $\alpha$ -helikale Schleifenstruktur von über 100 Å besitzt. Interessanterweise ist das amphiphile/transmembrane Segment von BoNT/A und BoNT/B auf das gegenüberliegende Ende der Translokationsdomäne beschrieben würde (Abbildung 50). Zum Beispiel ist die aktive Seite von BoNT/B (die leichte Kette) 15 Å tief in das Protein vergraben und die Struktur von dem Komplex zwischen leichte Kette und Synaptobrevin II zeigt eine coil-Konformation. Das Zinkatom ist bei BoNT/B koordiniert mit His 229, His 233 und Glu 267. Wasser ist gebunden an Glu 230.

Die chromaffine Zellen wurden in Puffer niedriger Ionenstärke (pH-Wert = 7.2) und in saurem Milieu mit CNT und rec.LH<sub>N</sub>-Fragment von TeNT versetzt. Die Hypothese war, dass 1.) das rec.LH<sub>N</sub>-Fragment in beiden Puffern nicht in der Lage ist in die Zelle aufgenommen zu werden (da H<sub>C</sub>-Fragment fehlt), und folglich keinen Einfluss auf die Noradrenalinfreisetzung haben kann. 2.) Falls das rec.LH<sub>N</sub>-Fragment von TeNT gelangen sollte durch rezeptorvermittelte Endozytose von der Zelle aufgenommen zu werden, sollte die Translokation aus dem Vesikel gehemmt werden (Abbildung 51b, c). Und 3.) wenn das Fragment und Toxin beide ins Zytosol gelangen, soll die Wirkung auf das entsprechende Substrat nur im Falle von dem Fragment mit intakter leichter Kette verstärkt werden. Bei dem Fragment mit doppelmutierter LC soll keinen Effekt auf die Wirkung des Toxins zu sehen sein (205). Die Experimente ließen keine diese Hypothesen bestätigen. Eine Verdrängung (kompetitive Hemmung) der Wirkung von TeNT in Anwesenheit von rec.L-H<sub>N</sub>-Fragment im sauren Medium wurde erzielt. Während dieser Effekt für das Tetanustoxin deutlich um Faktor 20 lag, fiel die Verdrängung die durch Botulinumtoxine induzierte Blockade der Exozytose in Anwesenheit von rec.LH<sub>N</sub>-Fragment von BoNT/A aus (s. S. 64, 72 und 75; Abbildungen 35, 43 und 46). Dies kann daran liegen, dass in saurem pH-Wert, BoNT/A zum Teil direkt ins Zytosol gelangt, und so kann des Verdrängungseffekts von rekombinantem Fragment verdeckt werden. Diese Kompetitive Hemmung in saurem Medium durch rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT kann erklärt werden indem, dass ein zweiter Proteinrezeptor für die Bindung der CNT an chromaffinen Zellen vorhanden ist. Da der H<sub>C</sub>-Teil, der für die Bindung des Toxins an den Gangliosiden essentiell ist, bei diesem Fragment fehlt, kann die Translation in die Zelle bei rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT nicht stattfinden. Somit kommt ein anderer Rezeptor oder Bindungsstelle für die Aufnahme der CNT in Frage. Durch die Bindung von rec.L-H<sub>N</sub>/TeNT an diesen Rezeptor kommt zur einen Wirkungsminderung des TeNT. Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich sagen, dass für die Bindung der CNT in die präsynaptische Membran der Neuronen einen spezifischen Proteinrezeptor, der nur in saurem pH-Wert für TeNT zugänglich ist, vorhanden sein soll. Dieser Rezeptor ist für TeNT und BoNT unterschiedlich. Dies könnte die unterschiedliche Wege der beiden Toxine in Neuronen erklären. In Puffer niedriger Ionenstärke ist die Affinität zwischen Ganglioside und TeNT verstärkt, um genügend Toxin in die Zelle zu transportieren und die Exozytose geringfügig zu blockieren. Aus diesem Grund wird hier keine Verdrängung beobachtet (siehe unten Michaelis-Menten-Kinetik).

## Darstellung von der kompetitiven Hemmung durch die Michaelis-Menten-Kinetik:

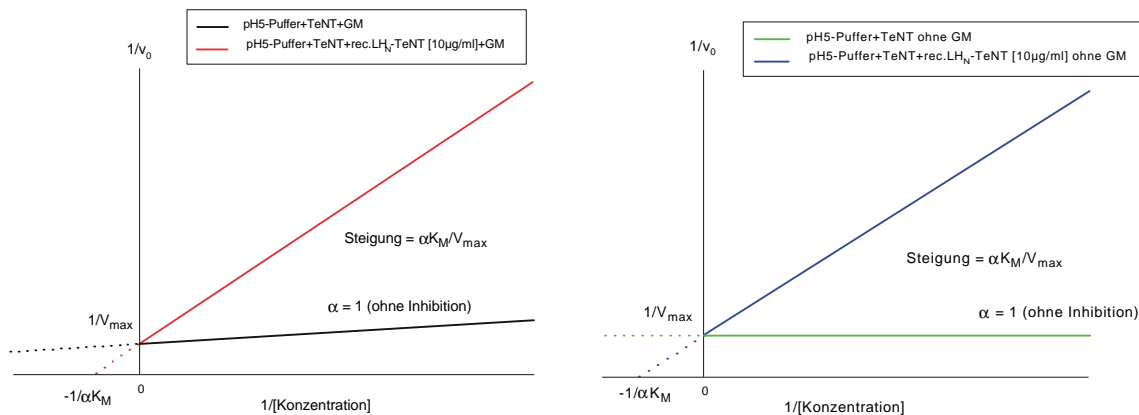


Abbildung 52, Lineweaver-Bruk-Diagramm oder doppel-reziproke Auftragung mit der Steigung  $K_M/V_{max}$ . Durch Michaelis-Menten-Kinetik wird die kompetitive Hemmung der Wirkung des TeNT auf die Neurotransmitterfreisetzung durch den Zusatz von rec.LH<sub>N</sub>-TeNT (-Mutant, 52a (links) und -Intakt, 52b (rechts)) in sauren Medium gezeigt (s. Seite 64 und 72, Abbildung 35 und 43). Die Steigungen verdeutlichen den Effekt des Inhibitors auf  $K_M$  (Michaelis-Konstante).

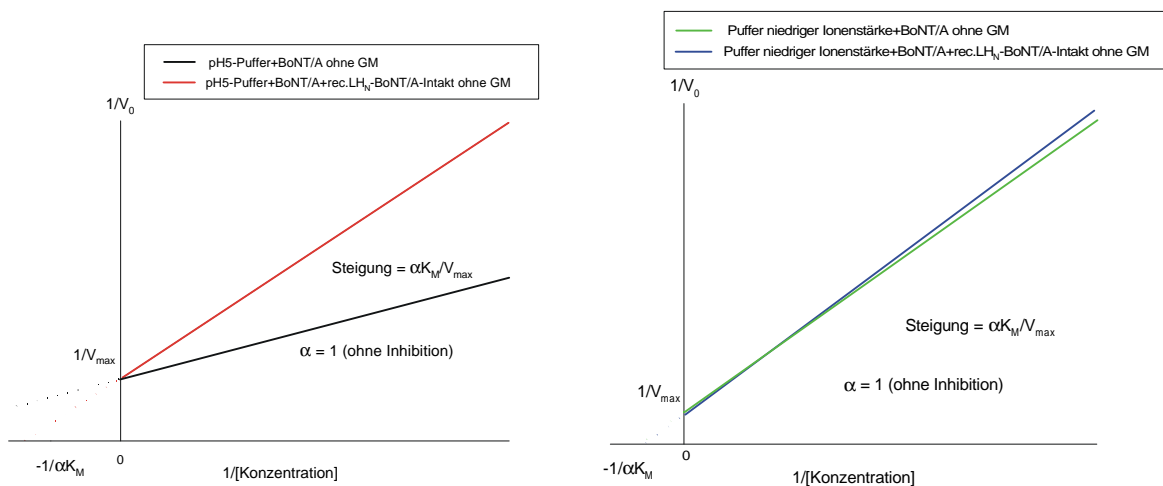


Abbildung 53, Lineweaver-Bruk-Diagramm mit der Steigung  $K_M/V_{max}$ , von der kompetitiven Hemmung der Wirkung des BoNT/A durch den Zusatz von rec.LH<sub>N</sub>-BoNT/A-Intakt in saurem Medium (links) und in Puffer niedriger Ionenstärke (rechts) (Michaelis-Menten-Kinetik) (s. Seite 75, Abbildung 46). Die Steigungen verdeutlichen den Effekt des Inhibitors auf  $K_M$  (Michaelis-Konstante). In Puffer niedriger Ionenstärke sieht man keine Hemmung.

Nach der Translokation ins Zytosol wird die enzymatische Reduktion der Disulfidbrücke und Trennung der leichten Kette von der schweren Kette durch Thioredoxin-Reduktase-System durchgeführt. Dies sollte ein Temperaturabhängiger



Prozess sein. Als Anhaltspunkt diene das Präsen die drei Enzyme: ATPase, Reduktase und Protease (135). Eine temperaturabhängige Hemmung der Exozytose wurde nur bei TeNT und Botulinumtoxin Typ B beobachtet (s. Seite 42 und 43, Abbildungen 17-18). BoNT/A hemmte die Noradrenalinausschüttung temperaturunabhängige. Aus diesen Experimenten kann man schließen, dass die zwei Schritte, nämlich die Bindung und die Reduktion der Ketten durch Thioedoxin-Reduktase keine temperaturabhängigen Prozesse sind. Und aus anderen Versuchen weiß man, dass die Proteolyse auch nicht temperaturabhängig ist (persönliche Mitteilung).

Erst jetzt nach der reduktiven Spaltung liegt das Zinkatom in der LC frei und kann sein Substrat angreifen (248).

Die LC spaltet einer der SNARE-Proteine, dadurch kann der SNARE-Komplex, der essentieller Bestandteil für die Fusion der präsynaptischen Membran und synaptischen Vesikel ist, nicht mehr gebildet werden. Es kommt zur Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung. Experimente, indenen die elektroporierte Zellen intakte und doppelmutierte rekombinanten leichte Ketten zugesetzt wurden, haben keine Verdrängung der intakten LC durch die mutierte leichte Kette an seinen Substrat gezeigt (Abbildung 51b, d.) (208).

Dieser Arbeit bestätigt die Doppelrezeptortheorie für die Bindung der Clostridien Neurotoxinen Tetanus und Botulinumtoxinen Typ A und Typ B an neuronalen Zellen. Einerseits die Bindung der Toxine an negativgeladenen Gangliosiden und andererseits die Existenz einer Bindungsstelle, die anders sein sollte als Polysialogangliosiden. Diese Bindungsstelle ist vor allem in sauren pH-Wert (pH=5.0) für die Toxine erkennbar (Verfügbarkeit der Bindungsstelle). Wie vorher erwähnt ist dieser Bindungsstelle für TeNT und BoNT unterschied. Diese Tatsache erklärt die unterschiedlichen Transportwege der Toxine.

## 8 Zusammenfassung

Die Clostridien Neurotoxine, Tetanus (TeNT) und die sieben Serotypen von Botulinumtoxin (BoNT/A-G) sind  $Zn^{2+}$ -Endopeptidasen mit spezifischer Bindung an neuronalen Zellen.

Das Holotoxin gehört zur Familie der AB-Toxine. Sie setzen sich aus zwei Fragmente zusammen. Eine schwere (Heavy Chain (HC) oder Bindungsdomäne, 100 kDa) und eine leichte Kette (light Chain (LC), die die katalytische Aktivität enthält, 50 kDa). Beide Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die schwere Kette (HC) kann proteolytisch durch Papain wiederum in zwei Untereinheiten, N- ( $H_N$ ) und C- ( $H_C$ ) Terminus, gespalten werden.

Die Wirkung von Clostridientoxinen (CNT) beruht auf der Spaltung von Komponenten einer Proteinfamilie namens SNARE's, welche an der endozytotischen Freisetzung von Neurotransmittern, wie Acetylcholin (ACh) beteiligt sind. Diese SNARE-Proteine (auf der präsynaptischen Seite SNAP-25 und Syntaxin 1) lagern sich während der calciuminduzierten Neurotransmitterfreisetzung mit dem vesikelassoziierten Membranprotein Synaptobrevin II zum ternären Komplex zusammen. Dieser SNARE-Komplex besteht aus vier superhelikalen  $\alpha$ -Helices (je eine Helix von Syntaxin 1 und Synaptobrevin II und zwei Helices von SNAP-25) und besitzt eine große Stabilität.

Ein Mehrstufenmodell wird für die Aufnahme der CNT diskutiert. 1. Bindung, 2. Internalisation, 3. ATP-abhängige Ansäuerung von Endosomen, 4. Translokation aus dem Endosom ins Zytosol, 5. reduktive Spaltung durch das Enzym Thioredoxin-Reduktase, 6. Abspaltung des jeweiligen Substrates (SNARE-Proteine), 7. Hemmung der ACh-freigabe des Axons und schließlich Paralyse, 8. Inaktivierung des Toxins durch Abspaltung in kleinen Fragmenten.

Nach der rezeptorvermittelten Endozytose gelangen die Toxine in das endosomale Kompartiment. TeNT und BoNT müssen ins Zytosol der Zielzellen gelangen, um ihre spezifische Substrate spalten zu können. Die Translokation aus den Vesikeln in das Zytosol wird wahrscheinlich durch eine Ansäuerung begünstigt, denn nur im sauren pH-Bereich (<5) bildet das Toxin Poren. Es kommt zur Konformationsänderung des  $H_N$ -Fragments der schweren Kette. Die dreidimensionale Struktur der Translokationsdomäne ( $H_N$ -Teil der schweren Kette) der Neurotoxine unterscheidet sich deutlich von den anderen Porenbildenden Toxinen. Der hydrophobe Teil des  $H_N$ -Fragments hat Ähnlichkeit mit der coiled-coil-Struktur viraler Proteine, welche zwar keine Poren in Membranen bilden, aber dennoch in der Lage sind, diese zu passieren.

Auf dem Weg vom Vesikel ins Zytosol werden die Toxine durch die Thioredoxin-Reduktase reduziert, denn die leichte Kette ist nur in ihrer reduzierten Form wirksam. Die leichte Kette ist eine Protease, welche eines der SNARE-Proteine spaltet. Dies bewirkt, dass das mit Neurotransmitter gefüllte Vesikel nicht mehr mit der Plasmamembran fusionieren kann. Es kommt zur Hemmung der Katecholaminfreisetzung.

Die proteolytische Inaktivierung der Toxine erfolgt langsam, wahrscheinlich in Autophagosomen.

In dieser Arbeit wurde die Translokation von Clostridientoxinen durch die Membran von chromaffinen Zellen untersucht, die unter physiologischen Bedingungen gegenüber Tetanustoxin unempfindlich und nur gering sensibel gegenüber Botulinumtoxin Typ A sind. Somit gilt dieses Zellsystem als gutes Werkzeug zur

Untersuchung der pH-abhängigen Translokation von Clostridientoxinen und die Rolle der Proteinfragmente.

Zunächst wurden die Zellen mit Phosphatpuffer (pH-Wert = 5.0) oder Puffer niedriger Ionenstärke und dem jeweiligen Neurotoxin (TeNT und Botulinumtoxinen Typ A und Typ B) inkubiert. Unter diesen experimentellen Bedingungen gelangte das Toxin unter Umgehung des endosomalen Kompartiments vom extrazellulären Raum direkt ins Zytosol. In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass durch Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub>, einem vesikulären H<sup>+</sup>-ATPase-hemmer, die Wirkung der CNT aufgehoben wird.

Die Wirkung von TeNT und BoNT/B auf die chromaffine Zellen erwies sich als temperatur- und energieabhängig. Bei BoNT/A war aber die Hemmung der Noradrenalinausschüttung temperaturunabhängig.

Mit rekombinant hergestellten Fragmente konnte zwischen Bindung und Transport diskriminiert werden. Dazu wurden folgende Konstrukte verwendet:

Ein rekombinant hergestelltes LH<sub>N</sub>-Fragment von TeNT mit Doppelmutation in der leichten Kette (Austausch von zwei Aminosäuren H (Histidin)<sup>233</sup> in V (Valin)<sup>233</sup> und E (Glutaminsäure)<sup>234</sup> in Q (Glutamin)<sup>234</sup>), das nicht mehr in der Lage ist Synaptobrevin II zu spalten, sowie ein LH<sub>N</sub>-Fragment mit intakter leichten Kette. Beide Fragmente fehlt der H<sub>C</sub>-Teil der schweren Kette, der Teil, der für die Bindung an Gangliosiden zuständig ist. Bei TeNT sind 34 AS seiner schweren Kette (H<sub>C</sub>-Teil) für die Bindung an Gangliosiden verantwortlich.

Rekombinant hergestellte LH<sub>N</sub>-Fragmente, denen der gangliosiderkennende Bereich (H<sub>C</sub>-Teil) fehlt, hemmen in chromaffinen Zellen beim niedrigen pH-Wert die Katecholaminfreisetzung nicht. Werden sie dagegen durch Elektroporation in die Zellen gebracht, blockieren sie die Exozytose.

Die Versuche zeigten, dass beide rekombinant hergestellte LH<sub>N</sub>-Fragmente in der Lage sind, die Wirkung des Holotoxins kompetitiv zu hemmen. Außerdem wurde eine Aufhebung der Wirkung der Toxine auf die Neurotransmitterausschüttung durch Zusatz des Protonenpumpenhemmers Bafilomycin A<sub>1</sub>, erzielt. Diese Effekte waren vor allem im sauren Milieu zu beobachten.

Die Aufhebung der Toxinwirkung durch Bafilomycin A<sub>1</sub> und die kompetitive Hemmung der TeNT durch seine rekombinant hergestellten LH<sub>N</sub>-Fragmente bestätigen die Vermutung, dass ein Membranrezeptor für die Aufnahme der Toxine in neuronale Zellen verantwortlich ist. Da das H<sub>N</sub>-Fragment der schweren Kette, das an der Translokation des Toxins beteiligt ist, bei Tetanus und Botulinumtoxin nicht identisch ist, kommen unterschiedliche Rezeptoren für deren Aufnahme in Nervenzellen in Frage. Diese Aussagen müssen jedoch durch weitere experimentelle Daten bestätigt werden.

Die vorliegende Dissertation stellt somit eine gute Vorraussetzung für weitere Untersuchung der unterschiedlichen Transportwege der Clostridien Neurotoxinen dar.

## 9 Literaturverzeichnis

1. ADAM-VIZI, V., DERI, Z., BORS, P., AND TRETTER, L., (1993) Lack of involvement of  $[Ca^{2+}]_i$  in the external  $Ca^{2+}$ -independent release of acetylcholine evoked by veratridine, ouabain and alpha-latrotoxin: possible role of  $[Na^+]_i$ . *J. Physiol. (Paris)* 87, 43-50.
2. ADLER, M., DESHPANDE, S. S., SHERIDAN, R. E., AND LEBEDA, F. J., (1994) Evaluation of captopril and other potential therapeutic compounds in antagonizing botulinum toxin-induced muscle paralysis. In: *Therapy with Botulinum Toxin*, edited by J. Jankovic and M.Hallett. New York: Dekker, p. 63-70.
3. ADLER, M., NICHOLSON, J. D., AND HACKLEY, B. E., (1998) Efficacy of a novel metalloprotease inhibitor on botulinum neurotoxin B activity. *FEBS Lett.* 429, 234-238.
4. AHNERT-HILGER, G., BADER, M. F., BHAKDI, S., AND GRATZL, M., (1989a) Introduction of macromolecules into bovine adrenal medullary chromaffin cells and rat pheochromocytoma cells (PC12) by permeabilization with streptolysin O: inhibitory effect of tetanus toxin on catecholamine secretion. *J. Neurochem.* 52, 1751-1758.
5. AHNERT-HILGER, G., AND BIGALKE, H., (1995) Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. *Prog. Neurobiol.* 46, 83-96.
6. AHNERT-HILGER, G., KUTAY, U., CHAHOUD, I., RAPOPORT, T., AND WIEDENMANN, B., (1996) Synaptobrevin is essential for secretion but not for the development of synaptic processes. *Eur. J. Cell Biol.* 70, 1-11.
7. AHNERT-HILGER, G., WELLER, U., DAUZENROTHA, M. E., HABERMANN, E., AND GRATZL, M., (1989b) The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis. *FEBS Lett.* 242, 245-248.
8. ALMERS, W., AND TSE, F. W., (1990) Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* 6, 813-818.
9. ARNON, S. S., (1980) Infant botulism. *Annu. Rev. Med.* 31, 541-560.
10. AULD, D. S., (1995) Removal and replacement of metal ions in metalloproteases. *Methods Enzymol.* 248, 228-242.
11. AURELI, P., FENICIA, L., PASOLINI, B., GIANFRANCESCHI, M., MCCROSKEY, L. M., AND HATHEWAY, C. L., (1986) Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxic Clostridium butyricum in Italy. *J. Infect. Dis.* 154, 207-211.
12. BAGEITA, G., KNOTT, C., NISTICO, G., AND BOWERY, N. G., (1990) Tetanus toxin produces neuronal loss and a reduction in GABA A, but not GABA B binding sites in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 109, 7-12.
13. BANERJEE, A., KOWALCHYK, J. A., DASGUPTA, B. R., AND MARTIN, T. F. J., (1996) SNAP-25 is required for a late postdocking step in  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* 271, 20227-20230.
14. BARNARD, R. J. O., MORGAN, A., AND BURGOYNE, R. D., (1997) Stimulation of NSP ATPase activity by alpha-SNAP is required for SNARE complex disassembly and exocytosis. *J. Cell Biol.* 13, 875-883.
15. BARTELS, F., (1993) Regeneration der Exozytose in chromaffinen Zellen nach der Vergiftung mit Tetanus- und Botulinum A- Neurotoxin. *Diss. Medizinische Hochschule Hannover.*
16. BEISE, J., HAHNEN, J., ANDERSEN-BECKH, B., AND 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.
17. BENNETT, M. K., CALAKOS, N., AND SCHELLER, R. H., (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257, 255-259.
18. BENNETT, M. K., GARCIA-ARRARAS, J. E., ELFERINK, L. A., PETERSON, K., FLEMING, A. M., HAZUKA, C. D., AND SCHELLER, R. H., (1993) The syntaxin family of vesicular Transport receptors. *Cell* 74, 863-873.
19. BETZ, W. J., AND ANGLFSON, J. K., (1998) The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 347-363.
20. BETZ, W. J., MAO, F., AND SMITH, C. B., (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr. Opin. Neurol.* 6, 365-371.
21. BEZPROZVANNY, I., SCHELLER, R. H., AND TSIEN, R. W., (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378, 623-626.
22. BI, G. Q., ALDERTON, J. M., AND STEINHARDT, R. A., (1995) Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *J. Cell Biol.* 131, 1747-1758.
23. BIGALKE, H., BINSHECK, T., AND BARTELS, F., (1996) Transmembrane voltage and pH gradients facilitate the translocation of tetanus toxin through membranes devoid of receptors. *Toxicon* 34, 294.
24. BIGALKE, H., MÜLLER, H., AND DREYER, F., (1986) Botulinum A neurotoxin unlike tetanus toxin acts via a neuraminidase sensitive structure. *Toxicon* 24, 1065-1074.

25. BIGALKE, H., SHOER, L., (2000) Clostridial Neurotoxins. In Aktories K, Just I, (Ed.), Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 145, Bacterial Protein Toxins, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 407-443.
26. BINZ, T., BLASI, J., YAMASAKI, S., BAUMEISTER, A., LINK, E., SÜDHOF, T. C., JAHN, R., AND NIEMANN, H., (1994) Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 269, 1617-1620.
27. BITTNER, M. A., DASGUPTA, B. R., AND HOLZ, R. W., (1989a) Isolated light chains of botulinum neurotoxins inhibit exocytosis: studies in digitonin-permeabilized chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 264, 18, 10354-10360.
28. BITTNER, M. A., HABIG, W. H., AND HOLZ, R. W., (1989b) Isolated light chain of tetanus toxin inhibits exocytosis: studies in digitonin-permeabilized cells. *J. Neurochem.* 53, 966-968.
29. BITTNER, M. A., AND HOLZ, R. W., (1988) Effects of tetanus toxin on catecholamine release from intact and digitonin-permeabilized chromaffin cells. *J. Neurochem.* 51, 451-456.
30. BIZZINI, B., STOECKEL, K., AND SCHWAB, M., (1977) An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems. *J. Neurochem.* 28, 529-542.
31. BLACK, J. D., AND DOLLY, J. O., (1986a) Interaction of <sup>125</sup>I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. 1. Ultrastructural autoradiographic localization and quantification of distinct membrane acceptors for type A and B on motor nerves. *J. Cell Biol.* 103, 521-534.
32. BLACK, J. D., AND DOLLY, J. O., (1986b) Interaction of <sup>125</sup>I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. 2. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 103, 535-544.
33. BLACK, J. D., AND DOLLY, J. O., (1987) Selective location of acceptors for botulinum neurotoxin A in the central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 23, 767-779.
34. BLASI, J., CHAPMAN, E. R., LINK, E., BINZ, T., YAMASAKI, S., DE CAMILLI, P., SÜDHOF, T. C., NIEMANN, H., AND JAHN, R., (1993a) Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365, 160-163.
35. BLASI, J., CHAPMAN, E. R., YAMASAKI, S., BINZ, T., NIEMANN, H., AND JAHN, R., (1993b) Botulinum neurotoxin C<sub>1</sub> blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12, 4821-4828.
36. BLAUSTEIN, R. O., GERMANN, W. J., FINKELSTEIN, A., AND DASGUPTA, B. R., (1987) The N-terminal half of the heavy chain of botulinum type A neurotoxins from channels in planar phospholipid bilayers. *FEBS Lett.* 226, 115-120.
37. BLECK, T. P., (1989) Clinical aspects of tetanus. In: *Botulinum Neurotoxins and Tetanus Toxin*, edited by L. L. Simpson. San Diego, CA: Academic, p. 379-398.
38. BOCK, J. B., AND SCHELLER, R. H., (1997) A fusion of new ideas. *Nature* 387, 133-135.
39. BOQUET, P., AND DUFLLOT, E., (1982) Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7614-7618.
40. BOQUET, P., DUFLLOT, E., AND HAUTTECOEUR, B., (1984) Low pH induces a hydrophobic domain in the tetanus toxin molecule. *Eur. J. Biochem.* 144, 339-344.
41. BORODIC, G. E., FERRANTE, R. J., PERACE, L. B., AND ALDERSON, K., (1994) Pharmacology and histology of the therapeutic application of botulinum toxin. In: *Therapy With Botulinum Toxin*, edited by J. Jankovic and M. Hallett. New York: Dekker, p. 119-157.
42. BRUNS, D., ENGERS, S., YANG, C., OSSIG, R., JEROMIN, A., AND JAHN, R., (1997) Inhibition of transmitter release correlates with the proteolytic activity of tetanus toxin and botulinum toxin A in individual cultured synapses of *Hirudo medicinalis*. *J. Neurosci.* 17, 1898-1910.
43. BURKARD, F., CHEN, F., KUZIEMKO, G. M., AND STEVENS, R. C., (1997) Electron-density projection map of the botulinum neurotoxin 900 kilodalton complex by electron crystallography. *J. Struct. Biol.* 120, 78-84.
44. CABIAUX, V., LORGE, P., VANDENBRANDEN, M., FALMAGNE, P., AND RUYSSHAERT, J. M., (1985) Tetanus toxin induces fusion and aggregation of lipid vesicles containing phosphatidylinositol at low pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 840-849.
45. CALAKOS, N., AND SCHELLER, R. H., (1996) Synaptic vesicle-biogenesis, docking and fusion: a molecular description. *Physiol. Rev.* 76, 1-29.
46. CECCARELLI, B., AND HURLBUT, W. P., (1980) Ca<sup>2+</sup>-dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 87, 297-303.
47. CHAPMAN, E. P., AN, S., BARTON, N., AND JAHN, R., (1994) SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J. Biol. Chem.* 269, 27427-27432.
48. CHEN, F., KUZIEMKO, G. M., AND STEVENS, R. C., (1998) Biophysical characterization of the stability of the 150 kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900 kilodalton botulinum toxin complex species. *Infect. Immune.* 66, 2420-2425.

49. CORNILLE, F., DELOYE, F., FOURNIE-ZALUSKI, M. C., ROQUES, B. P., AND POULAIN, B., (1995) Inhibition of neurotransmitter release by synthetic proline-rich peptides shows that the N-terminal domain of vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin is critical for neuroexocytosis. *J. Biol. Chem.* 270, 16826-16832.
50. CORNILLE, F., GOUDREAU, N., FICHEUX, D., NIEMAN, H., AND ROQUES, B. P., (1994) Solid-phase synthetic, conformational analysis and in vitro cleavage of synthetic human synaptobrevin II 1-93 by tetanus toxin L chain. *Eur. J. Biochem.* 222, 173-181.
51. CORNILLE, F., MARTIN, L., LENOIR, C., CUSSAC, D., ROQUES, B. P., AND FOURNIE-ZALUSKI, M. C., (1997) Allosteric-type control of synaptobrevin cleavage by tetanus toxin light-chain. *Lett. Pept. Sci.* 4, 207-212.
52. CORNILLE, F., MARTIN, L., LENOIR, C., CUSSAC, D., ROQUES, B. P., AND FOURNIE-ZALUSKI, M. C., (1997) Cooperative exosite-dependent cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin light chain. *J. Biol. Chem.* 272, 3459-3464.
53. CREMONA, O., AND DE CAMILLI, P., (1997) Synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurol.* 7, 323-330.
54. CRITCHLEY, D. R., HABIG, W. H., AND FISHMAN, P. H., (1986) Reevaluation of the role of gangliosides as a receptors for tetanus toxin. *J. Neurochem.* 47, 213-222.
55. CRITCHLEY, D. R., PARTON, R. G., DAVISON, M. D., AND PIERCE, E. J., (1988) Characterization of tetanus toxin binding by neuronal tissue. In: *Neurotoxins in neurochemistry, Ellis Harvard series in Biotechnology*, 109-122. Ed. DOLLY, J. O., WILEY, J., and SONS: New York.
56. DAGERT, M., AND EHRLICH, S. D., (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Genes* 6, 23-28.
57. DASGUPTA, B. R., (1989) The structure of botulinum neurotoxin. In: *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*, edited by L.L. Simpson. San Diego, CA: Academic, p. 53-67.
58. DASGUPTA, B. R., (1994) Structures of botulinum neurotoxin, its functional domains, and perspectives on the crystalline type A toxin. In: *Therapy with Botulinum Toxin*, edited by J. Jankovic and M. Hallett. New York: Dekker, p. 15-39.
59. DAYANITHI, G., AHNERT-HILGER, G., WELLER, U., NORDMANN, J. J., AND GRATZL, M., (1990) Release of vasopressin from isolated permeabilized neurosecretory nerve terminals is blocked by the light chain of botulinum A toxin. *Neuroscience* 39, 711-715.
60. DAYANITHI, G., STECHER, B., HÖHNE-ZELL, B., YAMASAKI, S., BINZ, T., WELLER, U., NIEMANN, H., AND GRATZL, M., (1994) Exploring the functional domain and the target of the tetanus toxin light chain in neurohypophysial terminals. *Neuroscience* 58, 423-431.
61. DAYANITHI, G., WELLER, U., AHNERT-HILGER, G., LINKE, H., NORDMANN, J. J., AND GRATZL, M., (1992) The light of tetanus toxin inhibits calcium-dependent vasopressin release from permeabilized nerve endings. *Neuroscience* 46, 489-493.
62. DE FILIPPIS, V., VANGELISTA, L., SCHIAVO, G., TONELLO, F., AND MONTECUCCO, C., (1995) Structural studies on the zinc-endopeptidase light chain of tetanus neurotoxin. *Eur. J. Biochem.* 229, 61-69.
63. DE PAIVA, A., ASHTON, A. C., FORAN, P., SCHIAVO, G., MONTECUCCO, C., AND DOLLY, J. O., (1993) Botulinum A like type B and tetanus toxins fulfill criteria for being a zinc-dependent protease. *J. Neurochem.* 61, 2338-2341.
64. DE PAIVA, A., POULAIN, B., LAWRENCE, G. W., SHONE, C. C., TAUC, L., AND DOLLY, J. O., (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, 20838-20844.
65. DIMITROV, D. S., AND SOWERS, A. E., (1990) Membran electroporation fast molecular exchange by electroosmosis. *Biochem. Et Biophys. Acta* 1022, 381-392.
66. DIMPFFEL, W., HUANG, R. T. C., AND HABERMANN, E., (1977) Gangliosides in nerve tissue cultures and binding of <sup>125</sup>I-labelled tetanus toxin, a neuronal marker. *J. Neurochem.* 29, 329-334.
67. DREYER, F., BECKER, C., BIGALKE, H., FUNK, J., PENNER, R., ROSENBERG, F., AND ZIEGLER, M., (1984) Action of botulinum A toxin and tetanus toxin on synaptic transmission. *J. Physiol. Paris.* 79, 252-258.
68. EDELMANN, L., HANSON, P. I., CHAPMAN, E. R., AND JAHN, R., (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion. *EMBO J.* 14, 224-231.
69. EISEL, U., JARAUSCH, W., GORETZKI, K., HENSCHEN, A., ENGELS, J., WELLER, U., HUDEL, U., HABERMANN, E., AND NIEMANN, H., (1986) Tetanus toxin: primary structure, expression in E. coli, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.* 5, 2495-2502.
70. EKONG, T. A., MCLELLAN, K. AND SESARDIC, D., (1995) Immunological detection of Clostridium botulinum toxin type A in therapeutic preparations. *J. Immunol. Methods* 180, 181-191.
71. EKONG, T. A., MCLELLAN, K. AND SESARDIC, D., (1996). Recombinant SNAP-25 is an effective substrate for Clostridium botulinum type A toxin endopeptidase activity in vitro. *Microbiology* 143, 3337-3347.

72. ELEOPRA, R., TUGNOLI, V., ROSSETTO, O., DE GRANDIS, D., AND MONTECUCCO, C., (1998) Botulinum neurotoxin serotype A and E in human: evidence of a different temporal profile in the neuromuscular block induced. *Neurosci. Lett.* 226, 135-138.
73. ELEOPRA, R., TUGNOLI, V., ROSSETTO, O., MONTECUCCO, C., AND DE GRANDIS, D., (1997) Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human. *Neurosci. Lett.* 224, 91-94.
74. ERDAL, E., BARTELS, F., BINSHECK, T., ERDMANN, G., FREVERT, J., KISTNER, A., WELLER, U., WEVER, J., BIGALKE, H., (1995) Processing of tetanus toxin and botulinum A neurotoxin in isolated chromaffin cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 351, 67-78.
75. ERDMANN, G., WIEGAND, H., AND WELHÖRNER, H. H., (1975) Intra-axonal and extra-axonal Transport of <sup>125</sup>I-tetanus toxin in early local tetanus. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 290, 357-373.
76. FAIRWEATHER, N. F., LYNESS, V. A., PICKARD, D. J., ALLEN, G., AND THOMSON, R. O., (1986) Cloning, nucleotide sequencing, and expression of tetanus toxin fragment C in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 165, 21-27.
77. FAIRWEATHER, N. F., SANDERS, D., SLATER, D., HUDEL, M., HABERMANN, E., WELLER, U., (1993) Production of biologically active light chain of tetanus toxin in *Escherichia coli*. Evidence for the importance of the C-terminal 16 amino acids of full biological activity. *FEBS Lett.* 323, 218-222.
78. FERNANDEZ, I., UBACH, J., DULUBOVA, I., ZHANG, X. Y., SÜDHOF, T. C., AND RIZO, J., (1998) Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin IA. *Cell* 94, 841-849.
79. FERRO-NOVICK, S., AND JAHN, R., (1994) Everything that fuses must converge: proteins that mediate vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370, 191-193.
80. FESCE, R., GROHOVAZ, F., VALTORTA, F., AND MELDOLESI, J., (1994) Neurotransmitter release: fusion or "kiss-and-run." *Trends Cell Biol.* 4, 1-4.
81. FIGUEIREDO, D. M., HALLEWELL, R. A., CHEN, L. L., FAIRWEATHER, N. F., DOUGAN, G., SAVITT, J. M., PARKS, D. A., AND FISHMAN, P. S., (1997) Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central-nervous-system neurons by retrograde axonal-transport. *Exp. Neurol.* 145, 546-554.
82. FORAN, P., LAWRENCE, G. W., SHONE, C. C., FOSTER, K. A., AND DOLLY, J. O., (1996) Botulinum neurotoxin C<sub>1</sub> cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. *Biochemistry* 35, 2630-2636.
83. FORAN, P., SHONE, C. C., AND DOLLY, J. O., (1994) Differences in the protease activities of tetanus and botulinum B toxins revealed by the cleavage of vesicle-associated membrane protein and various sized fragments. *Biochemistry* 33, 15365-15374.
84. FRIEND, M., AND LOCK, L. N., (1987) Field guide to wildlife disease, Washington DC, US Department of Interior Fish and Wildlife Service Resource Publication 167.
85. FUJITA YOSHIGAKI, J., DOHKE, Y., HARA, M., KAMATA, Y., KOZAKI, S., FURUYAMA, S., AND SUGIYA, H., (1996) Vesicle-associated membrane protein 2 is essential for cAMP-regulated exocytosis in rat parotid acinar cells. The inhibition of cAMP-dependent amylase release by botulinum neurotoxin B. *J. Biol. Chem.* 271, 13130-13134.
86. GAISANO, H. Y., SHEU, L., FOSKETT, J. K., AND TRIMBLE, W. S., (1994) Tetanus toxin light chain cleaves a vesicle-associated membrane protein (VAMP) isoform 2 in rat pancreatic zymogen granules and inhibits enzyme secretion. *J. Biol. Chem.* 269, 17062-17066.
87. GERONA, R. R., LARSEN, E. C., KOWALCHYK, J. A., MARTIN T. F., (2000) The C terminus of SNAP25 is essential for Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J Biol Chem.* 275, 6328-6336.
88. GLENN, D. E., AND BURGOYNE, R. D., (1996) Botulinum neurotoxin light chains inhibit both Ca<sup>2+</sup>-induced and GTP analogue-induced catecholamine release from permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 386, 137-140.
89. GUNDERSEN, C. B., (1980) The effects of botulinum toxin on the synthesis, storage and release of acetylcholine. *Prog. Neurobiol.* 14, 99-119.
90. GUNDERSEN, C. B., KATZ, B., AND MILEDI, R., (1982) The antagonism between botulinum toxin and calcium in motor nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 216, 369-376.
91. GUTIERREZ, L. M., VINIEGRA, S., RUEDA, I., FERRER MONTIEL, A. V., CANAVES, J. M., AND MONTAL, M., (1997) A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle docking in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 272, 2634-2639.
92. HABERMANN, E., AND DREYER, F., (1986) Clostridial neurotoxins: handling and action at the cellular and molecular level. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 129, 93-179.
93. HABERMANN, E., DREYER, F., AND BIGALKE, H., (1980) Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission *in vitro* like botulinum A toxin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 311, 33-40.
94. HALLIS, B., JAMES, B. A., AND SHONE, C. C., (1996) Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxin based on their endopeptidase activities. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1934-1938.

95. HALPERN, J. L., AND LOFTUS, A., (1993) Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. *J. Biol. Chem.* 268, 11188-11192.
96. HALPERN, J. L., AND NEALE, E. A., (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 195, 221-241.
97. HANSON, P. I., HEUSER, J. E., AND JAHN, R., (1997) Neurotransmitter release. Four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurol.* 7, 310-315.
98. HANSON, M. A., AND STEVENS, R. C., (2000) Cocystal structure of synaptobrevin II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* Vol. 7, No. 8, 687-692.
99. HASE, C. C., AND FINKELSTEIN, R. A., (1993) Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* 57, 823-837.
100. HATHEWAY, C. L., (1995) Botulism: the present status of the disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 195, 55-75.
101. HAUSINGER, A., VOLKNANDT, W., ZIMMERMANN, H., AND HABERMANN, E., (1996) Inhibition by clostridial neurotoxins of calcium-independent [<sup>3</sup>H] noradrenaline outflow from freeze-thawed synaptosomes: comparison with synaptobrevin hydrolysis. *Toxicon* 33, 1519-1530.
102. HAY, J. C., AND SCHELLER, R. H., (1997) SNAREs and NSF intardeted membrane fusion. *Curr. Op. Cell Biol.* 9, 505-512.
103. HAYASHI, T., MCMAHON, H., YAMASAKI, S., BINZ, T., HATA, Y., SÜDHOF, T. C., AND NIEMANN, H., (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 13, 5051-5061.
104. HENDERSON, I., DAVIS, T., ELMORE, M., AND MINTON, N., (1997) The genetic basis for toxin production in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in the clostridia: molecular biology and pathogenesis (ed. Rood, J., McClane, D., Souger, J., Titball, R.) *Academic Press*, 261-284.
105. HERREROS, J., MIRALLES, F. X., SOLSONA, C., BIZZINT, B., BLASI, J., AND MARSAL, J., (1995) Tetanus toxin inhibits spontaneous quantal release and cleaves VAMP/synaptobrevin. *Brain Res.* 699, 165-170.
106. HERREROS, J., MARTI, E., RUIZ MONTASELL, B., CASANOVA, A., NIEMANN, H., AND BLASI, J., (1997) Localization of putative receptors for tetanus toxin and botulinum neurotoxin type A in rat central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2677-2686.
107. HESS, D. T., SLATER, T. M., WILSON, M. C., AND SKENE, J. H., (1992) The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation an adult CNS. *J. Neurosci.* 12, 4634-4641.
108. HÖHNE-ZELL, B., ECKER, A., WELLER, U., AND GRATZL, M., (1994) Synaptobrevin cleavage by the tetanus toxin light chain is linked to the inhibition of exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.* 355, 131-134.
109. HOLMGREN, J., ELWING, H., FREDMAN, P., AND SVENNER-HOLM, L., (1980) Polystyrene-adsorbed gangliosides for investigation of the structure of the tetanus-toxin receptor. *Eur. J. Biochem.* 106, 371-379.
110. HUNT, J. M., BOMMERT, K., CHARLTON, M. P., KISTNER, A., HABERMANN, E., AUGUSTINE, G. J., AND BETZ, H., (1994) A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 12, 1269-1279.
111. INOUE, K., FUJINAGA, Y., WATANABE, T., OHYAMA, T., TAKESHI, K., MORIISHI, K., NAKAJIMA, K., INOUE, K., AND OGUMA, K., (1996) Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infect. Immun.* 64, 1589-1594.
112. JACOBSSON, G., HAKANSSON, M. L., HULTING, A. L., AND MEISTER, B., (1997) Botulinum neurotoxin F, a VAMP-specific endopeptidase, inhibits Ca<sup>2+</sup>-stimulated GH secretion from rat pituitary cells. *Regul. Pept.* 71, 37-44.
113. JAHN, R., (2000) Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage. *Neuron* 27, 201-204.
114. JAHN, R., AND HANSON, P. I., (1998) Membrane fusion. SNAREs line up in new environment. *Nature* 393, 14-15.
115. JAHN, R., AND SÜDHOF, T. C., (1994) Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 219-246.
116. JIANG, W., AND BOND, J. S., (1992) Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* 312, 110-114.
117. JONGENEEL, C. V., BOUVIER, J., AND BAIROCH, A., (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* 242, 211-214.
118. JOHNSTONE, S. R., MORRICE, L. M., AND VAN HEYNINGEN, S., (1990) The heavy chain of tetanus toxin can mediate the entry of cytotoxic gelonin into intact cells. *FEBS Lett.* 265, 101-103.
119. KAMATA, Y., KOZAKI, S., SAKAGUCHIA, G., IWAMORI, M., AND NAGAI, Y., (1986) Evidence for direct binding of *Clostridium botulinum* type E derivative toxin and its fragments to gangliosides and free fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 1015-1019.



120. KARLI, U. O., SCHÄFER, T., AND BURGER, M. M., (1990) Fusion of neurotransmitter vesicles with target membrane is calcium independent in a cell free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5912-5915.
121. KISTNER, A., AND 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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 345, 227-234.
122. KISTNER, A., SANDERS, D., AND HABERMANN, E., (1993) Disulfide formation in reduced tetanus toxin by thioredoxin; The pharmacological role of interchain covalent and noncovalent bonds. *Toxicon* 31, 1423-1434.
123. KITAMURA, M., IWAMORI, M., AND NAGAI, Y., (1980) Interaction between Clostridium botulinum neurotoxin and gangliosides. *Biochem. Biophys. Acta* 628, 328-335.
124. KITAMURA, M., TAKAMIYA, K. A., AI ZAWA, S., FURUKAWA, K., AND FURUKAWA, K., (1999) Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice. *Biochem. Biophys. Acta* 1441, 1-3.
125. KNAPP, M., SEGELKE, B., AND RUPP, B., (1998) The 1.61 Angstrom structure of the tetanus toxin. Ganglioside binding region: solved by MAD and MIR phase combination (Abstract). *Am. Cryst. Assoc.* 25, 90.
126. KNIGHT, D. E., (1986) Botulinum toxin types A, B und D inhibit catecholamine secretion from bovine adrenal medullary cells. *FEBS Lett.* 207, 222-226.
127. KNIGHT, D. E., AND BARKER, P. F., (1982) Calcium dependences of exocytosis. *J. Membrane Biol.* 68, 107-140.
128. KNIGHT, D. E., TONGE, D. A., AND BAKER, P. F., (1985) Inhibition of exocytosis in bovine adrenal medullary cells by botulinum toxin type D. *Nature* 317, 719-721.
129. KOZAKI, S., KAMATA, Y., WATARAI, S., NISHIKI, T., AND MOCHIDA, S., (1998) Ganglioside GT<sub>1b</sub> as a complementary receptor component for clostridium botulinum neurotoxins. *Microbiol. Pathog.* 25, 91-99.
130. KOZAKI, S., MIKI, A., KAMATA, Y., OGASAWARA, J., (1989) Immunological characterization of papain-induced fragments of clostridium botulinum type A neurotoxin and interaction of the fragment with brain synaptosomes. *Infect. Immun.* 57, 2634-2639.
131. KRIEGLSTEIN, K. G., DASGUPTA, B. R., AND HENSCHEN, A. H., (1994) Covalent structure of botulinum neurotoxin type A: location of sulfhydryl groups, and disulfide bridges and identification of c-termini of light and heavy chains. *J. Prot. Chem.* 13, 49-57.
132. KURAZONO, H., MOCHIDA, S., BINZ, T., EISEL, U., QUANZ, M., GREBENSTEIN, O., WERNARS, K., POULAIN, B., TAUC, L., AND NIEMANN, H., (1992) Minimal essential domains specifying toxicity of the light chains of tetanus toxin and botulinum neurotoxin type A. *J. Biol. Chem.* 267, 14721-14729.
133. KUROKAWA, Y., OGUMA, K., YOKOSAWA, N., SYUTO, B., FUKATSU, R., AND YAMASHITA, I., (1987) Binding and cytotoxic effects of clostridium botulinum type A, C<sub>1</sub> and E toxins in primary neuron cultures from foetal mouse brains. *J. Gen. Microbiol.* 133, 2647-2657.
134. LACY, D. B., AND STEVENS, R. C., (1999) Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J. Mol. Biol.* 291, 1091-1104.
135. LACY, D. B., TEPP, W., COHEN, A. C., DASGUPTA, B. R., AND STEVENS, R. C., (1998) Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nature Struct. Biol.* 5, 898-902.
136. LALLI, G., HERREROS, J., OSBORNE, S. L., MONTECUCCO, C., ROSSETTO, O., AND SCHIAVO, G., (1999) Functional characterization of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J. Cell Sci.* 112, 2715-2724.
137. LAEMMLI, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
138. LAWRENCE, G. W., FORAN, P., MOHAMMED, N., DASGUPTA, B. R., AND DOLLY, J. O., (1997) Importance of two adjacent C-terminal sequences of SNAP-25 in exocytosis from intact and permeabilized chromaffin cells revealed by inhibition with botulinum neurotoxins A and E. *Biochemistry* 36, 3061-3067.
139. LEBEDA, F. J., AND OLSON, M. A., (1994) Secondary structural predictions for the clostridial neurotoxins. *Proteins* 20, 293-300.
140. LEBEDA, F. J., AND OLSON, M. A., (1995) Structural predictions of the channel-forming region of Botulinum neurotoxin heavy chain. *Toxicon* 33, 559-567.
141. LEVEQUE, C., EL FAR, O., MARTIN-MOUTOT, N., SATO, K., KATO, R., TAKAHASHI, M., AND SEAGAR, M. J., (1994) Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 269, 6306-6312.
142. LI, L., BINZ, T., NIEMANN, H., AND SINGH, B. R., (2000) Probing the mechanistic role of glutamate residue in the zinc-binding motif of type A botulinum neurotoxin light chain.

143. LI, L., AND SINGH, B. R., (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.
144. LI, Y., FORAN, P., FAIRWEATHER, N. F., DE PAIVA, A., WELLER, U., DOUGAN, G., AND DOLLY, J. O., (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. *Biochem.* 33, 7014-7020.
145. LINDAU, M., AND ALMERS, W., (1995) Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol.* 7, 509-517.
146. LINK, E., EDELMANN, L., CHOU, J. H., BINZ, T., YAMASAKI, S., EISEL, U., BAUMERT, M., SÜDHOF, T. C., NIEMANN, H., AND JAHN, R., (1992) Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1017-1023.
147. LIVETT, B. G., (1984) Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.* 64, 1103-1161.
148. LÜCKE, T., AND BIGALKE, H., (1996) Tetanus toxin: studies on translocation in neuronal networks *in vitro*. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 353, R 374.
149. MATRIN, T. F. J., (1997) Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol.* 7, 271-276.
150. MARTIN, H. C., AND SESARDIC, D., (1999) Testing of neutralising antibodies to botulinum A toxin: Implications for potency testing of therapeutic antitoxins.
151. MARXEN, P., (1992) Tetanus und Botulinum A-Neurotoxin: Interaktion mit chromaffinen Zellen vom Nebennierenmark des Rindes. *Diss. Christian-Albrechts-Universität Kiel.*
152. MARXEN, P., BARTELS, F., AHNERT-HILGER, G., AND BIGALKE, H., (1991a) Distinct targets for tetanus and botulinum A neurotoxin within the signal transducing pathway in chromaffin cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344, 387-395.
153. MARXEN, P., AND BIGALKE, H., (1991) The chromaffin cell: a suitable model for investigating the actions and the metabolism of tetanus and botulinum A neurotoxin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 343, 12-29.
154. MARXEN, P., AND BIGALKE, H., (1989) Tetanus toxin: inhibitory action in chromaffin cells is initiated by specific types of gangliosides and promoted in low ionic strength solution. *Neuroscience Letters* 107, 261-266.
155. MARXEN, P., ERDMANN, G., AND BIGALKE, H., (1991b) The translocation of botulinum A neurotoxin by chromaffin cells is promoted in low ionic strength solution and is insensitive to trypsin. *Toxicon* 29, 181-189.
156. MARXEN, P., FUHRMANN, U., AND BIGALKE, H., (1989) Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicon* 27, 849-859.
157. MATTEOLI, M., TAKEI, Y., PERIN, M. S., SÜDHOF, T. C., AND DE CAMILLI, P., (1992) Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 117, 849-861.
158. 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. USA* 93, 13310-13315.
159. MCINNES, C., AND DOLLY, J. O., (1990) Ca<sup>2+</sup>-dependent noradrenaline release from permeabilized PC12 cells is blocked by botulinum neurotoxin A or its light chain. *FEBS Lett.* 261, 323-326.
160. MCLELLAN, K., GAINES DAS, R. E., EKONG, T. A. N., AND SESARDIC, D., (1996) Therapeutic botulinum type A toxin: factors affecting potency. *Toxicon*, Vol. 34, No. 9, 975-985.
161. MCMAHON, H. T., FORAN, P., DOLLY, J. O., VERHAGE, M., WIEGANT, V. M., AND NICHOLLS, D. G., (1992) Tetanus toxin and botulinum toxins type A and B inhibit glutamate, gamma-aminobutyric acid, aspartate, and met-enkephalin release from synaptosomes. Clues to the locus of action. *J. Biol. Chem.* 267, 21338-21343.
162. MCMAHON, H. T., AND SÜDHOF, T. C., (1995) Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin and SNAP-25 froms high affinity  $\alpha$ -SNAP binding site. *J. Biol. Chem.* 270, 2213-2217.
163. MCMAHON, H. T., USHKARYOV, Y. A., EDELMANN, L., LINK, E., BINZ, T., NIEMANN, H., JAHN, R., AND SÜDHOF, T. C., (1993) Cellubrevin is a ubiquitous tetanus toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 364, 346-349.
164. MENEGHINI, C., AND MORANTE, S., (1998) The active site structure of tetanus neurotoxin resolved by multiple scattering analysis in X-ray absorption spectroscopy. *Biophys. J.* 75, 1953-1963.
165. MENESTRINA, G., FORTI, S., AND GAMBALE, F., (1989) Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles. Effects of pH, surface charge, and transmembrane Potential on the kinetics of channel formation. *Biophys. J.* 55, 393-405.
166. MENG, X., KARASAWA, T., ZOU, K., KUANG, X., WANG, X., LU, C., WANG, C., YAMAKAWA, K., AND NAKAMURA, S., (1997) Characterization of a neurotoxicogenic *clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2160-2162.

167. MINTON, N. P., (1995) Molecular genetics of clostridial neurotoxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 195, 161-194.
168. MOCHIDA, S., POULAIN, B., WELLER, U., HABERMANN, E., AND TAUC, L., (1989) Light chain of tetanus toxin intracellularly inhibits acetylcholine release at neuro-neuronal synapses, and its internalization is mediated by heavy chain. *FEBS Lett.* 253, 47-51.
169. MONCK, J. R., OBERHAUSER, A. F., FERNANDEZ, J. M., (1995) The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release. *Mol Membr. Biol.* 12, 151-156).
170. MONTAL, M. S., BLEWITT, R., TOMICH, J. M., AND MONTAL, M., (1992) Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of tetanus and botulinum neurotoxins. *FEBS Lett.* 313, 12-18.
171. MONTECUCCO, C., PAPINI, E., AND SCHIAVO, G., (1994) Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett.* 346, 92-98.
172. MONTECUCCO, C., AND SCHIAVO, G., (1993) Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem. Sci.* 18, 324-327.
173. MONTECUCCO, C., AND SCHIAVO, G., (1994) Micro Review: Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Molecular Microbiol.* 13, 1-8.
174. MONTECUCCO, C., AND SCHIAVO, G., (1995) Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* 28, 423-472.
175. MONTECUCCO, C., SCHIAVO, G., AND DASGUPTA, B. R., (1989) Effect of pH on the interaction of botulinum neurotoxins A, B and E with liposomes. *Biochem. J.* 259, 47-53.
176. MORANTE, S., FURENLID, L., SCHIAVO, G., TONELLO, F., ZWILLING, R., AND MONTECUCCO, C., (1996) X-ray absorption spectroscopy study of zinc coordination in tetanus neurotoxin, astacin, alkaline protease and thermolysin. *Eur. J. Biochem.* 235, 606-612.
177. NICHOLS, B. J., AND PELHAM, H. R. B., (1998) SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Acta* 1404, 9-31.
178. NIEMANN, H., BLASI, J., AND JAHN, R., (1994) Clostridial neurotoxins: new tool for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4, 179-185.
179. 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.
180. NISHIKI, T., TOKUYAMA, Y., KAMATA, Y., NEMOTO, Y., YOSHIDA, A., SATO, K., SEKIGUCHI, M., TAKAHASHI, M., AND KOZAKI, S., (1996a) The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT<sub>1b</sub>/GD<sub>1a</sub>. *FEBS Lett.* 378, 253-257.
181. NISHIKI, T., TOKUYAMA, Y., KAMATA, Y., NEMOTO, Y., YOSHIDA, A., SEKIGUCHI, M., TAKAHASHI, M., AND KOZAKI, S., (1996b) Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci Lett.* 208, 105-108.
182. NISHIO, H., TAKEUCHI, T., HATA, F., AND YAGASAKI, O., (1996) Ca<sup>2+</sup>-independent fusion of synaptic vesicles with phospholipase A<sub>2</sub> treated presynaptic membranes in vitro. *Biochem. J.* 318, 981-987.
183. OBLATT-MONTAL, M., YAMASAKI, 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), 1490-1497.
184. OCHANDA, J. O., SYUTO, B., OHISHI, I., NAKI, M., AND KUBO, S., (1986) Binding of Clostridium botulinum neurotoxin to gangliosides. *J. Biochem. (Tokyo)* 100, 27-33.
185. OSEN-SAND, A., STAPLE, J. K., NALDI, E., SCHIAVO, G., ROSSETTO, O., PETITPIERRE, S., MALGAROLI, A., MONTECUCCO, C., AND CATASICAS, S., (1996) Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J. Comp. Neurol.* 367, 222-234.
186. OYLER, G. A., HIGGINS, G. A., BATTENBERG, E., BILLINGSLEY, M., BLOOM, F. E., AND WILSON, M. C., (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell Biol.* 109, 3039-3052.
187. PARLATI, F., WEBER, T., MCNEW, J. A., WESTERMANN, B., SÖLLNER, T. H., ROTHMAN, J. E., (1999) Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12565-12570.
188. PELLEGRINI, L. L., O'CONNOR, V., AND BETZ, H., (1994) Fusion complex formation protects synaptobrevin against proteolysis by tetanus toxin light chain. *FEBS Lett.* 353, 319-323.
189. PELLEGRINI, L. L., O'CONNOR, V., LOTTSPEICH, F., AND 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.

190. PELLIZARI, R., MASON, S., SHONE, C. C., AND MONTECUCCO, C., (1997) The interaction of synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin with botulinum neurotoxins D and F. *FEBS Lett.* 409, 339-342.
191. PELLIZARI, R., ROSSETTO, O., LOZZI, L., GIOVEDI, S., JOHNSON, E., SHONE, C. C., AND MONTECUCCO, C., (1996) Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 271, 20353-20358.
192. PENNER, R., NEHER, E., AND DREYER, F., (1986) Intracellularly injected tetanus toxin inhibits exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *Nature* 324, 76-78.
193. PIERCE, E. J., DAVISON, M. D., PARTON, R. G., HABIG, W. H., AND CRITCHLEY, D. R., (1986) Characterization of tetanus binding to rat brain membranes. *Biochem. J.* 236, 845-852.
194. POIRIER, M. A., XIAO, W. Z., MACOSKO, J. C., CHAN, C., SHIN, Y. K., AND BENNETT, M. K., (1998) The synaptic SNARE complex is a parallel 4-stranded helical bundle. *Nature Struct. Biol.* 5, 765-769.
195. POULAIN, B., TAUC, L., MAISEY, E. A., WADSWORTH, J. D., MOHAN, P. M., AND DOLLY, J. O., (1988) Neurotransmitter release is blocked intracellularly by botulinum neurotoxin, and this requires uptake of both toxin polypeptides by a process mediated by the larger chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4090-4094.
196. PRICE, D. L., GRIFFIN, J., YOUNG, A., PECK, K., AND STOCKS, A., (1975) Tetanus toxin: direct evidence for retrograde Intraaxonal transport. *Science* 188, 945-947.
197. RACIBORSKA, D. A., AND CHARLTON, M. P., (1999) Retention of cleaved SNAP-25 in neuromuscular junction: A new hypothesis to explain persistence of botulinum A poisoning. The Chemical Synapse Symposium. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2617-2628.
198. RACIBORSKA, D. A., TRIMBLE, W. S., AND CHARLTON, M. P., (1998) Presynaptic protein interactions in vivo. Evidence from botulinum A, botulinum C, botulinum D and botulinum E action at frog neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2617-2628.
199. RAHAMIMOFF, R., AND FERNANDEZ, J. M., (1997) Pre- and postfusion regulation of transmitter release. *Neuron* 18, 17-27.
200. RAUCH, G., GAMBALE, F., AND MONTAL, M., (1990) Tetanus toxin channel in phosphatidylserine planar bilayers: conductance states and pH dependence. *Eur. Biophys. J.* 18, 79-83.
201. RIZO, J., AND SÜDHOF, T. C., (1998) Mechanics of membrane fusion. *Nature Struct. Biol.* 5, 839-842.
202. ROA, M., AND BOQUET, P., (1985) Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles at low pH. Protection of specific polypeptides against proteolysis. *J. Biol. Chem.* 260, No. 11, 6827-6835.
203. ROBINSON, L. J., AND MARTIN, T. F. J., (1998) Docking and fusion in neurosecretion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 483-492.
204. ROTHMAN, J. E., (1994) Mechanisms of intracellular protein Transport. *Nature* 372, 55-63.
205. ROTHMAN, J. E., AND WIELAND, F. T., (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227-234.
206. SANDERS, D., HABERMANN, E., (1992) Evidence for a link between specific proteolysis and inhibition of [<sup>3</sup>H]-noradrenaline release by the light chain of tetanus toxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 346, 358-361.
207. SCHANTZ, E. J., AND JOHNSON, E. A., (1997) Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. *Perspect. Biol. Med.* 40, 317-327.
208. SCHEDEL, D., (2000) Interaktion von Clostridienneurotoxinen an ihren Substraten. *Diss. Medizinische Hochschule Hannover.*
209. SCHENGRUND, C. L., DASGUPTA, B. R., AND RINGLER, N. J., (1991) Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT<sub>1b</sub> and derivatives thereof. *J. Neurochem.* 57, 1024-1032.
210. SCHIAVO, G., BENFENATI, F., POULAIN, B., ROSSETTO, O., POLVERINO DE LAURETO, P., DASGUPTA, B. R., AND MONTECUCCO, C., (1992a) Tetanus and botulinum B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832-835.
211. SCHIAVO, G., DEMEL, R., AND MONTECUCCO, C., (1991) On the role of polysialoglycosphingolipids as tetanus toxin receptors. *A study with lipid monolayers.* *Eur. J. Biochem.* 199, 705-711.
212. SCHIAVO, G., GMACHT, M. J., STEINBECK, G., SÖLLNER, T. H., AND ROTHMAN, J. E., (1995a) A possible docking and fusion partical for synaptic transmission. *Nature* 378, 733-736.
213. SCHIAVO, G., MALIZIO, C., TRIMBLE, W. S., POLVERINO DE LAURETO, P., MILAN, G., SUGIYAMA, H., JOHNSON, E. A., AND MONTECUCCO, C., (1994) Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J. Biol. Chem.* 269, 20213-20216.
214. SCHIAVO, G., MATTEOLI, M., AND MONTECUCCO, C., (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological Reviews* 80, 717-766.

215. SCHIAVO, G., AND MONTECUCCO, C., (1997) Clostridial neurotoxins. In bacterial toxins. Tools in cell biology and pharmacology (ed. Aktories, K.) pp. 169-186. London: Chapman & Hall.
216. SCHIAVO, G., OSBORNE, S. L., AND SGOUROS, J. G., (1998) Synaptotagmins: more isoforms than functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 248, 1-8.
217. SCHIAVO, G., PAPINI, E., GENNA, G., AND MONTECUCCO, C., (1990) An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. *Infect. Immun.* 58, 4136-4141.
218. SCHIAVO, G., POULAIN, B., ROSSETTO, O., BENFENATI, F., TAUC, L., AND MONTECUCCO, C., (1992b) Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depends on zinc. *EMBO J.* 11, 3577-3583.
219. SCHIAVO, G., ROSSETTO, O., BENFENATI, F., POULAIN, B., AND MONTECUCCO, C., (1994a) Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus. *Ann. N Y Acad. Sci.* 710, 65-75.
220. SCHIAVO, G., ROSSETTO, O., CATSICAS, S., POLVERINO DE LAURETO, P., DASGUPTA, B. R., BENFENATI, F., AND MONTECUCCO, C., (1993a) Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J. Biol. Chem.* 268, 23784-23787.
221. SCHIAVO, G., ROSSETTO, O., AND MONTECUCCO, C., (1994b) Clostridial neurotoxins as tools investigate the molecular events of neurotransmitter release. *Semin. Cell Biol.* 5, 221-229.
222. SCHIAVO, G., ROSSETTO, O., SANTUCCI, A., DASGUPTA, B. R., AND MONTECUCCO, C., (1992c) Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 23479-23483.
223. SCHIAVO, G., SANTUCCI, A., DASGUPTA, B. R., MEHTA, P. P., JONTES, J., BENFENATI, F., WILSON, M. C., AND MONTECUCCO, C., (1993b) Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett.* 335, 99-103.
224. SCHIAVO, G., SHONE, C. C., BENNETT, M. K., SCHELLER, R. H., AND MONTECUCCO, C., (1995b) Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J. Biol. Chem.* 270, 10566-10570.
225. SCHIAVO, G., SHONE, C. C., ROSSETTO, O., ALEXANDER, F. C., AND MONTECUCCO, C., (1993c) Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J. Biol. Chem.* 268, 11516-11519.
226. SCHIAVO, G., STENBECK, G., ROTHMAN, J. E., AND SÖLLNER, T. H., (1997) Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 997-1001.
227. SCHMID, M. F., ROBINSON, J. P., AND DASGUPTA, B. R., (1993) Direct visualization of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles. *Nature* 364, 827-830.
228. SCHMITT, A., DREYER, F., AND JOHN, C., (1981) At least three sequential steps are involved in the tetanus toxin-induced block of neuromuscular transmission. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 317, 326-330.
229. SCHWAB, M. E., SUDA, K., AND THOENEN, H., (1979) Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. *J. Cell Biol.* 82, 798-810.
230. SCHWEIZER, F. E., BETZ, H., AND AUGUSTINE, G. J., (1995) From vesicle docking to endocytosis: intermediate reactions of exocytosis. *Neuron* 14, 689-696.
231. SCHWEIZER, F. E., DRESBACH, T., DEBELLO, W. M., O'CONNOR, V., AUGUSTINE, G. J., AND BETZ, H., (1998) Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science* 279, 1203-1206.
232. SHAPIRO, R. E., SPECHT, C. D., COLLINS, B. E., WOODS, A. S., COTTER, R. J., AND SCHNAAR, R. L., (1997) Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand. *J. Biol. Chem.* 272, 30380-30386.
233. SHENG, Z. H., RETTING, J., TAKAHASHI, M., AND CATTERALL, W. A., (1994) Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron.* 13, 1303-1313.
234. SHONE, C. C., HAMBLETON, P., AND 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, 175-180.
235. SHONE, C. C., QUINN, C. P., WAIT, R., HALLIS, B., FOOKS, S. G., AND HAMBLETON, P., (1993) Proteolytic cleavage of synthetic fragments of vesicle-associated membrane protein, isoform-2 by botulinum type B neurotoxin. *Eur. J. Biochem.* 217, 965-971.
236. SHONE, C. C., AND ROBERTS, A. K., (1994) Peptide substrate specificity and properties of the zinc-endopeptidase activity of botulinum type B neurotoxin. *Eur. J. Biochem.* 225, 263-270.

237. SIMPSON, L. L., (1980) Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin A and the cholinergic neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212, 16-21.
238. SIMPSON, L. L., (1986) Molekular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 427-453.
239. SIMPSON, L. L., (1989) Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin. *San Diego, CA: Academic Press, New York, pp. 20, 153-173.*
240. SIMPSON, L. L., COFFIELD, J. A., AND BAKRY, N., (1993) Chelation of zinc antagonizes the neuromuscular blocking properties of the seven serotypes of botulinum neurotoxin as well as tetanus toxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 720-727.
241. SINGH, B. R., (2000) Intimate details of the most poisonous poison. *Nature Structural Biology. Vol. 7, No. 8., 617-619.*
242. SÖLLNER, T., (1995) SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Lett.* 369, 80-83.
243. SÖLLNER, T., BENNET, M. K., WHITEHEARTE, S. W., SCHELLER, R. H., AND ROTHMAN, J. E., (1993a) A protein assembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 75, 409-418.
244. SÖLLNER, T., AND ROTHMAN, J. E., (1994) Neurotransmission: Harnessing fusion machinery at the synapse. *TINS* 17, 344-348.
245. SÖLLNER, T., WHITEHEART, S. W., BRUNNER, M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., GEROMANOS, S., TEMPST, P., AND ROTHMAN, J. E., (1993b) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.
246. STANLEY, E. F., (1997) The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci.* 20, 404-409.
247. STANLEY, E. F., AND MIROTZNIK, R. R., (1997) Cleavage of syntaxin prevents G protein regulation of presynaptic calcium channels. *Nature* 385, 340-343.
248. STECHER, B., GRATZL, M., AND AHNERT-HILGER, G., (1989a) Reductive chain separation of botulinum A toxin-a prerequisite to its inhibitory action on exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.* 248, 23-27.
249. STECHER, B., HENS, J. J. H., WELLER, U., GRATZL, M., GISPE, W. H., AND GRAAN, P. N. E., (1992) Noradrenalin release from permeabilized synaptosomes is inhibited by the light chain of tetanus toxin. *FEBS Lett.* 312, 192-194.
250. STECHER, B., WELLER, U., HABERMANN, E., GRATZL, M., AND AHNERT-HILGER, G., (1989b) The light chain but not the heavy chain of botulinum A toxin inhibits exocytosis from permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 255, 391-394.
251. STOECKEL, K., SCHWAB, M., AND THOENEN, H., (1975) Comparison between the retrograde axonal Transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. *Brain Res.* 99, 1-16.
252. STRITTMATTER, W. J., (1988) Molecular Mechanisms of Exocytosis: The adrenal chromaffin cells as a Model System. *Cell. Molec. Neurobiol.* 8, 18-25.
253. SÜDHOF, T. C., (1995) The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interaction. *Nature* 375, 645-653.
254. SÜDHOF, T. C., DE CAMILLI, P., NIEMANN, H., AND JAHN, R., (1993) Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 75, 1-4.
255. SÜDHOF, T. C., AND JAHN, R., (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6, 665-677.
256. SUTTON, R. B., FASSHAUER, D., JAHN, R., AND BRÜNGER, A. T., (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
257. SWAMINATHAN, S., AND ESWARAMOORTHY, S., (2000) Structural analysis of the catalytic and binding sites of clostridium botulinum neurotoxin B. *Nature Structural Biology* 3, 693-699.
258. TONELLO, F., SCHIAVO, G., AND MONTECUCCO, C., (1997) Metal substitution of tetanus neurotoxin. *Biochem. J.* 322, 507-510.
259. UMLAND, T. C., WINGERT, L. M., SWAMINATHAN, S., FUREY, W. F., SCHMIDT, J. J., AND SAX, M., (1997) Structure of the receptor binding fragment H<sub>C</sub> of tetanus toxin. *Nature Struct. Biol.* 4, 788-792.
260. UMLAND, T. C., WINGERT, L. M., SWAMINATHAN, S., SCHMIDT, J. J., AND SAX, M., (1998) Crystallization and preliminary X-ray analysis of tetanus neurotoxin C fragment. *Acta Crystallogr.* 54, 273-275.
261. UNGERMANN, C., SATO, K., AND WICKNER, W., (1998) Defining the functions of trans-SNARE pairs. *Nature* 396, 543-548.

262. VAIDYANATHAN, V. V., YOSHINO, K., JAHNZ, M., DORRIES, C., BADE, S., NAUENBERG, S., NIEMANN, H., AND 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, 327-337.
263. VAN HEYNINGEN, W. E., (1974) Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin. *Nature* 249, 415-417.
264. VAN HEYNINGEN, W. E., AND MILLER, P. A., (1961) The fixation of tetanus toxin by gangliosides. *J. Gen. Microbiol.* 24, 107-119.
265. VILLIERS, M. B., GABERT, F. M., JACQUIER, M. R., VILLIERS, C. L., AND COLOMB, M. G., (1993) Involvement of the Zn<sup>2+</sup>-binding region of tetanus toxin in B and T recognition. Influence of Zn<sup>2+</sup> fixation. *Mol. Immunol.* 30, 129-136.
266. WALCH-SOLIMENA, C., BLASI, J., EDELMANN, L., CHAPMAN, E. R., FISCHER VON MOLLARD, G., AND JAHN, R., (1995) The t-SNAREs Syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Biol.* 128, 637-645.
267. WALCH-SOLIMENA, C., JAHN, R., AND SÜDHOF, T. C., (1993) Synaptic vesicle proteins in exocytosis: what do we know? *Current Opinion in Neurobiology* 3, 329-336.
268. WALTON, K. M., SANDBERG, K., ROGERS, T. B., AND SCHNAAR, R. L., (1988) Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma Cells. *J. Biol. Chem.* 263, 2055-2063.
269. WASHBOURNE, P., PELLIZZARI, R., BALDINI, G., WILSON, M. C., AND MONTECUCCO, C., (1997) Botulinum neurotoxin type A and type E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS Lett.* 418, 1-5.
270. WASHBOURNE, P., SCHIAVO, G., AND MONTECUCCO, C., (1995) Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem. J.* 305, 721-724.
271. WEBER, T., ZEMELMAN, B. V., MCNEW, J. A., WESTERMANN, B., GMACHL, M. J., PARLATI, F., SÖLLNER, T. H., AND ROTHMAN, J. E., (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.
272. WELLER, U., DAUZENROTH, M. E., MEYER ZU HERINGDORF, D., AND HABERMANN, E., (1989) Chains and fragments of tetanus toxin. Separation, reassociation and pharmacological properties. *Eur. J. Bio. Chem.* 182, 649-656.
273. WELLER, U., TAYLOR, C. F., AND HABERMANN, E., (1986) Quantitative comparison between tetanus toxin, some fragments and toxoid for binding and axonal transport in the rat. *Toxicon* 24, 1055-1063.
274. WELLHÖRNER, H. H., (1982) Tetanus Neurotoxin. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 93, 1-68.
275. WELLHÖRNER, H. H., (1992) Tetanus and botulinum neurotoxins. In handbook of experimental pharmacology, edited by H. Herken and F. Hucho. Berlin: Springer-Verlag, p. 357-417.
276. WENDLAND, B., EMR, S. D., AND RIEZMAN, H., (1998) Protein traffic in the yeast endocytic and vacular protein sorting pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 513-522.
277. WHITEART, S. W., ROSSNAGEL, K., BUHROW, S. A., BRUNNER, M., JAENICKE, R., AND ROTHMAN, J. E., (1994) N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* 126, 945-954.
278. WICTOME, M., ROSSETTO, O., MONTECUCCO, C., AND SHONE, C. C., (1996) Substrate residues N-terminal to the cleavage site of botulinum type B neurotoxin play a role in determining the specificity of its endopeptidase activity. *FEBS Lett.* 386, 133-136.
279. WILLIAMSON, L. C., HALPERN, J. L., MONTECUCCO, C., BROWN, J. E., AND NEALE, E. A., (1996) Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J. Biol. Chem.* 271, 7694-7699.
280. WILLIAMSON, L. C., AND NEALE, E. A., (1994) Bafilomycin A<sub>1</sub> inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. *J. Neurochem.* 63, 2342-2345.
281. WILLIAMSON, L. C., AND NEALE, E. A., (1998) Syntaxin and 25-kDa synaptosomal associated protein: differential effects on botulinum neurotoxins C and A on neuronal survival. *J. Neurosci. Res.* 52, 569-583.
282. WILSCHUT, J., SCHOLMA, J., EASTMAN, S. J., HOPE, M. J., AND CUTTS, P. R., (1992) Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of phospholipid vesicles containing free fatty acids: modulation by transmembrane pH gradients. *Biochemistry* 31, 2629-2636.
283. WILSON, M. C., MEHTA, P. P., AND HESS, E. J., (1996) SNAP-25, enSNAREd in neurotransmission and regulation of behaviour. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 670-676.
284. WISER, O., BENNETT, M. K., AND ATLAS, D., (1996) Functional interaction of syntaxin and SNAP-25 with voltage-sensitive L- and N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *EMBO J.* 15, 4100-4110.
285. WOODMAN, P. G., (1997) The roles of NSF, SNAPs and SNAREs during membrane fusion. *Biochem. Biophys. Acta* 1357, 155-172.

286. WRIGHT, J. F., PERNOLLET, M., REBOUI, A., AUDE, C., AND COLOMB, M. G., (1992) Identification and partial characterization of a low affinity metal binding site in the light chain of tetanus toxin. *J. Biol. Chem.* 267, 9053-9058.
287. XU, T., BINZ, T., NIEMANN, H., AND NEHER, E., (1998) Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nature Neurosci.* 1, 192-200.
288. YAMASAKI, S., BAUMEISTER, A., BINZ, T., BLASI, J., LINK, E., CORNILLE, F., ROQUES, B., FYKSE, E. M., SÜDHOF, T. C., JAHN, R., AND NIEMANN, H., (1994a) Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin. *J. Biol. Chem.* 269, 12764-12772.
289. YAMASAKI, S., BINZ, T., HAYASHI, T., SZABO, E., YAMASAKI, N., EKLUND, M., JAHN, R., AND NIEMANN, H., (1994b) Botulinum neurotoxin type G proteolyzes the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 829-835.
290. YAMASAKI, S., HU, Y., BINZ, T., KALKUHL, A., TAMURA, T., JAHN, R., KANDEL, E., AND NIEMANN, H., (1994c) Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of *Aplysia californica*. Structure and proteolysis by tetanus and botulinum neurotoxins type D and F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4688-4692.
291. YAVIN, E., AND HABIG, W. H., (1984) Binding of tetanus toxin to somatic neural hybrid cells with varying gangliosides composition. *J. Neurochem.* 42, 1313-1320.
292. YAVIN, E., LAZAROVICI, P., AND NATHAN, A., (1987) Molecular interactions of ganglioside receptors with tetanotoxin on solid supporters, aqueous solutions and natural membranes. In Wirtz KAW (ed) *Membrane receptors, dynamics, and energetics*, Plenum, pp. 135-137.
293. ZELLMER, S., CEVC, G., AND RISSE, P., (1994) Temperature- and pH- controlled fusion between complex lipid membranes. Examples with the diacylphosphatidylcholine/fatty acid mixed liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 1196, 101-113.



## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Niloofar

Khadjeh Nasir Tousi

Grüne Aue 1

30559 Hannover

Tel. : 0511/527581

E-Mail: [niloofar.khadjeh@web.de](mailto:niloofar.khadjeh@web.de)

Geboren am 22.03 1966 in Teheran

Ledig keine Kinder

### Schulbildung

1971-1976	Grundschule in Teheran
1976-1979	Orientierungsstufe in Teheran
1979-1983	Gymnasium in Teheran
1983	Abschluss: Abitur
1985	Einreise nach Deutschland
1985-1986	Erlernen der deutschen Sprache an der Inlingua-Sprachschule in Hannover
1987-1988	Besuch von Studienkolleg an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

### Studium

1988-1993	Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwig-Universität Freiburg i. Breisgau
1993-1994	praktisches Jahr in der öffentlichen Apotheke Während dieser Tätigkeit habe ich unter anderem folgenden Arbeiten ausgeführt: <ul style="list-style-type: none"><li>- Qualitätskontrolle der eingehenden Stoffe,</li><li>- Aktive Beratung der Kunden,</li><li>- Herstellung verschiedener Galenischen Zubereitungen,</li><li>- EDV-Tätigkeiten, wie MS-Office</li></ul>

- 1995 Abschlussexamen mit der Note „gut“
- 1995-1996 tätig in der öffentlichen Apotheke als Apothekerin
- 1997-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung Toxikologie und Anschließende Promotion

Meine Tätigkeiten in dieser Zeit:

- Arbeiten mit primären Zellkulturen
- Anwendung verschiedenen Zellkulturtechniken, unter anderem: Elektroporation, radioaktive Markung und Anfärbung der Zellen
- Gentechnologische Herstellung von verschiedenen Proteinen

und nebenbei:

- Betreuung von Praktikanten, unter anderem Biochemiestudenten und MTA-, BTA- und CTA-Praktikanten,
- Erhaltung von Pharmakologieseminare für Medizinstudenten,
- Klausuraufsicht bei Medizinerinnen,
- Erstellung von Klausurfragen (in Fach allgemeine Pharmakologie) und Korrektur der Arbeiten,
- Assistieren bei Frühjahrstagungen,
- Bereitschaftsdienste in der Toxikologischen Analytik

Auslandsaufenthalten:

- Juni 1999 Bei Frau Dr. Sesardic in Division of Bacteriology National Institut for Biological Standards And Control (NIBSC)  
Blanche lane, South Mimms, Potters Bar,  
Herfordshire in UK
- Oktober 1999 Bei Frau Dr. Eton in List Biological Laboratories, INC.  
501-B Vandell Way  
Campbell, CA 95008  
U.S.A.

Seit 2002 tätig in der öffentlichen Apotheke als Apothekerin

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge:

- Oktober 1999 in Miami, Florida, USA, Society for Neuroscience 1999 mit dem Poster: pH-Dependent Translocation of Tetanus Toxin
- November 1999 in Orlando, Florida, USA, International Conference 1999, Basic and

Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus toxins mit dem Poster: Tetanustoxin-pH-Dependent translocation through receptor-free membranes.

- März 2001 in Mainz, Deutschland, 41. Frühjahrstagung der Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie mit dem Poster: Receptor-mediated translocation of tetanus toxin across the plasma membrane
- Juni 2002 in Hannover, Deutschland, Bei der internationalen Conference 2002: Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxin, mit dem Poster: Characterization of tetanus toxin translocation through the plasma membrane of chromaffin cells

### Zusatzqualifikationen

Weiterbildung:	In Fach Toxikologie, Besuch der DGPT-Kurse (Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie), Voraussichtliche Abschlussprüfung, März 2003.
	Fortbildung nach § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. Gentechnische Sicherheits-Verordnung
Sprachen	Deutsch, Farsi (Muttersprache) Englisch sehr gute Kenntnisse (in Wort und Schrift) Spanisch Grundkenntnisse
Hobbys	Reisen, lesen

Hannover, 05.12.03