

Synaptobrevin-beladene ghosts:
Aufbau eines Modellsystems zur
Untersuchung des
Translokationsschrittes von Tetanustoxin

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Jeannette Koch geb. Heyn,
geb. am 30. Mai 1967 in Berlin

Hannover, im Juni 2005

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

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

Tag der Promotion: 09. Juni 2005

Erklärung

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

Hannover, den 09. Juni 2005

Zusammenfassung

Die Gruppe der clostridiellen Neurotoxine (CNT), zu denen **Tetanus Neurotoxin** (TeNT) und **Botulinum Neurotoxin Serotyp A-G** (BoNT/A-/G) gehören, stellt die Gruppe der potentesten bekannten Gifte dar. Sie binden spezifisch an Nervenzellen und blockieren deren Neurotransmitterausschüttung. Ihre letale Dosis für den Menschen liegt Bereich von 1-2 ng/kg Körpergewicht. Damit müssen alle Schritte (Bindung, Endozytose, Translokation, und enzymatische Spaltung der Substrate) des Wirkungsmechanismus sehr spezifisch sein, damit es schließlich zur Unterbindung der Exozytose und der damit verbundenen Symptome kommt. Den Schritten die zur Wirkung führen, können verschiedene Domänen in den clostridiellen Neurotoxinen zugeordnet werden. Die CNT sind zweikettige Proteine. Sie bestehen aus einer schweren (~ 100 kDa) und einer leichten (~50 kDa) Kette, die über eine Disulfidbrücke und nicht kovalente Wechselwirkungen verbunden sind. Die schwere Kette lässt sich weiter in zwei Fragmente (jeweils ~50 kDa), H_N und H_C, unterteilen. Die H_C-Domäne vermittelt die neuroselektive Bindung der Toxine. Die H_N-Domäne ist nach bisherigen Erkenntnissen für die Translokation der leichten Kette aus dem sauren endosomalen Kompartiment in das Zytosol verantwortlich. Die leichten Ketten der verschiedenen Serotypen gehören zur Gruppe der Zink-Endoproteasen. Sie hydrolysieren selektiv bestimmte Proteine der SNARE-Familie (**soluble NSF attachment protein receptor**), die essentiell für die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran sind. Die verschiedenen Schritte des Wirkungsmechanismus sind bisher zu unterschiedlichem Grad aufgeklärt: Während die Bindung und die enzymatische Aktivität der Toxine weitgehend geklärt sind, ist der Translokationsmechanismus aus dem Endosom in das Zytosol noch ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es, ein Modellsystem aufzubauen, in dem man den Translokationsprozess von TeNT über natürliche Membranen verfolgen kann. Mit diesem System sollte die Translokationsdomäne von TeNT näher untersucht werden, um für die Translokation wichtige Bereiche zu charakterisieren.

In dem aufgebauten Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts konnte erstmals der Rezeptor-unabhängige Translokationsschritt von TeNT über eine natürliche Membran unter den eingestellten, bekannten physiologischen Bedingungen durch die Spaltung von Synaptobrevin II gesondert betrachtet werden. Dieses Modell kann für Untersuchungen von Translokationsvorgängen vom endosomalen Kompartiment in das Zytosol genutzt werden. Durch Aufnahme der anderen am Vesikel-Fusions-Komplex beteiligten

Proteine der SNARE-Familie während der Präparation (diese können aufgrund ihrer Größe problemlos eingeschleust werden), kann damit auch die Translokation der anderen CNT verfolgt werden. Es kann außerdem für die Betrachtung der Translokation anderer Toxine über Membranen herangezogen werden, da durch Anpassung der Bedingungen während der Präparation und der Versuche beliebige Kompartimentübergänge dargestellt werden können.

Durch „site directed mutagenesis“ einzelner Aminosäuren, die in hochkonservierten amphiphatischen Regionen der H_N-Domäne lokalisiert sind, sollten Bereiche, die als „pH-sensibler Schalter“ die pH-induzierte Konformationsänderung der H_N-Domäne auslösen, identifiziert werden. Hauptauswahlkriterium für die eingefügten Mutationen war der funktionelle Aspekt der mutierten Aminosäuren, wie Änderungen des Protonierungszustandes bei pH-Wertabsenkung und cis/trans Isomerie. Zusätzlich wurde großen Wert eine hohe Struktur- und Sequenzkonservierung gelegt. Die Mutation vieler strikt konservierter Aminosäuren zeigte keine Auswirkungen auf die Funktion des Proteins. Das legt nahe, dass die hohe Konservierung innerhalb der H_N-Domäne vorwiegend der Faltung und Stabilität dient. Eine Mutation (TeNTHis6 D634A K635A D638A) zeigte eine um den Faktor 5 abgeschwächte Wirkung. Diese ist wahrscheinlich auf eine gestörte Interaktion zwischen der H_C- und der H_N-Domäne zurückzuführen. Damit sind auch Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Domänen der schweren Kette wichtig für die Translokation der leichten Kette.

Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation ermöglichen mit dem präsentierten Versuchsmodell erstmals die genaue Untersuchung der Rezeptor-unabhängigen Translokation von TeNT über ein natürliches Membransystem und liefern erste experimentelle Daten zu dieser Thematik.

Stichworte: Clostridielle Neurotoxine, Translokation, Erythrozyten ghosts

Summary

Clostridial neurotoxins (CNT), which include **tetanus neurotoxin** (TeNT) and the seven serologically distinct serotypes of **botulium neurotoxin type A – G** (BoNT), are the most potent of all known toxins. After specifically binding to neurons, they can inhibit the release of neurotransmitters. The lethal toxin dose for humans is as low as 1 – 2 ng/kg body weight. Thus, all steps (i.e. receptor binding, endocytosis, translocation into the cytoplasm, and enzymatic cleavage) that finally result in the inhibition of neurotransmitter release and the characteristic symptoms have to be highly specific. Separate domains of the clostridial neurotoxins are responsible for the different reaction steps. CNT are double chained molecules, made up of a heavy chain (MW ~100 kDa), and a light chain (MW ~50 kDa) linked by disulfide bonds and non-covalent interactions. The heavy chain can be further divided into the two fragments H_N and H_C (MW ~50 kDa each). The H_C domain mediates specific binding of the toxin to neurons, whereas the H_C domain seems to be responsible for translocating the light chain from acidified endosomes to the cytoplasm. The light chains of the different serotypes are zinc-metalloproteases that act by selective hydrolytic cleavage of SNARE (soluble NSF attachment protein receptor)-family proteins, which are essential for the fusion of synaptic vesicles with the pre-synaptic membrane. Whilst the binding mechanisms as well as the enzymatic activity have been thoroughly analysed, the translocation of the toxin from the endosome into the cytoplasm is not yet fully understood.

The aim of this study was therefore to establish a model system that allows the analysis of TeNT translocation through a biological membrane. This model was then employed to detect regions of the protein important for the translocation process.

In the model with synaptobrevin-loaded ghosts, the receptor-independent translocation step of TeNT through a biological membrane could be analysed independently under defined, physiological conditions for the first time, using cleavage of synaptobrevin II as a readout system. In general, this model is a helpful tool for studying translocation processes from endosomes to the cytosol. By including other SNARE-family proteins of the vesicle fusion complex into the ghosts during preparation (which does not pose any problems, since SNARE-family proteins are sufficiently small), translocation of other clostridial neurotoxins can be analysed. Similarly, translocation mechanisms of other toxins can be examined, since adaptation of experimental conditions during ghost

preparation and the actual translocation experiment enables modelling of a large number of compartmental transitions.

In order to identify pH-sensitive regions of the H_N domain that induce pH-dependent conformational changes, single amino acids in the highly-conserved amphiphatic regions of the H_N domain were modified by site directed mutagenesis. The amino acids were selected because of specific functional characteristics, such as pH-sensitivity or cis/trans isomerism. Additionally, maximum conservation of structure and sequence was taken into consideration.

However, the mutation of several highly conserved amino acids did not alter translocation. This suggests that the highly conserved regions within the H_N domain are mainly responsible for correct protein folding and stability. One of the inserted mutations (TeNTHis6 D634A K635A D 638A) resulted in a five-fold reduction of toxicity. With great likelihood, this was due to a disturbed interaction between the H_C and the H_N domains. Thus, interactions between heavy chain domains may influence translocation of the light chain.

Based on the results of this thesis, it is now possible to analyse the receptor independent translocation of TeNT through a biological membrane system. First experimental data using this model system were obtained in this study.

Key words: clostridial neurotoxins, translocation, erythrocyte ghosts

Danksagung

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

Für die Bereitstellung des Themas und für die fachliche Unterstützung während der gesamten Promotion bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Bigalke.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Betreuung dieser Arbeit und freundliche Unterstützung während des Promotionsverfahrens.

Ein besonderer Dank gebührt allen unbekanntem (Blutbank der MHH) und bekannten Blutspendern, vor allem Peter und Uwe für ihre stetige Bereitschaft zum Aderlass, ohne die das in dieser Arbeit aufgebaute ghost-Modell ohne Ausgangsmaterial dagestanden hätte.

Allen Mitarbeitern der Abteilung für Toxikologie gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des toxikologisch-analytischen Rufbereitschaftsdienstes bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. T. Binscheck, Karin Agternkamp und Sandra Hagemann.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. T. Binz danke ich für die freundliche Aufnahme und die Starthilfe in der Zeit der molekularbiologischen Arbeiten. Für die projektbezogene Zusammenarbeit möchte ich besonders Steffen Bade und Andreas Rummel danken.

Speziell bedanken möchte ich mich bei Carola Kassebaum, Tina Hottopp-Hergesell, Ulrike Fuhrmann, Martina Enge, Stefanie Feldhege und Tina Schaper für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner neuen Arbeitsgruppe am Institut für Anatomie der Universität Magdeburg: bei Diane Bimczok, Monika Sagebiel und Andreas Post für die fröhliche Arbeitsatmosphäre und besonders bei Prof. Hermann-Josef Rothkötter, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit fertigzustellen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, und dass sie mir in allen Dingen mit Wort und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Peter für seine Motivation, Geduld, Aufmunterung und vor allem für viel Abwechslung und Spaß außerhalb des Labors.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung.....	1
1.1 Clostridielle Neurotoxine.....	1
1.1.1 Struktur und Wirkung von clostridiellen Neurotoxinen.....	3
1.2 Ghosts	9
1.2.1 Bakterien ghosts	9
1.2.2 Erythrozyten ghosts.....	9
2 Zielsetzung der Arbeit.....	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Materialliste	12
3.1.1 Reagenzien	12
3.1.2 Systeme	13
3.1.3 Standards.....	14
3.1.3.1 DNA-Standard.....	14
3.1.3.2 Proteinstandards.....	14
3.1.4 Enzyme.....	14
3.1.4.1 Nukleinsäure modifizierende Enzyme.....	14
3.1.4.2 Weitere Enzyme	14
3.1.5 Radiochemikalien.....	15
3.1.6 Häufig verwendete Puffer und Medien	15
3.1.7 Antikörper	17
3.1.7.1 Anti-Synaptobrevin-2	17
3.1.7.2 Anti-Spektrin	17
3.1.7.3 Peroxidase-Anti-Maus	17
3.1.8 Bakterienstämme.....	17
3.1.8.1 <i>E.coli</i> DH5 α (Gibco BRL)	17
3.1.8.2 <i>E.coli</i> TG1	18
3.1.8.3 <i>E. coli</i> M15pREP4 (Qiagen).....	18
3.1.8.4 <i>E. coli</i> BL21 DE3 (Novagen)	18
3.1.9 Plasmide	19
3.1.9.1 PQE-3	19
3.1.9.2 pAR4b-TeNTHis6-H236V E237Q.....	19
3.1.9.3 pAR2-TeNTHis6	19
3.1.10 Oligonukleotide.....	20
3.1.10.1 Oligonukleotide zur Amplifikation.....	20
3.1.10.2 Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen	21
3.1.11 Sonstige Materialien und Geräte	21

	Seite
3.2 Methoden.....	22
3.2.1 Arbeiten mit Erythrozyten-ghosts	22
3.2.1.1 Präparation von Erythrozyten-ghosts.....	22
3.2.1.2 Erythrozyten-ghosts für ¹²⁵ I TeNT-Aufnahmeversuche.....	23
3.2.1.3 Synaptobrevin-beladene ghosts	23
3.2.2 Aufnahmeversuche von ¹²⁵ I-TeNT in Erythrozyten-ghosts.....	25
3.2.3 Spaltung von Synaptobrevin in Erythrozyten-ghosts durch TeNT.....	26
3.2.4 Biochemische Methoden	27
3.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli modifiziert	27
3.2.4.1.1 Probenvorbereitung.....	27
3.2.4.1.2 Gelelektrophorese	27
3.2.4.1.3 Coomassiefärbung.....	28
3.2.4.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	29
3.2.4.2 Western-blot.....	29
3.2.4.2.1 Protein-Transfer	29
3.2.4.2.2 Immunologische Detektion	30
3.2.4.3 Iodierung von TeNT und BSA mit ¹²⁵ I.....	31
3.2.4.4 Fluoreszenzmarkierung von BSA	33
3.2.5 Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.5.1 Transformation von <i>E. coli</i>	33
3.2.5.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen	34
3.2.5.1.2 Herstellung kompetenter, tieffrierbarer Bakterien-Zellen.....	34
3.2.5.1.3 Transformation von <i>E. coli</i>	35
3.2.5.1.4 Aufbewahrung transformierter Klone – Anlegen von <i>E. coli</i> Glycerinkulturen	35
3.2.5.2 Plasmid-Präparation.....	35
3.2.5.2.1 Plasmid-Mini-Präparation.....	36
3.2.5.2.2 Plasmid-Midi-Präparation.....	37
3.2.5.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	38
3.2.5.3 DNA-Gelextraktion	39
3.2.5.4 PCR.....	40
3.2.5.4.1 Reinigung von PCR-Produkten.....	41
3.2.5.5 Sequenzierung von Plasmid DNA	41
3.2.5.6 Restriktionsschnitte.....	43
3.2.5.7 Dephosphorylierung eines Vektors.....	44
3.2.5.8 Ligation.....	45
3.2.5.9 Agarose-Gelelektrophorese.....	46
3.2.6 Klonierung von TeNT mit Mutationen in der Translokationsdomäne	47
3.2.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	47
3.2.7.1 Proteinpräparation.....	47
3.2.7.1.1 Präparation rekombinanter TeNT	48
3.2.7.1.2 Präparation von rekombinantem Synaptobrevin-2.....	49
3.2.7.2 Trypsinaktivierung rekombinant hergestellter TeNT Moleküle	51
3.2.8 Bestimmung der Toxizität von CNT am Nervus phrenicus Zwerchfell- Präparat der Maus.....	52

	Seite
4 Ergebnisse.....	53
4.1 Das Erythrozyten ghost Modell	53
4.1.1 Herstellung von Erythrozyten ghosts	53
4.1.2 pH-Stabilität der ghosts	54
4.2 Translokation von ¹²⁵ I-TeNT im ghost-Modell.....	55
4.3 Inkorporation von Cy 3.5-markiertem BSA in ghosts während der Präparation	57
4.4 Präparation von Synaptobrevin-beladenen ghosts	58
4.5 Quantifizierung des Synaptobrevin-Verdaus in den Synaptobrevin-beladenen ghosts	60
4.6 Translokation von nativem TeNT im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts	61
4.7 Molekularbiologische Ergebnisse	62
4.7.1 Klonierungsstrategie.....	62
4.7.2 Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren	63
4.7.3 Klonierung des TeNT Gens mit Mutationen im Genabschnitt der Translokationsdomäne	65
4.7.4 Umsetzen des Genabschnittes der Translokationsdomäne mit den darin lokalisierten Punktmutationen aus pJK1(a-j)-TeNTHis6 in pAR2-TeNTHis6.....	67
4.8 Produktion von TeNT mit Mutationen in der Translokationsdomäne	67
4.8.1 "Nicking" und enzymatische Aktivität des (rekombinant hergestellten) aktiven TeNT.....	69
4.8.1.1 "Nicking" der rekombinant hergestellten aktiven TeNT	69
4.8.1.2 <i>In-vitro</i> -Aktivität von rekombinatem TeNT	70
4.9 Translokationsexperimente mit rekombinatem TeNT in verschiedenen Systemen	72
4.9.1 Translokation/Aktivität von TeNT-Mutanten im Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparat der Maus.....	72
4.9.2 Translokation von rekombinatem TeNTHis6 und TeNTHis6 D634A K635A D638A im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts	73
5 Diskussion.....	76
5.1 Erythrozyten ghosts als Modellsystem für Translokationsexperimente	78
5.2 Der Translokationsschritt im Wirkungsmechanismus der CNT	81
5.3 Die Translokationsdomäne von TeNT	83
5.4 Vergleich der verschiedenen genutzten Translokationsmodelle	88
6 Ausblick	90
7 Literaturverzeichnis	91

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
μ	mikro
A, Ala	Alanin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
bp	Basenpaare
BoNT	Botulinum Neurotoxin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CD	Cirkular Dichroismus
CFT	<i>channel-forming toxin</i>
CNT	Clostridielles Neurotoxin
cpm	Impulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
D, Asp	Aspartat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gravitation
G, Gly	Glycin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GPI	Glykophosphoinositol
h	Stunde
HC	schwere Kette
H _C	carboxyterminale Hälfte der schweren Kette (HC)
H _N	aminoternale Hälfte der schweren Kette (HC)
HCl	Salzsäure
HEPES	4-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio-D-Galactopyranosid
K, Lys	Lysin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter

LC	leichte Kette
m	milli; Meter
M	molar
min	Minute
MLD	mediane letale Dosis
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P, Pro	Prolin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
PI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
rpm	Umdrehungen pro min (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SNAP 25	<i>synaptosomal-associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor accessory protein receptor</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TeNT	Tetanus Neurotoxin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	<i>unit[s]</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Bakterielle Proteintoxine nutzen verschiedene Mechanismen, um ihre Wirkung zu entfalten. Über die Analyse ihrer Kristallstrukturen erhält man neue Einblicke in deren Wirkmechanismen und kann zusätzlich unerwartete Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Toxinen feststellen. So können diese Toxine aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden (siehe Tab. 1). (1) Die A-B Toxine sind aus zwei funktionellen Domänen aufgebaut: Die B-Domäne ist für das Binden der Zielzelle und die Aufnahme des Toxins mit der katalytisch aktiven A-Domäne in die Zelle zuständig. Eine Untergruppe bilden die AB₅-Toxine, welche durch die Zusammenlagerung von 5 Bindungsuntereinheiten pro katalytische Untereinheit (Bildung eines Hexamers) charakterisiert werden. (2) Die porenbildenden Toxine, die je nach Struktur der in die Membran inserierenden (porenbildenden) Domäne weiter in α - und β -porenbildende Toxine (Gouaux 1997) unterteilt werden.

Tab. 1: Einteilung einiger Proteintoxine aufgrund der strukturellen Eigenschaften ihrer Translokationsdomäne: CFT (channel-forming toxin) (nach Lacy *et al.* 1998)

AB-Toxine		Porenbildner	
Toxin	Struktur Translokationsdomäne	Toxin	Struktur Translokationsdomäne
Anthrax PA	β -CFT	Colicin A	α -CFT
Cholera Toxin	AB ₅	Colicin E 1	α -CFT
Pertussis Toxin	AB ₅	Colicin IA	α -CFT
Shiga Toxin	AB ₅	δ -Endotoxin (CytB)	β -CFT
Diphtherie Toxin	α -CFT	α -Hämolysin	β -CFT
Pseudomonas exotoxin A	α -CFT	Perfringolysin O	β -CFT
CNT	nicht klassifiziert		

1.1 Clostridielle Neurotoxine

Zu der Familie der clostridiellen Neurotoxine (CNT) gehören **Tetanus Neurotoxin** (TeNT) und 7 **Botulinum Neurotoxine** (BoNT): BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C₁, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F und BoNT/G. Ihnen gemeinsam ist die hohe Spezifität für Nervenzellen. Die CNT sind die potentesten bekannten Toxine mit einer MLD von ca. 5-30 pg/Maus.

Tetanus (Wundstarrkrampf) und Botulismus (eine Lebensmittelvergiftung) wurden erstmals durch Hippokrates (5. Jh. v. Chr.) bzw. Kerner (1817) erwähnt. Die Erforschung dieser Krankheiten begann mit der Entdeckung der verursachenden Bakterien am Ende des 19. Jahrhunderts.

Clostridium tetani ist ein anaerob wachsendes Bakterium, das in Sporenform ubiquitär vorkommt. Nach einer Infektion vermehrt sich das Bakterium in tiefen, sauerstoffarmen und schlecht durchbluteten Wunden unter leicht sauren Bedingungen und setzt nach Autolyse das TeNT ins Gewebe frei. Das Exotoxin gelangt über Blut oder Lymphe zu peripheren Nervenendigungen. Dort wird es nach Bindung an die präsynaptische Membran von Motoneuronen (Wernig *et al.* 1977) durch Rezeptor-gekoppelte Endozytose aufgenommen und gelangt über Clathrin-umhüllte („coated vesicles“, Parton *et al.* 1987) oder auch glatte („non coated“) Vesikel (Montesano *et al.* 1982) in das endosomale Kompartiment, in dem ein Sortierungsprozess stattfindet. TeNT wird von hier aus in Transportvesikeln retrograd zu den Nervenzellkörpern transportiert (Ahnert-Hilger und Bigalke 1995, Lalli and Schiavo 2002), die im Vorderhorn der grauen Substanz im Rückenmark liegen (Stoeckel *et al.* 1975). Dort wird es nach Freisetzung in den synaptischen Spalt von inhibitorischen Interneuronen aufgenommen, in denen es die Freisetzung der inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glycin blockiert (Osborne und Bradford 1973, Bigalke *et al.* 1981, Bigalke *et al.* 1983). Die Erhöhung der Impulsrate der Motoneurone führt, wie bei einer Strychninvergiftung, zu einer Erhöhung des Muskeltonus. Daraus resultiert eine spastische Paralyse der quergestreiften Muskulatur (Curtis und DeGroat 1968), die meistens in der Gesichtsmuskulatur beginnt (Risus sardonius, Trismus) und dann auf Nacken- und Rückenmuskulatur übergeht (Opisthotonus). Unbehandelt erfolgt der Tod infolge spastischer Atemlähmung.



Abb. 1: Soldat aus der Zeit der Napoleonkriege mit den Symptomen einer schweren Tetanusvergiftung, die durch die maximale Kontraktion der gesamten quergestreiften Muskulatur charakterisiert ist (aus Sir Charles Bell: *Essay on the anatomy and philosophy of expression*, London 1824)

Im Gegensatz zum TeNT wird BoNT über die Nahrung aufgenommen. Bei den kontaminierten Nahrungsmitteln handelt es sich meist um nicht fachgerecht sterilisierte Konserven von Fleisch und Hülsenfrüchten, in denen es unter anaeroben Bedingungen zum Wachstum von *Clostridium botulini* und damit zur Produktion von BoNT kommt. BoNT wird zusammen mit nichttoxischen Proteinen in Form eines stabilen Komplexes (sog. Progenitor-Toxin, Sakaguchi *et al.* 1984) aufgenommen. In diesem Proteinkomplex, der auch die Bindung an Mikrovilli im oberen Dünndarm vermittelt (Fujinaga *et al.* 1997, Fujinaga *et al.* 2000), ist das BoNT gegenüber niedrigem pH-Wert und Proteasen im Verdauungstrakt geschützt. Es wird enteral resorbiert und gelangt zunächst in das lymphatische System (Sakaguchi *et al.* 1984) und weiter über das Blut zu den motorischen Endplatten peripherer Motoneurone. Nach Aufnahme kommt es dort zu einer langanhaltenden Blockade der Acetylcholinausschüttung aus präsynaptischen Vesikeln (Burgen *et al.* 1949) und somit zur Hemmung der neuromuskulären Erregungsübertragung. Symptome imponieren als Pupillenerweiterung, Doppelsehen, Schluck- und Sprechschwierigkeiten, Muskelschwäche und Atemnot. Schließlich kommt es, im Gegensatz zum Tetanus, zu einer schlaffen Lähmung, die unbehandelt zum Tod durch Atemlähmung führt.

Aufgrund ihrer spasmolytischen Wirkung werden BoNT/A und /B zur lokalen klinischen Therapie von Strabismus (Schielen), Blepharospasmus (Lidkrampf), Hemispasmus facialis und bei komplexen Dystonien (z. B. Torticollis spasmodicus) eingesetzt (Denislic *et al.* 1994, Thomas *et al.* 1993, Scott 1989).

1.1.1 Struktur und Wirkung von clostridiellen Neurotoxinen

Trotz der sehr unterschiedlichen Krankheitsbilder zeichnen sich TeNT und BoNT durch eine Reihe an Gemeinsamkeiten aus:

Beide gehören zu den A-B Toxinen (siehe Tab. 1) und bestehen in ihrer aktiven Form aus zwei über eine Disulfidbrücke miteinander verbundenen Peptidketten. Sie werden zunächst als einkettige Proteine (MG 150 kDa) synthetisiert und erlangen ihre volle Wirksamkeit erst nach der Spaltung in zwei Ketten („nicking“) durch (bakterielle) Proteasen (vgl. Abb. 2) (Bergey *et al.* 1989, Weller *et al.* 1989). Die dadurch entstehende schwere Kette (H-chain: MG 100 kDa) wird neben der Disulfidbrücke noch durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der leichten Kette (L-chain: MG 50 kDa) zusammengehalten (DasGupta und Sugiyama 1977).

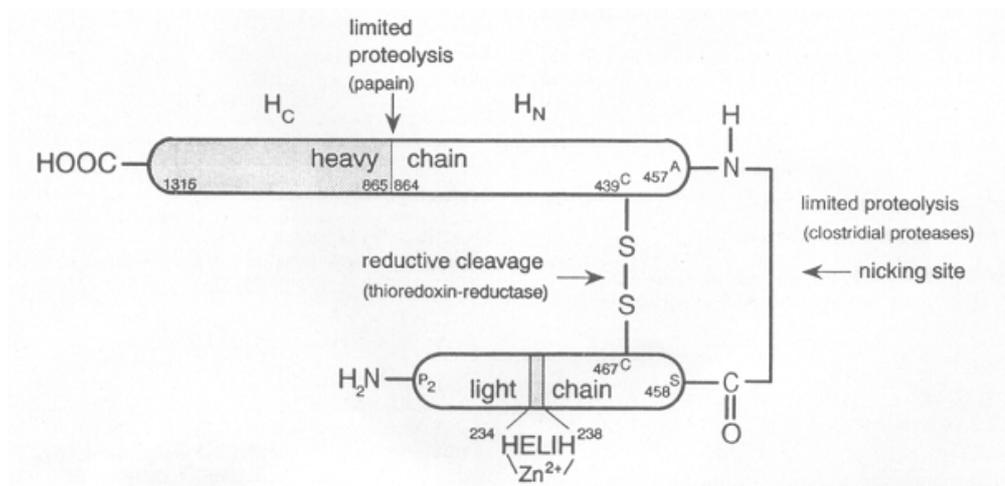


Abb. 2: Schematische Darstellung von TeNT. Die proteolytische Spaltung findet beim single-chain TeNT zwischen den Positionen A⁴⁵⁷ und S⁴⁵⁸ statt (Krieglstein *et al.* 1991). Die beiden Peptidketten sind über eine Disulfidbrücke zwischen den Positionen C⁴³⁹ und C⁴⁶⁷ miteinander verbunden. Die schwere Kette von TeNT kann weiter mit Papain geschnitten werden. Durch die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen S⁸⁶⁴ und L⁸⁶⁵ entstehen zwei Fragmente: der N-terminale Bereich der schweren Kette (H_N-Fragment) und der C-terminale Bereich der schweren Kette (H_C-Fragment). In der leichten Kette ist die konservierte Sequenz des aktiven Zentrums hervorgehoben.

Das Gen, das für BoNT codiert, befindet sich auf einem Chromosom (Binz *et al.* 1990). Die Erbinformation für TeNT liegt hingegen auf einem Plasmid (Eisel *et al.* 1986, Fairwether und Lyness 1986, Laird *et al.* 1980).

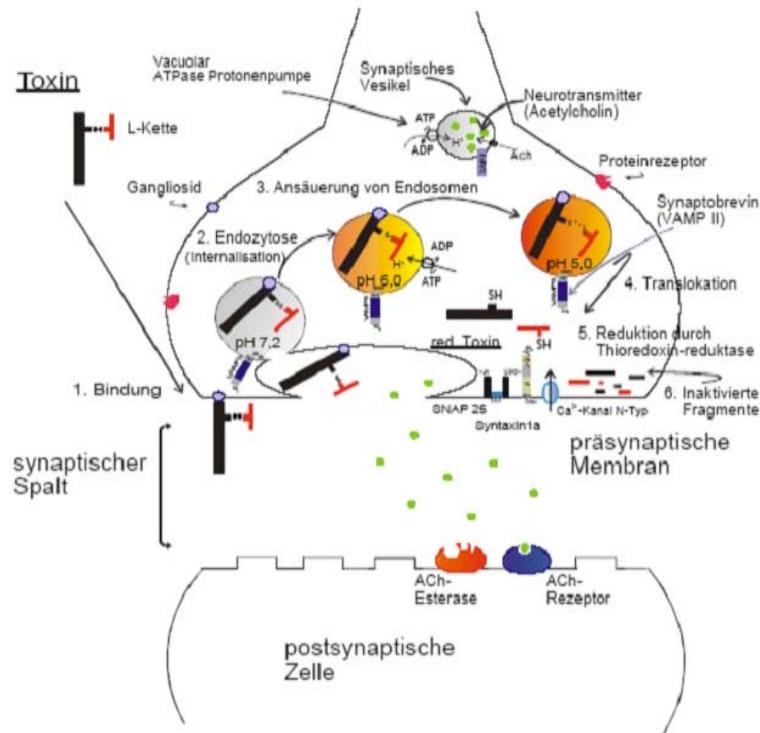


Abb. 3: Wirkungsmechanismus der CNT: 1. Bindung an negativ geladene Rezeptoren (Polysialoganglioside) der präsynaptischen Membran 2. Aufnahme über Rezeptor-gekoppelte Endozytose 3. ATP-abhängige Ansäuerung des Endosoms 4. Translokation aus dem endosomalen Kompartiment ins Zytosol 5. reduktive Spaltung des Toxins durch die Thioredoxin-Reduktase 6. enzymatische Spaltung des jeweiligen Substrates (Bestandteile des docking-fusion-Komplexes) durch die leichte Kette 7. Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung der Nervenzelle

Beide Toxine müssen, um die Neurotransmitterfreisetzung zu hemmen, in das Zytosol der Nervenzellen gelangen. Um den Vergiftungsprozess zu beschreiben, wurde 1981 von Simpson ein 3-Stufen Mechanismus vorgeschlagen (Simpson 1980, Simpson 1981 und Schmitt *et al.* 1981):

- (a) 1. Stufe: **Bindung** der Toxine an die Zellmembran von Nervenzellen und Rezeptor-gekoppelte Endozytose
- (b) 2. Stufe: **Translokation** der Toxine über das endosomale Kompartiment in das Zytosol
- (c) 3. Stufe: **Paralyse**, hervorgerufen durch die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung

- zu (a) Die schweren Ketten der CNT sind für die Toxinbindung an die neuronalen Zellmembranen, die Aufnahme in das endosomale Kompartiment und den retrograden intraaxonalen Transport verantwortlich (Weller *et al.* 1986). Damit präsentieren sie den pharmakokinetisch wirksamen Teil der Toxine. Das H_C-Fragment (siehe Abb. 2) der schweren Kette vermittelt die Bindung der Toxine an Ganglioside, eine Familie von Glycosphingolipiden, die in hoher Konzentration in der Membran von Nervenzellen vorkommt (van Heyningen 1961, Simpson und Rapport 1971, van Heyningen 1974). Dabei werden mit besonders hoher Affinität Disialoganglioside gebunden, GD1b z. B. ist für die Bindung von TeNT erforderlich (Halpern *et al.* 1995). Da der Bindungsschritt außerdem eine Proteasesensitivität aufweist (Lazarovici und Yavin 1986, Pierce *et al.* 1986), geht man inzwischen von einem zwei-Rezeptor-Modell aus, in dem die Ganglioside für die Anreicherung der CNT an der Oberfläche der Plasmamembran und die Protein-Rezeptoren für deren Endozytose verantwortlich sind (Montecucco 1986, Niemann 1991). Diese Hypothese wird durch die Rolle von Synaptotagmin II für Bindung von BoNT/B und /G (Nikishi *et al.* 1994, Nikishi *et al.* 1996, Kozaki *et al.* 1998, Li *et al.* 1998, Dong *et al.* 2003 und Rummel *et al.* 2004) und die Identifikation von GPI-verankerten Glykoproteinen in neuronalen Membranen als spezifische Rezeptoren für das H_C-Fragment von TeNT (Herreros *et al.* 2000, Herreros *et al.* 2001, Munro *et al.* 2001) unterstützt.
- zu (b) Die gebundenen Toxine werden über Rezeptor-gekoppelte Endozytose in das endosomale Kompartiment der Zelle aufgenommen. Diese Aufnahme erfolgt im Fall des TeNT hauptsächlich über „non-coated vesicles“ (Montesano *et al.* 1982). Für die weitere Translokation der Toxine aus dem Endosom ins Zytosol, in dem die Substrate der CNT lokalisiert sind, ist die im Endosom stattfindende Ansäuerung von grundlegender Bedeutung. Substanzen wie Bafilomycin, die die endosomale Ansäuerung verhindern, unterbinden die Wirkung der CNT (Williamson und Neale 1994). In chromaffinen Zellen kann die gesamte Plasmamembran, die keine zur Toxinbindung befähigten Ganglioside enthält, als „endosomale“ Membran fungieren. Hier wird die Toxizität der CNT allein durch Herabsetzen des extrazellulären pH-Wertes (auf pH 5) erhöht. Der eigentliche Mechanismus der Translokation der CNT durch die Membran ist bis heute ungeklärt. Durch die pH-Wert-Änderung im Endosom kommt es zu einer Konformationsänderung in der H_N-Domäne der schweren Kette, die das Molekül lipophiler macht (Roa und Boquet 1985a). In dieser Form kann die schwere Kette

mit künstlichen Membranen (Hoch *et al.* 1985, Gambale und Montal 1988), Liposomen (Montecucco *et al.* 1988), Synaptosomen (Högy *et al.* 1992) und Membranen von Rückenmarksneuronen (Beise *et al.* 1994) interagieren. Dabei kann eine Porenbildung durch die schweren Ketten und auch durch das di-chain TeNT in Liposomen (Boquet und Duflot 1982) und künstlichen Membranen (Donovan und Middlebrook 1986) beobachtet werden. Mindestens eine α -helikale Region, die viele hydrophobe Aminosäuren enthält, ist im H_N-Fragment von TeNT und BoNT identifiziert worden (Montal *et al.* 1992). Dieser Bereich ist lang genug, um die gesamte Plasmamembran zu durchspannen und käme damit für die Porenbildung in Frage. Dabei ist fraglich, ob der Durchmesser der Poren groß genug für die Translokation der aktiven leichten Kette des Toxins ist. Außerdem ist bis heute ungeklärt, ob das di-chain Toxin oder lediglich die leichte Kette in das Zytosol gelangt.

- zu (c) Während der Translokationsprozess der Toxine noch nicht geklärt ist, geht man davon aus, dass es zur Trennung der beiden Ketten kommen muss, um die volle katalytische Aktivität der leichten Kette zu erhalten. Bevor die beiden Ketten getrennt werden können, muss es zur Reduktion der Disulfidbrücke kommen. Dabei ist die Lokalisation des reduzierenden Enzyms noch nicht klar. Thioredoxin-Reduktase, die in hoher Konzentration im Zytosol vorkommt, reduziert TeNT und BoNT *in-vitro* in geringem Maße (Schiavo *et al.* 1990, Kistner *et al.* 1993). Western-blot Analysen mit einem gegen die leichte Kette von TeNT gerichteten Antikörper zeigen die Anwesenheit von TeNT leichter Kette im Zytosol vergifteter chromaffiner Zellen (Erdal *et al.* 1995).

Die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung durch die CNT wird durch die spezifische Proteolyse von Komponenten des neuronalen Exozytoseapparates ausgelöst. Die katalytische Aktivität der Toxine ist in Form einer Zink-abhängigen Endopeptidase auf der leichten Kette lokalisiert. In deren Mitte findet sich, über alle Serotypen konserviert, ein Histidin-reiches Motiv (HEXXH, X ist jede beliebige Aminosäure), das in einer α -helikalen Region liegt. Dabei liegen alle Histidine auf der gleichen Seite der Helix. Die beiden Histidine komplexieren, gemeinsam mit einem Glutamat-gebundenen Wassermolekül, ein Zinkatom. Der vierte Ligand wird in der Thermolysin-Familie der Metalloproteasen, zu der die CNT gehören, von einem Glutamat, das 37-39 Aminosäuren

stromaufwärts des Histidin-reichen Motivs liegt, gebildet (Matthews 1988, Jongeneel *et al.* 1989).

Im Gegensatz zu der geringen Spezifität anderer Zink-Proteasen der Thermolysin-Familie (Roques *et al.* 1993), zeichnen sich die CNT durch eine sehr hohe Selektivität bezüglich ihrer Substrate aus. Bis auf BoNT/C₁ (Foran *et al.* 1996) schneiden sie nur ein Substrat an einer bestimmten Stelle (Rossetto *et al.* 1995).

Tab. 2: Darstellung der verschiedenen Substrate der CNT und der Spaltstelle innerhalb der Substrate (grau unterlegt): SNAP-25: synaptosomal-associated protein of 25 kDa, VAMP: vesicle-associated membrane protein.

Toxin	Substrat	Gespaltene Peptidbindung
TeNT	VAMP	⁷¹ Gln-Ala-Gly-Ala-Ser-Gln—Phe-Glu-Thr-Ser-Ala ⁸¹
BoNT/A	SNAP-25	¹⁹³ Asp-Glu-Ala-Asn-Gln—Arg-Ala-Thr-Lys-Met ²⁰²
BoNT/B	VAMP	⁷¹ Gln-Ala-Gly-Ala-Ser-Gln—Phe-Glu-Thr-Ser-Ala ⁸¹
BoNT/C ₁	Syntaxin	²⁴⁸ Ser-Asp-Thr-Lys-Lys—Ala-Val-Lys-Tyr-Gln ²⁵⁷
BoNT/C ₁	SNAP-25	¹⁹³ Asp-Glu-Ala-Asn-Gln-Arg—Ala-Thr-Lys-Met ²⁰²
BoNT/D	VAMP	⁵⁴ Leu-Glu-Arg-Asp-Gln-Lys—Leu-Ser-Glu-Leu ⁶³
BoNT/E	SNAP-25	¹⁷⁶ Asn-Arg-Gln-Ile-Asp-Arg—Ile-Met-Glu-Lys ¹⁸⁵
BoNT/F	VAMP	⁵³ Val-Leu-Glu-Arg-Asp-Gln—Lys-Leu-Ser-Glu ⁶²
BoNT/G	VAMP	⁷⁶ Gln-Phe-Glu-Thr-Ser-Ala—Ala-Lys-Leu-Lys-Arg ⁸⁶

Die in Tab. 2 aufgeführten Substrate werden auch als SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) bezeichnet und sind wichtige Komponenten des Vesikel-Membran-Fusions-Komplexes, der in vielen sekretorisch aktiven Zellen vorkommt (Rothman 1994, Südhof 1995). Die Substratspezifität der CNT wird über die Erkennung von zwei Komponenten vermittelt: dem Fragment, in dem die Schnittstelle liegt, einerseits und einem SNARE-Motiv andererseits (Montecucco und Schiavo 1995, Rossetto *et al.* 1994, Rossetto *et al.* 1995, Washbourne *et al.* 1997). Dieses SNARE-Motiv findet man in Eukaryoten nur in diesen drei Proteinen. Es kommt in VAMP und Syntaxin an zwei und in SNAP-25 an vier Positionen vor. Es besteht aus einer Sequenz von neun Aminosäuren, in der drei negativ geladene und drei hydrophobe Aminosäuren vorkommen, welche in Segmenten mit helikaler Struktur liegen (Chapman *et al.* 1995).

1.2 Ghosts

Zellhüllen, die man in der Durchlichtmikroskopie nicht sichtbar sind, werden als ghosts bezeichnet. Sie können sowohl aus Bakterien (Bakterien ghosts) (Paukner *et al.* 2003) als auch aus roten Blutkörperchen (Erythrozyten ghosts) hergestellt werden.

1.2.1 Bakterien ghosts

Bakterien ghosts bestehen aus Zellhüllen gram-negativer Bakterienzellen, die frei von zytoplasmatischen Bestandteilen sind, aber ihre Zellmorphologie und ihre natürlichen Oberflächen- und Antigenstrukturen einschließlich ihrer Bioadhärenz behalten. Ihre Herstellung erfolgt durch kontrollierte Expression des Lysis-Proteins E des Bakteriophagen PhiX174, welches transmembranäre Tunnel in den Zellhüllen gram-negativer Bakterien ausbildet (Szostak *et al.* 1996). Natürliche und auch künstlich eingeführte Antigene können vor der Protein E –induzierten Lyse auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, Antigene verschiedenster Abstammung gleichzeitig zu präsentieren (Jalava *et al.* 2003). Diese Bakterien ghosts könnten als „nicht-lebend-Impfstoffe“ eine Alternative zu hitze- oder chemisch-inaktivierten Bakterien-Impfstoffen darstellen. Bisher konnten u.a. aus folgenden gram-negativen Bakterien ghosts hergestellt werden: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacillus pleuropulmonariae* (Szostak *et al.* 1996) und *Helicobacter pylori* (Panthel *et al.* 2003). Dabei wurde in Tierversuchen nach intraperitonealer, subkutaner oder intramuskulärer Applikation eine spezifische humorale und zelluläre Immunantwort gegen die präsentierten bakteriellen und viralen Komponenten gezeigt.

1.2.2 Erythrozyten ghosts

Als Erythrozyten ghosts (im weiteren Verlauf dieser Arbeit als ghosts bezeichnet) bezeichnet man post-hämolytische Zellreste roter Blutkörperchen. Diese Zellreste bestehen hauptsächlich aus ihrer Zellmembran und sind weitgehend frei von intrazellulären Bestandteilen (Bodemann und Passow 1972, Schwach und Passow, 1973). An ghosts werden Untersuchungen zur Zusammensetzung, Struktur und Funktion der Erythrozytenmembran durchgeführt. Außerdem werden sie als Modellsysteme für unterschiedlichste Fragestellungen genutzt, für die abgeschlossene Kompartimente aus intakten

Biomembranen benötigt werden. Dabei konnten z. B. Transportvorgänge über Membranen (Fernandez-Rivera-Rio *et al.* 1985), die Wirkung porenbildender Toxine (Chhatwal *et al.* 1983, Dalla Serra *et al.* 1992) untersucht, oder aber Vesikelsysteme für Biominalisationsstudien aufgebaut werden (Ierardi *et al.* 2002). Ghosts stellen ein einfach zugängliches und osmotisch stabiles System dar, welches alternativ bzw. als Ergänzung zu künstlichen Membranpräparationen (Liposomen) genutzt werden kann.

Die einfachste und am häufigsten genutzte Möglichkeit ghosts zu präparieren, besteht in der direkten hypotonen Hämolyse roter Blutkörperchen (Steck und Kant 1974). Hierbei werden zunächst die Erythrozytenmembranen durch Ultrazentrifugation präpariert und diese im Anschluss in isotonischer Lösung der benötigten Zusammensetzung, die auch einzuschließende Substanzen enthalten kann, überführt. Durch anschließendes „resealen“ verschließen sich die Poren in der Erythrozytenmembran und es entstehen „resealed“ ghosts, deren Inhalt je nach Anforderung variiert werden kann.

Weitere Möglichkeiten zur Präparation von ghosts bestehen in der Elektroporation (Zimmermann *et al.* 1976) einerseits und der Dialyse andererseits (Dale *et al.* 1977). Im Gegensatz zu den über hypotone Hämolyse hergestellten ghosts legt man bei diesen Präparationen Wert auf die Erhaltung des intrazellulären Milieus. Diese Zellen sollen als *in-vivo*-Trägersysteme für therapeutisch wirksame Enzyme und andere Substanzen dienen, die während der Präparation in die ghosts eingeschleust und so u.a. zur Therapie von angeborenen Stoffwechselstörungen genutzt werden (DeLoach 1983).

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Wirkmechanismus der CNT ist der Schritt der Translokation der Toxine aus dem endosomalen Kompartiment in das Zytosol weiterhin ungeklärt. Die bisher hierzu durchgeführten Experimente wurden entweder an künstlich hergestellten Membranen (Liposomen, Monolayer) oder an Zellkulturen (z. B. chromaffine Zellen) durchgeführt. Im artifiziellen System können die Versuchsbedingungen frei gewählt werden. Es liegen jedoch Membranen vor, die in ihrer Lipidzusammensetzung nicht natürlich sind und denen die eingelagerten Proteine fehlen. In den Zellkulturen liegen Membranen natürlicher Herkunft vor. Die Versuchsbedingungen können aber nicht in dem Maße variiert werden, das nötig ist, um die Bedingungen im endosomalen Kompartiment nachzustellen. Außerdem handelt es sich um lebende Zellen, in denen viele metabolische Komponenten den zu beobachtenden Transportprozess beeinflussen können.

Im Vordergrund dieser Arbeit steht der Aufbau eines Modells, das die Möglichkeit bietet Translokationsprozesse über natürliche Membranen zu verfolgen. Außerdem soll das System in der Lage sein, den Bedingungen, die im Endosom vorliegen, ohne Beeinflussung der Membranintegrität standzuhalten.

Im weiteren ist die Translokationsdomäne von TeNT näher untersucht worden, um für die Translokation wichtige Bereiche näher zu charakterisieren. Hierzu sollten durch „site directed mutagenesis“ innerhalb der Domäne bestimmte Aminosäuren ausgetauscht und die damit verbundenen Auswirkungen auf den Translokationsprozess untersucht werden.

Die Translokation dieser TeNT mit verschiedenen Mutationen in der Translokationsdomäne sollte in verschiedenen Translokations-Modellen getestet und diese Modelle miteinander verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialliste

3.1.1 Reagenzien

Acrylamid	Riedel-DeHaen
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Merck
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma
Bacto-Agar	Difco Laboratories
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories
Bacto Pepton, enzymatisch verdaut	Difco Laboratories
Beaded Trypsin	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva
Chloramin T	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck
p-Cumarsäure	Fluka
dATP	Boehringer Mannheim
dCTP	Boehringer Mannheim
Desthiobiotin	Sigma
dGTP	Boehringer Mannheim
Dimethylformamid	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Merck
10 × Dephosphorylierungspuffer	Boehringer Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dTTP	Boehringer Mannheim
Essigsäure, reinst	Riedel-DeHaen
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumsalz	Serva
Glycerin, doppelt destilliert	Serva
Harnstoff	Roth
4-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-1-ethansulfonsäure	Roth
Imidazol	Merck
Isopropylthio-D-Galactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumdihydrogensulfat	Merck
10 × Ligationspuffer	Biolabs
Luminol	Fluka
Magermilchpulver	Glücksklee

Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J.T. Baker
N, N'-Methylen-bis-acrylamid	Serva
Natriumacetat, wasserfrei	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriummetadisulfit	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Penicillin	Serva
Pepstatin A	Sigma
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ponceaurot	Sigma
10 × Restriktionsendonukleasenpuffer A, B, L, M, H	Boehringer Mannheim
10 × Restriktionsendonukleasenpuffer 2,4	Biolabs
Rinderserumalbumin (BSA), lyophilisiert, pH 7.0	Serva
Salzsäure 37 %	Merck
Streptomycin	Serva
Templare Supression Reagent	Perkin Elmer
N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Sigma
10 × Transkriptionspuffer	Boehringer Mannheim
Trichloressigsäure	Sigma
Xylen Cyanol FF	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth

3.1.2 Systeme

QIAquick Gel-Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Plasmid Midi Kit	Qiagen
Fluorolink™ Cy3.5™	Amersham
BigDye RR Terminator AmpliTaq®, FS Kit	Perkin Elmer

3.1.3 Standards

3.1.3.1 DNA-Standard

λ -DNA/ <i>EcoRI</i> / <i>Hind III</i> : eigene Herstellung														
Größen	21226	5148	4973	4268	3530	2027	1904	1584	1330	983	831	564	125	bp
% DNA	43,8	10,6	10,3	8,8	7,3	4,2	4,0	3,3	2,8	2,0	1,7	1,2	0,3	
200 ng =	87,6	21,2	20,6	17,6	14,6	8,4	7,8	6,6	5,4	4,0	3,4	2,2	0,5	ng

3.1.3.2 Proteinstandards

SDS-PAGE Standard, low molecular weight	Biorad
SDS-PAGE Standard, high molecular weight	Biorad
SDS-PAGE Standard, broad range	Biorad

3.1.4 Enzyme

3.1.4.1 Nukleinsäure modifizierende Enzyme

Restriktionsenzyme	
<i>Aat</i> II, <i>Cla</i> I, <i>EcoR</i> V, <i>Kas</i> I, <i>Pvu</i> I, <i>Sac</i> II	Biolabs
<i>Bam</i> H I, <i>Bgl</i> II, <i>EcoR</i> I, <i>Pst</i> I	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I	Boehringer
Alkalische Phosphatase	Sigma
Turbo- <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene
T4 DNA Ligase	Biolabs

3.1.4.2 Weitere Enzyme

Beaded Trypsin	Sigma-Aldrich
----------------	---------------

3.1.5 Radiochemikalien

Verwendet wird Na ¹²⁵I von der Firma Amersham (IMS30/01).

3.1.6 Häufig verwendete Puffer und Medien

PBS	140 mM NaCl 7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ autoklaviert
Tween® 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
2YT-Platten (1 l)	16 g Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Bacto-Agar autoklaviert
2YT-Medium (1 l)	16 g Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl autoklaviert
TAE-Puffer	40 mM Tris 0,11 % (v/v) Essigsäure 10 mM EDTA pH 8,0
Hämolysepuffer	5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 0,1 % BSA
Puffer A	161 mM KCl 4 mM Hepes 0,8 mM NaEDTA pH wird nach Bedarf mit NaOH auf 5,0 oder 7,5 eingestellt, direkt vor Gebrauch werden 0,1 % BSA zugesetzt bei Bedarf Zusatz von 5 mM DTT

Puffer B	4	mM KCl
	157	mM TEA-Cl
	4	mM Hepes
	0,8	mM NaEDTA
	pH wird nach Bedarf mit NaOH auf 5,0 oder 7,5 eingestellt, direkt vor Gebrauch werden 0,1 % BSA zugesetzt	
Laemmli-Laufpuffer	25	mM Tris
	250	mM Glycin
	0,1	% (m/v) SDS
Bjerrum und Schafer-Nielsen Blotting-Puffer	48	mM Tris
	39	mM Glycin
	1,3	mM SDS
	20	Vol.% Methanol zur Chromatographie
	WICHTIG: pH-Wert nicht einstellen!	
TTBS	20	mM Tris
	0,5	M NaCl
	450	µl Tween-20 auf 1000 ml TBS
1 % bzw. 5 % Magermilch TTBS	1/5	Gew. % Magermilchpulver in TTBS
	WICHTIG: immer frisch ansetzen!	
ECL-Deteketionslösung A	2,5	mM Luminol
	0,4	mM p-Cumarsäure
	in 100 mM TrisHCl pH 8.5	
ECL-Deteketionslösung B	41	µl 30 % Wasserstoffperoxidlösung
	in 50 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,5	
Sonification-Puffer TeNT	50	mM NaPO ₄
	300	mM NaCl
mit Protease-Inhibitoren	5	mM Benzamidin
	0,5	mM PMSF
	0,15	µM Pepstatin A
	pH 8,0	

3.1.7 Antikörper

3.1.7.1 Anti-Synaptobrevin-2

Verwendet wird ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon Cl 69.1, Edelmann *et al.* 1995), der uns freundlicherweise von R. Jahn vom MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen zur Verfügung gestellt wurde. Dieser ist gegen den N-Terminus von Ratten-Synaptobrevin gerichtet und zeigt keinerlei Kreuzreaktivität mit Synaptobrevin-1 oder Cellubrevin.

Verdünnung für Western-blotting: 1 : 500

3.1.7.2 Anti-Spektrin

Verwendet wird ein monoklonaler Anti-Spektrin Antikörper der Firma Sigma aus der Maus (Prod. Nr. S3396), der die 220 kDa (β) und die 240 kDa (α) Banden des humanen Spektrins aus Erythrozyten detektiert.

Verdünnung für Western-blotting: 1 : 1500

3.1.7.3 Peroxidase-Anti-Maus

Verwendet wird ein Anti-Maus IgG –Peroxidase-Konjugat von der Firma Sigma (Prod. Nr. A9044).

Verdünnung Western-blotting: 1 : 2000

3.1.8 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme stammen vom *E. coli* Sicherheitsstamm K12 ab.

3.1.8.1 *E.coli* DH5 α (Gibco BRL)

In DH5 α -Bakterien werden Arbeiten wie die Transformation von Ligationsansätzen sowie Amplifikation und Reinigung von DNA durchgeführt, da sie durch ihre Rekomb-

binasedefizienz für eine hohe Insertstabilität sorgen und außerdem die Präparation sehr reiner DNA ermöglichen.

Genotyp: *F* Φ 80*lacZDM15 D(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 l thi-1 gyrA96 relA1*

3.1.8.2 *E. coli* TG1

Dieser Bakterienstamm wird sowohl zur Transformation von Plasmid-DNA als auch zur Produktion der rekombinanten TeNT-Derivate verwendet. *E. coli* TG1 trägt das *lacI^q*-Gen. Dieses hat einen mutierten Promotor, der zur Produktion von zehnmal mehr *lac*-Repressor als beim Wildtyp führt. Der *lac*-Repressor bindet an den *lac*-Promotor und verhindert so die Genexpression. Durch Zugabe von IPTG zum Medium wird der *lac*-Repressor gebunden und löst sich vom *lac*-Promotor. Dadurch wird eine hocheffiziente Genexpression ermöglicht. Geringe Mengen an IPTG können den Gehalt an *lac*-Repressor so reduzieren, dass Transkription auf niedriger Stufe stattfindet. Dieses Prinzip erlaubt eine gute Kontrolle über den Grad der Genexpression. TG1 ist ein *EcoK* Abkömmling vom JM101-Stamm, der transformierte DNA weder modifiziert noch schneidet.

Genotyp: *supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)F'[traD36pro AB⁺ lac^q lacZΔM15]*

3.1.8.3 *E. coli* M15pREP4 (Qiagen)

E. coli M15pREP4 ist ein Abkömmling vom K-12-Stamm. Dieser Stamm wird ausschließlich zur Expression der rekombinanten TeNT verwendet.

Genotyp: *Nal^S Str^S rif^S, lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺*

3.1.8.4 *E. coli* BL21 DE3 (Novagen)

Dieser *E. coli* Stamm trägt das T7-RNA-Polymerasegen unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors und exprimiert zusätzlich T7 Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7-RNA Polymerase. Dies führt zu einer reduzierten Basalexpression. Dieser Stamm wird ausschließlich zur Herstellung von rekombinanten Synaptobrevin-2 verwendet.

Genotyp: *F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)*

3.1.9 Plasmide

Die Plasmide pAR4b-TeNTHis6-H236V E237Q und pAR2-TeNTHis6 wurden von Andreas Rummel aus der Arbeitsgruppe Binz (MHH, Abteilung für physiologische Chemie) zur Verfügung gestellt.

3.1.9.1 PQE-3

Größe: 3416 bp

Das Plasmid pQE-3 (Qiagen) ist ein Standardexpressionsvektor mit einer Größe von 3416 bp. In pQE-Vektoren klonierte Gene werden durch einen T5-Promotor, welcher von der *E.coli*-RNA-Polymerase erkannt wird, kontrolliert. Zur effizienten Repression des T5-Promotors besitzt der pQE-3-Vektor zwei *lac*-Operatoren, an welche der Repressor binden kann. Durch IPTG wird der *lac*-Repressor inaktiviert und die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Für eine hohe Translationsrate besitzen die pQR-Vektoren eine synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBS) im optimalen Abstand zum Startcodon stromaufwärts vom Polylinker. Die Vektoren pQE-3, pQE-4 und pQE-5 unterscheiden sich lediglich durch den Leserahmen des Polylinkers ab dem Startcodon. Alle drei Vektoren besitzen ein β -Lactamasegen als Selektionsmarker.

3.1.9.2 pAR4b-TeNTHis6-H236V E237Q

Größe: 7400 bp

Das Plasmid pAR4b-TeNTHis6-H236V E237Q kodiert das TeNT-Gen. Es enthält die synthetische, leichte Kette von TeNT (Eisel et al. 1993) mit der Doppelmutation H234V E237Q, die proteolytisch inaktiv ist und die schwere Kette mit einem C-terminalen His6-Tag. Das Gen ist über *Bam* H I und *Sma* I in den Vektor pQE-3 eingefügt.

3.1.9.3 pAR2-TeNTHis6

Größe: 7394 bp

Das Plasmid pAR2-TeNTHis6 kodiert das aktive volle Länge TeNT-Gen. Es besitzt einen C-terminalen His6-Tag, die Sequenz entspricht dem Plasmid pAR1 (Rummel et al. 2003), trägt jedoch einen C-terminalen His6-tag.

3.1.10 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Roth bezogen. Die gelieferten Stammlösungen werden mit Aqua bidest. auf die gebrauchsfertige Konzentration von 10 mM der Oligonukleotide eingestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.1.10.1 Oligonukleotide zur Amplifikation

Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung aufgeführt. Die nicht an die Template-DNA bindenden Basen sind kursiv gedruckt, die für die Klonierung neu eingefügten Schnittstellen unterstrichen und die zusätzlich zur Überprüfung der Punktmutationen eingefügten Schnittstellen fett gedruckt.

TeNTP644GFw	ab bp 2041 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) TCTCTG <u>GACGTC</u> TCCACTATTGTTGGCTATATAGGACCC unterstrichen: <i>Aat</i> II Erkennungssequenz
TeNTP644GRv	ab bp 2046 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) TCTCTG <u>GACGTC</u> TGAAATTTTATCAATAGTAGTTTTT unterstrichen: <i>Aat</i> II Erkennungssequenz
TM10Fw	ab bp 886 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) CTGGATCCAAACACAGGAAATCTACATGC
3HCTx1Rv	ab bp 4054 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) CTCTAAGCTTAAAAGTACCAATCCATCCTAAAA
TeNTP648GFw	ab bp 2071 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) CTCTC <u>GGCGC</u> CTTAAACATTGTAAACAAGGCTATG unterstrichen: <i>Kas</i> I Erkennungssequenz
TeNTP648GRv	ab bp 2076 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) CTCTC <u>GGCGC</u> CTCCTATATAAGGAACAATAGTG unterstrichen: <i>Kas</i> I Erkennungssequenz
TeNTTM7984Fw	ab bp 2152 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) CTCTCTC <u>TCGAG</u> TATATTGCACAGATTACTTTAGCAGTAATTG- CAGCTTTATCTAT unterstrichen: <i>Xho</i> I Erkennungssequenz
TENTTM7984Rv	ab bp 2147 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) CTCTCTC <u>TCGAG</u> TAATAAAACCACTCCGGTAGTTTC unterstrichen: <i>Xho</i> I Erkennungssequenz

TeNTDMPGRv	ab bp 2076 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) CTCTCGGCGCCTCCTATATACGGAACAATAGTG unterstrichen: <i>Kas</i> I Erkennungssequenz
TeNTWDDFw	ab bp 2024 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) TCTCTCTCGATC- <u>G(CA)TAAAATTTCTG(CA)AGTATCCACTATTGTTTCCTTSTATA</u> unterstrichen: <i>Pvu</i> I Erkennungssequenz fett: <i>Cla</i> I Erkennungssequenz und <i>Pst</i> I Erkennungssequenz
TeNTWDDRv	ab bp 2029 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) TCTCTCTCGATCGTAGTTTTTTGTGAAGATTCATTG unterstrichen: <i>Pvu</i> I Erkennungssequenz
TeNTK635AFw	ab bp 2024 (pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q) TCTCTCTCGATCGCTGCAATTTCTGCAGTATATCCACTATTG unterstrichen: <i>Pvu</i> I Erkennungssequenz

3.1.10.2 Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen

THNSeq 3	ab bp 1895 (pAR4bTeNTHis6-H234VE237Q) TCTCTCTCCACCAAATATATTCAT
----------	---

3.1.11 Sonstige Materialien und Geräte

Biomax II Röntgenfilm	Kodak
Color Scanner JX-325 High Resolution	Sharp
Elektrophorese-Apparatur (Mini-Protean™)	Biorad
Filmentwicklungsmaschine Potimax	Protec
Automatic gamma counter 1480 Wizard TM 3	Wallac
Geltrockner Modell 543	Biorad
ImageMaster™ 1-D	Pharmacia Biotech
Image-Station 440 CF	Kodak
Mikrowelle	Sharp
Nitrilotriessigsäure (NTA) Agarose	Sigma
Nitrocellulosemembran 0,2 µm	Schleicher & Schüll
Photometer	Eppendorf
Refrigerated incubator shaker innova TM 4330	New Brunswick Scientific

Thermocycler TouchDown	Hybaid
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5403	Eppendorf
Tischzentrifuge Mikro Rapid/K	Hettich
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Schüttelinkubator Certomat [®] H	B. Braun
Semidry-Blotting Zelle	Biorad
Sephadex G25/ G50	Sigma
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckmann
Ultrazentrifuge RC2-B	Sorvall
Ultrazentrifugenröhrchen 25 ml	Sorvall
Whatman 3MM Papier	Whatman

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Erythrozyten-ghosts

3.2.1.1 Präparation von Erythrozyten-ghosts

Die Präparation der Erythrozyten-ghosts (im weiteren als ghosts bezeichnet) erfolgt durch hypotone Hämolyse in Anlehnung an die Methode von Steck und Kant (1974, siehe Abb. 4).

Verwendet wird frisch entnommenes humanes Citrat-Blut (Gruppe A Rh positiv) freiwilliger Spender oder von der MHH-Blutbank. Die Erythrozyten werden bei 4°C in der Kühlzentrifuge (Biofuge) bei $2.300 \times g$ sedimentiert und in folgendem $3 \times$ mit dem fünffachen Volumen 0,9%iger Kochsalzlösung pH 7,5 gewaschen. Nach dem letzten Waschen werden die Erythrozyten bis zur Präparation (für mindestens eine Stunde) in 0,9%iger Kochsalzlösung pH 7,5 mit 0,1 % BSA bei 4°C gelagert.

Zur Präparation werden die Erythrozyten bei 4°C in der Kühlzentrifuge bei $2.300 \times g$ sedimentiert. In 30 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall) werden 20 ml kalter Hämolysepuffer vorgelegt und auf Eis gestellt. In jedes Ultrazentrifugenröhrchen werden 0,5 ml Erythrozyten pipettiert und mehrmals resuspendiert, so dass eine klare, hellrote Lösung

vorliegt (Hämolyse). Die Erythrozytenmembranen werden durch Ultrazentrifugation bei $22.000 \times g$ (Rotortyp 50.2 Ti, Beckmann-Zentrifuge) und 4°C für 13 min pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, die durch restliches Hämoglobin hellrosa gefärbten Erythrozytenmembranen werden mit Hämolysepuffer gewaschen, wobei jeweils 3 Pellets in ein Ultrazentrifugenröhrchen vereinigt werden (Endvolumen wieder 20 ml). Die Erythrozytenmembranen werden erneut durch Ultrazentrifugation bei $22.000 \times g$ und 4°C für 15 min sedimentiert. Die Erythrozytenmembranen sind jetzt cremeweiss und werden nach vorsichtiger Entfernung der Waschflüssigkeit auf Eis gelagert.

Zum „resealing“ der ghosts werden folgende Ansätze gewählt:

3.2.1.2 Erythrozyten-ghosts für ^{125}I TeNT-Aufnahmeversuche

"reseal"-Ansatz: 1300 μl Puffer A oder B pH 7,5; 0,1 % BSA
 50 μl 1,6 M KCl

Der Puffer wird auf Eis in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend werden 500 μl Erythrozytenmembranen vorsichtig in dieser Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis gestellt.

3.2.1.3 Synaptobrevin-beladene ghosts

"reseal"-Ansatz: X μl Synaptobrevin (entsprechend 25 μg)
 30 μl 1,6 M KCl
 300 μl Erythrozytenmembranen
 ad 720 μl Puffer A pH 7,5; 0,1 % BSA ohne EDTA mit 5 mM
 DTT

Das Proteinlösungs-Puffergemisch (wichtig: Puffer ohne EDTA und mit DTT) wird im Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, auf Eis gekühlt und die Erythrozytenmembranen vorsichtig darin resuspendiert.

Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis werden die Eppendorfgefäße für 40 min bei 37°C ins Schüttelwasserbad gestellt, um den "resealing"-Vorgang abzuschließen. Danach werden die Ansätze für 1 h auf Eis gelagert.

Die ghosts werden anschließend $3 \times$ mit Puffer A/B gewaschen, dazu werden die ghosts in der Eppendorfkühlzentrifuge (5415C) bei 4°C und $10.000 \times g$ für jeweils 5 min pelletiert.

Die Lagerung der ghosts erfolgt bei 4°C für höchstens 24 h. Die Synaptobrevin-beladenen ghosts werden umgehend weiterverwendet.

Reagenzien:

0,9 % NaCl pH 7,5

0,9 % NaCl pH 7,5 mit 0,1 % BSA

Hämolysepuffer

Siehe unter 3.1.6.

Puffer A/B pH 7,5/5,0 mit 0,1 % BSA, 5 mM DTT

Siehe unter 3.1.6.

1,6 M KCl

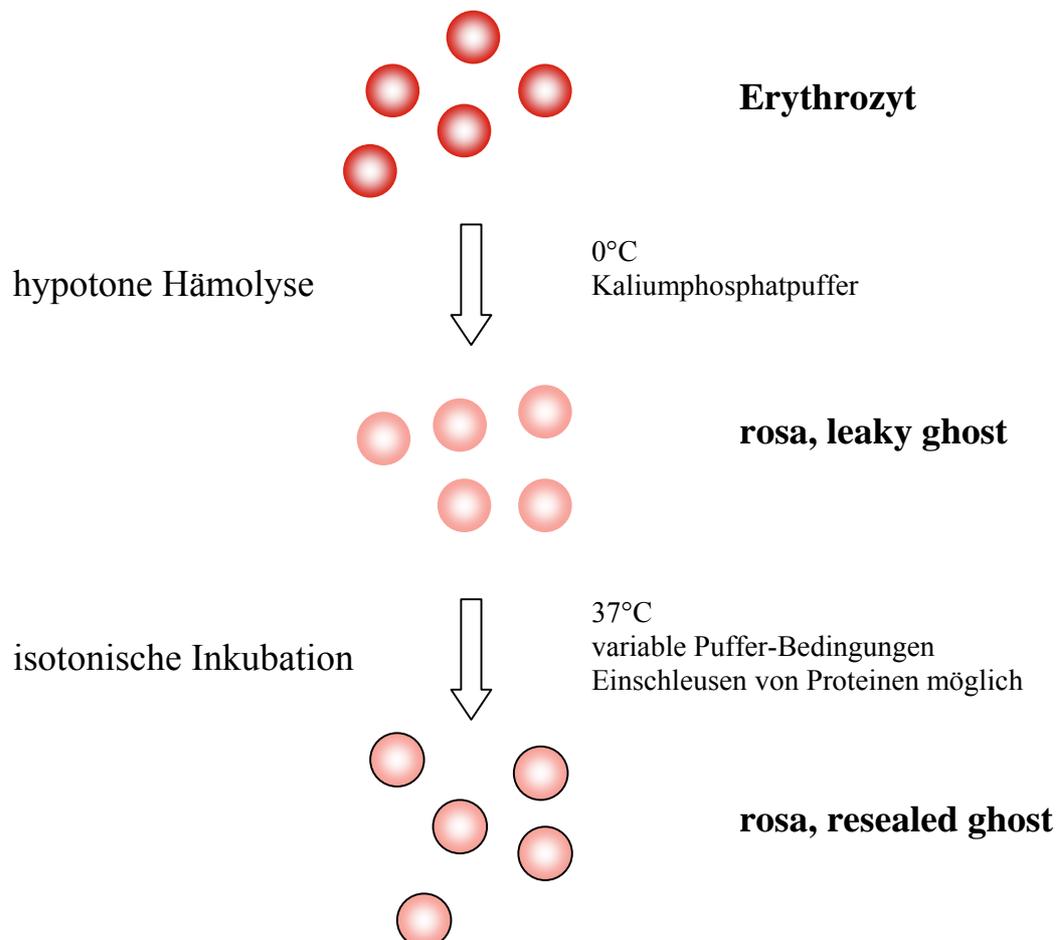


Abb. 4: Schematische Darstellung der ghost Präparation. Herstellung von ghosts durch hypotone Hämolyse und anschließende isotonische Inkubation.

3.2.2 Aufnahmeversuche von ^{125}I -TeNT in Erythrozyten-ghosts

Für die ^{125}I -TeNT-Aufnahmeversuche werden ghosts verwendet, die frisch präpariert sind, oder höchstens 24 Stunden bei 4°C gelagert wurden (siehe auch unter 3.2.1.2). Die Versuche werden unter Beachtung der Strahlenschutzmaßnahmen in den dafür vorgesehenen Räumen durchgeführt.

Hierzu wird folgender Ansatz gewählt:

150 µl	ghosts
1000 µl	^{125}I -TeNT-Puffer-Mischung (A/B pH 7,5/5,0)
1150 µl	Versuchsansatz

Die Inkubation erfolgt bei festgelegten Temperaturbedingungen (4°C im Kühlraum, RT, 37°C im Wärmeschrank) in Eppendorf-Inkubationsgefäßen mit Schraubdeckel im Überkopfschüttler bei 30 rpm. Die Probennahme erfolgt nach 30, 60 und 120 min mit jeweils dreifach-Bestimmungen je Versuchsbedingung. Zum Entfernen der Toxinlösung werden die ghosts bei 10.000 rpm für 2 min (Eppendorf 5415C) abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach werden die ghosts 3 × mit 800 µl des entsprechenden Puffers gewaschen.

Folgende Fraktionen werden abgenommen und zur Auswertung im γ -counter gezählt:

1	100 µl ^{125}I -TeNT-Puffer-Gemisch	Ausgangswert
2	100 µl Überstand nach der 1. Zentrifugation	Überstand 1
3	100 µl Überstand nach der 1. Wäsche	Überstand 2
4	Pellet	

Reagenzien:

Puffer A/B pH 7,5/5,0 0,1% BSA

Siehe unter 3.1.6.

^{125}I -TeNT-Stammlösung

3.2.3 Spaltung von Synaptobrevin in Erythrozyten-ghosts durch TeNT

Die erfolgte Translokation des TeNT soll durch die Spaltung des in ghosts aufgenommenen Synaptobrevin nachgewiesen werden.

Hierzu werden frisch präparierte, mit Synaptobrevin-beladene ghosts verwendet (siehe unter 3.2.1.3). In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß werden Synaptobrevin-beladene ghosts und Versuchspuffer (Puffer A/B pH 7,5/5,0 0,1 % BSA ohne EDTA) vorgelegt und 500 nM TeNT (oder Mutanten) zugegeben. Die Inkubation erfolgt im Thermomixer bei 37°C und 800 rpm. Nach 60, 120, 180 und 240 min werden Proben entnommen und 3 min bei 10.000 rpm (Eppendorf 5415C) zentrifugiert. Das Pellet wird 3 × mit 200 µl Puffer A/B pH 7,5/5,0 0,1 % BSA (mit EDTA) gewaschen. Nach Zugabe von 20 µl Lysis-Puffer wird das Pellet 2 min bei 37°C und 800 rpm im Thermoblock inkubiert. Anschließend wird 10 min bei 12.000 rpm (Eppendorf 5415C) zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit Probenauftragepuffer (reduzierend) versetzt und für 3 min bei 95°C gekocht. Die Proben werden entweder sofort auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Zur Sicherstellung der Integrität der ghosts nach 4 h Inkubationszeit bei 37°C wird ein Ansatz ohne Toxin unter Versuchsbedingungen mitgeführt. Nach 4 h wird 3 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Hier wird neben dem Pellet auch der Überstand auf einer SDS-PAGE analysiert, um zu kontrollieren, ob die ghosts die Versuchsbedingungen unter Erhaltung ihrer Membranintegrität überstehen.

Die Auswertung des Synaptobrevinverdaus wird im Anschluss über SDS-PAGE, Western-blot und immunologische Detektion durchgeführt.

Reagenzien:

Puffer A/B pH 7,5/5,0 0,1 % BSA mit und ohne EDTA und DTT (siehe unter 3.1.6)

Lysis-Puffer:

Puffer A pH 7,5 0,1 % BSA mit EDTA

Protease-Inhibitoren: 5 mM Benzamidin

0,5 mM PMSF

0,15 µM Pepstatin A

2 % Triton X-100

3.2.4 Biochemische Methoden

3.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli modifiziert

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) ist es möglich, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Proportional zur Peptidlänge lagern sich SDS-Moleküle an das Makromolekül und bestimmen so den Grad der negativen Ladung des Komplexes. Diese wird im Sammelgel bei einem pH-Wert von 6,8 in einem elektrischen Feld zwischen Chloridionen und langsamer laufenden Glycin-Kationen fokussiert. Im Trenngel mit dem pH-Wert von 8,8 liegt das Glycin als neutrales Zwitterion vor und der SDS-Proteinkomplex wird aufgetrennt. Je nach Proteingröße wird der Acrylamid-Gehalt des Trenngels zwischen 10 % und 15 % variiert.

3.2.4.1.1 Probenvorbereitung

Standardprobenvorbereitung:

Die am häufigsten verwendeten Geltaschen nehmen ein Probenvolumen von 10 µl auf. Den zu analysierenden Proben (z. B. rekombinante, aufgereinigte Proteine, Bakterienlysate) werden 1/3 ihres Volumens an Probenauftragepuffer (4 ×) für Proteingele zugesetzt, 5 min im siedenden Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis gelagert.

Reagenzien:

Probepuffer für Proteingele (4 ×) nicht reduzierend

25 mM Tris/HCl, pH 6,75
40 % (w/v) Glycerin
8 % (w/v) SDS
0,004 % (w/v) Bromphenolblau
0,004 % (w/v) Xylencyanol FF

Probepuffer für Proteingele (4 ×) reduzierend

25 mM Tris/HCl, pH 6,75
40 % (w/v) Glycerin
8 % (w/v) SDS
20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
0,004 % (w/v) Bromphenolblau
0,004 % (w/v) Xylencyanol FF

3.2.4.1.2 Gelelektrophorese

Das Auftrennen des Proteingemisches erfolgt auf vertikalen, 0,75 mm dicken Polyacrylamidgelen. Hierzu wird ein Trenngel variabler Konzentration (10-15 % Polyacrylamid) mit einem 6,3%igen Trenngel überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das

Gel senkrecht in eine Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean™, Biorad) eingespannt, diese mit Elektrodenpuffer aufgefüllt, der Kamm aus dem Sammelgel gezogen und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Anschließend werden die Taschen mit den Proben (jeweils 10 µl) und Molekulargewichtsstandard beladen. Die Gelelektrophorese wird bei 20 mA pro Gel durchgeführt bis der Farbmaler des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hat.

Reagenzien:

Acrylamidlösung:	29 % (w/v) Acrylamid
	1 % (w/v) N'-N'-Methylenbisacrylamid
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
Sammelgel (6,3 %), Ansatz für zwei Gele:	0,5 ml Acrylamidlösung
	0,38 ml 1M Tris/HCl pH 6,8
	2,1 ml dest. H ₂ O
	15 µl 20 % SDS
	5 µl TEMED
	30 µl APS-Lösung (10%)
Trenngel 10 %, Ansatz für zwei Gele	3,34 ml Acrylamidlösung
	3,75 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,8
	2,9 ml dest. H ₂ O
	50 µl 20 % SDS
	5 µl TEMED
	150 µl APS-Lösung (10 %)
Trenngel 12,5 %, Ansatz für zwei Gele	3,75 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,8
	50 µl 20 % SDS
	5 µl TEMED
	150 µl APS-Lösung (10 %)
Trenngel 15 %, Ansatz für zwei Gele	5,10 ml Acrylamidlösung
	3,17 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,8
	0,68 ml dest. H ₂ O
	50 µl 20 % SDS
	5 µl TEMED
	150 µl APS-Lösung (10 %)
Laemmli-Laufpuffer	Siehe unter 3.1.6

3.2.4.1.3 Coomassiefärbung

Das Gel wird 30-45 min in Coomassie Brilliant Blue-Lösung geschwenkt und danach mehrere Stunden lang entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Während des Entfärbens wird die Entfärbelösung mehrmals gewechselt.

Bis zum Trocknen wird das Gel in Wasser aufbewahrt.

Reagenzien:**Coomassie-Lösung:**

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

Entfärbelösung:

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

3.2.4.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Proteine wird ein SDS-Gellauf zusammen mit einer BSA-Standardreihe durchgeführt. Von dem zu bestimmenden Protein werden 2-3 Proben mit einem Volumen zwischen 0,5 und 5 μl sowie 10 μl einer BSA-Standardreihe (entsprechend 0,1-1,6 mg/10 μl) auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese werden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt, das Gel luftblasenfrei zwischen zwei 0,5 mm starke Kunststoffplatten gelegt und mit einem Sharp JX-325 High Resolution Color Scanner gescannt. Die einzelnen Proteinbanden auf dem so erhaltenen Bild werden mit der Contour Band-Funktion des Softwareprogrammes ImageMasterTM1-D (Pharmacia Biotech) detektiert und integriert. Durch lineare Regression wird aus den so erhaltenen $\text{OD} \times \text{mm}^2$ -Werten und den bekannten BSA-Konzentrationen eine Eichgerade erstellt. Ausgehend von der Annahme der gleichen Coomassie-Anfärbbarkeit von BSA und dem zu bestimmenden Protein wird die Konzentration des zu untersuchenden Proteins errechnet. Mit dieser Methode können im Gegensatz zur Bestimmung über photometrische Messungen auch die Konzentrationen von nicht 100 % reinen Proteinen mit vergleichbarer Genauigkeit bestimmt werden.

3.2.4.2 Western-blot**3.2.4.2.1 Protein-Transfer**

Das Western-blotting wird in Anlehnung an die von Towbin *et al.* (1979) und Bjerrum und Schafer-Nielsen (1986) beschriebenen Protokolle in einer Halbtrockenzelle (Bio-rad) mit Platin/Edelstahlelektroden durchgeführt .

Beim „blotting“ werden die Proteine eines SDS-Gels oder eines nativen Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Die in dieser Arbeit verwendete Nitro-

zellulosemembran (Schleicher & Schüll, Porengröße 0,2 µm) besitzt eine hohe Proteinbindungskapazität und eignet sich für Protein- und Immunfärbung.

Nach Abschluss der SDS-PAGE werden die Gele zunächst für 10 min zusammen mit den auf Gelgröße zugeschnittenen Membranen in gekühltem blotting-Puffer equilibriert. Auf drei Lagen in blotting-Puffer getränktes Filterpapier (Whatman) wird die equilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt. Auf die Membran wird das Gel derart gelegt, dass sich zwischen den beiden Lagen keine Luftblasen bilden. Auf das Gel werden wiederum 3 mit blotting-Puffer getränkte Filterpapiere gelegt. Eventuell entstehende Luftblasen werden durch Glattrollen mit einem Glasstab entfernt. Der Proteintransfer wird bei 15 V für 45 min durchgeführt.

Nach Beendigung des Proteintransfers wird durch Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran und des Gels die Vollständigkeit des Proteintransfers überprüft. Die Färbung ist reversibel und verträgt sich mit einer anschließenden Immunfärbung. Hierzu wird die Membran für 1-2 min bei RT in Ponceaurot (2 % in 3 % Trichloressigsäure) inkubiert und die überschüssige Farbe danach mit Wasser gewaschen. Dabei werden die Proteine durch die Trichloressigsäure gleichzeitig auf der Membran fixiert.

3.2.4.2.2 Immunologische Detektion

Vor der Reaktion des „blots“ mit Antikörpern werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran mit einem Blocker abgesättigt. Hierzu wird die Membran für 1 h bei RT in 5 % Magermilchpulver in TTBS geschwenkt. Während des Blockens verschwinden die durch Ponceaurot angefärbten Banden.

Die Membran wird nach dem Blocken über Nacht bei 4°C im Kühlraum unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei werden folgende Verdünnungen der primären Antikörper verwendet: a.) Anti-Synaptobrevin 1 : 500, b.) Anti-Spektrin 1 : 1500 jeweils in 1 % Magermilch TTBS. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Antikörper wird die Membran anschließend 3 × 20 min in TTBS gewaschen. Danach erfolgt unter leichtem Schütteln die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus-POD) in einer Verdünnung von 1 : 2000 in 1 % Magermilch TTBS für 2 h bei RT. Anschließend wird die Membran wieder zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Antikörper 3 × 20 min in TTBS gewaschen.

Die Detektion erfolgt über Chemilumineszenz, die bei der von der Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol entsteht (ECL-Reaktion). Das entstehende Licht wird über einen Film oder mit Kodak Image-Station 440 CF detektiert. Hierzu wird die Blotmembran für genau eine Minute im Detektionsreagenz (frisch hergestellt aus jeweils 5 ml Detektionslösung A und B) geschwenkt, in Haushaltsfolie eingeschlagen und mit dem Film 3-5 min inkubiert, oder mit der Kamera für 1-3 min detektiert.

Reagenzien:

TTBS	siehe unter 3.1.6
1 bzw. 5 % Magermilchpulver in TTBS	
primärer und sekundärer Antikörper	siehe unter 3.1.7
ECL-Detektionsreagenz A und B	siehe unter 3.1.6

3.2.4.3 Iodierung von TeNT und BSA mit ^{125}I

Für die Iodierung müssen Proteine ein Tyrosin, Histidin oder primäre Aminogruppen besitzen. Tyrosinreste werden gern mit Chloramin-T (N-monochlor-p-toluene sulfonamid) iodiert (Rehm und Lazdunski 1992). Chloramin-T zersetzt sich in wässriger Lösung langsam zu Hypochlorsäure, die $^{125}\text{I}^-$ zu $^{125}\text{I}^+$ oxidiert. $^{125}\text{I}^+$ reagiert mit der anionischen Form des Tyrosins in ortho-Stellung zu ^{125}I -Tyrosin. Die Reaktion hat ein pH-Optimum von 7,5. Überschüssiges Chloramin-T wird durch ein Reduktionsmittel ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) reduziert, dabei wird auch freies Iod zu Iodid reduziert. Die iodierten Proteine werden durch Gelfiltration vom restlichen $^{125}\text{I}^-$ abgetrennt. Trägeriodid und BSA werden zugegeben, um eine gute Trennung zu ermöglichen, ohne dass Protein oder radioaktives Iod unspezifisch an Oberflächen etc. haften und verloren gehen. Nach der Iodierung liegt eine Mischung von einfach, mehrfach und nicht iodierten Proteinen vor, wobei die monoiodierte Verbindung überwiegt.

Die Iodierungsreaktion wird im Heisslabor der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

150 μg Protein werden in ein kurzes, silikonisiertes Reagenzglas pipettiert und mit 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5 auf 100 μl aufgefüllt. Das vorher abgewogene Chloramin-T wird in der berechneten Menge 0,05 M Na-Phosphatpuffer gelöst (1 mg/25 ml für 4 γ bzw. 1 mg/12,5 ml für 8 γ). Genauso wird eine Natriumdisulfidlösung mit 1 mg/10 ml in 0,05 M Na-Phosphatpuffer hergestellt. Nach einer erfolgreichen Vorprobe (mit kalter NaI-Lösung) wird die eigentliche Iodierung folgendermaßen durchgeführt:

100 µl Proteinlösung
+ 100 µl 0,5 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5
+ 100 µl Tracerverdünnung
+ 100 µl Chloramin-T
→ umrühren und genau nach 1 min
+ 100 µl Natriumdisulfidlösung
→ umrühren, nach genau 1 min
+ 100 µl kalte NaI-Lösung
+ 40 µl 7%ige BSA-Lösung

Der Reaktionsansatz wird auf eine Sephadex G25 coarse-Säule aufgetragen und das Reaktionsgefäß mit 200 µl 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5 mit 0,9 % NaCl 0,5 % BSA gespült. Die Spülflüssigkeit wird ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Eluiert wird mit 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5, dabei werden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die einzelnen Fraktionen werden im γ -Counter gezählt. Die Fraktionen, die das iodierter Protein enthalten, werden aliquotiert und bei 4°C im Isotopenlabor der Nuklearmedizin gelagert. Zur weiteren Analyse werden Aliquote von 10 µl abgenommen und diese weiter im Institut für Toxikologie bearbeitet.

Zur Ermittlung des Iodierungsgrades des Proteins wird eine Fällung mit Trichloressigsäure durchgeführt. Zu den 10 µl der iodierten Proteinlösung werden 200 µl 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5 mit 0,9 % NaCl und 0,5 % BSA und 500 µl 10%ige TCA zupipettiert. Der Ansatz wird geschüttelt, im γ -Counter gezählt und 10 min stehen gelassen. Nach dreiminütiger Zentrifugation wird der Überstand abgenommen (*Überstand 1*), das Pellet mit weiteren 500 µl 10%iger TCA versetzt, resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand abgenommen (*Überstand 2*). Zur Analyse werden sowohl beide Überstände als auch das Pellet im γ -Counter gezählt und anschließend ausgewertet.

Reagenzien:

0,5 M NaPO₄-Puffer pH 7,5
0,05 M NaPO₄-Puffer pH 7,5
Chloramin T
Natriumdisulfid
0,05 M NaPO₄, 0,9 % NaCl, 0,5 % BSA, pH 7,5
10%ige Trichloressigsäure

3.2.4.4 Fluoreszenzmarkierung von BSA

Die Fluoreszenzmarkierung von BSA mit Cy 3.5 (Amersham) wird in Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Protokoll durchgeführt. Cy 3.5 ist ein rot fluoreszierendes Cyanin (Absorptionsmaximum bei 581 nm, Emissionsmaximum bei 596 nm), das mit freien Aminogruppen reagiert.

Für die Konjugation werden 1,62 mg BSA in 162 µl Lösung A gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Cy 3.5 überführt. Die Fluoreszenzmarkierung findet über Nacht bei RT unter leichtem Schütteln statt. Zum Abtrennen des markierten Proteins wird eine Gelfiltration durchgeführt. Hierzu wird die Reaktionslösung auf eine Zentrifugationssäule mit in Lösung B ausgequollenem und damit equilibriertem Sephadex G50 gegeben. Durch Zentrifugation für 5 min bei 2.500 rpm (5403, Eppendorf) kann das fluoreszenzmarkierte BSA abgetrennt werden.

Durch Extinktionsmessung bei 280 nm (Protein) und 581 nm (Fluorophor) kann über das vom Hersteller angegebene Berechnungsschema das Protein/Fluorophor-Verhältnis bestimmt werden.

Reagenzien:

Lösung A:	1 M NaPO ₄ Puffer pH 8,0
Lösung B	1 M PBS pH 7,2
Sephadex G50	
Fluorolink™ Cy 3.5™	siehe unter 3.1.2

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1 Transformation von *E. coli*

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

3.2.5.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen

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

Zwanzig ml 2YT-Medium werden mit 200 µl einer Übernachtskultur eines geeigneten *E. coli*-Stammes angeimpft und 2 h bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4°C und 2.500 rpm abzentrifugiert (5403, Eppendorf), in 20 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (1.200 rpm, 4°C) wird das Bakteriensediment in 2 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen. Nach weiteren 2 h auf Eis sind die Bakterien kompetent und können 48 h lang für eine Transformation verwendet werden.

Reagenzien:

2YT-Medium mit Selektionsantibiotikum Siehe unter 3.1.6
0,1 M CaCl₂-Lösung

3.2.5.1.2 Herstellung kompetenter, tiefrierbarer Bakterien-Zellen

Die Herstellung kompetenter, tiefrierbarer Bakterien-Zellen erfolgt analog der Herstellung kompetenter Zellen. Es werden 200 ml 2YT-Medium mit 2 ml Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4°C und 2.500 rpm abzentrifugiert (5403, Eppendorf), das Pellet in 100 ml einer 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 enthaltenden Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut sedimentiert (8 min, 4°C) und in 20 ml einer 15 mM CaCl₂ und 15 % (v/v) Glycerin enthaltenden Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

Reagenzien:

2YT-Medium mit Selektionsantibiotikum siehe unter 3.1.6
50 mM CaCl₂, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
15 mM CaCl₂, 15 % Glycerin

3.2.5.1.3 Transformation von *E. coli*

100 µl kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut, mit etwa 20 ng Vektor-DNA oder 10 ng ringförmiger Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem fünfminütigen Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad werden die Bakterien 10 min lang auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 300 µl 2YT-Medium wird der Ansatz 30 min bei 37°C und 800 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können die transformierten Bakterien die jeweilige Antibiotikumresistenz ausbilden, bevor sie auf einer 2YT-Agarplatte, welche das für die Selektion notwendige Antibiotikum enthält, ausplattiert werden. Die transformierten Zellen wachsen bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht zu Kolonien heran.

Kovalent geschlossene Plasmid-DNA kann in einer verkürzten Prozedur von *E. coli* aufgenommen werden. Diese Transformationsmethode kann nur genutzt werden, wenn keine Antibiotikumresistenz ausgebildet werden muss. Hierzu werden 1-10 ng der Plasmid-DNA mit 50-100 µl kompetenter (auch tiefgefrorener) *E. coli*-Suspension versetzt, gemischt und 1 min auf 44°C erwärmt. Anschließend werden 300 µl 2YT-Medium hinzugegeben und die Suspension sofort auf einer vorgewärmten 2YT-Agarplatte mit dem entsprechendem Antibiotikum-Zusatz ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht sind Kolonien gewachsen.

3.2.5.1.4 Aufbewahrung transformierter Klone – Anlegen von *E. coli* Glycerinkulturen

Für die Herstellung von *E. coli* Glycerinkulturen werden zunächst 2 ml 2YT-Medium, welches mit entsprechendem Selektionsantibiotikum versetzt ist, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag werden 800 µl dieser Kultur mit 800 µl 87%igem Glycerin auf Eis gemischt und bei -80°C eingefroren.

3.2.5.2 Plasmid-Präparation

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle unabhängig von der chromosomalen DNA vermehrt werden. Die hier verwendeten Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA, die eine Abwandlung des Protokolls von Birnboin und Dolly (1979) darstellen, basieren auf den unterschiedlichen Eigenschaften von

chromosomaler und Plasmid-DNA bei ihrer Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung. Während Plasmid-DNA beim Neutralisieren des pH-Wertes nach alkalischer Denaturierung wieder renaturiert und damit löslich bleibt, haftet chromosomale DNA an Zellwandbruchstücken und Proteinen und kann mit diesen abzentrifugiert werden.

3.2.5.2.1 Plasmid-Mini-Präparation

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

Es werden 2 ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Drehrad inkubiert. Anschließend werden die Bakterienzellen 2 min bei 10.000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) pelletiert und in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl des alkalischen und detergentienhaltigen Puffers P2, sofortiges Mischen und fünfminütiger Inkubation bei RT werden die Zellen lysiert und gleichzeitig die DNA denaturiert. Anschließend wird die Lösung durch Zusatz von 300 µl Puffer N3 neutralisiert und auf die richtige Salzkonzentration für die Bindung der DNA an die Silicagelmembran eingestellt. Nach zehnminütiger Zentrifugation (14.000 rpm, 5415 C, Eppendorf) wird der Plasmid-DNA-haltige Überstand auf eine, in einem Auffanggefäß steckende Minizentrifugensäule überführt. Während der nachfolgenden Zentrifugation (45 s, 14.000 rpm) bindet die DNA an die Silicagelmembran. Der Durchfluss wird verworfen. Die an die Membran gebundene DNA wird erst mit 500 µl Puffer PB (Inkubationszeit 1 min) und anschließend mit 750 µl Puffer PE zur Entfernung von Salzen gewaschen. Dazu wird die jeweilige Lösung auf die Säule pipettiert und durch die Membran zentrifugiert (45 s, 14.000 rpm). Der Durchfluss wird nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wird das Auffanggefäß entleert und restlicher Waschpuffer durch erneute Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) entfernt. Die so gereinigte DNA wird durch Auftragen von 50 µl Puffer EB auf die Silicagelmembran, einminütige Inkubation bei RT und anschließende Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) eluiert. Die erhaltene DNA wird auf einem Agarosegel analysiert und kann ohne weitere Reinigung für Transformationen oder Sequenzierreaktionen eingesetzt werden.

Reagenzien:**Puffer P1** (Qiagen)

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 mg/ml Ribonuklease A

Puffer N3 (Qiagen)

Kaliumacetat/Essigsäure, pH 4,3
Guanidiniumchlorid

PE-Puffer (Qiagen)

Ethanolhaltiger Tris/HCl-Waschpuffer,
Moderate Salzkonzentration, pH 7,7

Puffer P2 (Qiagen)

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

Puffer PB (Qiagen)

Isopropanol
Guanidiniumchlorid, pH 7,0

Puffer EB (Qiagen)

10 mM Tris/HCl, pH 8,5

3.2.5.2.2 Plasmid-Midi-Präparation

Bei der Midi-Präparation erfolgt die Plasmidreinigung über kommerzielle Anionenaustauschersäulen. Auch diese Extraktionsmethode basiert auf einer alkalischen, mit dem Einsatz von SDS gekoppelten Lyse der Zellen. Anschließend wird die Plasmid-DNA bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Bei mittlerer Salzkonzentration wird sie von Verunreinigungen befreit und durch hohe Salzkonzentration wieder eluiert. Mit dieser Methode ist eine DNA-Ausbeute von bis zu 4 µg/ml Kultur möglich.

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das *Plasmid Handbook* von Qiagen (1995).

Von einer 2YT-Agarplatte mit Einzelkolonien oder aus einer Glycerin-Kultur werden 25 ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Bakterien 5 min bei 3.500 rpm (5305, Eppendorf) abzentrifugiert und in 4 ml gekühltem Puffer P1 mit 100 µg/ml Rnase A resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 werden die Zellen lysiert und die DNA und Proteine denaturiert. Um die Plasmid-DNA zu renaturieren, wird das Gemisch nach 5 min bei RT mit 4 ml Puffer P3 neutralisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Der hohe Salzgehalt des Puffers führt außerdem zur Fällung des vorhandenen SDS, welches eine spätere Bindung der DNA an die Anionenaustauschersäule verhindert. Das Präzipitat wird anschließend 15 min bei 15.000 rpm (5403, Eppendorf) abzentrifugiert. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wird danach durch einen Filter auf eine mit 4 ml Puffer QBT equilibrierte Säule (Tipp 100, Qiagen) überführt. Die vorhandenen Lösungsbedingungen (Salzkonzentration, pH-Wert) führen ausschließlich zur Bindung der Plasmid-

DNA, während zelluläre Proteine und die durch die RNase degradierte RNA nicht vom Säulenmaterial gebunden werden.

Die Säule wird zweimal mit 10 ml Waschpuffer QC behandelt, wodurch neben RNA- und Proteinresten auch RNase A und nukleinsäurebindende Proteine entfernt werden. Der Waschpuffer QC enthält zusätzlich 15 % Ethanol, der unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen verringert und so die Reinheit der Plasmid-DNA weiter erhöht.

Die Plasmid-DNA wird mit $3 \times 1,2$ ml Puffer QF in 2 ml Eppendorfgläser eluiert. Die DNA wird mit jeweils 840 μ l Isopropanol gefällt und 30 min bei 11.500 rpm (Hettich, Mikro Rapid/K) und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und 5-10 min bei 37°C getrocknet, bevor die DNA in 3×50 μ l dH₂O gelöst wird.

Die so erhaltene DNA wird durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Reagenzien:

Puffer P1:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
autoklaviert

Puffer P2:

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

Puffer P3:

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Puffer QBT:

0,75 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % (v/v) Ethanol
0,15 % (w/v) Triton X-100
sterilfiltriert

Waschpuffer QC:

1 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % (v/v) Ethanol
sterilfiltriert

Puffer QF:

1,25 M NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 8,5
15 % (v/v) Ethanol

Isopropanol

3.2.5.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Menge an Ethidiumbromid, die während einer Agarose-Gelelektrophorese in die DNA interkaliert, ist proportional zur Anzahl ihrer Basenpaare. Dieser Eigenschaft be-

dient man sich zur Bestimmung der DNA-Konzentration. Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Probe mit denen eines mitgelaufenen Standards lässt sich die DNA-Konzentration auf einem Transilluminator (366 nm) abschätzen.

3.2.5.3 DNA-Gelextraktion

Durch PCR oder Restriktionsspaltung erhaltene DNA-Fragmente, die für eine Ligation verwendet werden sollen, werden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe unter 3.2.5.9), mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und gewogen. Die Gelextraktion wird in Anlehnung an das *Qiaquick Spin Handbook* durchgeführt.

Pro 100 mg Gel werden 300 µl Lösungspuffer QG gegeben und der Ansatz für bis zu 15 min bei 50°C unter Schütteln (Stufe 7) im Thermomixer inkubiert, bis das Gelstück vollständig gelöst ist. Diese Lösung wird auf eine Säule gegeben und für 1 min bei RT bei 14.000 rpm (5415C, Eppendorf) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die an das Säulenmaterial gebundene DNA nacheinander mit 500 µl Puffer QB und 500 µl ethanolhaltigem Puffer PE gewaschen. Am Ende des Waschvorganges werden durch Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) Rückstände des Waschpuffers PE entfernt. Die an die Säule gebundene DNA wird mit 30-50 µl Puffer EB (je nach eingesetzter Menge DNA) durch einminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm in ein Eppendorf Reagiergefäß eluiert. Nach anschließender Bestimmung der DNA-Konzentration kann die DNA für Ligationen eingesetzt werden.

Reagenzien:

QIAquick Gel-Extraktionskit

TAE

siehe unter 3.1.6

Agarose

Ethidiumbromid

Auftragspuffer für Agarosegele

0,25 % 8w/v Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF

30 % (w/v) Glycerol

3.2.5.4 PCR

Mit Hilfe der PCR-Technik (Saiki *et al.* 1988) lassen sich beliebige Teile einer Nukleinsäuresequenz einer Matrize *in-vitro* selektiv vervielfältigen. Durch Einsatz speziell synthetisierter Primer können Punktmutationen und zusätzliche Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen generiert werden.

PCR-Ansatz:

1,0	µl Template-DNA (10-20 ng/µl)
1,0	µl 3'-Primer (25 pmol/µl)
1,0	µl 5'-Primer (25 pmol/µl)
1,0	µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
5,0	µl 10 × DNA-Polymerase-Puffer
0,7	µl <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

ad 50 µl mit autoklaviertem dH₂O

Anschließend erfolgt die Inkubation der Ansätze im Hybaid TouchDown Thermocycler mit beheiztem Deckel. Dabei wird folgendes Temperaturprogramm durchlaufen:

1. Schritt:	2 min	94°C	Denaturierung doppelsträngiger DNA
2. Schritt:	1 min	94°C	Denaturierung doppelsträngiger DNA
3. Schritt:	2 min	50-60°C	Hybridisierung der Primer
4. Schritt:	2 min	72°C	Polymerisation

Die Schritte 2 bis 4 werden 25 bis 30 Mal wiederholt. Anschließend wird die Temperatur von 72°C für 10 min gehalten, um unvollständig polymerisierte Stränge zu vervollständigen. Am Programmende wird die Probe auf 4°C abgekühlt. Als Kontrolle dient ein gleichbehandelter PCR-Ansatz, der keine Template-DNA enthält.

Je 2,5 µl der PCR-Produkte werden im Anschluss auf Agarose-Gelen analysiert.

Reagenzien:

dNTP MIX

10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP

DNase Polymerase-Puffer (10x)

200 mM Tris/HCl pH 8,0

100 mM KCl

100 mM (NH₄)SO₄20 mM MgSO₄

0,1 % BSA

1,0 % TritonX-100

3.2.5.4.1 Reinigung von PCR-Produkten

Bevor ein durch PCR synthetisiertes DNA-Fragment durch Restriktionsendonukleasen geschnitten werden kann, um es als Insert in einen Vektor zu ligieren, muss die DNA-Polymerase entfernt werden.

Die Reinigung erfolgt in Anlehnung an das *QIAquick Spin Handbook* (1997) unter Verwendung eines *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) durch selektive Bindung der im PCR-Reaktionsgemisch enthaltenen DNA an eine mit Silicagel beschichtete Membran. Diese Membran bindet nur DNA-Fragmente größer 100 bp, so dass Primer und Template-DNA entfernt werden.

3.2.5.5 Sequenzierung von Plasmid DNA

Zur Überprüfung von Mutationen, Ligationen oder der korrekten Synthese von PCR-Produkten wird die Plasmid-DNA sequenziert. Bei der Polymerasekettenreaktion nimmt die Wahrscheinlichkeit für eine Punktmutation mit der Länge des zu amplifizierenden Bereiches zu. Um sicher gehen zu können, dass durch PCR generierte Klone die richtige Sequenz und keine unerwünschten Mutationen enthalten, wird durch DNA-Minipräparation das klonierte Plasmid aus den Bakterien isoliert und die Sequenz des Inserts durch Sequenzanalyse bestätigt.

Die hier angewendete DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Methode von Sanger (1977) durch Kettenabbruch. Hierbei wird unter Verwendung eines spezifischen Primers, der komplementär zu einem vektorialen Bereich stromauf- bzw. stromabwärts des zu untersuchenden Inserts ist, die DNA durch DNA-Polymerase und Desoxynukleotide in den Insertbereich hinein neu synthetisiert.

Um die neu synthetisierten Stränge zu markieren, wird zunächst eine Markierungsreaktion mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt und nachfolgend mit der

Terminationsreaktion kombiniert. Hierfür sind die 2', 3'-Dideoxynukleotide (ddNTP) mit jeweils einem anderen Fluorophor versehen. Dadurch ergeben sich statistisch verteilt unterschiedliche Kettenlängen, die mit jeweils einem spezifischen Farbstoff enden (Lee *et al.* 1992). Diese DNA-Fragmente werden durch eine Kapillar-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und beim Passieren eines Fensters durch Anregung mit LASER-Licht zur Fluoreszenz gebracht. Die je nach Nukleotid bzw. Fluorophor emittierten unterschiedlichen Wellenlängen werden fokussiert, von einem Spektrographen nach Wellenlänge zerlegt und simultan von einer CCD-Kamera (charge-coupled device) aufgenommen und digitalisiert. Anschließend werden die Rohdaten von der ABI Prism *DNA Sequencing Analysis 3.0* Software ausgewertet. Aus der Abfolge der Fluoreszenzsignale kann die Gesamtsequenz ermittelt werden.

Reaktionsansatz mit BigDye RR Terminator AmpliTaq®, FS Kit:

Ansatz im 0,5 ml Eppendorf-Gefäß:

250	ng DNA in HPLC-H ₂ O
2-5	pmol Primer
2	µl BigDye RR Terminator AmpliTaq®
ad 10	µl mit HPLC H ₂ O

Sequenzier-Reaktion mit Hybaid Touchdown Thermocycler:

Programmablauf:

Doppelstrangtrennung	30 s bei 96°C
Primerbindung	15 s bei 50°C
Strangverlängerung (Polymerisation)	4 min bei 60°C
25 Zyklen	

Aufreinigung der DNA durch Ethanol-Präzipitation:

Zum Abtrennen nicht eingebauter Nukleotide werden 100 µl 0,3 M Natriumaetat-Lösung, pH 4,6 zum Reaktionsansatz gegeben. Zur DNA-Präzipitation werden 250 µl abs. Ethanol zugesetzt, gemischt und 15 min bei 14.000 rpm (5415C, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet mit 250 µl 70 % (v/v) Ethanol/HPLC-H₂O gewaschen und erneut 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nachdem auch dieser Überstand verworfen wurde, wird das Pellet 5 min bei 37°C getrocknet

und in 25 µl TSR (Template Supression Reagent) gelöst. Die DNA wird 2 min bei 90°C denaturiert und das Reaktionsgefäß mit einem Gummiseptum verschlossen.

Analyse mit dem ABI PRISMTM 310 von Perkin Elmer:

Auswertung:

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

Reagenzien:

Big Dye RR Termin AmpliTaq®,FS Kit	siehe unter 3.1.2
Primer	siehe unter 3.1.10.2
0,3 M Natriumacetat	
Ethanol absolut und 70 %	
Template Supression Reagent	

3.2.5.6 Restriktionsschnitte

Restriktionsenzyme hydrolysieren die Bindung zwischen Phosphatgruppe und Desoxyribose im Zuckerphosphatrückgrad beider Stränge eines DNA-Doppelstranges. Die in der Gentechnologie am häufigsten verwendeten Typ II-Endonukleasen schneiden die DNA innerhalb einer für das Enzym charakteristischen Erkennungssequenz aus 4-8 Basenpaaren. Sie erzeugen dabei glatte bzw. 3'- oder 5'-überhängende Enden.

Restriktionsschnitte werden zu unterschiedlichen Zwecken genutzt. Mit ihrer Hilfe können DNA-Fragmente schnell aus Plasmiden herausgeschnitten werden, um sie in andere Vektoren einzufügen. Außerdem können erfolgreiche Subklonierungen dieser Art anhand des Spaltmusters bestimmter Restriktionsenzyme identifiziert werden.

Zusammensetzung eines analytischen Restriktionsansatzes:

5,0	µl Plasmid-DNA (etwa 1 µg)
2,0	µl 10 × Puffer
2,0	µl BSA [1 mg/ml] (optional)
0,5	µl Restriktionsenzym (2-10 U)
10,5	µl dH ₂ O
20,0	µl Σ

Der Ansatz wird 90 min bei 37°C inkubiert.

Je nach verwendetem Restriktionsenzym sind unterschiedliche Pufferbedingungen für eine optimale Enzymaktivität notwendig. Bei Spaltungen mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen muss ggf. ein Kompromiss bei der Pufferwahl eingegangen werden. Dann wird die 1,5-fache Menge des Enzyms, das nicht mit seinem herstellerempfohlenen Puffer verwendet wird, eingesetzt. Alternativ werden die Restriktionsspaltungen nacheinander und nach zwischenzeitlicher Umsalzung durchgeführt. Die Inkubation wird durch Hitzeinaktivierung beendet und die Spaltung auf Agarose-Gelen kontrolliert (siehe 3.2.5.9).

Ein präparativer Restriktionsansatz wird analog, jedoch mit größeren Mengen (5 µg DNA) durchgeführt.

Reagenzien:

Restriktionsenzyme	siehe unter 3.1.4.1
BSA (1 mg/ml)	
10 × Puffer 2	
10 × Puffer 4	
10 × Puffer H	

3.2.5.7 Dephosphorylierung eines Vektors

Um Genfragmente mit hoher Effizienz in geeignete Plasmid-Vektoren zu klonieren, muss eine Religation des Vektors ohne Einbau eines Inserts verhindert werden. Zu diesem Zweck behandelt man Vektor-DNA, besonders nach Linearisierung mit nur einem Restriktionsenzym oder nach Schneiden mit Endonukleasen, die kompatible Enden erzeugen, mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm.

Dephosphorylierungsansatz:

16,0	µl DNA-Lösung (etwa 5 µg)
2,0	µl 10 × Dephosphorylierungspuffer
1,0	µl alkalische Phosphatase (0,1 U/ml)
<hr/>	
19,0	µl Σ

Der Reaktionsansatz wird 60 min bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 min nochmals die gleiche Enzymmenge zugesetzt wird. Durch Zusatz von EDTA auf eine Endkonzentration von 20 mM und Erwärmen des Ansatzes auf 65°C für 10 min wird das Enzym inaktiviert. Das denaturierte Enzym kann anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion oder präparative Agarose-Gelelektrophorese aus dem Ansatz entfernt werden.

Reagenzien:

10 × Dephosphorylierungspuffer
Alkalische Phosphatase
EDTA-Stammlösung

3.2.5.8 Ligation

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

In einem Ligationsansatz zur Ligation komplementärer DNA-Enden werden etwa 20 ng Vektor-DNA und soviel Insert-DNA eingesetzt, dass sich ein molares Vektor-Insert-Verhältnis von 1 : 3 bis 1 : 4 ergibt. Liegen die Enden der DNA glatt vor, so wird die Ligation mit einem molaren Vektor-Insert-Verhältnis von 1 : 6 bei ebenfalls 20 ng eingesetzter Vektor-DNA durchgeführt. Das Gemisch aus Vektor und Insert wird mit 1 µl 10 × Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 : 3 mit dH₂O verdünnt = 133 U ≡ 2 Weiß'sche Units) versetzt. Anschließend wird der Ansatz mit dH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und mindestens 3 h bei 16°C inkubiert. Ligationen von glatten DNA-Enden werden ca. 16 h bei 16°C inkubiert. Danach wird der Ligationsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt. Die hierbei inaktivierte Ligase löst sich von der DNA und erhöht somit die Effizienz der nachfolgenden Transformation.

Parallel zu jeder Ligationsreaktion wird eine Kontrolle mitgeführt, die zwar Vektor und T4-DNA-Ligase, aber kein DNA-Insert enthält. Nach der Transformation zeigt diese Kontrolle die Anzahl von Kolonien an, die auf eine Religation des Vektors zurückzuführen sind.

Reagenzien:

10 × Ligationspuffer

T4-DNA-Ligase

2YT-Medium mit Selektionsantibiotikum siehe unter 3.1.6**2YT-Agaroseplatten** mit Selektionsantibiotikum siehe unter 3.1.6**3.2.5.9 Agarose-Gelelektrophorese**

Die qualitative und quantitative Überprüfung von DNA nach einer PCR, einer Restriktionsspaltung oder nach einer Minipräparation erfolgt anhand von Agarose-Gelen. Die Konzentration an Agarose richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Mit Hilfe des λ -DNA-Standards lässt sich die Molekülgröße von DNA-Fragmenten durch Vergleich der Laufstrecke und anhand deren Intensität die jeweilige Menge bestimmen.

Die erforderliche Menge an Agarose (w/v) wird durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle in 1 × TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wird die Lösung mit 1 µl Ethidiumbromid pro 20 ml versetzt, in ein horizontales Gelbett gegossen und mit einem Kamm für die Geltaschen versehen. Nach dem Erstarren wird das Gel mit 1 × TAE-Puffer überschichtet. Die Proben werden mit 1/5 ihres Volumens an Auftragspuffer für Agarose-Gele versetzt und die Elektrophorese für die ersten 5 min bei 15 V, anschließend 40 min bei 45 V durchgeführt. Währenddessen interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und macht damit die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) sichtbar.

Reagenzien:**TAE Laufpuffer**

Siehe unter 3.1.6

Agarose

Ethidiumbromid

Auftragspuffer für Agarosegele

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF

30 % Glycerol

3.2.6 Klonierung von TeNT mit Mutationen in der Translokationsdomäne

In der folgenden Tabelle sind sämtliche Klonierungen zusammengefasst. Dabei werden jeweils Fragmente durch Restriktionsverdau der Template DNA oder durch PCR an der Template DNA mit anschließendem Restriktionsverdau isoliert und nachfolgend in den entsprechend geschnittenen und dephosphorilierten Akzeptorvektor ligiert. Die erhaltenen Plasmide werden durch Sequenzierung (siehe 3.2.5.5) mit geeigneten Oligonukleotiden überprüft.

Tab. 3 Klonierung der Punktmutation im Bereich der Translokationsdomäne des TeNT-Gens

DNA	Template	Oligonukleotide	Restr.-Verdau	Akzeptorvektor
pJK1a-TeNTD634A	pAR4b	#TeNTWDD Fw/#HCTx1 Rv	<i>Pvu</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pAR4b	#TM10 Fw/#TeNTWDD Rv	<i>EcoR</i> V, <i>Pvu</i> I	
pJK1b-TeNTD638A	pAR4b	#TeNTWDD Fw/#HCTx1Rv	<i>Pvu</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pAR4b	#TM10 Fw/#TeNTWDD Rv	<i>EcoR</i> V, <i>Pvu</i> I	
pJK1c-TeNTD638A	pAR4b	#TeNTWDD Fw/#HCTx1 Rv	<i>Pvu</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pAR4b	#TM10 Fw/#TeNT WDD Rv	<i>EcoR</i> V, <i>Pvu</i> I	
pJK1d-TeNTDKD/AAA	pJK1c	#TeNTK635A Fw/#3HCTx1 Rv	<i>Pvu</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pAR4b	#TM10 Fw/#TeNTWDD Rv	<i>EcoR</i> V, <i>Pvu</i> I	
pJK1e-TeNTP644G	pAR4b	#TeNTP644G Fw/ #3HCTx1 Rv	<i>Aat</i> II, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pAR4b	#TM10 Fw/#TeNTP644 Rv	<i>EcoR</i> V, <i>Aat</i> II	
pJK1f-TeNTP648G	pAR4b	#TeNTP648G Fw/#3HCTx1 Rv	<i>Kas</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pAR4b	#TM10 Fw/#TeNTP648G Rv	<i>EcoR</i> V, <i>Kas</i> I	
pJK1g-TeNTDMPG	pJK1e	#TeNTP648 Fw/#HCTx1 Rv	<i>Kas</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pJK1e	#TM10 Fw/#DMPG Rv	<i>EcoR</i> V, <i>Kas</i> I	
pJK1h-TeNTTM7984	pAR4b	#TeNTTM7984 Fw/#3HCTx1 Rv	<i>Xho</i> I, <i>EcoR</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pAR4b	#Ex-2 Fw/#TeNTTM7984 Rv	<i>Xho</i> I, <i>EcoR</i> V, <i>Bam</i> H I	
pJK1j-DMPGTM7984	pJK1g	#TeNTTM7984 Fw/#3HCTx1 Rv	<i>Xho</i> I, <i>EcoR</i> I, <i>Sac</i> II	pAR4b
	pJK1g	#Ex-2 Fw/#TeNTTM7984 Rv	<i>Xho</i> I, <i>EcoR</i> V, <i>Bam</i> H I	
PJK2a-TeNTD634A	pJK1a-TeNTD634A	--	<i>Hpa</i> I, <i>Sac</i> II	pAR2
PJK2b-TeNTD638A	pJK1b-TeNTD638A	--	<i>Hpa</i> I, <i>Sac</i> II	pAR2
PJK2c-TeNTD638A	pJK1c-TeNTD638A	--	<i>Hpa</i> I, <i>Sac</i> II	pAR2
PJK2d-TeNTDKD/AAA	pJK1d-TeNTDKD/AAA	--	<i>Hpa</i> I, <i>Sac</i> II	pAR2
PJK2e-TeNTP644G	pJK1e-TeNTP644G	--	<i>Hpa</i> I, <i>Sac</i> II	pAR2
PJK2f-TeNTP648G	pJK1f-TeNTP648G	--	<i>Hpa</i> I, <i>Sac</i> II	pAR2
PJK2g-TeNTDMPG	pJK1g-TeNTDMPG	--	<i>Hpa</i> I, <i>Sac</i> II	pAR2

3.2.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

3.2.7.1 Proteinpräparation

Für diese Arbeit werden ausschließlich His6-Tag-Fusionsproteine (QIAexpress System der Firma Qiagen) hergestellt und aufgereinigt. Dieses System basiert auf der hohen Affinität von Histidin zu Nickel-NTA (Nitrilotriessigsäure). Die zu präparierenden Proteine werden am N- oder C-terminalen Ende mit einem His6-Tag fusioniert über den

eine einfache, effektive und unter milden Bedingungen durchzuführende Aufreinigung möglich ist.

3.2.7.1.1 Präparation rekombinanter TeNT

Rekombinantes TeNT wird in Form von C-terminalen His6-Tag-Fusionsproteinen in *E. coli* M15pREP4 (Qiagen) hergestellt.

Zunächst wird durch Überimpfen einer Einzelkolonie auf 20 ml 2YT-Medium mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin, Kanamycin) über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator eine Vorkultur angesetzt. Von dieser ausgehend, wird am nächsten Tag durch Überführen von 5 ml Vorkultur auf 1 l 2YT-Medium mit Selektionsantibiotikum die Hauptkultur angelegt. Diese wird bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,7 bei 37°C im Schüttelinkubator (200 U/min) inkubiert. Nach Induktion mit IPTG (Endkonzentration 0,3 mM) wird die Temperatur auf RT gesenkt und die Proteinexpression über Nacht (10 h) laufen gelassen. Die Bakterienkultur wird am nächsten Morgen bei 5.000 rpm, 4°C für 20 min im GSA-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und anschließend autoklaviert. Die Pellets werden in Sonication-Puffer (Zusatz von Protease-Inhibitoren) resuspendiert und in SS34-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach dem Aufschluss der Zellen mit Ultraschall werden die Zelltrümmer durch zwei hintereinander durchgeführte Zentrifugationen a.) SS34-Rotor, 15.000 rpm, 4°C, 20 min der Überstand weiter b.) Ultrazentrifugation, Ti-70-Rotor, 50.000 rpm, 4°C, 1 h) entfernt. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation wird dekantiert und bis zur weiteren Behandlung auf Eis gelagert. Die folgenden Arbeitsschritte finden bei 4°C im Kühlraum statt. Während der Zentrifugationen werden die Ni-Agarosesäulen (800 µl Ni-Agarosesuspension) vorbereitet und mit 20 ml Sonication-Puffer equilibriert. Der Überstand der Ultrazentrifugation wird auf die Säule gegeben, der Durchfluss in einem autoklavierten Gefäß aufgefangen und bei 4°C aufbewahrt. Nach dem vollständigen Auftragen des Überstandes wird die Säule zunächst mit 20 ml Sonication-Puffer und anschließend mit 10 ml Sonication-Puffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Die Waschflüssigkeiten werden getrennt in autoklavierten Gefäßen aufgefangen und vorläufig bei 4°C aufbewahrt. Eluiert wird mit 6×500 µl Sonication-Puffer mit 100 mM Imidazol. Von jeder Fraktion (auch vom Durchfluss und den beiden Waschflüssigkeiten) werden 18 µl Probe abgenommen, mit 6 µl $4 \times$ Probenpuffer (denaturierend) versetzt und die Probe für 20 min bei 37°C denaturiert. Danach wird eine SDS-PAGE durchgeführt, um zu überprüfen, in welchen Fraktionen sich das Protein befindet.

Die proteinhaltigen Fraktionen werden vereinigt und bei 4°C im Kühlraum gegen 100 mM TrisHCl pH 8,0 dialysiert. Die Proteinlösung wird aliquotiert (Probe für Konzentrationsbestimmung) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration wird im Anschluss an die Dialyse durch eine SDS-PAGE mit anschließender densitometrischer Auswertung (siehe 3.2.4.1.4) bestimmt.

Reagenzien:

2YT-Medium mit Selektionsantibiotikum	siehe unter 3.1.6
Sonication-Puffer mit Protease-Inhibitoren mit/ohne Imidazol	siehe unter 3.1.6
Ni-Agarose	
100 mM Tris/HCl pH 8,0	

3.2.7.1.2 Präparation von rekombinantem Synaptobrevin-2

Synaptobrevin-2 wird ohne Transmembrandomäne in Form eines N-terminalen His6-Tag-Fusionsproteins (Sorensen *et al.* 2002) in *E. coli* BL21DE3 hergestellt. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Ulf Matti aus der Arbeitsgruppe Binz (MHH, Abteilung für physiologische Chemie) zur Verfügung gestellt.

Zum Ansetzen der Bakterienkultur siehe unter 3.2.7.1.1, in diesem Fall wird von frisch mit Plasmid-DNA transfizierten *E. coli* BLR21DE3 Zellen (frisch hergestellte kompetente Zellen) ausgegangen. Die Genexpression wird bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 mit 0,8 mM IPTG induziert. Nach 2 h bei 37°C, wird die Kultur bei 5.000 rpm, 4°C für 20 min im GSA-Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wird wahlweise sofort weiter verarbeitet, oder über Nacht bei -20°C eingefroren.

Die Synaptobrevin-2 Präparation erfolgt in Anlehnung an die Anleitung zur denaturierenden Proteinaufarbeitung aus dem „Handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins“ (Qiagen). Hierzu wird das Pellet zunächst in Lysis-Puffer resuspendiert und solange vorsichtig bei RT geschüttelt (Schaumbildung vermeiden), bis eine klare Lösung vorliegt. Das Lysat wird für 20 min bei RT und 10.000 × g zentrifugiert, um Zellreste abzutrennen. Anschließend wird 1 ml 50 % Ni-Agarose pro 4 ml Lysat zugesetzt und für 1 h bei RT bei leichtem Schütteln inkubiert. Die Suspension wird in eine leere Säule gegeben, der Durchfluss in einem autoklavierten Gefäß aufgefangen und bis zur Analyse bei RT aufbewahrt. Die Säule wird im Anschluss 2 ×

gefangen und bis zur Analyse bei RT aufbewahrt. Die Säule wird im Anschluss $2 \times$ mit 4 ml Waschpuffer gewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls in einem autoklavierten Gefäß aufgefangen. Danach wird das Protein mit $4 \times 0,5$ ml Elutionspuffer 1 und mit $4 \times 0,5$ ml Elutionspuffer 2 eluiert. Vom Lysat, dem Durchfluss, den Waschflüssigkeiten und den einzelnen Fraktionen werden $18 \mu\text{l}$ mit $6 \mu\text{l}$ $4 \times$ Probenauftragepuffer (reduzierend) versetzt und auf einem 15%igen SDS-Gel analysiert.

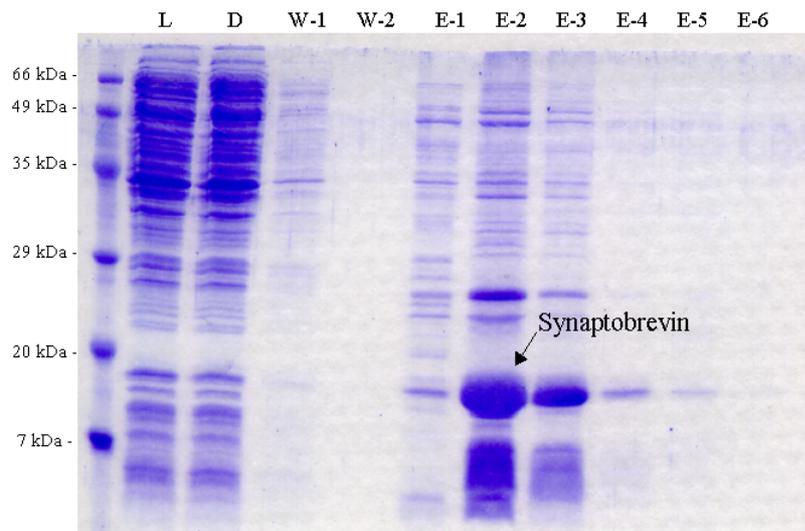


Abb. 5: Aufreinigung von Synaptobrevin 2 ohne Transmembrandomäne über den N-terminalen His6-tag. 15%ige SDS-PAGE, Coomassiefärbung, L = Lysat der Bakterienkultur, D = Durchfluss, W = Waschflüssigkeit, E = Eluat, aufgetragen wurden $7,5 \mu\text{l}$ Proteinlösung.

Die Synaptobrevin-2-haltigen Fraktionen werden vereinigt und bei 4°C gegen Puffer A pH 7,5 dialysiert. Anschließend wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Protein bis zur Nutzung bei -80°C gelagert.

Reagenzien:

2YT-Medium mit Selektionsantibiotikum	siehe unter 3.1.6.
Lysis-Puffer	8 M Harnstoff 0,1 M NaH_2PO_4 0,01 M Tris/HCl pH 8,0 frisch einstellen
Wasch-Puffer	8 M Harnstoff 0,1 M NaH_2PO_4 0,01 M Tris/HCl pH 6,3 frisch einstellen

Elutionspuffer 1	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl pH 5,9 frisch einstellen
Elutionspuffer 2	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl pH 4,5 frisch einstellen
Probenauftragepuffer reduzierend Puffer A ohne EDTA Ni-Agarose	siehe unter 3.2.4.1.1 siehe unter 3.1.6

3.2.7.2 Trypsinaktivierung rekombinant hergestellter TeNT Moleküle

Rekombinantes TeNT (einschließlich der Mutanten) wird in *E. coli* als inaktives 150 kDa single-chain Moleküle mit einem C-terminalen His6-Tag hergestellt. Zwischen L- und H-Kette der CNT befindet sich eine proteolytisch sensitive Region, die von zwei Cysteinen eingerahmt wird. Durch „nicking“ entsteht das aktive, durch eine Disulfidbrücke verbundene, di-chain Toxin. Für alle durchgeführten Experimente wird rekombinantes TeNT mit an Agarose immobilisiertem Trypsin (Sigma-Aldrich) zwischen schwerer und leichter Kette proteolytisch gespalten.

Hierzu wird die benötigte Menge Toxin mit "beaded" Trypsin (0,002 U/μg Toxin) in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 für 1 h bei 30°C im Thermomixer bei 800 rpm inkubiert. Die "beads" werden durch Zentrifugation (5.000 rpm, 1 min) pelletiert, der Überstand mit geknicktem Toxin abgenommen und weiterverwendet.

Es werden zwei 2 μl Aliquote zur Überprüfung der erfolgreichen Spaltung und zur Überprüfung der Disulfid-Brückenbildung (mit reduzierendem/nicht reduzierendem Gelladepuffer) auf einem 10%igen SDS-Gel analysiert.

Reagenzien:

20 mM Tris/HCl pH 8,0
an beads immobilisiertes Trypsin

3.2.8 Bestimmung der Toxizität von CNT am Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparat der Maus

Das Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparat wird als Standardpräparat für experimentelle Untersuchungen an motorischen Endplatten von Säugern genutzt (Bülbring 1946). Das Zwerchfell der Maus eignet sich wegen seiner geringen Dicke besonders gut für die Untersuchung der hochmolekularen CNT, da diese ausschließlich durch Diffusion zu den motorischen Endplatten gelangen.

Die Zwerchfelle werden männlichen oder weiblichen NMRI-Mäusen mit einem Gewicht von ca. 20-30 g entnommen. Dafür werden die Tiere mit CO betäubt und entblutet. Die Thoraxwand wird entfernt und die linke Zwerchfelloberfläche mit dem Nervus phrenicus präpariert. Das isolierte Nerv-Muskelpräparat wird in ein 37°C warmes Organbad mit einem Volumen von 70 ml überführt. Die Badlösung (Krebs-Ringer-Lösung, pH 7,4) wird mit 5 % CO₂/95 % O₂ (Carbogen) begast. Der Nerv wird über zwei Ringelektroden mit supramaximalen Reizimpulsen (Reizdauer 0,1 ms; Amplitude 3 V) und einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Die isometrischen Muskelkontraktionen werden mit einem Kraft-Wandler übersetzt und mit der VitroDat Online software (FMI GmbH) erfasst.

Die Toxine werden direkt in die Badlösung appliziert, welcher vorher BSA (Endkonzentration 0,1 %) zugesetzt wird, um unspezifische Bindung der Toxine an Glasoberflächen zu verhindern. Gemessen wird die Zeit, in der die Kontraktionsamplitude 50 % des Ausgangswertes erreicht hat (Paralysezeit/2). Auf diesem Weg werden Dosis-Wirkungskurven der verschiedenen Tetanus Neurotoxine (Wildtyp und rekombinant hergestelltes TeNT einschließlich Mutationen in der Translokationsdomäne) aufgenommen. Die rekombinant hergestellten Toxine werden direkt vor der Messung mit Trypsin „genicked“ (siehe Punkt 3.2.7.2)

Reagenzien:

Krebs-Ringer-Lösung pH 7,4: 118,0 mM NaCl
4,7 mM KCl
1,2 mM MgSO₄
1,2 mM KH₂PO₄
2,5 mM NaHCO₃
2,5 mM CaCl₂
11,0 mM Glucose
pH 7,4 (unter Begasung mit CO₂)

4 Ergebnisse

4.1 Das Erythrozyten ghost Modell

Im Vordergrund dieser Arbeit stand der Aufbau eines Modells, mit dem der Translokationsprozess von TeNT über Membranen beobachtet werden kann. Dieses Modell soll die Bedingungen nachstellen können, die beim Translokationsprozess des Toxins aus dem Endosom ins Zytosol der Zellen vorliegen: pH- und Ionengradient über ein für das Toxin rezeptorfrees, durch natürliche Membranen gebildetes, abgeschlossenes Kompartiment.

4.1.1 Herstellung von Erythrozyten ghosts

Die ghosts wurden über die direkte hypotone Hämolyse in Anlehnung an das Protokoll von T. Steck und J. Kant (1974) hergestellt und die Pufferbedingungen in Anlehnung an die Arbeit von M. Dalla Serra *et al.* (1992) gewählt (siehe Abb. 4). Der Ionengradient wurde in diesem System über Kaliumionen aufgebaut, der pH-Wert im „endosomal“ Kompartiment auf pH 5 und im „zytosolischen“ Bereich auf pH 7,5 eingestellt. Die Orientierung wurde folgendermaßen gewählt: Im ghost-Lumen wurden die zytosolischen Bedingungen eingestellt, die ghosts wurden für die Versuche in einem Puffer resuspendiert, der den endosomal Verhältnissen nachempfunden war. Diese Orientierung bot folgende Vorteile:

- a) Für die weiteren Versuche sollte die Translokation des Toxins über den Verdau von Synaptobrevin nachgewiesen werden (siehe 4.6.). Da kleinere Moleküle mit größerer Effizienz während des „reseal“-Prozesses in ghosts eingeschleust werden können und TeNT (Mr 150 kDa) größtmäßig an die obere Grenze der überhaupt über die Präparation einschließbaren Proteine stößt, war es einfacher Synaptobrevin (Mr ~ 20 kDa) -beladene ghosts zu präparieren. Da das Substrat im Zytosol der Zellen zu finden ist, ergaben sich so die weiteren Bedingungen für das ghost-Lumen.
- b) Es ist operativ einfacher mit Pellets zu arbeiten, die ghosts lassen sich während der Versuchsreihen gut pelletieren und das zu untersuchende Protein liegt durch Membranen geschützt vor.

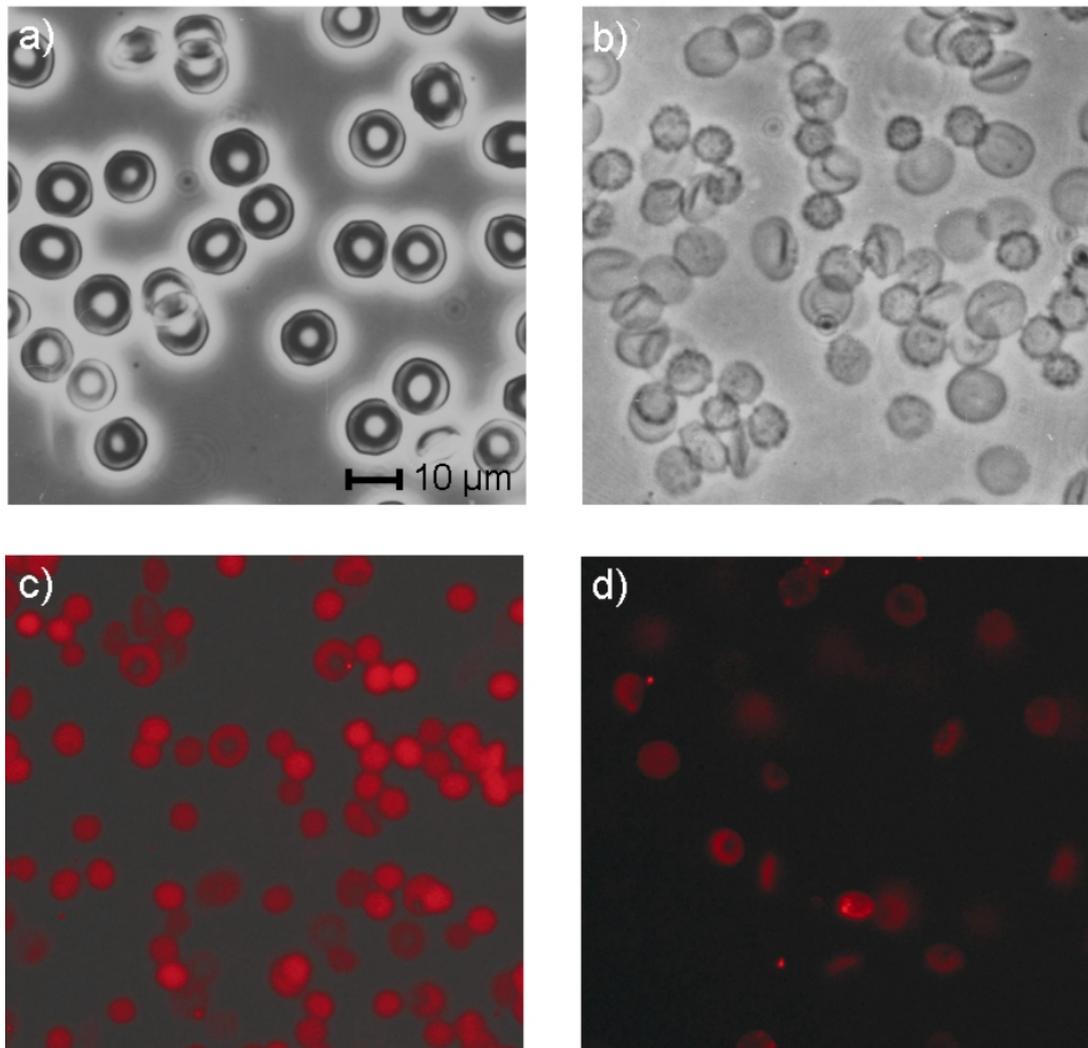


Abb. 6: Aufnahmen von a) Erythrozyten und b) Erythrozyten ghosts. c) Fluoreszenz-markierten ghosts: Erythrozytenmembranen wurden in Gegenwart von Cy 3.5-markiertem BSA „resealed“. Die resultierenden ghosts haben das fluoreszierende BSA in ihr Lumen aufgenommen. d) Erythrozytenmembranen wurden in PBS „resealed“, die fertigen ghosts wurden im Anschluss mit Cy 3.5-markiertem BSA inkubiert, um zu verfolgen in welchem Maße membrangebundenes Cy 3.5-BSA zur Gesamtfluoreszenz in c) beiträgt.

4.1.2 pH-Stabilität der ghosts

Die präparierten ghosts werden während der Translokationsexperimente über einen längeren Zeitraum großen pH-Unterschieden ausgesetzt, die sie intakt, d. h. unter Erhaltung ihrer Membranintegrität, überstehen müssen. Zur Kontrolle der pH-Stabilität der ghosts wurden Erythrozytenmembranen in Gegenwart von ^{125}I -markiertem BSA „resealed“. Nach ausgiebigem Waschen wurde die aufgenommene Radioaktivität gemessen.

Damit war die Möglichkeit der Proteinaufnahme über die gewählte Präparationsmethode gezeigt. Das eingeschleuste BSA (Mr ~ 70 kDa) stellt ein größeres Molekül als das für die weiteren Experimente einzuschleusende Synaptobrevin dar. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass im weiteren Verlauf der Arbeit die Präparation von Synaptobrevin-beladenen ghosts möglich war. Die ghosts wurden in PBS mit unterschiedlichem pH-Wert resuspendiert und bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Radioaktivität im Überstand und Pellet bestimmt.

Tab. 4: pH-Stabilität von ^{125}I -BSA-beladenen ghosts. Die ghosts wurden für die angegebenen Zeiträume bei RT in PBS mit den aufgeführten pH-Werten im Überkopfschüttler inkubiert. Die Werte geben die Menge Radioaktivität in Prozent bezogen auf den ursprünglichen Wert vor der Inkubation an. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SD (n=3).

pH-Wert	Radioaktivität [% des Ausgangswertes]	
	4 Stunden	20 Stunden
8.0	98.0 \pm 0.87	97.8 \pm 0.49
7.0	99.1 \pm 0.50	98.0 \pm 0.81
6.0	99.5 \pm 0.30	98.2 \pm 0.61
5.0	97.9 \pm 0.10	98.2 \pm 0.19

Die mit ^{125}I -BSA-beladenen ghosts zeigten im überprüften pH-Bereich und Zeitraum eine gute pH-Stabilität. Die Integrität der ghosts über die angegebenen Zeiträume, unter entsprechenden pH-Bedingungen, wurde zusätzlich über Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert (siehe Abb. 6).

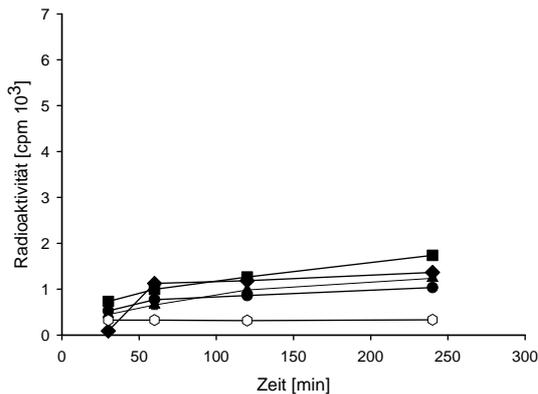
4.2 Translokation von ^{125}I -TeNT im ghost-Modell

Als Vorversuch sollte zunächst mit ^{125}I -markiertem nativen TeNT kontrolliert werden, ob es durch Nachstellung (Variation pH-Wert und/oder Ionengradient) der endosomalen Bedingungen im ghost-Modell zu Unterschieden in der Translokation von nativem ^{125}I -markiertem TeNT kommt. Hierzu wurde zunächst mit dem radioaktiv markierten, nativen Toxin gearbeitet, um die Translokation des Wildtyptoxins verfolgen zu können.

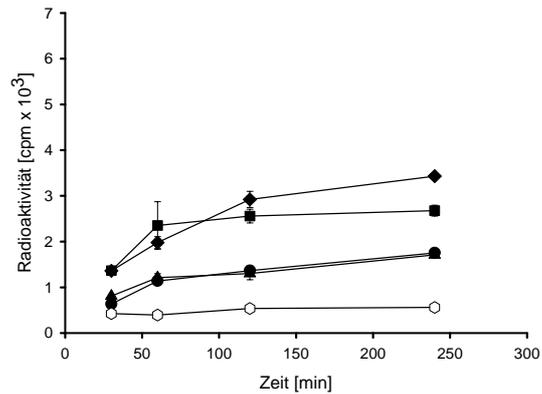
Ghosts wurden in Puffer A pH 7,5 (hohe Kaliumkonzentration) „resealed“ und anschließend bei verschiedenen Temperaturen und Pufferbedingungen (siehe Abb. 7) mit 500 nm ^{125}I -TeNT inkubiert. Nach 30, 60, 120 und 240 min wurden Proben genommen und die pelletierten ghosts nach mehrmaligem Waschen im γ -counter gezählt. Als Kon-

trolle wurden ghosts mit ^{125}I -markiertem BSA in Puffer B (niedrige Kaliumkonzentration) pH 5,0 bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

A 4°C



B Raumtemperatur



C 37°C

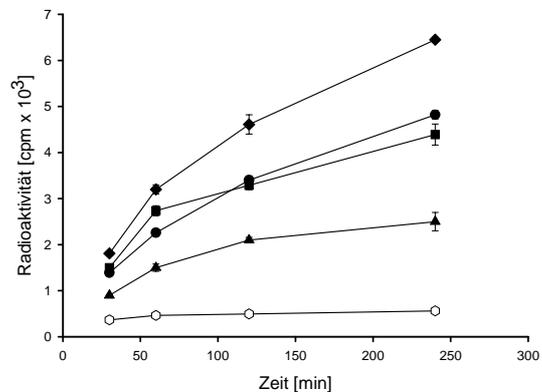
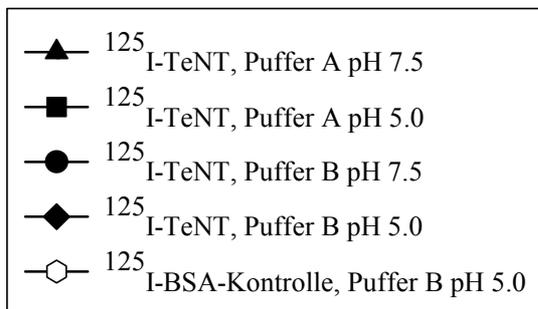


Abb. 7: Aufnahme von nativem ^{125}I -markiertem TeNT in ghosts in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und Kaliumgradienten. In Puffer A pH 7,5 "resealte" ghosts wurden bei den angegebenen Temperaturen unter verschiedenen Pufferbedingungen mit 500 nm ^{125}I -TeNT inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach 30, 60, 120 und 240 min. Nach mehrmaligem Waschen wurden die pelletierten ghosts im γ -counter gezählt. Puffer A: 161 mM KCl, 4 mM Hepes, 0,8 mM NaEDTA, 0,1 % BSA pH 7,5 und 5,0, Puffer B: 4 mM KCl, 157 mM TEACl, 4 mM Hepes, 0,8 mM NaEDTA, 0,1 % BSA pH 7,5 und 5,0. Mittelwert \pm SD (n = 3).

Es zeigte sich, dass der Prozess der ^{125}I -TeNT -Aufnahme temperaturabhängig ist. Im Gegensatz zur BSA Kontrolle, die bei allen drei Temperaturen gleichbleibend niedrig liegt, zeigte sich beim TeNT eine vermehrte Aufnahme durch die ghosts mit steigender Temperatur. Während bei 4°C die TeNT-Aufnahme weitgehend unabhängig von den

Pufferbedingungen ist, zeigte sich bei RT eine pH-Abhängigkeit der Aufnahme, die zunächst noch unabhängig vom Ionengradienten ist. Bei 37°C wird die pH- und Ionengradientenabhängigkeit der TeNT-Aufnahme durch die ghosts besonders deutlich. Während die Aufnahme von TeNT ohne pH- und Ionengradienten bei RT und 37°C annähernd gleich bleibt und die Kombination aus pH- und Ionengradienten zur stärksten Anreicherung führt (besonders bei 37°C), liegt die Anreicherung von TeNT in Abhängigkeit von pH-Gradienten oder Ionengradienten allein auf gleichem Niveau. Während die TeNT-Aufnahme bei 4°C und RT nach 4 h eine Sättigung erreicht, gilt dies bei 37°C nur für den Versuchsansatz ohne pH- und Ionengradienten.

Die Aufnahme von ^{125}I -TeNT in ghosts zeigt neben einer Temperaturabhängigkeit auch eine vom pH- und Ionengradienten über die ghost-Membran.

4.3 Inkorporation von Cy 3.5-markiertem BSA in ghosts während der Präparation

Für die fortführenden Experimente musste noch geklärt werden, ob es über die gewählte Präparation möglich war, Proteine in hinreichender Menge in das ghost-Lumen aufzunehmen. Außerdem sollte sicher sein, dass sich eingeschleustes Protein im ghost-Lumen befindet und nicht an die ghost-Membran angelagert vorliegt. Hierfür wurden die Erythrozytenmembranen nach der Hämolyse in der Gegenwart von Cy 3.5-markiertem BSA „resealed“. Wie in Abb. 6c zu sehen ist, fluoreszieren die entstehenden ghosts, was auf die Inkorporation des fluoreszenzmarkierten Proteins schließen lässt.

Um sicher zu gehen, dass es sich hierbei um tatsächlich aufgenommenes und nicht nur an Membranen gebundenes Protein handelt, wurde parallel folgender Ansatz gewählt: Erythrozytenmembranen wurden in PBS „resealed“. Die so präparierten ghosts wurden im Anschluss mit Cy 3.5-markiertem BSA inkubiert und dem Herstellungsprotokoll folgend gewaschen. In Abb. 6d ist zu erkennen, dass die Membranmarkierung über Cy 3.5-BSA nur in geringem Maß zur Gesamtfluoreszenz beiträgt.

Das in die ghosts inkorporierte Cy 3.5-BSA liegt zum großen Teil im Lumen vor.

4.4 Präparation von Synaptobrevin-beladenen ghosts

Bei dem zytosolischen Substrat von TeNT Synaptobrevin II oder auch VAMP II (vesicle attached membrane proteins) handelt es sich um ein ~ 20 kDa großes Protein, welches sich in der Zelle über eine Transmembrandomäne verankert, auf der Außenseite von transmitterhaltigen Vesikeln befindet und als Bestandteil des docking-fusion-Komplexes an der Exozytose der Transmitter beteiligt ist.

Für das aufgebaute Modellsystem ist es wichtig, dass sich das Substrat ausschließlich im ghost-Lumen befindet, so dass nur über die Membran gelangtes TeNT sein Substrat schneiden kann. Dafür wurde in dieser Arbeit Synaptobrevin ohne Transmembrandomäne (siehe unter 3.2.7.1.2) als Substrat verwendet. Ohne seinen Transmembrananker sollte sich Synaptobrevin II nicht in Membranen einlagern können. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es an der Außenseite der ghosts dem Toxin vor seiner Translokation durch die Membran zugänglich ist.

Für die Translokationsexperimente war es notwendig, ausreichend Synaptobrevin in das Lumen einer gut zu bearbeitenden Menge ghosts einzubringen. Dabei sollte später auch die Spaltung des Substrats über immunologische Detektion zu verfolgen sein. Hierzu musste zunächst die Substratmenge während der „reseal“-Bedingungen und später auch die unter Versuchsbedingungen eingesetzte Menge an Synaptobrevin-beladenen ghosts festgelegt werden.

200 µl Erythrozytenmembranen wurden in Gegenwart (siehe Abb. 8) von 25 (1), 12,5 (2), 6,25 (3) und 3,13 (4) µg Synaptobrevin in einem Gesamtvolumen von 720 µl Puffer A "resealed" (siehe auch 3.2.1.3.). Nach mehrmaligem Waschen wurden sie in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der gesamte Überstand abgenommen (ghost Lysat Überstand) und das Pellet in 200 µl Puffer A aufgenommen (ghost Membranen). Die Auswertung der aufgenommenen Synaptobrevinmenge erfolgte nach SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-blot und immunologischer Detektion (Abb. 8).

a)

Synaptobrevin Eichreihe [μg]					ghost Lysat Überstand				marker	ghost Membranen			
500	100	50	20	10	1	2	3	4	21kDa	1	2	3	4



b)

Ansatz	Synaptobrevin-beladene ghosts				Standard	Erythrozyten			
Zellen [μl]	10	20	20	30	Syb	10	20	20	30
LP [μl]	10	10	20	20	50 ng	10	10	20	20



Abb. 8: **Western-blot a) zur Bestimmung der benötigten Synaptobrevinkonzentration während des "resealens".** Synaptobrevin-Eichreihe und Synaptobrevin-beladene ghosts: Erythrozytenmembranen wurden in Gegenwart von 25 (1), 12,5 (2), 6,25 (3) und 3,13 (4) μg Synaptobrevin „resealed“. Nach mehrmaligem Waschen, der Zugabe von 200 μl Lysispuffer und anschließender Zentrifugation wurden Überstand und in 200 μl Puffer A resuspendiertes Pellet analysiert. SDS-PAGE mit jeweils 10 μl Probe, anschließender Western-blot und immunologischer Detektion. ECL, Expositionszeit 3 min. **b) Bestimmung der Menge an Synaptobrevin-beladenen ghosts, die ein Signal liefert, welches im Translokationsversuch einen Synaptobrevin-Verdau verfolgen lässt:** Verschiedene Mengen Synaptobrevin-beladener ghosts Bahn 1-4 (Synaptobrevinkonzentration während des Resealens 25 μg , siehe unter a) und Erythrozyten Bahn 6-9 wurden mit unterschiedlicher Menge Lysispuffer inkubiert, zentrifugiert und vom Überstand jeweils 15 μl über eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-blot und immunologischer Detektion analysiert. Syb = Synaptobrevin, LP = Lysis-Puffer, ECL, Expositionszeit 15 min.

Der Lysatüberstand des „reseal“-Ansatzes mit 25 μg Synaptobrevin zeigt ein deutliches Signal auf dem Western-blot (Abb. 8a), welches von der Intensität im Bereich der 50 ng-Bande der Synaptobrevin-Eichreihe liegt. Die Signalintensität der "reseal"-Ansätze mit 12,5 (2) bzw. 6,25 (3) und 3,13 (4) μg Synaptobrevin ist zu schwach, um einen späteren Synaptobrevinabbau quantitativ verfolgen zu können. Das schwache Synaptobrevin-Signal in der Pelletprobe (1) des 25 μg "reseal"-Ansatzes kann durch Überstandsreste entstanden sein, die durch eine zusätzliche Wäsche zu entfernen gewesen wären.

Im zweiten Schritt sollte die nötige Menge Synaptobrevin-beladener ghosts, die für die Translokationsexperimente eingesetzt werden sollte, festgelegt werden. Hierfür wurden verschiedene Mengen Synaptobrevin-beladener ghosts mit unterschiedlichen Mengen an Lysispuffer versetzt, inkubiert, zentrifugiert und die Überstände nach SDS-PAGE und Western-blot über immunologische Detektion auf Synaptobrevin untersucht (Abb. 8b).

In Abb. 8 b ist zu erkennen, dass der Ansatz, in dem 30 μ l Synaptobrevin ghosts mit 20 μ l Lysis-Puffer inkubiert worden sind, im Western-blot ein Signal liefert, das intensiv genug ist, einen späteren Verdau des Proteins verfolgen zu können.

4.5 Quantifizierung des Synaptobrevin-Verdaus in den Synaptobrevin-beladenen ghosts

Zuletzt musste noch ein „housekeeping-Protein“ zur Quantifizierung der Synaptobrevinspaltung festgelegt werden. Zur Auswahl standen die beiden Zytoskelettproteine Aktin und Spektrin, die im intakten Erythrozyten maßgeblich an der Aufrechterhaltung der charakteristischen Form verantwortlich sind. Da das Zytoskelett an der Erythrozytenmembran verankert ist, sollten sie auch in den zytosolfreien ghosts in ausreichender Menge vorhanden sein, um bei der Quantifizierung als konstante Größe genutzt werden zu können.

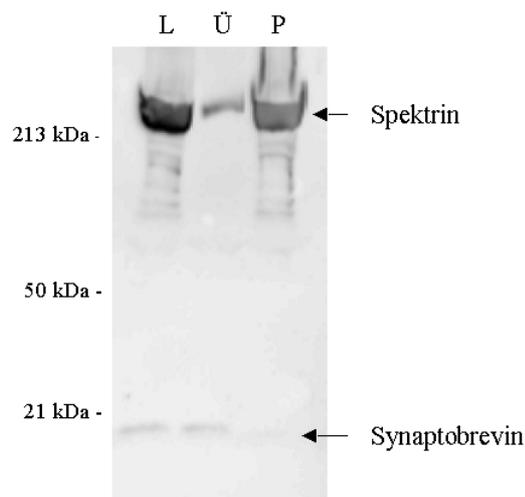


Abb. 9: Western-blot von Synaptobrevin-beladenen ghosts: 30 μ l Synaptobrevin-beladene ghosts wurden mit 20 μ l LP inkubiert. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l Lysat (L), Überstand (Ü) und in 50 μ l LP aufgenommenes Pellet (P). SDS PAGE (Gradientengel 7,5-15 %), die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Proteintransfer auf Höhe der 50 kDa Bande geteilt. Der obere Teil wurde gegen Spektrin und der untere Teil gegen Synaptobrevin immunologisch detektiert. ECL, Expositionszeit 3 min.

Auf dem oberen Teil des Western-blots (Abb. 9) ist im Lysat und im Pellet der ghosts ganz deutlich die Spektrinbande bei \sim 220 kDa (β -Spektrin) zu erkennen, auch im Überstand findet sich ein, wenn auch wesentlich schwächeres, Spektrinsignal. Zusätzlich ist im Lysat und im Überstand Synaptobrevin in detektierbarer Menge vorhanden.

Für die TeNT Translokationsversuche im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts wird die β -Spektrinbande als feste Größe zur Quantifizierung des Synaptobrevinverdaus genutzt.

4.6 Translokation von nativem TeNT im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts

Nachdem im ghost Modell die Rahmenbedingungen für die Translokationsversuche festgelegt waren, sollte zunächst der Synaptobrevin-Verdau nach erfolgter Translokation von nativem TeNT über die ghost-Membran untersucht werden.

Hierzu wurden Synaptobrevin-beladene ghosts mit 500 nm nativem TeNT unter den in 4.2 beschriebenen pH-Wert- und Ionengradientenbedingungen bei 37°C inkubiert und die zu den angegebenen Zeiten genommenen Proben über Western-blot analysiert.

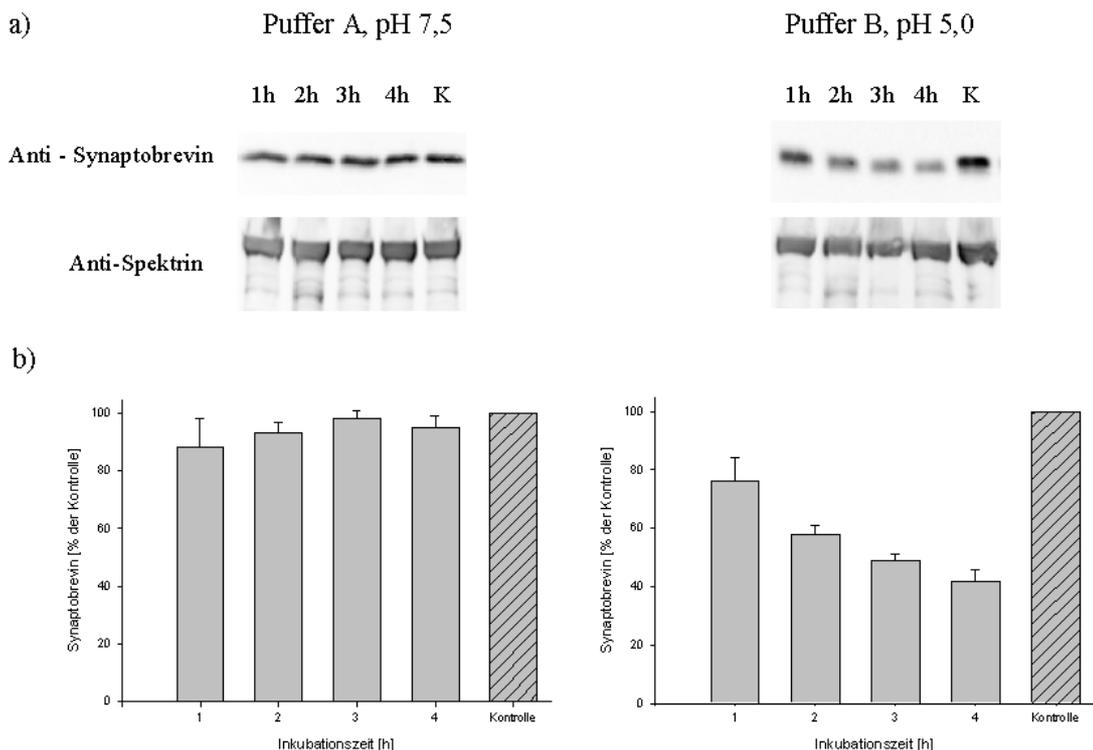


Abb. 10: Translokation von nativem TeNT im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts: Synaptobrevin-beladene ghosts wurden mit 500 nm nativem TeNT bei 37°C inkubiert. Nach 1, 2, 3 und 4 h wurden 30 μ l ghosts als Probe genommen, nach mehrmaligem Waschen mit LP versetzt und nach Zusatz von denaturierendem Probenpuffer analysiert. Als Kontrolle wurden Synaptobrevin-beladene ghosts ohne Toxinzusatz für 4 h mit Puffer B pH 5,0 bei 37°C inkubiert. **a)** Western-blot von Synaptobrevin-beladenen ghosts, immunologische Detektion von Synaptobrevin und Spektrin. ECL, Expositionszeit 3 min. **b)** graphische Darstellung des Synaptobrevin-Verdaus nach erfolgter Translokation von nativem TeNT. Mittelwert \pm SD (n = 3).

Im Western-blot (Abb. 10 a) für den Versuchsansatz mit Puffer B pH 5,0 ist deutlich eine Abnahme der Synaptobrevinkonzentration zu erkennen, während das Synaptobrevinsignal im Ansatz mit Puffer A pH 7,5 keine Änderung zeigt. Nach 4 h Inkubation mit pH- und Ionengradienten (Puffer B, pH 5,0) wurde fast 60 % des ursprünglich enthaltenen Synaptobrevins gespalten. Die Kontrolle belegt die Integrität der ghost Membran nach vierstündiger Inkubationszeit.

Im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts ist die Translokation von nativem TeNT über die Membran anhand des Synaptobrevin-Verdaus zu verfolgen.

4.7 Molekularbiologische Ergebnisse

4.7.1 Klonierungsstrategie

Zur Herstellung der unten beschriebenen Konstrukte wurde vom Klon pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q ausgegangen. Bei diesem Konstrukt handelt es sich um ein Plasmid, das TeNT mit einem C-terminalen His6-Tag und einer Doppelmutation (H234V und E237Q) im Bereich des Zinkbindungsmotivs des katalytischen Zentrums, die die proteolytische Aktivität der L-Kette vollständig aufhebt, kodiert. Die Sequenzen des Konstruktes lagen vor, so dass auf eine weitere Sequenzüberprüfung verzichtet werden konnte.

Ziel der Klonierungen war das Einfügen von Mutationen in die H_N-Domäne der schweren Kette (Translokationsdomäne), die unter folgenden Kriterien ausgewählt wurden:

- 1) Hoher Konservierungsgrad über die verschiedenen Serotypen der CNT hinweg
- 2) pH-Wert-abhängige Veränderung der Aminosäure im Bereich pH 5-7 (Protonierung, cis/trans Isomerisierung)
- 3) Aminosäure muss an der Oberfläche des Proteins (von außen zugänglich) liegen
- 4) Aminosäure darf nicht in helikalen Bereichen der Translokationsdomäne liegen und
- 5) Mögliche ionische Wechselwirkungen mit benachbarten Domänen.

Zunächst sollte am inaktiven Toxin überprüft werden, ob die Toxine mit den eingefügten Punktmutationen in *E. coli* mit zufriedenstellender Ausbeute hergestellt werden können, bevor die Translokationsdomäne in das Konstrukt pAR2-TeNTHis6 überführt wurde, in dem die leichte Kette in aktiver Form vorliegt. Häufig führt schon der Austausch von einzelnen Aminosäuren zu so grundlegenden strukturellen Veränderungen von Proteinen, dass sie nicht in löslicher Form gewonnen werden können. Da die Herstellung der Toxine mit aktiver leichter Kette aber unter S-2-Auflagen erfolgen muss, wurde zunächst der Weg über die inaktiven Toxine gewählt.

4.7.2 Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren

Wie unter 4.7.1 erwähnt, sollten Aminosäuren ausgetauscht werden, die durch Protonierung/Deprotonierung im pH-Bereich von 5-7 (Endosom-Zytosol) zu strukturellen Veränderungen in der Translokationsdomäne führen können. Dafür in Frage kommen einerseits Glutamat und Aspartat, welche bei neutralem pH-Wert in geladener Form vorliegen, den Bereich damit also hydrophil machen. Bei saurem pH-Wert kommt es zur Protonierung der Aminosäuren, die damit ungeladen, lipophiler und membranlöslicher werden und zur Translokation in die Endosomenmembran inserieren könnten. Andererseits können auch Proline über eine cis/trans Isomerie zu Konformationsänderungen in Proteinen, wie z. B. Diphtherie Toxin, führen (Gray Johnson *et al.* 1993). Viele biologisch wichtige Peptidsequenzen beinhalten Prolin, welches aufgrund seines einzigartigen strukturellen Zwanges auf die Peptidkette nicht nur strukturelle, sondern auch biologische Funktionen beeinflussen kann. Dazu kommt der sehr hohe Grad der Konserviertheit, wie er in vielen Proteinen und Peptiden wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, V3-loops des HIV-Hüllenglykoproteins gp 120 und neuro- und vasoaktiven Peptiden zu beobachten ist (Vanhoof *et al.* 1995).

Unter den oben genannten Gesichtspunkten wurde der Bereich der Translokationsdomäne von TeNT, in dem die von Lebeda *et al.* (1995) bestimmten amphiphatischen Segmente liegen, nach in Frage kommenden Aminosäuren durchsucht, wobei auch die Lage innerhalb der Tertiärstruktur (oberflächliche Lage) mit berücksichtigt wurde.

genannten Aminosäuren liegen am Ende der Loopstruktur, die die amphiphatischen Segmente I und II verbindet. Die unter (4) aufgeführten Aminosäuren sind am Anfang des amphiphatischen Segmentes IIIB lokalisiert. Bis auf Prolin 648 liegen alle ausgewählten Aminosäuren über sämtliche CNT hinweg konserviert vor.

4.7.3 Klonierung des TeNT Gens mit Mutationen im Genabschnitt der Translokationsdomäne

Die unter 4.7.2 aufgeführten Punktmutationen wurden über die im pAR4b-TeNTHis6-H234V E237Q vorhandenen *EcoR* V und *Sac* II-Schnittstellen in den Vektor einkloniert. Die Vorgehensweise wird exemplarisch an der Mutation von P (644) G erläutert (die weiteren Klonierungen sind in Tab. 3 zusammengefasst).

Zusammen mit der geänderten Sequenz für die Aminosäure 644 wurde über die Oligonukleotide (TeNT P644G Fw/Rv siehe 3.1.10) eine neue *Aat* II-Schnittstelle eingefügt. Mit pAR4b-TeNTHis6-H234V E237Q als Template, den weiteren Oligonukleotiden TM10 Fw (upstream) und 3HCTx1 Rv (downstream) wurde das Gen von Position 886 bis 4054 in zwei Fragmenten amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die Fragmente einem Restriktionsverdau mit *EcoR* V und *Aat* II (liefert Bereich 983-2055) und *Aat* II und *Sac* II (liefert Bereich 2055-3152) unterzogen. Die Vektor-DNA wurde mit *EcoR* V und *Sac* II geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Nach Extraktion der Fragmente aus einem präparativen Gel wurden der Akzeptorvektor und die beiden Inserts mit T-4-DNA-Ligase ligiert, in DH5 α -Zellen transformiert und über Nacht auf 2YT-Amp-Agarplatten angezogen. Von einzelnen Kolonien ausgehend wurde aus Übernachtskulturen DNA isoliert (Minipräp, QIAGEN) und durch Restriktionsverdau mit *Aat* II der richtige Klon identifiziert. Zusätzlich wurde die Punktmutation durch Sequenzierung kontrolliert.

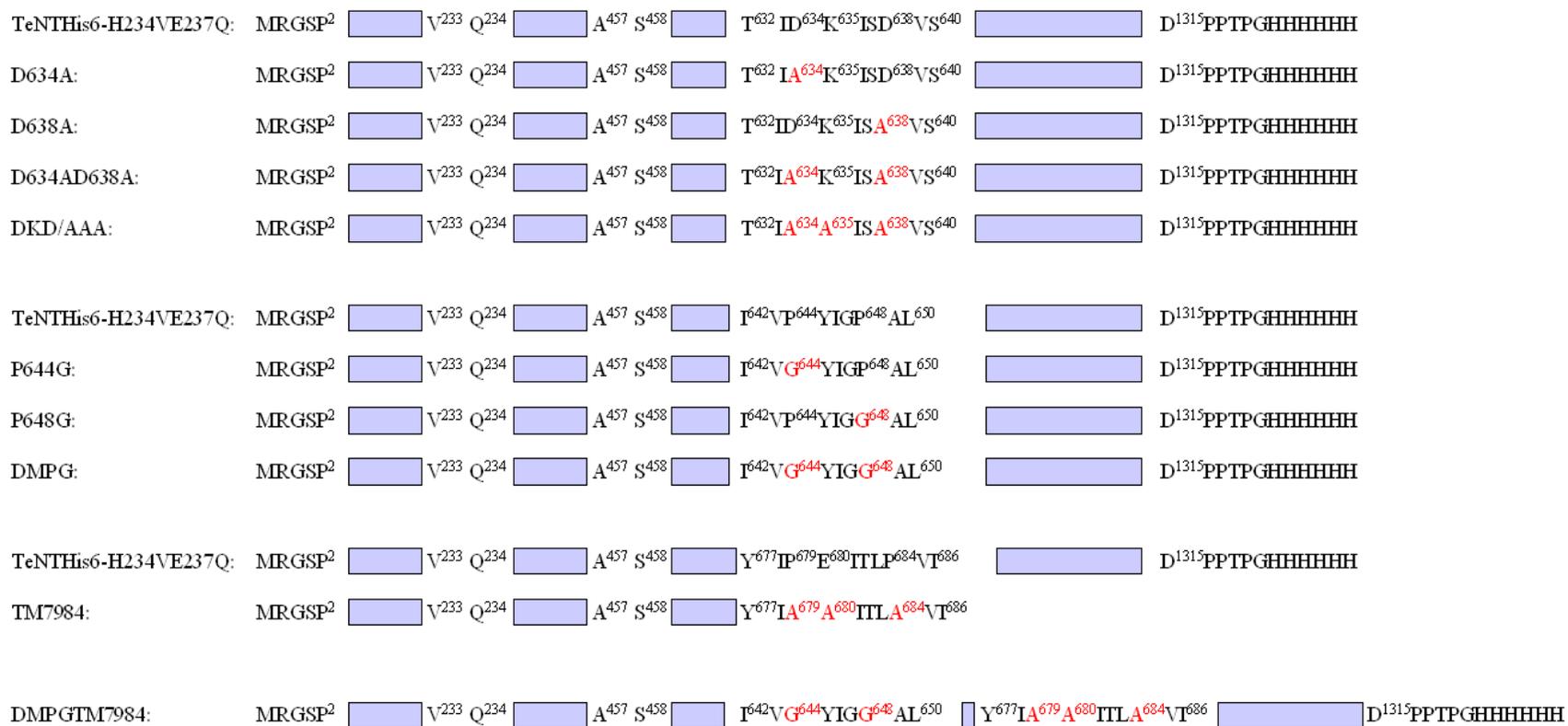


Abb. 12: Schematische Darstellung von TeNTHis6 H234V E237Q mit eingefügten Punktmutationen. Darstellung der Aminosäuresequenz als Balkendiagramm: Die relative Länge der Balken entspricht der Anzahl der in dem jeweiligen Fragment enthaltenen Aminosäuren. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code verwendet. Veränderte Aminosäuren wurden in rot hervorgehoben.

4.7.4 Umsetzen des Genabschnittes der Translokationsdomäne mit den darin lokalisierten Punktmutationen aus pJK1(a-j)-TeNTHis6 in pAR2-TeNTHis6

Nachdem die Toxine, mit Ausnahme von TeNTHis6 TM7984, von pJK1(a-j)-TeNTHis6 ausgehend (siehe unter 3.2.6, Tab. 3) in M15pRep4 Zellen erfolgreich hergestellt werden konnten (siehe Tab. 4), wurden die Translokationsdomänen über einen Restriktionsverdau mit *Hpa* I und *Sac* II in das Plasmid pAR2-TeNTHis6 überführt. Hierzu wurden sowohl pAR2-TeNTHis6 als Akzeptorvektor, als auch sämtliche pJK1(a-j)-TeNTHis6 – Translokationsdomänenmutanten mit *Hpa* I und *Sac* II geschnitten, der Akzeptorvektor anschließend dephosphoryliert und die entsprechenden Fragmente aus einem präparativen Gel extrahiert. Nach Ligation, Transformation und Kontrolle über Restriktionsverdau mit den Endonukleasen, die die neu generierten Schnittstellen verdauen, wurden richtige Klone identifiziert und durch Sequenzierung überprüft.

Es konnten 7 Klone hergestellt werden, die für volle Länge aktives TeNT codieren und die verschiedenen Punktmutationen in der Translokationsdomäne (siehe Abb. 12) als Einfach-, Doppel- und Dreifachmutation tragen.

4.8 Produktion von TeNT mit Mutationen in der Translokationsdomäne

Da die Herstellung von aktivem TeNT S-2 Sicherheitsbedingungen unterliegt (Genehmigung: AZ: 501g.40654/3/57/3), wurde zunächst am inaktiven Toxin untersucht, ob die eingefügten Mutationen Auswirkungen auf die Sekundär- oder Tertiärstruktur haben, die dazu führen, dass die entsprechenden Proteine nicht mehr in löslicher Form produziert werden können.

Hierfür wurden von pJK1(a-j)-TeNTHis6 ausgehend die TeNT mit den verschiedenen Mutationen in der Translokationsdomäne in M15pRep4 Zellen produziert (siehe unter 3.2.7.1.1). Die Aufreinigung erfolgte über den C-terminalen His6-Tag der Proteine und Ni-Agarose-Säulen. Die TeNT-haltigen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE ermittelt, gegen 100 mM Tris pH 8.0 dialysiert, aliquotiert und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

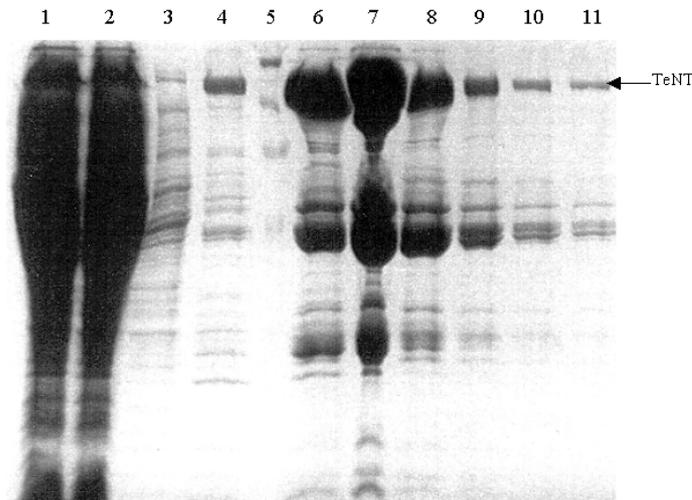


Abb. 13: Beispiel für die Aufreinigung und Aufkonzentrierung von rekombinatem TeNTHis6 mit der Dreifachmutation D634A K635A D638A in der Translokationsdomäne über den C-terminalen His6-Tag und Ni-Agarose. 10 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung, Bahn: 1 Lysat, 2 Durchfluss, 3 Waschflüssigkeit, 4 Waschflüssigkeit mit 20 mM Imidazol, 5 BR-marker, 6-11 Eluat 1-6. Aufgetragen wurden jeweils 7,5 µl Proteinlösung.

Bei der Analyse der einzelnen Fraktionen ist deutlich die Anreicherung von TeNTHis6 D634A K635A D638A zu erkennen. Die Verunreinigung von der Größe ca. 50 kDa konnte durch die anschließende Dialyse entfernt werden.

Tab. 5: Übersicht über die Menge an TeNTHis6 mit Mutationen in der Translokationsdomäne, die in M15pRep4 Zellen hergestellt werden konnte. Dargestellt sind die Ausbeuten bezogen auf 100 ml Bakterienkultur für pAR4b-TeNTHis6-H234VE237Q und pJK1(a-j)-TeNTHis6 (inaktives TeNT) und pAR2-TeNTHis6 und pJK2(a-g) TeNTHis6 (aktives TeNT).

Mutation in der Translokationsdomäne	TeNTHis6 (inaktiv) [µg Protein/100 ml Kultur]	TeNTHis6 (aktiv) [µg Protein/100 ml Kultur]
keine	53	274
D634A	17	70
D638A	46	100
D634AD638A	30	132
D634AK635AD638A	52	278
P644G	48	163
P648G	64	97
DMPG	55	178
TM7984	/	kein Expressionsversuch
DMPGTM7984	/	kein Expressionsversuch

Mit Ausnahme von TeNTHis6 TM7984 und TeNTHis6 DMPGTM7984 konnten alle TeNT-Mutanten in ausreichender Menge in der inaktiven Form hergestellt werden.

Nach erfolgreicher Proteinproduktion wurden die Genabschnitte für die Translokationsdomänen aller pJK1(a-g)-TeNTHis6-Klone mit Ausnahme von pJK1h-TeNTHis6 TM7984 und pJK1j-TeNTHis6 DMPGTM7984 in den Vektor pAR2-TeNTHis6 umgesetzt (siehe 4.7.4) und diese unter S-2 Bedingungen hergestellt (siehe Tab. 5).

4.8.1 "Nicking" und enzymatische Aktivität des (rekombinant hergestellten) aktiven TeNT

4.8.1.1 "Nicking" der rekombinant hergestellten aktiven TeNT

Die rekombinanten TeNTs einschließlich der Mutanten wurden in *E. coli* als aktive 150 kDa single-chain Moleküle mit einem C-terminalen His6-tag hergestellt. Zwischen L- und H-Kette clostridieller Neurotoxine befindet sich eine proteolytisch sensitive Region, die von zwei Cysteinen eingerahmt wird. Durch „nicking“ entsteht das aktive, durch eine Disulfidbrücke verbundene, di-chain Toxin. Das native TeNT wird von einer clostridiellen Protease in diesem Bereich gespalten. Für alle durchgeführten Experimente wurde zuvor mit an Agarose immobilisiertem Trypsin zwischen schwerer und leichter Kette proteolytisch gespaltenes TeNT eingesetzt.

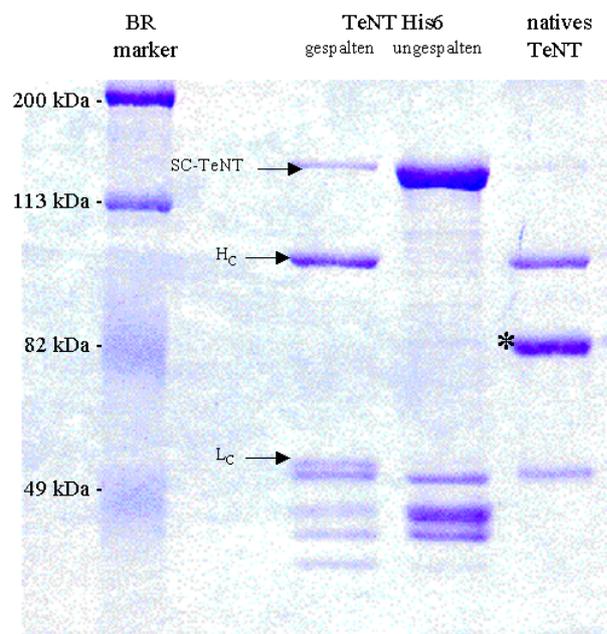


Abb. 14: Beispiel für die enzymatische Aktivierung von rekombinantem TeNTHis6 mit Trypsin. TeNTHis6 wurde mit 0,002 U/ μ g Toxin für 1 h bei 30°C inkubiert, das immobilisierte Trypsin abzentrifugiert und der Überstand anschließend in reduzierendem Probenauftragepuffer aufgenommen. 10 % SDS-PAGE, Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden 1 μ g natives TeNT und rekombinantes ungespaltenes TeNTHis6 und 0,5 μ g rekombinantes gespaltenes TeNTHis6, * das der Präparation von nativem TeNT zugesetzte BSA.

Das rekombinant hergestellte TeNTHis6 liegt nach einstündiger Inkubation mit der angegebenen Trypsinkonzentration zu 98 % in der di-chain Form vor. Unter diesen Bedingungen konnten nachfolgend alle rekombinanten TeNTHis6-Toxine in ihre di-chain Form überführt werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine korrekte Faltung der hergestellten Proteine hin. Die Exposition des Trypsin-sensitiven Spaltbereiches zwischen der leichten und schweren Kette wird durch die eingefügten Mutationen nicht verändert.

4.8.1.2 *In-vitro*-Aktivität von rekombinatem TeNT

Nachdem die rekombinanten, aktiven TeNTs in ihrer di-chain- Form vorlagen, sollte zunächst deren enzymatische Aktivität *in-vitro* kontrolliert werden, um evtl. die Toxinmenge für die verschiedenen Translokationsmodelle anzugleichen.

Hierzu wurde Synaptobrevin ohne Transmembrandomäne mit 250 nM nativem TeNT oder TeNTHis6 bei 37°C inkubiert, zu den angegebenen Zeiten Proben genommen und der Verdau des Synaptobrevins über eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-blot und immunologische Detektion verfolgt.

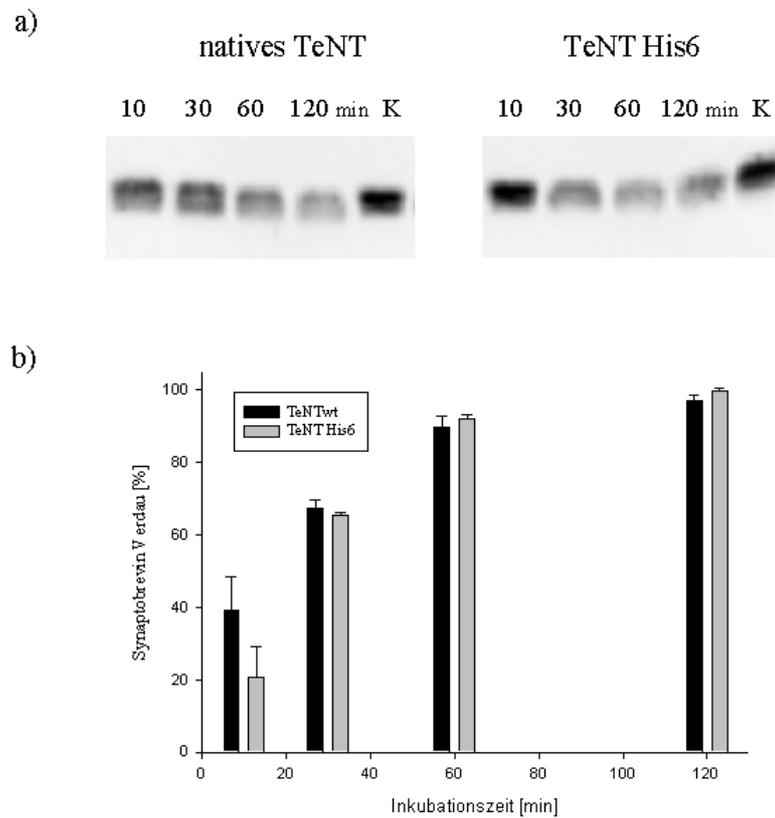


Abb. 15: *In-vitro* Aktivität von TeNTHis6 im Vergleich zu nativem TeNT: Synaptobrevin ohne Transmembrandomäne wurde mit 250 Mm a) nativem TeNT und TeNTHis6 bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Probennahme erfolgte nach 10, 30, 60 und 120 min. 15%ige SDS-PAGE Westernblot, ECL, Expositionszeit 3 min, 80 ng Synaptobrevin ohne Transmembrandomäne pro Bahn. b) graphische Darstellung der *in-vitro* Aktivität von nativem TeNT und TeNTHis6 in Vergleich. Mittelwerte \pm SD (n=3).

Die enzymatische *in-vitro* Aktivität des rekombinanten TeNTHis6 ist mit der des nativen TeNT zu vergleichen. Damit kann eine später bestimmte Wirkungsverzögerung in den verschiedenen Translokationsmodellen nicht auf eine verminderte enzymatische Aktivität der leichten Kette zurückgeführt werden.

4.9 Translokationsexperimente mit rekombinantem TeNT in verschiedenen Systemen

4.9.1 Translokation/Aktivität von TeNT-Mutanten im Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparat der Maus

Nachdem die rekombinant hergestellten TeNT *in-vitro* die gleiche Aktivität gezeigt haben wie das native TeNT, wurde die Translokation zunächst im Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparat der Maus untersucht. In diesem Modell kann allerdings nicht zwischen den einzelnen Schritten des Wirkungsmechanismus diskriminiert werden. Die gemessene Verlängerung der Paralysehalbwertszeit kann nicht nur durch verminderte Translokationsrate über die Endosomenmembran, sondern auch durch gestörte Rezeptorbindung und damit geringerer intrazellulärer Toxinkonzentration entstehen.

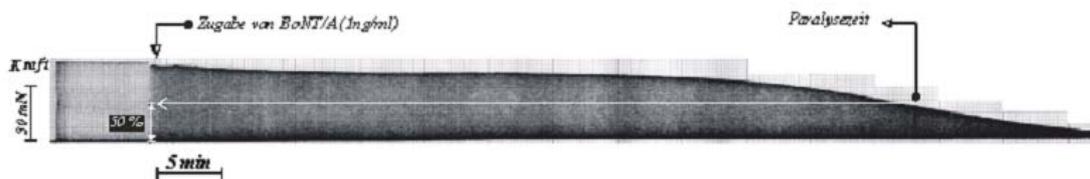


Abb. 16: Toxizitätstest am Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparat der Maus. Beispiel für die Messung der Aktivität von BoNT/A und Bestimmung der Paralysehalbwertszeit im Nervus phrenicus Modell.

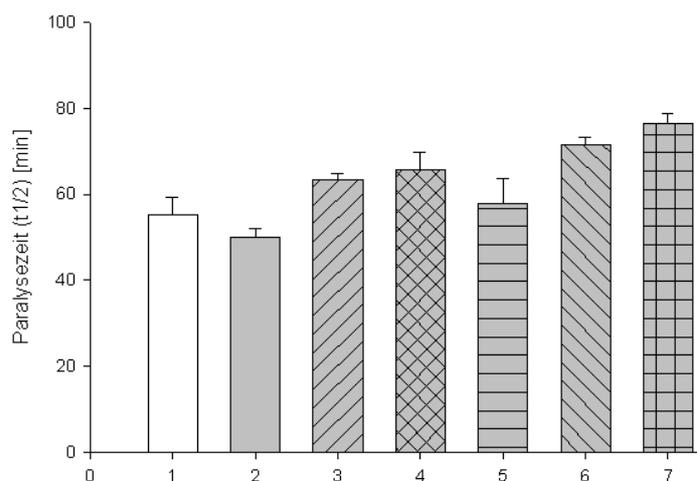


Abb. 17: Paralyse-Halbwertszeiten der rekombinanten TeNT am Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparaten der Maus. Zugewetzt wurden 1 μ l „genicktes“ Toxin/ml Badlösung. TeNTHis6 (1), TeNTHis6 P644G (2), TeNTHis6 P648G (3), TeNTHis6 DMPG (4), TeNTHis6 D634A (5), TeNTHis6 D638A (6) und TeNTHis6 D634A K635A D638A (7). Mittelwerte \pm SD (n=3).

Sämtliche TeNT mit Mutationen in der Translokationsdomäne sind im Nervus phrenicus Zwerchfell-Präparat aktiv. Die in der Translokationsdomäne ausgetauschten Aminosäuren verlängern die Paralyse-Halbwertzeit, wobei die Wirkungsverzögerung der Dreifachmutante TeNTHis6 D634A K635A D638A am deutlichsten ausgeprägt ist. Von dieser Dreifachmutation wurde zusätzlich eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen und mit TeNTHis6 verglichen.

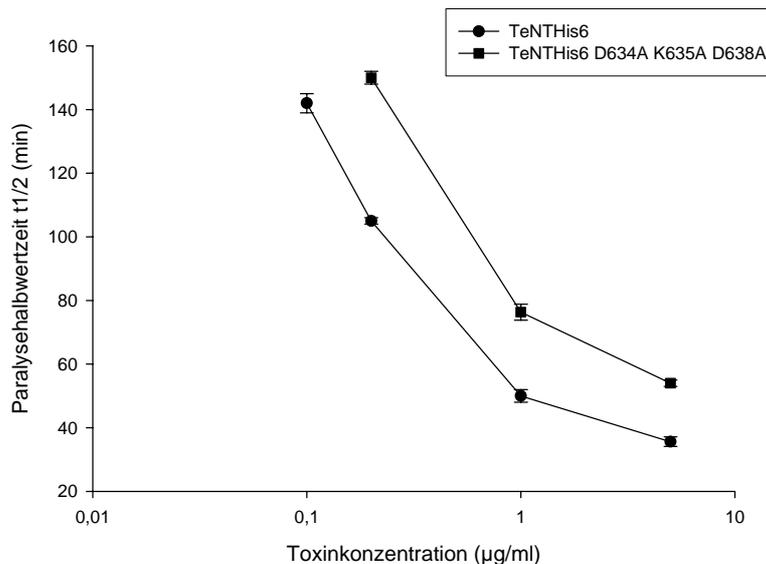


Abb. 18: Dosis-Wirkungs-Kurven von rekombinant hergestelltem TeNTHis6 und der Dreifachmutante TeNTHis6 D634A K635A D638A. Zugewetzt wurden 0,1 (nur bei TeNTHis6), 0,2, 1,0 und 5,0 μg „geknicktes“ Toxin/ml Badlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n=3$).

Die Wirkung der Dreifachmutante TeNTHis6 D634A K635A D638A ist um den Faktor 5 schwächer als die von TeNTHis6 (siehe Abb.18).

4.9.2 Translokation von rekombinantem TeNTHis6 und TeNTHis6 D634A K635A D638A im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts

Die Translokation dieser beiden rekombinant hergestellten TeNT sollte auch im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts untersucht werden. Die Versuchsbedingungen sind unter 4.2 beschrieben. Eingesetzt wurden jeweils 500 nmol rekombinantes TeNTHis6 und TeNTHis6 D634A K635A D638A, die Probennahme erfolgte nach 1, 2, 3 und 4 h. Die Auswertung durch immunologische Detektion erfolgte nach SDS-Gelelektrophorese und Western-blot. Als „housekeeping“-Protein zur Quantifizierung des Synaptobrevin-Verdau wurde Spektrin genutzt.

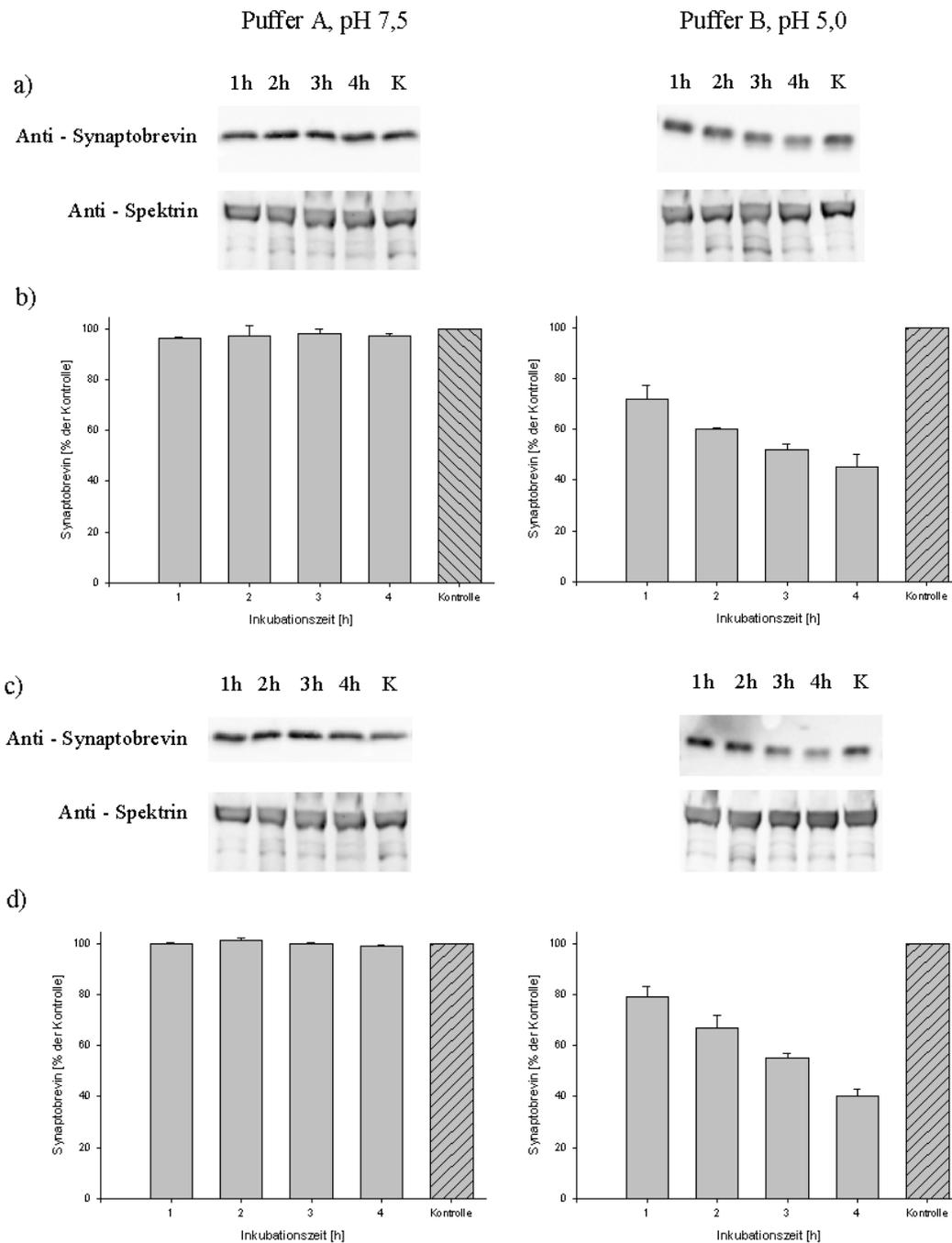


Abb. 19: Translokation von rekombinantem TeNT im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts:

Synaptobrevin-beladene ghosts wurden mit 500 nm rekombinant hergestelltem TeNTHis6 und TeNTHis6 D634A K635A D638A bei 37°C inkubiert. Nach 1, 2, 3 und 4 h wurden 30 µl ghosts als Probe genommen, nach mehrmaligem Waschen mit LP versetzt und nach Zusatz von denaturierendem Probenpuffer analysiert. Als Kontrolle wurden Synaptobrevin-beladene ghosts für 4 h mit Puffer B pH 5.0 bei 37°C inkubiert. **a)** Translokation von TeNTHis6: Western-blot von Synaptobrevin-beladenen ghosts, immunologische Detektion von Synaptobrevin und Spektrin. ECL, Expositionszeit 3 min. **b)** graphische Darstellung von a). Mittelwert ± SD (n = 3). **c)** Translokation von TeNTHis6 D634A K635A D638A: Western-blot von Synaptobrevin-beladenen ghosts, immunologische Detektion von Synaptobrevin und Spektrin. ECL, Expositionszeit 3 min. **d)** graphische Darstellung von b) Mittelwert ± SD (n = 3).

In dem Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts lässt sich die Translokation von TeNTHis6 unter den Bedingungen mit Ionen- und pH-Gradienten deutlich verfolgen (Abb. 19 a und b). Nach 3 h Inkubationszeit sind fast 50 % des Synaptobrevins gespalten. Der Kontrollversuch (Puffer A, pH 7,5) ohne jeglichen Gradienten zeigt über die gesamte Inkubationszeit hinweg konstante Synaptobrevinwerte, die nur wenig von der Kontrolle ohne TeNT abweichen. In diesem Modellsystem zeigt damit das rekombinante TeNTHis6 eine dem nativen TeNT vergleichbare Translokation und enzymatische Aktivität (siehe unter 4.6).

Abschließend sollte noch die Translokation von TeNTHis6 mit der Dreifachmutation D634A K635A D638A in der Translokationsdomäne, das im Nervus phrenicus Modell eine um den Faktor 5 verzögerte Wirkung gezeigt hatte, im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts untersucht werden.

Das TeNTHis6 mit der Dreifachmutation in der Translokationsdomäne zeigt eine dem TeNTHis6 vergleichbare Translokation (Abb. 19 c und d). Auch dieses Toxin hat nach 3 h Inkubation 50 % des Synaptobrevins gespalten. Die eingefügte Dreifachmutation hat keinen Einfluß auf den Rezeptor-unabhängigen Translokationsprozess des TeNT.

5 Diskussion

Die CNT, die spezifisch an neuronale Zellen binden, stellen die Gruppe der potentesten bekannten Gifte dar. Ihre letale Dosis für den Menschen liegt im Bereich von 1-2 ng/kg Körpergewicht. Dem entspricht eine Konzentration im femtomolaren Bereich in den Körperflüssigkeiten. Damit müssen alle Schritte (Bindung, Endozytose, Translokation, Reduktion und enzymatische Spaltung der Substrate) des Wirkungsmechanismus sehr spezifisch sein, damit es schließlich zur Unterbindung der Exozytose und der damit verbundenen Symptome kommt. Den Schritten, die zur Wirkung führen, können verschiedene Domänen in den CNT zugeordnet werden. Diese sind bisher zu unterschiedlichem Grad aufgeklärt:

- (1) Die enzymatische Wirkung der leichten Kette der CNT ist der bis heute am besten aufgeklärte Teil des Wirkungsmechanismus. Bei dem pharmakologisch wirksamen Teil der Toxine handelt es sich um eine Zink-abhängige Endopeptidase, die mit hoher Selektivität verschiedene Substrate der SNARE-Familie schneidet. Diese Proteine sind wichtige Komponenten des Vesikel-Membran-Fusions-Komplexes des neuronalen Exozytoseapparates (Wright *et al.* 1992, Schiavo *et al.* 1992, Montecucco *et al.* 1993, Lebeda *et al.* 1994, Li *et al.* 2000).
- (2) Für den Bindungsschritt, dessen hohe Spezifität dafür verantwortlich ist, dass die geringe Menge an Protein aus den Körperflüssigkeiten ausschließlich an den prä-synaptischen Membranen neuronaler Zellen bindet, ist der C-terminale Bereich der Rezeptorbindungsdomäne der schweren Kette verantwortlich. Diese Bindung findet in Regionen der Membran statt, die besonders reich an Cholesterol, Gangliosiden und Glykophosphoinositol (GPI)-verankerten Proteinen sind (Montecucco *et al.* 2004). Dabei fungieren ausschließlich in Neuronen vorkommende Polysialoganglioside als Angeln, die dafür sorgen, dass es an der präsynaptischen Membran zu einer Anreicherung der Toxine kommt. Dieser Teil der Bindung ist reversibel. TeNT bindet aufgrund von zwei vorhandenen Polysialogangliosid-Bindungsstellen innerhalb des C-terminalen Bereichs der schweren Kette mit höherer Affinität als BoNT/A und /B, die nur eine Polysialogangliosid-Bindungsstelle besitzen (Rummel *et al.* 2003). Nach der Anreicherung erfolgt die Bindung an einen Proteinrezeptor, die dann irreversibel ist. Für TeNT konnte das GPI-verankerte Glykoprotein Thy-1 (Herrerros *et al.* 2000, Herreros *et al.* 2001)

und für BoNT/B und /G konnten Synaptotagmin I und II (Dong *et al.* 2003, Rummel *et al.* 2004) als spezifische Rezeptoren für das H_C-Fragment der leichten Kette identifiziert werden. Dem N-terminalen Bereich der schweren Kette von TeNT, der eine Lectin-ähnliche Struktur aufweist, wird eine Rolle für den weiteren intrazellulären Weg der Toxine zugewiesen (Umland, *et al.* 1997, Lalli *et al.* 2003). Der dafür notwendige Interaktionspartner ist aber noch nicht identifiziert.

- (3) Der Schritt der Translokation, der zwischen den beiden vorher genannten liegt, ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Hierfür wird der N-terminale Teil der schweren Kette der CNT verantwortlich gemacht (Shone *et al.* 1987). Nach der Aufnahme der CNT durch Rezeptor-gekoppelte Endozytose gelangen sie in das endosomale Kompartiment. Hier kommt es zur Ansäuerung. Dieser Mechanismus wird von der Zelle genutzt, um Liganden von ihren Rezeptoren zu trennen (Futai *et al.* 2000). Man geht davon aus, dass es durch die Änderung des pH-Wertes zu einer Konformationsänderung in der Struktur der H_N-Domäne der schweren Kette kommt (Boquet *et al.* 1984), die dann eine Einlagerung dieses Teiles des Toxins in die Endosomenmembran ermöglicht, der die Translokation der leichten Kette in das Zytosol der Zelle folgt. Wie diese Translokationsstruktur der CNT aussieht, ist bis heute nicht geklärt.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines Modellsystems, mit dem der Translokationsschritt über die endosomale Membran gezielt untersucht werden kann. Die bisher hierzu durchgeführten Experimente wurden entweder an künstlich hergestellten Membranen wie Liposomen (Boquet und Duflot 1982, Roa und Boquet 1985b, Schmid *et al.* 1993) und planaren Lipiddoppelmembranen (Hoch *et al.* 1985, Montecucco und Schiavo 1986, Gambale und Montal 1988 und 1989), an Synaptosomen (Högy *et al.* 1992, Bade 2002) oder an Zellkulturen (chromaffine Zellen, Vero-Zellen, s. u.) durchgeführt. Dabei zeigt die Translokation im artifiziellen System eine große Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der Liposomen (Menestrina *et al.* 1989). In der Zellkultur kann nicht zwischen Bindungs- und Translokationsschritt diskriminiert werden. Die Endosomen können nicht synchronisiert und die Bedingungen auf den verschiedenen Seiten dieser Membran von außen schlecht kontrolliert werden. Deshalb wurden die Translokationsversuche an der Plasmamembran der Zellen durchgeführt, indem die Zellen einem sauren pH-Wert ausgesetzt wurden und die Translokation der Toxine direkt in das Zytosol untersucht wurde (Moskaug *et al.* 1989 und Khadje, 2003).

5.1 Erythrozyten ghosts als Modellsystem für Translokationsexperimente

Erythrozyten als Ausgangszellen für ein Modellsystem zur Translokation von CNT zu nutzen, bietet folgende Vorteile:

- (1) Sie sind ständig in gleichbleibender Qualität über die MHH-eigene Blutbank oder von freiwilligen Spendern zu beziehen.
- (2) Die daraus hergestellten ghosts sind in ihrem Membranaufbau gut charakterisiert (Tanner 1993, Low *et al.* 2002) und stellen im Gegensatz zu den artifiziellen Ansätzen (Monolayer, Liposomen) eine natürliche Membranstruktur dar.
- (3) Der Erythrozytenmembran fehlen die für die Bindung der CNT verantwortlichen Rezeptoren, so dass die Translokation ausschließlich über die Lipidschicht laufen kann.
- (4) Der intakte Erythrozyt besitzt keine endozytotische Aktivität, daher kann davon ausgegangen werden, dass es auch im ghost keine alternative Aufnahmemöglichkeit zur direkten Translokation über die Membran gibt.
- (5) In denen nach der Hämolyse zytosolfreien ghosts wird der Translokationsvorgang nicht durch andere metabolische Prozesse beeinflusst, wie es in Zellkulturen möglich ist.
- (6) Der Präparationsaufwand ist gering, die ghosts können sofort nach der Präparation für Versuche genutzt werden.
- (7) Für die ghosts kann die Zusammensetzung des Lumens frei gewählt werden, das Einschleusen von Proteinen während der Präparation ist möglich (siehe unter 4.4, Sprandel *et al.* 1979, Raap *et al.* 1981).
- (8) Die ghosts überstehen Inkubationen über einen weiten pH- und Temperaturbereich stabil, ohne ihre Membranintegrität zu verlieren (siehe unter 4.1.2).

Die aufgeführten Punkte machen das in dieser Arbeit aufgebaute Translokationsmodell zu einem einfach und ohne großen Zeitaufwand etablierbaren System, in dem über eine natürliche Membran ein pH- und Ionengradient aufgebaut werden kann. Damit können die heute für die Translokation der CNT aus dem endosomalen Kompartiment bekann-

ten Bedingungen nachgestellt und der Translokationsschritt in das Zytosol isoliert untersucht werden.

Zunächst konnte im ghost-Modell mit nativen ^{125}I -TeNT zusätzlich zur Abhängigkeit vom angelegten pH- und Ionengradienten eine Temperaturabhängigkeit der Toxinanreicherung nachgewiesen werden. Das steht im Einklang mit dem „fluid-mosaic-modell“ (Singer und Nicolson 1972, Vereb *et al.* 2003). Die Membranfluidität steigt u.a. mit zunehmender Temperatur, damit wird die Einlagerung von Proteinen in die Membran erleichtert. Da es sich hier für ^{125}I -TeNT um einen spezifischen Prozess handelt, wird durch das Kontrollexperiment mit ^{125}I -BSA deutlich, dass unspezifisch an die Membran bindet. Die Bindung von ^{125}I -BSA ist unabhängig von der Temperatur und den angelegten pH- und Ionengradienten.

Der Ionengradient über die endosomale Membran entsteht unter physiologischen Bedingungen durch die Regulation der Tätigkeit der vakuolären ATPase. Diese Protonenpumpe ermöglicht die Ansäuerung des endosomalen Lumens, indem sie Protonen einschleust. Im Gegenzug werden vor allem Kaliumionen über spezifische Kanäle in das Zytosol ausgeschleust (Grabe *et al.* 2001). Dadurch entsteht ein Kaliumgradient über die endosomale Membran (hohe Kaliumkonzentration (140 mM) im Zytosol, geringe im Endosom).

Betrachtet man die Anreicherung von ^{125}I -TeNT bei 37°C und unterschiedlichen Gradienten, zeigt sich, dass bei Einstellung der „endosomalen Bedingungen“ (pH 5,0 und geringe Kaliumkonzentration auf der Toxin-Seite, pH 7,5 und hohe Kaliumkonzentration im ghost-Lumen) die größte Menge an ^{125}I -TeNT eingeschleust wird (siehe Abb. 7 c).

Dies unterstreicht auch die Untersuchungen von Lazarovici und Yavin (1985a und b). Diese Autoren haben die Erythrozytenmembran als Modell für die Gangliosidanreicherung (GD_{1b} und GT_{1b}) in Membranen genutzt. Die Anreicherung der Ganglioside wurde über die spätere Bindung von ^{125}I -TeNT nachgewiesen. Dabei wurde beobachtet, dass die Menge des durch die mit Gangliosiden angereicherte Membran gebundene ^{125}I -TeNT pH-Wert abhängig war. Das pH-Optimum lag bei pH 5,0. Die Bindung von TeNT findet unter physiologischen Bedingungen bei neutralem pH-Wert statt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich ein Großteil des ^{125}I -TeNT bei pH 5,0 nach Konformationsänderung in die Erythrozytenmembran eingelagert hat und nicht ausschließlich Gangliosid-gebunden vorlag. Dafür spricht zusätzlich, dass ein Großteil des

ursprünglich gebundenen ^{125}I -TeNT auch nach mehrmaligem Waschen mit Lösungen hoher Ionenstärke irreversibel an die Erythrozytenmembran gebunden vorlag. Die Gangliosidbindung der CNT ist stark umgebungsabhängig und die größte Affinität liegt in Lösungen mit niedriger Ionenstärke vor (Bigalke *et al.* 1986, Critchley *et al.* 1986). Auch Lazarovici und Yavin schließen eine Toxin-Lipid-Interaktion, die unabhängig von der Gangliosid-Komponente ist, nicht aus. Außerdem konnte Thy-1, welches als Proteinrezeptorkomponente des Bindungsschrittes für TeNT identifiziert wurde, bis heute ausschließlich in Motoneuronen und neuronalen Zelllinien nachgewiesen werden (Herreros *et al.* 2000). Damit ist eine spezifische Toxin-Proteinrezeptor Interaktion für die Erythrozytenmembran eher unwahrscheinlich.

Mit diesem Versuchsansatz konnte aber nur die umgebungsabhängige Anreicherung des ^{125}I -TeNT in die ghost-Membran nachgewiesen werden. Es konnte davon ausgegangen werden, dass das Toxin in die Membran eingelagert vorliegt, da die Radioaktivität nach Lyse der ghosts zum größten Teil in der Pelletfraktion vorlag. Der Beweis der Translokation des Toxins durch die ghost-Membran musste noch erbracht werden.

Die Translokation im ghost-Modell sollte über die Spaltung von Synaptobrevin II, dem Substrat von TeNT belegt werden. Hierzu mussten die Bedingungen im Lumen der ghosts weiter an das zytosolische Milieu angepasst werden. Neben dem pH-Wert und der Ionenkonzentration musste auch eine reduzierende Umgebung (durch Zusatz von DTT) hergestellt werden. Im Zytosol der Zellen übernimmt das ubiquitär vorkommende Thioredoxin-Reduktase-System die Reduktion der Disulfidbrücke und damit die Trennung von leichter und schwerer Kette von TeNT, die dafür sorgt, dass das katalytische Zentrum für das Substrat zugänglich wird (Stecher *et al.* 1989, Kistner *et al.* 1993, Erdal *et al.* 1995, Cai *et al.* 1999). Synaptobrevin II konnte während des „reseal“-Vorgangs in ausreichender Menge in die ghosts eingeschleust werden (siehe unter 4.4). Durch Verwendung von Synaptobrevin II ohne seine Transmembrandomäne war sichergestellt, dass das Substrat des TeNT nur im Lumen der ghosts vorlag und nicht in die ghost-Membran eingelagert, dem Toxin schon vor der Translokation zugänglich war.

Wie unter 4.6 zu sehen ist, konnte die Translokation von nativem TeNT im ghost-Modell durch Spaltung von Synaptobrevin II über Western-blot nachgewiesen werden. Die Spaltung zeigt eine Zeitabhängigkeit und läuft nur unter den Bedingungen ab, die die physiologische Situation in der Zelle widerspiegeln: pH- und Ionengradient über eine Membran. Dabei führt der niedrige pH-Wert zur notwendigen Konformationsände-

rung insbesondere des N-terminalen Bereichs der schweren Kette, der für die Translokation des Toxins (bzw. der leichten Kette) ins Zytosol verantwortlich gemacht wird (siehe auch 5.2).

In dem aufgebauten Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts konnte erstmals der Translokationsschritt von TeNT über eine natürliche Membran unter den eingestellten, bekannten physiologischen Bedingungen durch die Spaltung von Synaptobrevin II gesondert betrachtet werden. Mit diesem Modellsystem sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die Translokationsdomäne von TeNT genauer untersucht werden.

5.2 Der Translokationsschritt im Wirkungsmechanismus der CNT

Wie für einige andere bakterielle AB-Toxine z. B. Diphtherie-Toxin (Kagan *et al.* 1981, Falmagne *et al.* 1982, Montecucco *et al.* 1985, Umata und Mekada 1998) schon nachgewiesen, wird für die Translokation der CNT eine pH-Wert-abhängige Konformationsänderung der Translokationsdomäne angenommen (Puhar *et al.* 2004). Mit dieser veränderten Struktur, in der hydrophobe Anteile des Moleküls exponiert werden, soll die Translokationsdomäne besser mit Membranen interagieren können. Für den Translokationsschritt der CNT werden drei Modelle diskutiert, in denen die bisherigen Erkenntnisse über die CNT in Anlehnung an besser untersuchte Translokationsmechanismen zusammengefasst werden.

In der ersten, als „Tunnel-Modell“ bezeichneten Hypothese, bildet die H_N -Domäne eine Pore. Durch diese hindurch überwindet die sich im sauren Milieu entfaltete leichte Kette die hydrophobe endosomale Membran. Im neutralen pH des Zytoplasmas faltet sich die leichte Kette nach Reduktion der Disulfidbrücke in ihre ursprüngliche Konformation zurück. Durch Strukturanalysen konnte für die CNT die Fähigkeit zur Porenbildung vorausgesagt werden (Montal *et al.* 1992, Lebeda und Olson 1995). Für die H_N -Domäne konnte die Interaktion mit Membranen gezeigt werden (Montecucco *et al.* 1988, Montecucco *et al.* 1989). Auch die Strukturänderung der leichten Kette bei saurem pH-Wert konnte durch spektroskopische Methoden nachgewiesen werden (Li und Singh 2000). Trotzdem lässt dieses Modell einige Fragen offen. Die von der H_N -Domäne gebildeten Poren besitzen eine Leitfähigkeit von nur wenigen Picosiemens (Donovan und Middlebrook 1986, Hoch *et al.* 1985, Hoch und Finkelstein 1985). Diese Werte sind zu niedrig für die Dimension eines Proteinkanals. Außerdem werden die leichten Ketten von TeNT, BoNT/A, /B und /E durch die von der H_N -Domäne gebildeten Pore nicht

vollständig gegen die Fettsäureanteile der Phospholipide abgeschirmt (Montecucco *et al.* 1986, Montecucco *et al.* 1989).

Auf dem „Tunnel-Modell“ aufbauend, wurde das „Lyse-Modell“ als zweite Hypothese formuliert (Beise *et al.* 1994). Die Toxin-haltigen Vesikel werden durch die vakuoläre ATPase angesäuert. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung des Toxinmoleküls ermöglicht seine Interaktion mit der Membran und daraus folgend die Ausbildung von Ionenkanälen. Die entstehende Änderung des elektrochemischen Gradienten führt zur osmotischen Lyse der Vesikel. Durch die Destabilisierung der Membran wird die leichte Kette in das Zytosol freigesetzt (Cabiaux *et al.* 1985).

In der dritten Hypothese, dem „Spalt-Modell“, bildet die H_N-Domäne einen hydrophilen Spalt lateral zu den Lipidanteilen der Membran (Montecucco *et al.* 1991, Montecucco *et al.* 1994). Durch diesen Spalt überwindet die sich bei saurem pH zum Teil entfaltete leichte Kette, die ihre hydrophoben Segmente zu den Lipidanteilen ausrichtet, die Membran. Nach Erreichen des Zytoplasmas mit neutralem pH und Reduktion faltet sich die leichte Kette zurück. Durch weitere Konformationsanpassung der H_N-Domäne an die hydrophobe Umgebung der Membran weitet sich der gebildete hydrophile Spalt wahrscheinlich zu einer Pore auf. Die in vielen Versuchen gemessene Kanalaktivität der CNT (Donovan und Middlebrook 1986, Blaustein *et al.* 1987) wäre dann Ausdruck eines leeren Zustandes des Kanals. Die Porenbildung ist in diesem Modell die Folge der Translokation der leichten Kette, nicht die Voraussetzung wie im „Tunnel-Modell“.

Für die Translokation von BoNT/A durch liposomale Membranen wird von Koriazova *et al.* (2003), auf einem kombinierten Nachweis von „Kanal-Spannungen“ und Substratspaltungen basierend, das Modell eines Membran-Chaperons vorgeschlagen. Dieses entspricht in seiner Funktion den bekannten spannungsabhängigen Translokationskanälen des ER, der Mitochondrien und der Chloroplasten. Die Chaperonaktivität der Translokationsdomäne wird durch den pH-Gradienten über die endosomale Membran reguliert. Es wird davon ausgegangen, dass es nicht nur zur Konformationsänderung der Translokationsdomäne der schweren Kette unter endosomalen Bedingungen kommt. Die leichte Kette entfaltet sich, diese Struktur wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der schweren Kette stabilisiert und bleibt in dieser Konformation während der Translokation über die Membran erhalten. Auf der zytosolischen Seite wird die leichte Kette nach erfolgter „Rückfaltung“ und Reduktion in das Zytosol entlassen. Diese Ent- und Rückfaltungs-Theorie wird durch CD-Messungen bei verschiedenen pH-Werten

unterstützt. Dabei stellte sich heraus, dass der α -helikale Anteil der schweren Kette bei pH-Wert -Erniedrigung konstant ist. Für die leichte Kette konnte aber eine deutliche Verringerung des helikalen Anteils bei pH 5,0 beobachtet werden. Die leichte Kette in dieser Konformation könnte dann durch einen Kanal mit dem inneren Durchmesser von 15 Å transportiert werden.

Über einen ähnlichen Translokationsmechanismus, für den das Protein Disulfid Isomerase als Membran-Chaperon unbedingt erforderlich ist, wird Cholera toxin aus dem ER ins Zytosol transportiert (Tsai *et al.* 2001). Für die Translokation der katalytisch aktiven Domäne von Diphtherietoxin aus dem Endosom ins Zytosol wurden das Chaperonin-Hitzeschockprotein 90 und die Thioredoxin Reduktase als Membran-Chaperon identifiziert (Ratts *et al.* 2003).

Unabhängig von der Struktur der leichten Kette ist die pH-abhängige Konformationsänderung der Translokationsdomäne Voraussetzung für die Interaktion mit der endosomalen Membran und damit für den Translokationsprozess. Aufgrund der hohen Konservierung innerhalb der H_N -Domäne der CNT wird davon ausgegangen, dass der Translokationsmechanismus innerhalb dieser Familie gleich ist.

5.3 Die Translokationsdomäne von TeNT

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten durch Einfügen von Punktmutationen im Bereich der Translokationsdomäne von TeNT Bereiche, die für den Translokationsprozess wichtig sind, lokalisiert werden. Für TeNT liegt bisher lediglich die Kristallstruktur des C-terminalen Bereiches der schweren Kette vor (Umland *et al.* 1997, Emsley *et al.* 2000, Fotinou *et al.* 2001). Deshalb wurde für die Planungen der in die Translokationsdomäne von TeNT einzufügenden Mutationen die Primärstruktur von TeNT auf die bekannte Kristallstruktur von BoNT A (Lacy *et al.* 1998) übertragen (siehe Abb. 20).

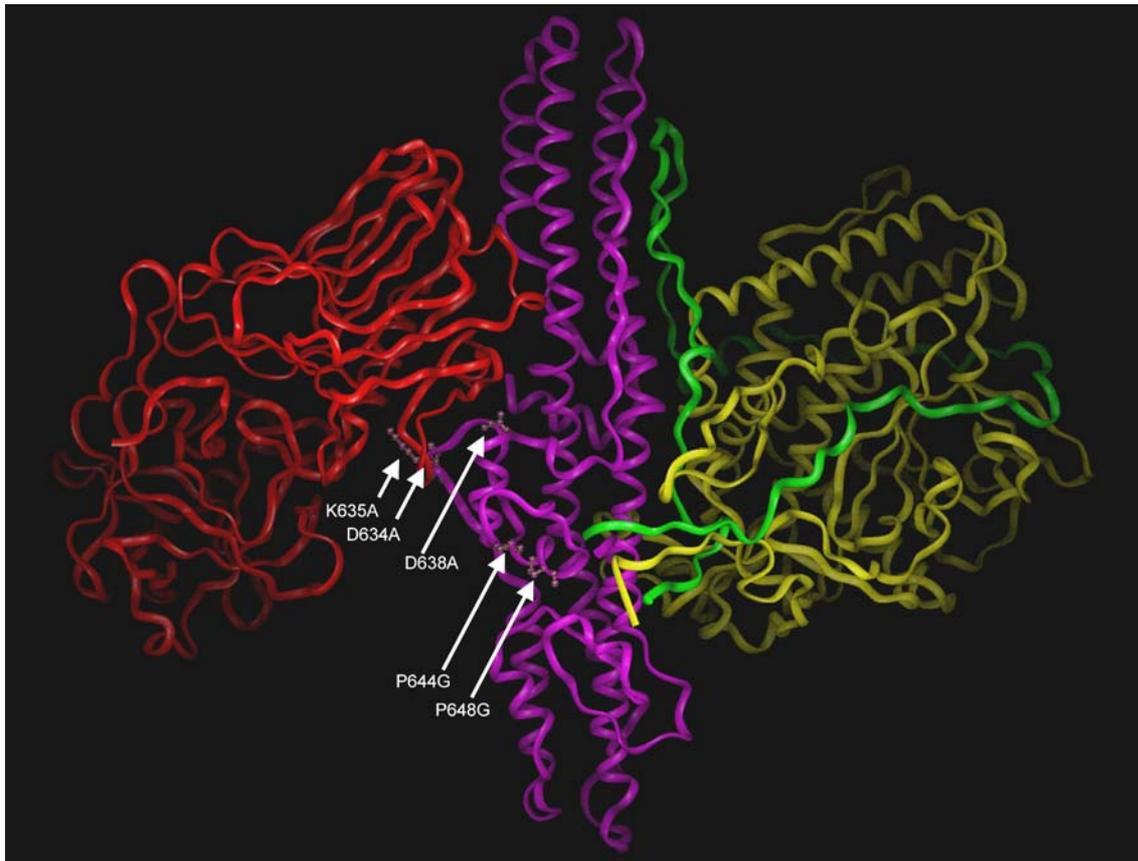


Abb 20: Kristallstruktur von Botulinumtoxin/A (Lacy *et al.* 1998). Die einzelnen Domänen sind farblich unterschiedlich hervorgehoben. Schwere Kette: Rezeptorbindungsdomäne (H_C -Domäne) rot, Translokationsdomäne (H_N -Domäne) violett, Gürtelregion grün. Leichte Kette: gelb. Die in die Translokationsdomäne von TeNT eingefügten Mutationen sind auf dieses Modell übertragen und hervorgehoben worden.

Betrachtet man die Kristallstruktur von BoNT/A (Abb. 20), so fällt im Bereich der violett gefärbten Translokationsdomäne besonders ein Paar sich überkreuzende α -Helices mit einer Länge von 105 Å und ein 54 Aminosäuren langer Gürtel, der die katalytische Domäne umschlingt, auf (Lacy *et al.* 1999). Vor diesen Helices liegt ein Bereich, der eine Loop-Struktur aufweist. Hier befinden sich die von Lebeda und Olsen (1995) über den MOMENT Algorithmus für hydrophobe Momente identifizierten amphiphatischen Segmente (Aminosäuren 595-614, 625-647 und 648-691, siehe auch Abb. 11). Innerhalb des dritten identifizierten amphiphatischen Segments (Aminosäuren 648-691) liegt ein Peptid (Aminosäuren 659-681), das in der Lage ist, Kanäle in planaren Lipiddoppelschichten zu bilden (Oblatt-Montal *et al.* 1995).

Die drei amphiphatischen Segmente bilden einen Teil eines von der Sequenz konservierten elektrostatischen Clusters. Durch „clustering“ der negativen Ladung kommt es

in diesem Bereich zur Anhebung des pK_a der dort lokalisierten Aminosäuren. Diese werden damit im endosomalen pH-Bereich protonierbar. Vergleicht man für BoNT/A die berechneten isoelektrischen Punkte (PI) des Gesamttoxins (6,0) mit denen der Bindungsdomäne (9,1) und der Translokationsdomäne (4,66) so kann die Translokationsdomäne als „pH-Wert sensibler Schalter“ fungieren. Betrachtet man die isoelektrischen Punkte der Translokationsdomäne genauer, so ist der niedrige PI auf die erste Hälfte der Domäne (Aminosäuren 548-685, bilden u.a. die amphiphatischen Segmente) und nicht die zweite Hälfte mit den beiden Helices (Aminosäuren 686-872, PI = 8,5) zurückzuführen.

Die in dieser Arbeit eingefügten Punktmutationen, die alle in der ersten Hälfte der Translokationsdomäne liegen, wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- a. Die Aminosäure darf nicht in den helikalen Bereichen der Translokationsdomäne liegen.
- b. pH-Wert-abhängige Veränderung der Aminosäure im Bereich pH 5-7 (Protonierung, cis/trans Isomerisierung).
- c. Hoher Konservierungsgrad über die verschiedenen Serotypen der CNT hinweg.
- d. Aminosäure muss an der Oberfläche des Proteins (für die Protonierung zugänglich) liegen.
- e. Mögliche ionische Wechselwirkungen mit benachbarten Domänen.

Der größte Teil der Mutationen wurde in der Region des zweiten, von Lebeda und Olsen (1995) identifizierten, amphiphatischen Segments eingefügt. Diese Region weist als einzige innerhalb der Translokationsdomäne und außerhalb der helikalen Bereiche eine hohe Sequenzhomologie (Aminosäuren 622-644) auf. Strukturell handelt es sich um einen großen Loop mit einer kleinen Helix. Der Loop zeigt von der Translokationsdomäne weg in Richtung Bindungsdomäne. Dieses Segment ist bisher noch nicht auf die Fähigkeit hin, Poren zu bilden, untersucht worden. In diesem Bereich wurden verschiedene Einzel-, Doppel- und Dreifachmutationen, (Aspartat 634 und 638 zu Alanin, Lysin 635 zu Alanin, Prolin 644 und 648 zu Glycin, siehe auch 4.7.2) eingefügt. Bis auf Prolin 648 liegen alle ausgewählten Aminosäuren über sämtliche CNT hinweg konserviert vor. Aspartat kann unter endosomalen Bedingungen protoniert werden und liegt damit in

ungeladener und somit lipophiler Form vor, die mit Membranen interagieren kann. Prolin kann aufgrund seines strukturellen Zwanges auf die Peptidkette eine besondere Rolle für die biologische Funktion von Proteinen zugewiesen werden. Durch eine cis/trans Isomerisierung kann es außerdem eine Konformationsänderungen in Proteinen auslösen (Gray Johnson *et al.* 1993).

Alle TeNT mit den im zweiten amphiphatischen Segment der Translokationsdomäne liegenden Mutationen (s.o.) konnten hergestellt werden. Die Aktivität der TeNT mit den eingefügten Mutationen in der Translokationsdomäne wurde zunächst an Zwerchfell-Präparaten der Maus überprüft und mit der des Wildtyps verglichen. Allein die Dreifachmutante TeNT D634A K635A D638A zeigte am Zwerchfell der Maus eine um den Faktor 5 schwächere Wirkung, alle anderen lagen im Bereich des TeNT Wildtyps (siehe Abb. 17 und 18). In diesem Modellsystem kann man zwischen den einzelnen Schritten nicht diskriminieren. Der gesonderte Translokationsschritt dieses Toxins wurde im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts (siehe Abb. 19) untersucht. In diesem System konnte für die Translokation von TeNT D634A K635A D638A kein Unterschied zum TeNT-Wildtyp festgestellt werden. Damit ist die im Zwerchfell-System gemessene Wirkungsabschwächung nicht auf die verzögerte Translokation, sondern wahrscheinlich auf eine gestörte Bindung des Toxins zurückzuführen. Durch die eingefügten Mutationen kann es zu Strukturveränderungen im TeNT kommen, die den Bindungsschritt des Toxins beeinflussen. Der Loop, in dem diese Aminosäuren ausgetauscht wurden, zeigt in Richtung der Bindungsdomäne. Durch die eingefügten Punktmutationen könnten Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen), die unter normalen Bedingungen vorhanden sind, nicht mehr ausgebildet werden und damit Auswirkungen auf die Rezeptorbindung des Toxins haben. Das Einfügen dieser Dreifachmutation in die H_N-Domäne von BoNT/D führt zu gleichen Ergebnissen (Bade 2002). In dieser Arbeit wurden zusätzlich CD-Analysen zur Sekundärstruktur des Toxins bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Annahme, dass die abgeschwächte Wirkung der Dreifachmutante auf eine gestörte Konformationsänderung bei saurem pH-Wert zurückzuführen ist, konnte durch zusätzliche Experimente widerlegt werden. Auch hier wird von einer abgeschwächten Wechselwirkung zwischen Translokations- und Bindungsdomäne als Grund für verminderte Toxizität im Zwerchfell-Modell ausgegangen.

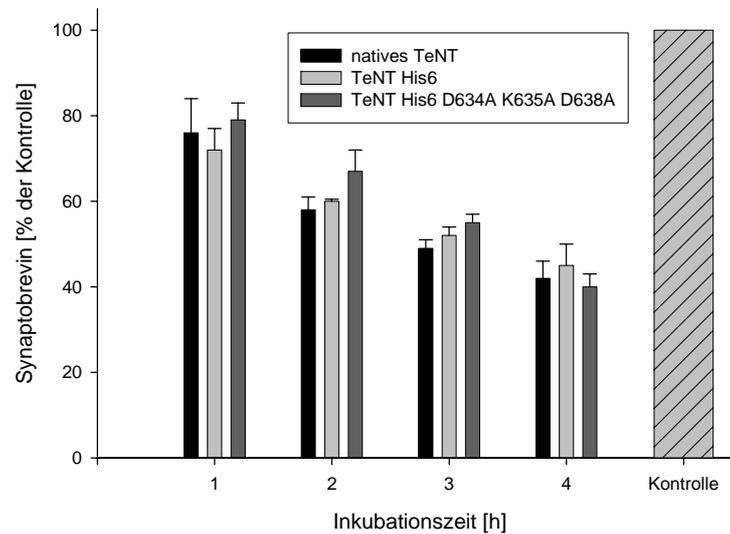


Abb. 21: Vergleich der Translokation von nativem TeNT, rekombinatem TeNTHis6 und TeNTHis6 D634A K635A D638A im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts. Dargestellt ist der Synaptobrevinverdau nach verschiedenen Inkubationszeiten im Vergleich zur Kontrolle (n = 3, \pm SD).

Innerhalb des dritten identifizierten amphiphatischen Segments (Aminosäuren 648-691) liegt ein Peptid (Aminosäuren 659-681), das in der Lage ist, Kanäle in planaren Lipid-doppelschichten zu bilden (Oblatt *et al.* 1995). In dieser Region wurde eine Dreifachmutation (Prolin 679, Glutamat 680 und Prolin 684 zu Alanin) eingefügt. Auch diese Aminosäuren liegen über alle Serotypen der CNT hinweg konserviert vor. Dieses Protein konnte nicht produziert werden. Wahrscheinlich waren die durch die Mutationen hervorgerufenen Strukturveränderungen zu groß. Dieser Bereich sollte in Zukunft durch Einfügen von Einzelmutationen genauer untersucht werden, da die bekannten Hinweise auf die Porenbildung auf eine wichtige Rolle für den Translokationsprozess deuten.

Die in dieser Arbeit in die Translokationsdomäne von TeNT eingefügten Punktmutationen beeinflussen den Translokationsschritt nicht, führen aber in einem Fall (TeNTHis6 D634A K635A D638A) zu einer Wirkungsabschwächung um den Faktor 5. Diese ist wahrscheinlich auf eine gestörte Bindung zurückzuführen, da auch die enzymatische Aktivität der rekombinant hergestellten TeNT der des nativen TeNT entspricht (siehe unter 4.8.1.2). Hauptauswahlkriterium für die eingefügten Mutationen war der funktionelle Aspekt der mutierten Aminosäuren, wie Änderungen des Protonierungszustandes bei pH-Wertabsenkung und cis/trans Isomerie. Zusätzlich wurde großen Wert eine hohe Struktur- und Sequenzkonservierung gelegt. Die Mutation vieler strikt konservierter

Aminosäuren zeigte keine Auswirkungen auf die Funktion des Proteins. Das lässt den Schluss zu, dass die hohe Konservierung innerhalb der H_N-Domäne vorwiegend der Faltung und Stabilität dient.

5.4 Vergleich der verschiedenen genutzten Translokationsmodelle

Im Folgenden werden die beiden in dieser Arbeit genutzten Translokationsmodelle miteinander verglichen:

Das Nervus phrenicus Modell ist für Untersuchungen des Translokationsschrittes der TeNT nur begrenzt geeignet, da zwischen den einzelnen Schritten des Wirkungsmechanismus nicht diskriminiert werden kann. Der Vorteil dieses Systems liegt in dem kurzen Zeitraum (1-2 h) nach dem die Ergebnisse vorliegen. Ein Nachteil darin, dass man für jeden Versuchsansatz das Zwerchfell einer Maus benötigt. Ein Großteil (fünf von sechs) der hergestellten TeNT mit veränderter Translokationsdomäne, deren Mutationen keine Auswirkung auf den Translokationsprozess hatte, konnte schon in diesem Modellsystem identifiziert werden. Das TeNT mit der Mutation D634A K635A D638A in der Translokationsdomäne zeigte in diesem System eine um den Faktor 5 abgeschwächte Wirkung.

Im Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts konnte festgestellt werden, dass für die Wirkungsabschwächung des TeNT mit der Dreifachmutation in der Translokationsdomäne nicht der Translokationsschritt verantwortlich ist. Im Vergleich zum Nervus phrenicus Modell handelt es sich um ein artifizielles System, welches im Gegensatz zu anderen Modellen (z. B. Liposomen) aber aus natürlichen Membranen aufgebaut ist. Hier wird die Translokation an der ehemaligen Plasmamembran der Erythrozyten untersucht. Die endosomale Membran der TeNT-haltigen Vesikel, die durch Rezeptor-gekoppelte Endozytose aufgenommen werden, entspricht in ihrer Zusammensetzung letztendlich auch der der Plasmamembran. Der Translokationsschritt kann isoliert untersucht werden. Die Bedingungen im Lumen der ghosts lassen sich während ihrer Präparation beliebig einstellen und die ghosts überstehen auch Inkubationen mit pH-Wert- und Ionengradienten unter Erhaltung ihrer Membranintegrität. Das ermöglicht im Modell eine große Variationsbreite und im Vergleich zu Modellen mit Zellkulturen (z. B. chromaffinen Zellen) überhaupt erst die Kontrolle über beide Seiten der Membran, ohne zusätzliche, unkontrollierbare metabolische Einflüsse auf der zytosolischen Seite des Systems. Durch die Aufnahme von Synaptobrevin II in das Lumen der ghosts während der Präpa-

ration konnte die Translokation des Toxins zeitabhängig verfolgt werden. Der Zeitaufwand liegt zwischen dem des Nervus phrenicus Modells (1-2 h) und dem der Zellkultur (1-2 Wochen): Präparation, Versuch und immunologische Detektion innerhalb von zwei Tagen. Große Vorteile liegen in der einfachen Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials, der einfachen Präparation und der empfindlichen Detektionsmöglichkeit mittels Western-blot .

6 Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell mit Synaptobrevin-beladenen ghosts kann für Untersuchungen von Translokationsvorgängen vom endosomalen Kompartiment in das Zytosol genutzt werden. Durch Aufnahme der anderen am Vesikel-Fusions-Komplex beteiligten Proteine der SNARE-Familie während der Präparation (diese können aufgrund ihrer Größe problemlos eingeschleust werden), könnte damit die Translokation der anderen CNT verfolgt werden. Dieses Modell kann außerdem für die Betrachtung anderer Translokationsprozesse herangezogen werden, da durch Anpassung der Bedingungen während der Präparation und der Versuche beliebige Kompartimentübergänge dargestellt werden können.

Durch Einfügen von Punktmutationen innerhalb der Translokationsdomäne von TeNT konnten einige, in dem von Lebeda und Olsen (1995) indentifizierten zweiten amphiphatischen Segmenten liegenden, Aminosäuren, die über sämtliche Serotypen konserviert vorliegen und die durch Protonierung oder pH-Wert-abhängige cis/trans Isomerisierung als Schlüssel für die Konformationsänderung im endosomalen Kompartiment in Frage kämen, als für den Translokationsprozess nicht relevant identifiziert werden. Die in dieser Arbeit eingefügte Dreifachmutation im dritten amphiphatischen Segment führte zu grundlegenden Strukturveränderungen im TeNT, so dass dieses nicht produziert werden konnte. Da sie in dem Bereich des Peptides liegt, für das Oblatt *et al.* (1995) eine Porenbildung in planaren Lipiddoppelschichten beobachtet haben, sollte dieser in Zukunft auf jeden Fall über Einfügen von Einzelmutationen genauer untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

Ahnert-Hilger, G. and Bigalke H. (1995) Molecular Aspects Of Tetanus And Botulinum Neurotoxin Poisoning. Progress in Neurobiol. 46, 83-96

Bade, S. (2002) Untersuchung des Translokationsmechanismus clostridieller Neurotoxine und ihrer potentiellen Nutzung als Proteintransporter. Diss. Technische Universität Hannover

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 (1), 66-73

Bergey, G. K., Habig, W. H., Bennett, J. I., and Lin C, S. (1989) Proteolytic cleavage of tetanus toxin increases activity. J. Neurochem. 53 (1), 155-161

Bigalke, H., Heller, I., Bizzini, B., and Habermann, E. (1981) Tetanus toxin and botulinum A toxin inhibit release and uptake of various transmitters, as studied with particulate preparations from rat brain and spinal cord. Naunyn Schiedeberg's Arch Pharmacol 316

Bigalke, H., Bergey, G. K., and Nelson, P. G. (1983) Inhibition of synaptic transmission by tetanus toxin in cultured mammalian spinal cord neurons. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 322

Bigalke, H., Muller, H., and Dreyer, F. (1986) Botulinum A neurotoxin unlike tetanus toxin acts via a neuroaminidase sensitive structure. Toxicon 24(11-12), 1065-1074

Binz, T., Kurazono, H., Wille, M., Frevert, J., Wernars, K., and Niemann, H. (1990) The Complete Sequence of Botulinum Neurotoxin Type A and Comparison with Other Clostridial Neurotoxins. J. Biol. Chem. 256 (16), 9153-9158

Birnboim, H. C. and Dolly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523

Bjerrum, O. J. and Schafer-Nielson, C. (1986) Analytical Electrophoresis. Weinheim: M. J. Dunn

- 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 neurotoxin forms channels in planar phospholipid bilayers. *FEBS Letters* 226 (1), 115-120
- Bodemann, H. and Passow, H.** (1972) Factors Controlling the Resealing of the Membrane of Human Erythrocyte Ghosts after Hypotonic Hemolysis. *J. Membrane Biol.* 8, 1-26
- Boquet, P. and Duflot, E.** (1982) Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 (24), 7614-7618
- Boquet, P., Duflot, E., and Hauttecoeur, B.** (1984) Low pH induces a hydrophobic domain in the tetanus toxin molecule. *Eur. J. Biochem.* 144, 339-344
- Bülbring, E.** (1946) Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 1, 38-61
- Burgen, A. S. V., Dickens, F., and Zatman, L. J.** (1949) The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 109, 10-24
- Cabiaux, V., Lorge, P., VandenBranden, M., Falmange, P., and Ruyschaert, J. M.** (1985) Tetanus toxin induces fusion and aggregation of lipid vesicles containing phosphatidylinositol at low pH. *Biochem Biophys Res Comm* 128 (2), 840-849
- Cai, S., Sarkar, H. K., and Singh, B. R.** (1999) Enhancement of the Endopeptidase Activity of Botulinum Neurotoxin by Its Associated Proteins and Dithiothreitol. *Biochemistry* 38, 6903-6910
- Chapman, E. R., Hanson, P. I., An, S., and Jahn, R.** (1995) Ca^{2+} regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J. Biol. Chem.* 270 (40), 23667-23671
- Chhatwal, G. S., Hessler, H. J., and Habermann, E.** (1983) The action of Palytoxin on Erythrocytes and Resealed Ghosts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 323, 261-268
- Critchley, D. R., Habig, W. H., and Fishman, P. H.** (1986) Reevaluation of the role of gangliosides as receptors for tetanus toxin. *J. Neurochem.* 47 (1), 213-222

- Curtis, D. R. and DeGroat, W. C.** (1968) Tetanus toxin and spinal inhibition. *Brain Res* 10 (2), 208-212
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D.** (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6 (1), 23-28
- Dale, G. L., Villacorte, D. G., and Beutler, E.** (1977) High-Yield Entrapment of Proteins into Erythrocytes. *Biochemical Medicine* 18, 220-225
- Dalla Serra, M., Pederzoli, C., and Menestrina, G.** (1992) A fluorimetric assay for the effects of cytolytic toxins on the transport properties of resealed erythrocyte ghosts. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 25, 83-94
- DasGupta, B. R. and Sugiyama, H.** (1977) Biochemistry and pharmacology of botulinum and tetanus neurotoxins. In: *Perspectives in Toxicology* (Bernheimer A.W., Hrsg) Wiley, New York, 87-119
- DeLoach, J. R.** (1983) Encapsulation of Exogeneous Agents in Erythrocytes and the Circulating Survival of Carrier Erythrocytes. *J. appl. Biochem.* 5 (3), 149-157
- Denislic, M., Pirtosek, Z., Vodusek, D. B., Zidar, J., and Meh, D.** (1994) Botulinum toxin in the treatment of neurological disorders. *Ann N Y Acad Sci* 710, 76-87
- Dong, M., Richards, D. A., Goodnough, M. C., Tepp, W. H., Johnson, E. A. and Chapman, E. R.** (2003) Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol*, 162 (7), 1293-1303
- Donovan, J. J. and Middlebrook, J. L.** (1986) Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes. *Biochemistry* 25 (10), 2872-2876
- Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R., and Jahn, R.** (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBOJ* 14 (2), 224-231
- Eisel, U., Jarasch, W., Goretzki, K., Henschen, A., Engels, J., Weller, U., Hudel, M., Habermann, E., and Niemann, H.** (1986) Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.* 5 (10), 2495-2502

- Eisel, U., Reynolds, K., Riddick, M., Zimmer, A., Niemann, H., and Zimmer, A.** (1993) Tetanus toxin light chain expression in Sertoli cells of transgenic mice causes alterations of the actin cytoskeleton and disrupts spermatogenesis. *EMBO J.* 12 (9), 3365-3372
- Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E., and Isaacs, N. W.** (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J. Biol. Chem.* 275 (12), 8889-8894
- Erdal, E., Bartels, F., Binscheck, T., Erdmann, G., Frevert, J., Kistner, A., Weller, U., Wever, J., and Bigalke, H.** (1995) Processing of tetanus and botulinum A neurotoxin in isolated chromaffin cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351 (1), 67-78
- Fairwether, N. F. and Lyness, V. A.** (1986) The complete nucleotide sequence of tetanus toxin. *Nucleic Acids Res.* 14 (19), 7809-7812
- Falmagne, P., Capiou, C., Zanen, J., Kayser, G., and Ruyschaert, J. M.** (1982) Structure-Activity Relationships Of The B Fragment Of Diphtheria Toxin: The Lipid-Binding Domains. *Toxicon* 20 (1), 243-246
- Fernandez-Rivera-Rio, L. and Rocio Gonzalez-Garcia, M.** (1985) The Human Erythrocyte Ghost: A New Experimental Model For Studying Adenosine Transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240 (1), 246-256
- Foran, P., Lawrence, G. W., Shone, C. C., Foster, K. A., and Dolly, J. O.** (1996) Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. *Biochemistry* 35 (8), 2630-2636
- Fotinou, C., Emsley, P., Black, I., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., Sinha, K. A., Fairweather, N. F., and Isaacs, N. W.** (2001) The crystal structure of tetanus toxin HC fragment complexed with a synthetic GT 1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. *J. Biol. Chem.* 276 (34), 32274-32281

- Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E., and Oguma, K.** (1997) The haemagglutinin of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology* 143, 3841-3847
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Nomura, T., Sasaki, J., Marvaud, J. C., Popoff, M. R., Kozaki, S., and Oguma, K.** (2000) Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS letters* 467, 179-183
- Futai, M., Oka, T., Sun-Wada, G. H., Moriyama, Y., Kanazawa, H., and Wada, Y.** (2000) Luminal Acidification Of Diverse Organelles By V-ATPase In Animal Cells. *J. Exp. Biol.* 203, 107-116
- Gambale, F. and Montal, M.** (1987) Tetanus toxin forms transmembrane channels in lipid bilayers at neutral pH. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13, 96
- Gambale, F. and Montal, M.** (1988) Characterization Of The Channel Properties Of Tetanus Toxin In Planar Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 53 (5), 771-783
- Gouaux, E.** (1997) Channel-forming toxins: tales of transformation. *Curr Opin Struct Biol* 7 (4), 566-573
- Grabe, M. and Oster, G.** (2001) Regulation of Organelle Acidity. *J. Gen. Physiol.* 117, 329-343
- Gray Johnson, V., Nicholls, P. J., Habig, W. H., and Youle, R. J.** (1993), The Role of Proline 345 in Diphtheria Toxin Translocation. *J. of Biol. Chem.* 268 (5), 3514-3519
- Halpern, J. L. and Neale, E. A.** (1995) Neurospecific binding, internalisation, and retrograde axonal transport. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 195, 221-241
- Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C., and Schiavo, G.** (2000) Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J. Neurochem.* 74 (5), 1941-1950

Herreros, J., Ng, T., and Schiavo, G. (2001) Lipid Rafts Act as Specialised Domains for Tetanus Toxin Binding and Internalization into Neurons. *Mol. Biol. Cell* 12, 2947-2960

Hippocrates aus Kos, *Epidemien V*, Kap. XV; XCV. Trad. R. Fuchs, Band 2 (227), 249-250

Hoch, D. H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B. E., Finkelstein, A., DasGupta, B. R., and Simpson, L. L. (1985) Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: Relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (6), 1692-1696

Hoch, D. H. and Finkelstein, A. (1985) Gating of large toxin channels by pH. *Ann N Y Acad Sci* 456, 33-35

Högy, B., Dauzenroth, M. E., Hudel, M., Weller, U., and Habermann, E. (1992) Increase of permeability of synaptosomes and liposomes by the heavy chain of tetanus toxin. *Toxicon* 30 (1), 63-76

Ierardi, D. F., Pizauro, J. M., and Ciancaglini, P. (2002) Erythrocyte ghost cell-alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies. *Biochim Biophys Acta* 1567, 183-192

Jalava, K., Eko, F. O., Riedmann, E., and Lubitz, W. (2003) Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery. *Expert. Rev. Vaccines* 2 (1), 45-51

Jongeneel, C. V., Bouvier, J., and Bairoch, A. (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* 242 (2), 211-214

Kagan, B. L., Finkelstein, A., and Colombini, M. (1981) Diphtheria toxin fragment forms large pores in phospholipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (8), 4950-4954

Kerner, J. (1817) *Vergiftungen durch verdorbene Würste*. Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneikunde. Band 3, Heft 1

Khadjeh Nasir Tousi, N. (2003) *Rezeptorvermittelte Translokation von Clostridien Neurotoxinen*. Diss. Technische Universität Hannover

- Kistner, A. and Habermann, E.** (1992) Reductive cleavage of tetanus toxin and botulinum neurotoxin A by the thioredoxin system from rat brain. Evidence for two redox isomers of tetanus toxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345 (2), 227-234
- Kistner, A., Sanders, D., and Habermann, E.** (1993) Disulfide formation in reduced tetanus toxin by thioredoxin: the pharmacological role of interchain covalent and non-covalent bonds. *Toxicon* 31 (11), 1423-1434
- Korizova, L. K. and Montal, M.** (2003) Translocation of botulinum light chain protease through the heavy chain channel. *Nat. Struct. Biol.* 10 (1), 13-18
- Kozaki, S., Kamata, Y., Watarai, S., Nishiki, T., and Mochida, S.** (1998) Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microb. Pathog.* 25 (2), 91-99
- Kriegstein, K. G., Henschen, A. H., Weller, U., and Habermann, E.** (1991) Limited proteolysis of tetanus toxin. Relation to activity and identification of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 202 (1), 41-51
- Lacy, D. B. and Stevens, R. C.** (1998) Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins. *Curr Opin Struc Biol* (8), 778-784
- Lacy, D. B. and Stevens, R. C.** (1999) Sequence Homology and Structural Analysis of the Clostridial Neurotoxins. *J. Mol. Biol.* 291, 1091-1104
- Laemmli, UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680-685
- Laird, W. J., Aaronson, W., Silver, R. P., Habig, W. H., and Hardegree, M.C.** (1980) Plasmid-associated toxigenicity in *Clostridium tetani*. *J. Infect. Dis.* 142 (4), 623
- Lalli, G. and Schiavo, G.** (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75^{NTR}. *J. CellBiol.* 156 (2), 233-239
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., and Schiavo, G.** (2003) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol.* 11 (9), 431-437

- Lazarovici, P. and Yavin, E.** (1985a) Tetanus toxin interaction with human erythrocytes. I. Properties of polysialoganglioside association with the cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* 812, 523-531
- Lazarovici, P. and Yavin, E.** (1985b) Tetanus toxin interaction with human erythrocytes. II. Kinetic properties of toxin association and evidence for a ganglioside-toxin macromolecular complex formation. *Biochim. Biophys. Acta* 812, 532-542
- Lazarovici, P. and Yavin, E.** (1986) Affinity-purified tetanus neurotoxin interaction with synaptic membranes: properties of a protease-sensitive receptor. *Biochemistry* 25, 7047-7054
- Lebeda, F. J. and Olson, M. A.** (1994) Secondary Structural Predictions for the Clostridial Neurotoxins. *Proteins* 20, 293-300
- Lebeda, F. J. and Olson, M. A.** (1995) Structural Predictions Of The Channel-Forming Region Of Botulinum Neurotoxin Heavy Chain. *Toxicon* 33 (4), 559-567
- Li, L. and Singh, B. R.** (1998) Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. *J. Nature Toxins* 7 (3), 215-226
- Li, L. and Singh, B. R.** (2000) Spectroscopic analysis of pH-induced changes in the molecular features of type A botulinum neurotoxin light chain. *Biochemistry* 39 (21), 6466-6474
- 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. *Biochemistry* 39 (9), 2399-405
- Low, T. L., Seow, T. K., and Chung, M. C. M.** (2002) Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2, 1229-1239
- Matthews, B. W.** (1988) Structural basics of the action of thermolysin and related zinc proteases. *Acc. Chem. Res.* 21, 333-340

- 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
- Montal, M. S., Blewitt, R., Tomich, J. M., and Montal** (1992) Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of tetanus and botulinum neurotoxins. *FEBS Lett.* 313 (1), 12-18
- Montecucco, C., Schiavo, G., and Tomasi, M.** (1985) pH-dependence of the phospholipid interaction of diphtheria-toxin fragments. *Biochem. J.* 231, 123-128
- Montecucco, C., Schiavo, G., Brunner, J., Dufлот, E., Boquet, P. and Roa, M.** (1986) Tetanus Toxin Is Labeled with Photoactivatable Phospholipids at low pH. *Biochemistry* 25 (4), 919-924
- Montecucco, C.** (1986) How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem. Sci.* 11, 31-317
- Montecucco, C., Schiavo, G., Gao, Z., Bauerlein, E., Boquet, P., and DasGupta, B.R.** (1988) Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayers surface. *Biochem. J.* 251 (2), 379-383
- Montecucco, C., Schiavo, G., and DasGupta, B. R.** (1989) Effect on pH on the interaction of botulinum neurotoxins A, B and E with liposomes. *Biochem J* 259 (1). 47-53
- Montecucco, C., Papini, E., and Schiavo, G.** (1991) Molecular models of toxin membrane translocation. In: *A Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, edited by J. E. Alouf and J. H. Freer. London: Academic, p. 45-56
- Montecucco, C. and Schiavo, G.** (1993) Tetanus and botulinum neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem. Sci.* 18, 324
- Montecucco, C., Papini, E., and Schiavo, G.** (1994) Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett* 346, 92-98
- Montecucco, C. and Schiavo, G.** (1995) Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* 28 (4), 423-472

- Montecucco, C., Rosetto, O., and Schiavo, G.** (2004) Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* 12 (10), 442-446
- Montesano, R., Roth, J., Robert, A., and Orci, L.** (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalisation of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296 (5858), 651-653
- Moskaug, J. O., Sandvig, K., and Olsnes, S.** (1989) Role of Anions in Low pH-induced Translocation of Diphtheria Toxin. *J. Biol. Chem.* 264 (19), 11367-11372
- Munro, P., Kojima, H., Dupont, J. L., Bossu, J. L., Poulain, B., and Boquet, P.** (2001) High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 623-629
- Niemann, H.** (1991) Molecular biology of clostridial neurotoxins. In *Sourcebook of bacterial Protein Toxins* (Alouf, J. E. and Freer, J. H., eds) pp. 303-348, Academic Press, London
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S.** (1994) Identification of the protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 10498-10503
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Takahashi, M., and Kozaki, S.** (1996) The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with ganglioside GT1b/GD1a. *FEBS Letters*, 378, 253-257
- Oblatt-Montal, M., Yamazaki, M., Nelson, R., and Montal, M.** (1995) Formation of ion channels in lipid bilayers by a peptide with the predicted transmembrane sequence of botulinum neurotoxin A. *Protein Science* 4, 1490-1497
- Osborne, R. and Bradford, H.** (1973) Tetanus toxin inhibits amino acid release from nerve endings in vitro. *Nat New Biol* 244 (135), 157-158
- Panthel, K., Jechlinger, W., Matis, A., Rohde, M., Szostak, M., Lubitz, W., and Haas, R.** (2003) Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates. *Infec. Immun.* 71 (1), 109-116

- Parton, R. G., Oxford, C. D., and Ctitchley, D. R.** (1987) A study on the mechanism of internalisation of tetanus toxin by primary mouse spinal cord cultures. *J. Neurochem.* 49, 1057-1068
- Paukner, S., Kohl, G., Jalava, K., and Lubitz, W.** (2003) Sealed Bacterial Ghosts—Novel Targeting Vehicles Advanced Drug Delivery of Water-soluble Substances. *J. Drug. Target.* 11 (3), 151-161
- Pierce, E. J., Davison, M. D., Parton, R. G., Habig, W. H., and Critchley, D., R.** (1986) Characterisation of tetanus binding to rat brain membranes. Evidence for a high-affinity proteinase-sensitive receptor. *Biochem. J.* 236, 845-852
- Puhar, A., Johnson, E. A., Rosetto, O., and Montecucco, C.** (2004) Comparison of the pH-induced conformational change of different clostridial neurotoxins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 319, 66-71
- QIAGEN** (1995), Plasmid Purification Handbook
- Raap, A. K. and Van Dujn, P.** (1981) Enzyme-incorporated Erythrocyte Ghosts: A New Model System for Quantitative Enzyme Cytochemistry. *J. of Histochem. Cytochem.* 29 (12), 1418-1424
- Ratts, R., Zeng, H., Berg, E. A., Blue, C., McComb, M. E., Costello, C. E., vander-Spek J. C., and Murphy J. R.** (2003) The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *J. Cell. Biol.* 160 (7), 1139-1150
- Rehm, H. and Lazdunski, M** (1992) Purification, affinity labelling and reconstitution of voltage-sensitive potassium channels. *Methods Enzymol.* 207, 556-564
- Roa, M. and Boquet, P.** (1985a) Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles at low pH- Protection of specific polypeptides against proteolysis. *J. Biol. Chem.* 260 (11), 6827-6835
- Roa, M. and Boquet, P.** (1985b) Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles at low pH. *J. Biol. Chem.* 260, 6827-6835

- Roques, B. P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M., C., and Beaumont, A.** (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 45 (1), 87-146
- Rossetto, O., Schiavo, G., Montecucco, C., Poulain, B., Lozzi, L., and Shone, C. C.** (1994) SNARE motif and neurotoxins. *Nature* 372 (6505), 415-416
- Rossetto, O., Deloye, F., Poulain, B., Pellizzari, R., Schiavo, G., and Montecucco, C.** (1995) The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. *J. Physiol. Paris.* 89 (1), 43-50
- Rothman, J. E.** (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372,55-62
- Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H., and Binz, T.** (2003) Two carbohydrate binding sites in the H (CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. *J. Mol. Biol.* 326 (3), 835-47
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T.** (2004) Synaptotagmins I and II Act as Nerve Cell Receptors for Botulinum Neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* 279 (29), 30685-70
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Ehrlich H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839), 487-91
- Sakaguchi, G., Kozaki, S., and Ohishi, I.** (1984) in: *Bacterial Protein Toxins.* Academic Press, London, 435-443
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Schiavo, G., Papini, E., Genna, G., and Montecucco, C.** (1990) An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus neurotoxin. *Infect. Immun.* 58 (12), 4136-4141
- Schiavo, G., Poulain, B., Rossetti, O., Benfenati, F., Tauc, L., and Montecucco, C.** (1992) Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depends on zinc. *EMBO J.* 11, 3577-3583

- Schmid, M. F., Robinson, J. P., and DasGupta, B. R.** (1993) Direct visualisation of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles. *Nature* 364, 827-830
- Schmitt, A., Dreyer, F., and John, Ch.** (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
- Schwoch, G. and Passow, H.** (1973) Preparation and Properties of Human Erythrocyte Ghosts. *Mol. Cell. Biochemistry* 2 (2), 197-218
- Scott, A. B.** (1989) Clostridial toxins as therapeutic agents. In: *Botulinum Neurotoxin und Tetanus Toxin*, ed. Simpson, L.L. Acad Press, New York
- Shone, C. C., Hambleton, P., and Melling, J.** (1987) A 50- kDa fragment from the NH₂-terminus of the heavy subunit of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin forms channels in lipid vesicles. *Eur. L. Biochem.* 167, 175-180
- Simpson, L. L. and Rapport, M. M.** (1971) The binding of botulinum toxin to membrane lipids: sphingolipids, steroids and fatty acids. *J. Neurochem.* 18 (9), 1751-1759
- Simpson, L. L.** (1980) Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin A and the cholinergic neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212 (1), 16-21
- Simpson, L. L.** (1981) The origin, structure and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol. Rev.* 33, 155-188
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (23), 720-31
- Sorensen, J. B., Matti, U., Wei, S.-H., Nehring, R. B., Voets, T., Ashery, U., Binz, T., Neher, E., and Rettig, J.** (2002) The SNARE protein SNAP 25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *PNAS* 99 (3), 1627-1632
- Sprandel, U., Hubbard, A. R., and Chalmers, R. A.** (1979) In vitro studies on resealed Erythrocyte Ghosts as Protein Carriers. *Res. Exp. Med. (Berl.)* 175, 239-245
- Stecher, B., Gratzl, M., and Ahnert-Hilger, G.** (1989) Reductive chain separation of botulinum A toxin- a prerequisite to its inhibitory action on exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.* 248, 23-27

- Steck, T. L. and Kant, J. A.** (1974) Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 31a, 172-180
- Stoeckel, K., Schwab, M. E., and Thoenen, H.** (1975) Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study. *Brain Res* 89 (1), 1-14
- Südhof, T. C.** (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653
- Szostak, M. P., Hensel, A., Eko, F. O, Klein, R., Auer, T., Mader, H., Haslberger, A., Bunka, S., Wanner, G., and Lubitz, W.** (1996) Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. *J. Biotechnol.* 44 (1-3), 161-170
- Tanner, M. J. A.** (1993) The major integral proteins of the human red cell. In *Baillier's Clinical Haematology* Vol. 6 (2), 333-356
- Thomas, R., Mathai, A., Rajeev, B., Sen, S., and Jacob, P.** (1993) Botulinum toxin in the treatment of paralytic strabismus and essential blepharospasm. *Indian J Ophthalmol* 41 (3), 121-124
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* Sep76 (9), 4350-4
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., and Rapoport, T. A.** (2001) Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104, 937-948
- Umata, T. and Mekada, E.** (1998) Diphtheria Toxin Translocation across Endosome Membranes. *J. Biol. Chem.* 273 (14), 8351-8359
- Umland, T.C., Wingert, L.M., Swaminathan, S., Furey, W.F., Schmidt, J.J., and Sax, M.** (1997) Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat. Struct. Biol.* 4: 788-792
- Van Heyningen, W. E. and Miller, P. A.** (1961) The fixation of tetanus toxin by ganglioside. *J. Gen. Microbiol.* 24, 107-119

- Van Heyningen, W. E.** (1974) Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. *Nature* 249, 415-417
- Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., and Scharpe, S.** (1995) Proline motifs in peptides and their biological processing. *The FASEB Journal* 9, 736-744
- Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A., and Damjanovich, S.** (2003) Dynamic, yet structured: The cell-membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (14), 8055-8
- Washbourne, P., Pellizari, R., Balini, G., Wilson, M. C., and Montecucco C.** (1997) Botulinum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS letters* 418, 1-5
- Weller, U., Taylor, C. F., and Habermann, E.** (1986) Quantitative comparison between tetanus toxin, some fragments and toxoid for binding and axonal transport. *Toxicol.* 24 (11-12), 1055-1063
- Weller, U., Dauzenroth, M. E., Meyer zu Heringsdorf, D., and Habermann, E.** (1989) Chains and fragments of tetanus toxin. Separation, reassociation and pharmacological properties. *Eur. J. Biochem.* 379, 1-8
- Wernig, A., Stover, H., and Tonge, D.** (1977) The labelling of motor endplates in skeletal muscle of mice with ¹²⁵I-tetanus toxin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 298
- Williamson, L. C. and Neale E. A.** (1994) Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. *J. Neurochem.* 63 (6), 2342-2345
- Wright, J. F., Pernollet, M., Reboul, A., Aude, C. and, Colomb, M. G.** (1992) Identification and partial characterisation of a low affinity metal binding site in the light chain of tetanus toxin. *J. Biol. Chem.* 267, 9053-9058
- Zimmermann, U., Riemann, F., and Pilwat, G.** (1976) Enzyme-loading of electrically homogeneous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* 436 (2), 460-474

Lebenslauf

Persönliche Daten

Jeannette Christina Koch geb. Heyn
Diplom-Biochemikerin
* 30.05.1967 in Berlin
verheiratet

Schulbildung

1973-1977 Pestalozzischule I, Grundschule, Hannover
1977-1979 Pestalozzischule II, Orientierungsstufe, Hannover
1979-1986 Gymnasium Misburg, Hannover
(Abschluss Allgemeine Hochschulreife)

Berufliche und Hochschulausbildung

1986-1989 Berufsausbildung zur
Staatlich geprüften Pharmazeutisch technischen Assistentin PTA
1990-1996 Studium der Biochemie (Diplom) an der Universität Hannover
06/1996 Diplom in Biochemie an der Universität Hannover
Diplomarbeit: *Regulation der Genexpression der NO-Synthase in insulinproduzierenden B-Zellen durch Glucose* (bei Herrn Prof. Dr. H. Zühlke am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover)
Gesamtnote: Sehr gut

Berufliche Tätigkeiten

05/1989-04/1990 Angestellte in der Friedenstal-Apotheke, Hannover
05-09/1990 Angestellte in der Insel-Apotheke, Westerland/Sylt
09/1996-09/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover zum Zwecke der Promotion
03/1998-09/2000 Toxikologische Rufbereitschaft am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
1997-2000 Lehrtätigkeit: Seminar „Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie für Mediziner“
Praktikumsbetreuung Pharmakologie für Biochemiker
Seit 10/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Otto von Guericke Universität Magdeburg

Publikationen

Originalpublikationen

R. A. Verhage, **J. Heyn**, P. van de Putte, J. Brouwer*
Transcription elongation factor S-II is not required for Transcription-coupled repair in yeast; MolGenGenet, **1997**, 254: 284-290

Veröffentlichte Abstracts

J. Heyn, H. Bigalke*
Erythrocyte Ghosts: A Model for Translocation of Tetanus Toxin through cytoplasmic Membranes devoid of Receptors; Abstract im Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Volume 357 (4), **1998**

J. Heyn, T. Binscheck, M. Meder, H. Bigalke*
Tetanus toxin: Translocation through membranes devoid of receptors; Poster anlässlich des 28th Meeting of the Society for Neuroscience, Los Angeles, **1998**

N. Khadjeh Nasir Tousi, **J. Heyn**, H. Bigalke*
pH-Dependent Translocation of Tetanus toxin; Poster anlässlich des 29th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Miami Beach, **1999**

J. Heyn, N. Khadjeh Nasir Tousi, H. Bigalke*
Tetanus toxin: pH-dependend translocation through receptor-free membranes; Poster anlässlich des 2. International Symposium on Clostridial Neurotoxins, Orlando, **1997**

J. Heyn, S. Bade, T. Binz, H. Bigalke*
Clostridial neurotoxins: translocation through membranes of erythrocyte ghosts; Abstract im Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement 2 to Volume 365, **2002** R61

