

Produktion rekombinanter Neurotoxine und Charakterisierung ihrer Wechselwirkungen mit Proteinrezeptoren

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Tino Karnath
geboren am 08. August 1975 in Dessau

Hannover, im November 2007

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

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

Tag der Promotion: 27. November 2007

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, 2007

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich bei meiner Doktorarbeit direkt oder indirekt unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Walter Müller und Prof. Dr. Hans Bigalke für die Übernahme der Referate dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thomas Binz und Dr. Andreas Rummel für die Bereitstellung des Themas und ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für viele Anregungen und Hilfestellungen.

Ein großer Dank gebürt auch meinen Kollegen der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Binz, Stefan Mahrhold, Stefan Sikorra und Tina Henke für die Schaffung einer aufgeschlossenen und freundlichen Arbeitsatmosphäre.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans Bigalke bedanke ich mich für die Präparation der Zwerchfelle.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders für ihre Liebe und ihr Vertrauen danken.

Pamela, Danke für alles!

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Botulinus Neurotoxin Serotyp E, F und G Genkonstrukte kloniert und diese zur Produktion von volle Länge rekombinanter Neurotoxine in *E. coli* und deren Affinitätsreinigung eingesetzt. Um die Toxine nach der Aufreinigung in ihre aktivierte Form überführen zu können, wurde jeweils zwischen der leichten und schweren Kette die lysinreiche Aminosäuresequenz KTKS sowie eine Thrombinschnittstelle eingefügt. Die so ermöglichte Aktivierung dieser clostridiellen Neurotoxine (CNT) durch *E. coli* eigene Proteasen oder durch Thrombin, war eine grundlegende Voraussetzung für die Untersuchung der Suszeptibilität von PC12-Zellen gegen CNT.

PC12-Zellen stellen ein gutes Modellsystem für Studien mit CNT dar, da sie die Proteine des neuronalen SNARE Komplexes und somit alle Substrate dieser Toxine besitzen. Ob die zur Aufnahme der CNT nötigen Proteinrezeptoren ebenfalls vorhanden sind, war bisher nicht für alle Serotypen bekannt. Mit Hilfe von Substratspaltungstests konnte nun nachgewiesen werden, dass PC12-Zellen Proteinrezeptoren für alle CNT exprimieren. Diese Zelllinie eignet sich demnach gut für weiterführende Studien, z.B. zur Bestimmung der Proteinrezeptoren der einzelnen CNT Serotypen.

Die gereinigten und aktivierten CNT können auch für Kristallisationsversuche eingesetzt werden. Hier wurde versucht, Kristallstrukturdaten von rekombinantem BoNT/B und BoNT/G zu gewinnen. Für BoNT/G gelang dies nicht, es bildeten sich keine vermessbaren Kristalle. Für das rekombinante BoNT/B konnte eine Kristallstruktur gewonnen werden, welche sich mit der bekannten Struktur des nativen Toxins deckte. Es lässt sich also vermuten, dass sich rekombinant hergestellte CNT strukturell kaum von ihren nativen Varianten unterscheiden. Die Kristallstruktur des rekombinanten BoNT/B lieferte sogar erstmals Daten für den Loopbereich zwischen leichter und schwerer Kette, da dieser beim nativen Toxin hydrolysiert vorliegt und somit dort nicht dargestellt werden konnte.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, BoNT/B gemeinsam mit seinem Proteinrezeptor Synaptotagmin-II zu kristallisieren. Das erzeugte Fusionsprotein lieferte vermessbare Kristalle, so dass eine genaue Abbildung der Interaktionsbereiche des H_CFragmentes von BoNT/B und seinem Proteinrezeptor möglich war.

Ein solches Bild der Proteinrezeptorbindungstasche existiert von BoNT/A und seinem Proteinrezeptor SV2 noch nicht und eine genaue Bestimmung der Lage dieser Tasche auf BoNT/A wäre ein erster Schritt in diese Richtung. Botulinus Neurotoxine verursachen Muskellähmungen, indem sie die für die Vesikelfusion in Motoneuronen nötigen Komponenten spalten. Dazu binden sie mit einer bei allen sieben Serotypen von Botulinum Neurotoxin und Tetanus Neurotoxin konservierten Tasche komplexe Ganglioside auf der Membran. Für die Aufnahme in die Zelle ist zusätzlich ein Proteinrezeptor notwendig. Die genaue Lage der Bindungstasche von SV2 war bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde die Position der Proteinrezeptorbindungstasche am äußeren Ende der H_{CC}-Domäne des Toxins lokalisiert. Dies korrespondiert mit den Proteinrezeptorbindungsstellen, die bei BoNT/B und BoNT/G gefunden wurden. Der Austausch einzelner Aminosäuren in diesem Bereich beeinträchtigte die Bindung an SV2 und verminderte die Toxizität im *Mouse Phrenic Nerve Assay*

Schlagworte: Clostridielle Neurotoxine; Proteinrezeptor; Kristallstruktur

Abstract

Within this study gene constructs of Botulinum Neurotoxin Type E, F and G were cloned and used to produce full length recombinant neurotoxins in *E. coli* and for their affinity purification for the first time. To provide the opportunity to transfer the toxins into their activated form after purification, a lysin-rich amino acid sequence and a thrombin cleavage site were inserted between the light and heavy chain. So it was possible to activate the toxin which was an important precondition for testing the susceptibility of PC12-cells versus clostridial neurotoxins (CNT).

Since PC12-cells express the proteins of the neuronal SNARE-complex and therefore contain all substrates of the CNT, they are a suitable model-system for studies on these toxins. Whether the individual protein receptors required for toxin-uptake are also expressed was not known for all serotypes. The results of substrate cleavage tests accomplished in this study evidenced that protein receptors for all CNT are existing in PC12-cells. So this cell line is adequate for utilization in further studies, e.g. the identification of the proteinreceptors of all CNT-serotypes.

The purified and activated CNT were also suitable for crystallization-experiments. So another scope of this work was to obtain crystal-structures of recombinant BoNT/B and BoNT/G. This was not possible for BoNT/G, because no measurable crystals accumulated. The structure received for recombinant BoNT/B aligned with the known structure of the native toxin. One can assume that recombinantly produced CNT are indistinguishable in their structure from the native version. Here it was also possible to show the loop area between light and heavy chain of BoNT/B, which largely sticks out of the structure.

It was also tried to obtain co-crystals of BoNT/B and its proteinreceptor Synaptotagmin-II. The produced fusionprotein gained measurable crystals and therefore a detailed conception of the area of interaction of BoNT/B and its proteinreceptor was possible.

Such a concept of the protein-binding area of BoNT/A and its proteinreceptor SV2 does not exist and the localization of this area would be a first step towards this aim. Botulinum neurotoxins cause muscle paralysis by selectively cleaving core components of the vesicular fusion machinery in motoneurons. Complex gangliosides initially bind to a pocket conserved among the seven botulinum neurotoxins and tetanus neurotoxin. Protein receptors are additionally required for productive neurotoxin uptake. The interaction site of SV2 protein within the neurotoxin is currently unknown. The protein receptor binding site was located in the present study to a pocket at the tip of the H_{CC}-domain. That position corresponds to those of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G. Substitution of several amino acids in this region impaired the binding to SV2 and decreased toxicity at mice phrenic nerve preparations.

Keywords: clostridial neurotoxins; protein receptor; crystal-structure

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Tetanus und Botulismus	1
1.2 Clostridielle Neurotoxine	2
1.2.1 Struktur clostridieller Neurotoxine	2
1.2.2 Wirkungsweise clostridieller Neurotoxine	4
1.2.2.1 Enzymatische Aktivität	5
1.2.2.2 Bindung an Nervenzellen und Internalisierung	6
1.2.2.3 Translokation und Transport	6
2 AUFGABENSTELLUNG	7
3 METHODEN	8
3.1 Molekularbiologische Arbeiten	8
3.1.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen	8
3.1.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien zur Transformation	8
3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	8
3.1.4 Plasmid-DNA Präparation	8
3.1.5 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen	9
3.1.6 Bestimmung der DNA-Konzentration	9
3.1.7 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	9
3.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden	9
3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	10
3.1.10 DNA- Agarosegelelektrophorese	10
3.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	10
3.1.12 Ortsgerichtete Mutagenese (GeneTailor™)	11
3.1.13 Reinigung von PCR-Produkten	12
3.1.14 Sequenzierung von DNA	12
3.2 Produktion und Nachweis von Proteinen	13
3.2.1 <i>In vitro</i> Translation	13
3.2.2 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine aus <i>E. coli</i>	13
3.2.3 Aufreinigung rekombinanter H ₆ -Fusionsproteine aus <i>E. coli</i>	14
3.2.4 Produktion von Proteinen mit Strep-tag® II in <i>E. coli</i>	14
3.2.4.1 Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i>	15
3.2.4.2 Ultraschallaufschluss	16
3.2.4.3 Aufreinigung durch Affinitätschromatographie	16
3.2.5 Aufkonzentration von Proteinlösungen	16
3.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	17
3.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgel	17
3.2.6.2 Probenvorbereitung	18
3.2.6.3 Elektrophorese	18

3.2.6.4	Coomassiefärbung	18
3.2.6.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	18
3.2.6.6	Bestimmung des Proteingehaltes nach Biorad	19
3.2.7	Westernblot	19
3.2.7.1	Transfer auf eine Blot-Membran	19
3.2.7.2	Immunodetektion von immobilisierten Proteinen	20
3.3	Protein-Analyse	20
3.3.1	ELISA	20
3.3.2	Aktivierung von clostridiellen Neurotoxinen	21
3.3.2.1	Trypsinaktivierung	21
3.3.2.2	Thrombinaktivierung	21
3.3.3	<i>In vitro</i> Toxizitätsassay am <i>Nervus phrenicus</i> der Maus	22
3.3.4	GST- <i>Pull-Down</i> Assays	22
3.3.5	Synaptosomen-Bindungsassay	23
3.3.5.1	Präparation von Rattenhirn Synaptosomen	23
3.3.5.2	Bindung an Synaptosomen	24
3.4	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	25
3.4.1	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	25
3.4.2	Einfrieren von Zellen	25
3.4.3	Wachstumsbedingungen für PC-12 Zellen	25
3.4.4	Trypsinieren adhärenter Zellen	26
3.4.5	Transfektion von Zellen	26
3.4.6	PC-12 Zellen - Neurotoxin Assay	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	Klonierungen von Botulinum Neurotoxin Serotyp E, F und G	28
4.2	Produktion und Reinigung der rekombinanten Neurotoxine	33
4.2.1	Isolation der CNT	33
4.2.2	Aktivierung der produzierten CNT	35
4.3	Sind PC12 Zellen suszeptibel für alle clostridiellen Neurotoxine?	38
4.4	Kristallisationsversuche mit BoNT/G, BoNT/B und Synaptotagmin-II	40
4.4.1	Konzentration von H ₆ BoNT/GS und BoNT/BSL	40
4.4.2	Ergebnisse der Kristallisation von H ₆ BoNT/GS und BoNT/BSL	40
4.4.3	Reinigung von Synaptotagmin-II Peptid	42
4.4.4	Test von BoNT/B-Syt-II Fusionsproteinen zur Toxin/Rezeptor Co-Kristallisation	43
4.4.4.1	Konstruktion von Expressionsplasmiden für BoNT/B-Syt-II Fusionsproteine	43
4.4.4.2	Aufreinigung von BoNT/BSL-Syt-II und BoNT/BSL-L-Syt-II	44
4.4.4.3	GST- <i>Pull-Down</i> Assays mit BoNT/BSL-Syt-II	45
4.4.4.4	Toxizitätsassay am <i>Nervus phrenicus</i> der Maus	46
4.4.4.5	Aufreinigung von H ₆ BoNT/BSL-Syt-II	47
4.5	In welchem Bereich bindet BoNT/A seinen Rezeptor SV2?	48
4.5.1	Bindet SV2 in der H _{CN} - oder H _{CC} -Domäne von BoNT/A?	48
4.5.2	Mutagenese einzelner Aminosäuren in der H _{CC} -Domäne von BoNT/A	49
4.5.3	Toxizitätstest der BoNT/A Mutanten im <i>Mouse Phrenic Nerve Assay</i>	51
4.5.4	Bindungstest der BoNT/A Mutanten an SV2 mittels GST- <i>Pull-Down</i> Assay	55
4.5.4.1	Umklonierung der mutierten H _{CC} -Genfragmente von BoNT/A in pSP72 Vektor	55
4.5.4.2	Ergebnisse des GST- <i>Pull-Down</i> Assays	56
4.5.5	Kontrolle der Gangliosidbindung	58
4.5.5.1	Bindungstest der BoNT/A Mutanten an Synaptosomen	58
4.5.5.2	Test der BoNT/A Mutanten im ELISA	59
5	DISKUSSION	60

5.1	Rekombinantes BoNT/E und BoNT/G lassen sich in hoher Ausbeute und Reinheit in <i>E. coli</i> produzieren	60
5.2	PC12-Zellen sind suszeptibel für alle Serotypen von Botulinum Neurotoxin.....	61
5.3	Kristallisation.....	63
5.4	BoNT/A bindet seinen Rezeptor SV2 in einer flachen Tasche am äußersten Ende der H_{CC}-Domäne	64
6	AUSBLICK.....	67
7	LITERATUR.....	69
8	ANHANG.....	76
8.1	Material.....	76
8.1.1	Chemikalien	76
8.1.2	Standards.....	77
8.1.3	Enzyme	78
8.1.4	Puffer und Medien.....	78
8.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze.....	81
8.1.6	Bakterienstämme	81
8.1.7	Humane Zelllinien	82
8.1.8	Plasmide	82
8.1.9	Antikörper.....	83
8.1.10	Oligonukleotide.....	84
8.1.11	Geräte.....	88
8.1.12	Firmen.....	88

Abkürzungsverzeichnis

λ	Lambda
μ	Mikro
A	Ampere
Å	Angström
A, Ala	Alanin
Abb	Abbildung
abs.	absolut
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BoNT/A-G	Botulinum Neurotoxin Serotyp A-G
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
c	Centi
C, Cys	Cystein
Ca	Calcium
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CNT	Clostridielle Neurotoxine
CO ₂	Kohlendioxid
C-terminal	carboxyterminal
D, Asp	Aspartat
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
E, Glu	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Erythrina cristagalli lectin, enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
f	Femto
F, Phe	Phenylalanin
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calve serum</i>)
g	Gramm
G, Gly	Glycin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSH	reduziertes Glutathion
h	Stunde(n)
H, His	Histidin

H ⁺	Wasserstoff-Ion
HABA	2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure
HC	schwere Kette
H _C	carboxyterminale Hälfte der schweren Kette (HC), Bindungsfragment
H _{CC}	carboxyterminale Hälfte des H _C -Fragments
HCl	Salzsäure
H _{CN}	aminoternale Hälfte des H _C -Fragments
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
H _N	aminoternale Hälfte der schweren Kette (HC), Translokationsdomäne
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS	Pferdeserum (<i>horse serum</i>)
I, Ile	Isoleucin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
k	Kilo
K, Lys	Lysin
k.A.	keine Angabe möglich
Da	Dalton
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidase
LASER	<i>Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation</i>
lat	lateinisch
LC	leichte Kette
LH _N	leichte Kette plus Translokationsdomäne der CNT
LMW	<i>Low Molecular Weight Marker</i> (Molekülmassenstandard)
Lsg	Lösung
m	Milli, Meter
M	Molar, Methionin
Max	Maximum
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
Mg	Magnesium
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute(n)
mol	Mol
MPN	<i>Mouse Phrenic Nerve</i>
N	Stickstoff
n	nano
N, Asn	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc [^]	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
Ni-NTA	Nickeltrinitrioloessigsäure
N-terminal	aminoterminal
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
p	Pico

P, Pro	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pKa	Maß für die Dissoziationsstärke einer Säure ($pK_a = -\lg K_a$)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPP	p-Nitro Phenyl Phosphat
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R, Arg	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S, Ser	Serin
sc	<i>single chain</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	Sulfhydryl-
Smp	Schmelzpunkt
SNAP-25	<i>Synaptosome-associated Protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
T, Thr	Threonin
Tab	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TeNT	Tetanus Neurotoxin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V, Val	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
VAMP	Vesikel assoziiertes Membranprotein
W, Trp	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp (<i>wild type</i>)
Y, Tyr	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

1 Einleitung

Viele von Pflanzen oder Bakterien produzierte Proteine wirken auf den Säugerorganismus toxisch, sobald sie das Zytoplasma erreicht haben und dort bestimmte Substrate attackieren können. Oft verhindern diese Toxine die Weiterleitung von Nervenimpulsen, indem sie die Funktion von Synapsen beeinträchtigen. Dies kann sowohl an der präsynaptischen als auch an der postsynaptischen Membran geschehen. Die clostridiellen Neurotoxine (CNT) wirken an der präsynaptischen Membran, indem sie die Exozytose von Neurotransmittern inhibieren und somit die Reizweiterleitung blockieren. Zur Gruppe der clostridiellen Neurotoxine gehören Tetanus Neurotoxin (TeNT) sowie die sieben serologisch unterscheidbaren Botulinum Neurotoxine (BoNT/A-G).

1.1 Tetanus und Botulismus

Die CNT verursachen die Erkrankungen Tetanus und Botulismus. Als Ursache für eine Tetanuserkrankung wurde ein Bakterium identifiziert (Carle & Rattone, 1884), welches die Form eines Trommelstocks besitzt (lat. *Closter*). *Clostridium tetani* ist ein gram-positives, obligat anaerobes sporenbildendes Bakterium, welches weltweit im Erdboden vorkommt. Wurde eine offene Wunde infiziert, bietet sie nach Wundverschluss optimale anaerobe Wachstumsbedingungen für die Bakterien, die dann das Neurotoxin synthetisieren. Das Krankheitsbild wurde bereits von Hippokrates beschrieben. Bei den Patienten ist die Skelettmuskulatur hyperkontrahiert, weshalb diese Krankheit als Tetanus bezeichnet wurde (*tetanos*, griech. = sich kontrahieren). Die auch als Wundstarrkrampf bezeichnete Infektionserkrankung endet meist mit dem Tod durch Atem- oder Herzstillstand. Durch eine hohe Impfquote in Deutschland (über 95% bei Vorschulkindern) tritt diese Erkrankung hier sehr selten auf. Seit 2001 sind in Deutschland 3 Erkrankungsfälle bekannt geworden, wobei hauptsächlich ältere Menschen betroffen sind (Robert-Koch-Institut, 2007). In Entwicklungsländern, in denen die Immunisierung längst nicht so weit verbreitet ist, traten aufgrund von Tetanusinfektionen in den Jahren 2000-2003 ca. 300000 Todesfälle auf, wobei es sich bei dem Großteil um maternalen Tetanus handelte (WHO, 2005).

Botulismus wurde erst im 19. Jahrhundert beschrieben (Kerner, 1817), was wohl an den weniger deutlich sichtbaren Symptomen dieser Erkrankung liegt. Akuter Botulismus äußert sich in der generellen Muskeler schlaffung, was meist zum Tod durch Versagen der Atmung führt. Da die Symptome häufig mit denen anderer Erkrankungen verwechselt und nicht als Botulismus erkannt werden, liegt die Dunkelziffer von Botulismusfällen wahrscheinlich deutlich höher als die von Tetanusinfektionen. Die Vergiftung wird durch eines von sieben serologisch unterscheidbaren Botulinum Neurotoxinen (BoNT/A-G) hervorgerufen, die von den gram-positiven, obligat anaeroben sporenbildenden Bakterien *Clostridium botulinum* (Van Ermengem, 1897), *Clostridium barati* und *Clostridium butyricum* (Aureli *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 1985) synthetisiert werden. Die Vergiftungen treten meist durch den Verzehr unsachgemäß produzierter Fleisch- oder Fischkonserven auf (*botulus*, lat. = Wurst). Da in den westlichen Industrienationen die Produktion von Konserven meist hohen Hygiene- und Qualitätsansprüchen genügt, tritt Botulismus dort nur noch sehr selten auf (jährlich ca. 10 Fälle in Deutschland, Robert-Koch-Institut, 2007).

1.2 Clostridielle Neurotoxine

Die CNT zählen zu den giftigsten bekannten Substanzen, die MLD (minimale letale Dosis) der Maus liegt z.B. bei BoNT/A bei 1,2 ng und bei TeNT bei 1 ng i.p. je Kilogramm Körpergewicht (Gill, 1982). Der Grund für diese hohe Toxizität begründet sich durch ihre absolute Neurospezifität und katalytische Aktivität. Nach der Aufnahme in den Organismus verbreiten sich die CNT über die Lymph- und Blutbahnen im Körper, bis sie schließlich an die präsynaptische Membran von motoneuralen Endplatten der quergestreiften Muskulatur binden und in das Neuron aufgenommen werden. In ihren Wirkorten unterscheiden sich TeNT und die BoNT jedoch. Während die BoNT durch ihre katalytische Aktivität im Zytosol einer Synapse direkt die Acetylcholinfreisetzung verhindern, was zur Erschlaffung der Muskulatur führt, wirkt TeNT nicht peripher. Es wird nach der Aufnahme retrograd axonal in das Rückenmark transportiert, wo es das Motoneuron verlässt und in ein inhibitorisches Interneuron gelangt (Schwab & Thoenen, 1976). Dort hemmt es die Freisetzung des inhibitorischen Neurotransmitters Glycin, so dass die motoneurale Aktivität nicht mehr kontrolliert werden kann und die tetanustypische dauerhafte Verkrampfung der Muskeln entsteht.

1.2.1 Struktur clostridieller Neurotoxine

Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus aus mehreren Untereinheiten zählen die CNT zur Gruppe der AB-Toxine. Während die A-Untereinheit, der pharmakodynamische Teil, für die katalytische Aktivität innerhalb der Zelle verantwortlich ist, vermittelt die B-Untereinheit, der pharmakokinetische Teil, die Bindung an Nervenzellen und die Translokation der A-Untereinheit in das Zytosol der Zelle.

Die CNT unterscheiden sich im Ort ihrer Aufnahme: Durch die Besiedlung offener Wunden mit Sporen von *Clostridium tetani* gelangt TeNT in den Blutkreislauf, während die Vergiftung mit BoNT meist auf orale Aufnahme des Toxins zurückzuführen ist. Deshalb werden Botulinustoxine, im Gegensatz zu TeNT, als Proteinkomplexe produziert, was ihnen ermöglicht, unbeschadet bis in den Darmtrakt zu gelangen. Dort wird vermutlich durch die neutralen pH-Wert Bedingungen der Proteinkomplex aufgelöst, und das Neurotoxin gelangt hier in den Blutkreislauf (Maksymowych & Simpson, 1998).

Die CNT sind ca. 150 kDa groß und bestehen aus einer leichten (~50 kDa, *light chain*, LC) und einer schweren (~100 kDa, *heavy chain*, HC) Kette, welche durch eine exponierte Schleife miteinander verbunden sind. Diese ist von zwei konservierten Cysteinen begrenzt, welche eine Disulfidbrücke ausbilden (Niemann, 1991; Montecucco & Schiavo, 1995). Die leichte Kette bildet die katalytische Untereinheit des Toxins und enthält das Zinkbindungsmotiv (HExxH) zinkabhängiger Endopeptidasen (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco & Schiavo, 1995). Die leichte Kette entspricht also der A-Untereinheit der AB-Toxine. Die schwere Kette der CNT stellt somit die B-Untereinheit dar. Sie wird weiter in zwei ~50 kDa große Fragmente unterteilt. Der N-terminale Teil (H_N) ist für die Translokation der leichten Kette in das Zytoplasma verantwortlich. Der C-terminale Teil (H_C) vermittelt die neurospezifische Bindung des Neurotoxins an neuronale Zellen.

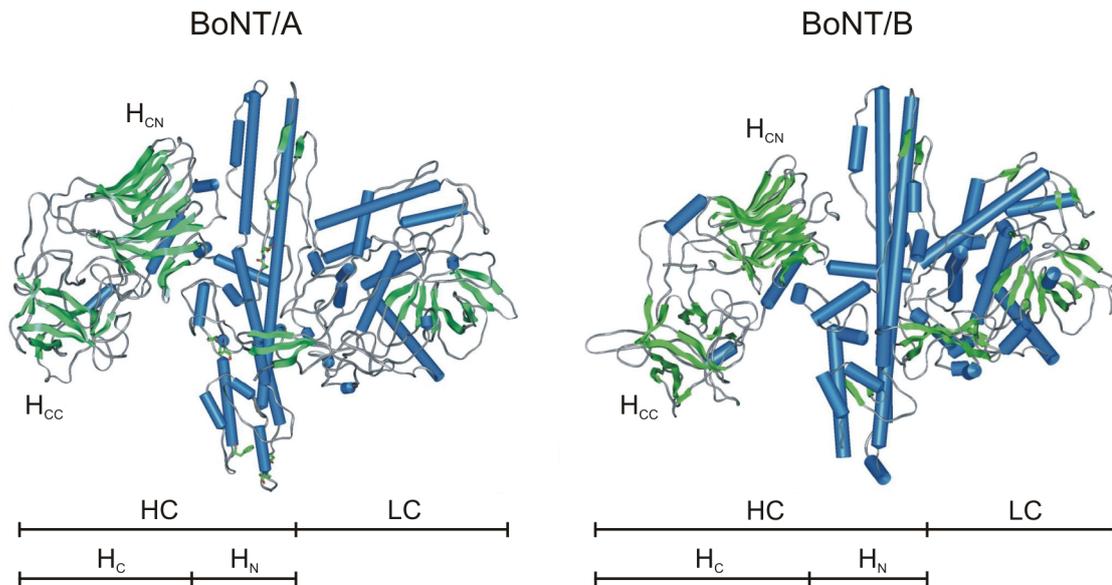


Abb. 1: Vergleich der Kristallstrukturen von BoNT/A und BoNT/B. Dargestellt sind die Sekundärstrukturmerkmale der Toxine (α -Helix = blau, β -Faltblatt = grün, Turns und Random-coils = grau).

Die Kristallstrukturen von BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998), BoNT/B (Swaminathan *et al.*, 2000) und des H_C-Fragments von TeNT (Umland *et al.*, 1997; Knapp *et al.*, 1998) wurden aufgeklärt und die einzelnen Domänen sind in Abb. 1 sehr gut zu erkennen und deutlich voneinander unterscheidbar.

Die leichten Ketten setzen sich zu etwa gleichen Teilen aus α -Helices und β -Faltblättern zusammen. Das an der katalytischen Spaltung des Substrats beteiligte Zinkion, ist zentral im sehr tiefen, so genannten katalytischen Spalt gebunden. Dort wird es von den Imidazolringen der zwei Histidine des HExxH-Motivs, der Carboxylgruppe eines ungefähr 35 Aminosäuren weiter stromabwärts liegenden Glutamates und einem Wassermolekül, das an das Glutamat des HExxH-Motivs gebunden ist, koordiniert. Die leichten Ketten weisen eine hohe Substratspezifität auf. So erkennen alle mit Ausnahme von BoNT/C, welches zwei Substrate hydrolysieren kann, nur ein Substrat. Die Sequenzhomologie der leichten Ketten der verschiedenen CNT liegt zwischen 32% und 61% (Niemann *et al.*, 1994).

Ein auffälliges Merkmal der H_N-Domäne ist der N-terminale unstrukturierte Bereich, welcher sich wie ein Gürtel um die leichte Kette legt. Dieser verdeckt im Fall von BoNT/A große Teile des katalytischen Spalts (Lacy *et al.*, 1998). Ein weiteres gemeinsames Strukturmerkmal aller H_N-Domänen der CNT sind die beiden sich kreuzenden 105 Å langen α -Helices. Sie ähneln denen des Ionenkanäle bildenden Proteins Colicin Ia (Wiener *et al.*, 1997). Die Aminosäuresequenz der H_N-Domäne ist mit 34% bis 62% ähnlich hoch konserviert wie die der leichten Kette.

Die die leichte und schwere Kette verbindende exponierte Schleife enthält zwei Cysteine, welche eine für die Intoxikation essentielle Disulfidbrücke ausbilden (Schiavo *et al.*, 1990). Die exponierte Lage dieser Schleife erleichtert ihre Hydrolyse, was aus dem inaktiven einkettigen Toxin (*single chain, sc*) das aktive *di-chain* Toxin entstehen lässt. Leichte und

schwere Kette sind nach dieser Aktivierung nur noch über die Disulfidbrücke und nichtkonvalente Wechselwirkungen miteinander verbunden.

Das H_C-Fragment besteht hauptsächlich aus β-Faltblättern und kann strukturell in H_{CN}- und H_{CC}-Domäne halbiert werden. Ihre Sequenzhomologie ist mit 21% bis 53% weniger stark ausgeprägt als die der leichten Ketten oder der H_N-Domänen. Die H_{CC}-Domäne ist für die Bindung des Neurotoxins an die neuronale Zelle verantwortlich. Die Unterschiede innerhalb dieser Domäne weisen auf unterschiedliche Rezeptoren der CNT hin, doch ist ihre dreidimensionale Struktur aufgrund von zwölf konservierten Aminosäureklustern homolog (Ginalski *et al.*, 2000). Die Funktion der H_{CN}-Domäne ist bisher nicht geklärt.

1.2.2 Wirkungsweise clostridieller Neurotoxine

Der Wirkmechanismus der clostridiellen Neurotoxine kann in 4 Schritte unterteilt werden (Abb. 2): Auf die neurospezifische Bindung (1) folgt die Internalisation durch rezeptorvermittelte Endozytose (2a). TeNT wird anschließend retrograd axonal transportiert (2b), im Rückenmark in den synaptischen Spalt freigesetzt und von einem inhibitorischen Interneuron aufgenommen (2c), während BoNT im Motoneuron den lysosomalen Transportweg nehmen. Schließlich erfolgt die Translokation der leichten Kette in das Zytosol des Neurons (3) und die enzymatische Hydrolyse der Substrate, die zur Blockade der Neurotransmitterfreisetzung führt (4).

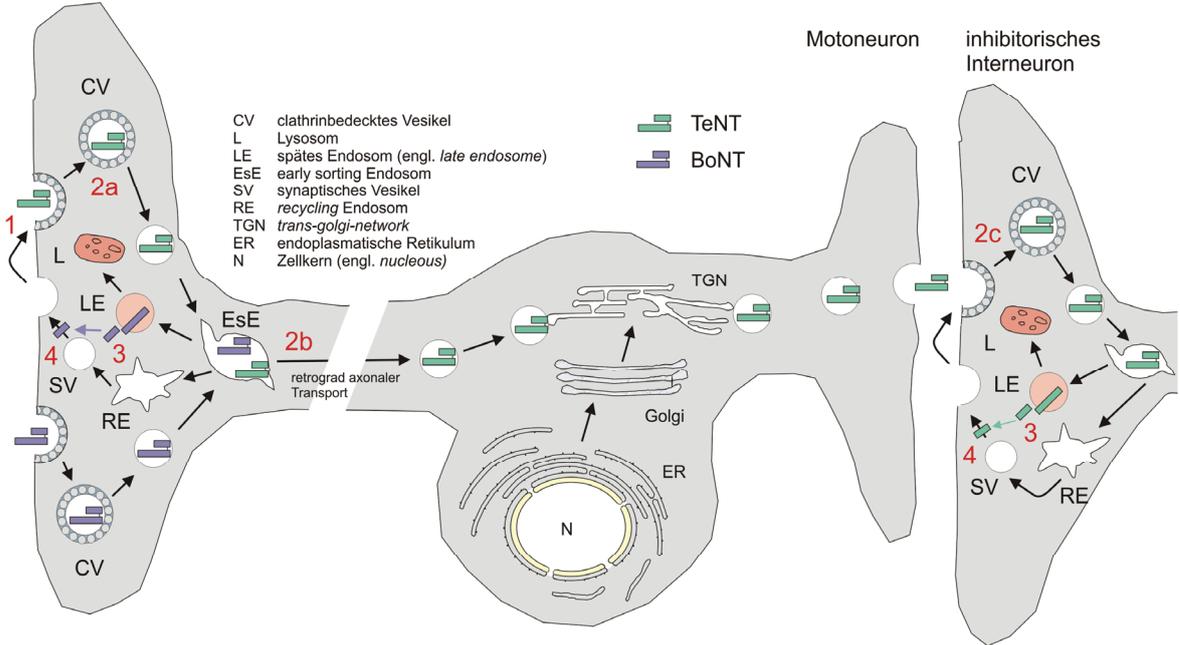


Abb. 2: Wirkmechanismus der clostridiellen Neurotoxine TeNT und BoNT. Nach neurospezifischer Bindung (1) und rezeptorvermittelter Endozytose (2a) trennen sich die Wege von BoNT und TeNT vermutlich am *early sorting endosome*. Während BoNT im Motoneuron verbleibt, gelangt TeNT durch retrograd axonalen Transport (2b) und Transzytose zu einem inhibitorischen Interneuron. Nach seiner Endozytose ist der weitere Wirkmechanismus von TeNT und BoNT in beiden Neuronen exakt der gleiche: Translokation der LC (3) und Entfaltung ihrer enzymatischen Aktivität (4).

1.2.2.1 Enzymatische Aktivität

Die enzymatische Aktivität ist bei allen CNT gleich. Nachdem sie in das Zytosol des Neurons gelangt sind (siehe 1.2.2.2), hydrolysieren sie dort ihre spezifischen Substrate. Diese gehören zur Familie der SNARE-Proteine (SNAREs, *soluble NSF attachment protein receptors*) und sind für die Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran verantwortlich. Eine Vergiftung mit CNT verhindert somit die Freisetzung von Neurotransmittern an den Synapsen. Aus der Gruppe der SNAREs gehören Synaptobrevin/VAMP (*vesicle associated membrane protein*)-2, SNAP-25 (*synaptosome associated protein of 25 kDa*) und Syntaxin 1a zu den neuronalen Substraten der CNT (siehe Abb. 3B). Syntaxin 1a ist ein Transmembranprotein der Plasmamembran (t-SNARE), wohingegen Synaptobrevin 2 mit seiner Transmembrandomäne im synaptischen Vesikel verankert ist (v-SNARE). SNAP-25 ist mittels palmitoylierter Cysteine auf beiden Membranoberflächen anzutreffen. Bei der Zusammenlagerung von vier Abschnitten dieser drei Proteine werden α -helikale Strukturen induziert, welche sich zu sogenannten *coiled-coils* zusammenschließen, was zu einer Annäherung der Vesikel an die präsynaptischen Membran führt (siehe Abb. 3A). Dieser Komplex ist thermisch außergewöhnlich stabil sowie SDS- und proteaseresistent (Hayashi *et al.*, 1994). Durch einen Einstrom von Kalzium kommt es letztendlich zur Fusion beider Membranen und Ausschüttung der im Vesikel enthaltenen Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Die Hydrolyse der SNARE-Proteine durch die CNT verhindert die Bildung dieses stabilen Komplexes und folglich auch die Exocytose der Neurotransmitter.

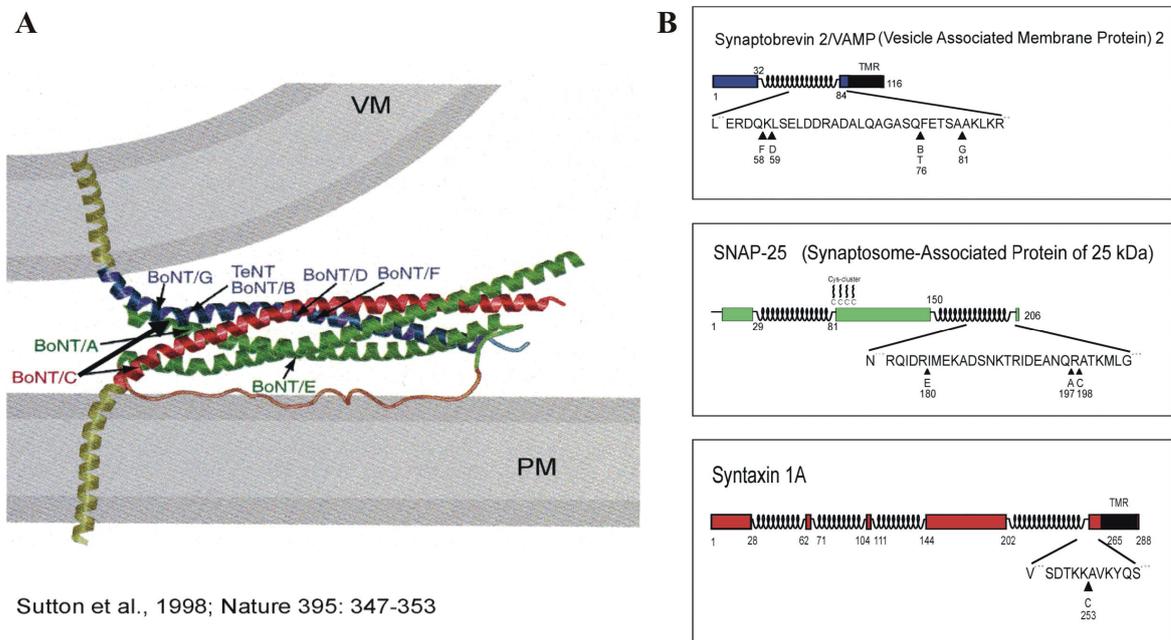


Abb. 3: Der trans-SNARE Komplex und die Substrate der CNT; A zeigt den aus vier *coils* bestehenden trans-SNARE Komplex (blau = Synaptobrevin 2/VAMP-2, grün = SNAP-25, rot = Syntaxin 1a); in B sind die Substrate der CNT mit ihren Spaltstellen schematisch dargestellt.

1.2.2.2 Bindung an Nervenzellen und Internalisierung

Die spezifische Bindung der CNT an die präsynaptische Membran und ihre anschließende Internalisierung wird durch die H_{CC}-Domäne der Toxine vermittelt (Herreros *et al.*, 2000; Schiavo *et al.*, 2000; Lalli *et al.*, 1999). Der Bindungsmechanismus kann durch ein duales Rezeptormodell erklärt werden: Auf der Membran befinden sich zahlreiche, zu lipid rafts zusammengesessene Polysialylganglioside. Die CNT binden zunächst an diese und werden so auf der Neuronenoberfläche angereichert (Herreros & Schiavo, 2002). Der zweite Rezeptor, ein in sehr viel geringerer Konzentration nur temporär auf der Zelloberfläche auftretender Proteinrezeptor, kann so anschließend effektiver gebunden werden. Bisher sind Synaptotagmin I und II als Proteinrezeptoren für Botulinum Neurotoxin Typ B (Dong *et al.*, 2003) und G (Rummel *et al.*, 2004), sowie SV2 für BoNT/A (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006) entdeckt worden. Für TeNT werden GPI-verankerte glykosylierte Proteine als Rezeptor diskutiert (Herreros *et al.*, 2001). Für alle anderen CNT liegen noch keine Erkenntnisse vor.

Die Internalisierung erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose des Proteinrezeptors und des daran gebundenen Toxins in clathrinbedeckte Vesikel (siehe Abb. 2). Nach dem Zerfall der Clathrinhülle fusionieren die Vesikel mit dem endosomalen Kompartiment, und das CNT ist damit in die Zelle eingedrungen.

1.2.2.3 Translokation und Transport

Um an ihre im Zytosol befindlichen Substrate zu gelangen, müssen die CNT die hydrophobe Membran des endosomalen Kompartiments überwinden. Die Translokation zählt zu den bisher am wenigsten verstandenen Prozessen des Vergiftungsprozesses mit clostridiellen Neurotoxinen. Bekannt ist, dass die CNT nach dem Passieren saurer Kompartimente (spätes Endosom) ihre Konformation ändern (Montecucco *et al.*, 1989). Dies ermöglicht der schweren Kette einen Kanal innerhalb der Vesikelmembran zu etablieren, durch welchen die leichte Kette in das Zytosol geschleust wird. Genauere Erkenntnisse über diesen Vorgang konnten für BoNT/A gewonnen werden (Korjaczova & Montal, 2003; Neale, 2003): So beträgt der Durchmesser des Kanals ca. 15 Å, so dass sich die leichte Kette für den Durchtritt teilweise entfalten muss (Li & Singh, 2000). Nach dem Transport der leichten Kette durch den HC-Kanal hilft dieser als Chaperon bei der korrekten Rückfaltung des Toxins in seine native Konformation. Für diesen gesamten Vorgang der Faltung und Rückfaltung ist im Vesikel ein saurer pH-Wert und im Zytosol ein neutraler pH-Wert nötig. Das reduzierende Milieu des Zytosols führt zur Spaltung der Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette und zur Freisetzung der leichten Kette in das Zytosol.

Welche Eigenschaften für die unterschiedliche Sortierung von BoNT und TeNT verantwortlich sind, ist bisher kaum verstanden. Es gibt experimentelle Hinweise, dass der Weitertransport von TeNT in Interneurone in Strukturen des H_C-Fragmentes (Fishman & Carrigan, 1987; Sinha *et al.*, 2000), oder genauer der H_{CC}-Domäne (Rummel *et al.*, 2001) begründet liegt, da diese isolierten Fragmente ebenfalls retrograd axonal transportiert werden.

2 Aufgabenstellung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Ort der Proteinrezeptorbindung auf Botulinum Neurotoxin Serotyp A zu identifizieren und zu charakterisieren. Die entsprechenden Bindungstaschen der Serotypen B und G wurden parallel zu dieser Arbeit ermittelt und befinden sich am äußersten Ende der H_{CC}-Domäne des Toxins (Rummel *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob die Bindungstasche bei BoNT/A in der entsprechenden Position liegt, sollte mittels *GST-Pull-Down* Assay bestimmt werden, auf welcher Toxin-Domäne sich die Rezeptorbindungstasche befindet.

Um die Lage der potenziellen Bindungstasche genauer vorherzusagen, sollten die kristallografischen Strukturdaten von BoNT/A analysiert und mit den Bereichen der Bindungstasche von BoNT/B verglichen werden. In viel versprechenden Bereichen sollten dann einzelne Aminosäuren so mutiert werden, dass die Zugänglichkeit der Tasche für den parallel ermittelten Proteinrezeptor SV2 erschwert oder verhindert wird, bzw. mögliche Interaktionsstellen ausgeschaltet werden. Die klonierten Genkonstrukte dieser Mutanten sollten dann als rekombinante Toxine aufgereinigt und anschließend im *Mouse Phrenic Nerve* Assay auf ihre Toxizität überprüfen werden. Sollte sich diese bei einigen Mutanten drastisch verringern, kann man davon ausgehen, dass die mutierte Aminosäure einen wichtigen Beitrag zur Bindung des Proteinrezeptors leistet. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sollten parallel in Synaptosomen-Bindungsexperimenten und *in vitro* *GST-Pull-Down* Assays mit GST-SV2 überprüft werden.

Diese Arbeiten sollten auch mit den Serotypen E und F durchgeführt werden. Da diese Toxine noch nie als rekombinante volle Länge Toxine produziert wurden, mussten die Neurotoxingene zunächst in Expressionsplasmide kloniert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte versucht werden, rekombinantes Botulinum Neurotoxin Serotyp G in einer ausreichend hohen Konzentration sowie Reinheit herzustellen, um es zu kristallisieren. Eine Kristallstruktur für dieses Toxin liegt noch nicht vor. Weiterhin war geplant, Botulinum Neurotoxin Serotyp B zusammen mit seinem Proteinrezeptor Synaptotagmin-II zu kristallisieren. Dieses Ziel sollte auf zwei Wegen verfolgt werden: Beide Proteine werden getrennt aufgereinigt und anschließend in einem aus ihrer ermittelten Konzentration berechneten äquimolaren Verhältnis gemischt. Als zweite Möglichkeit sollte ein Genkonstrukt aus BoNT/B und Synaptotagmin-II Peptid kloniert und als Fusionsprotein aufgereinigt werden. Dieses sollte vor der Verwendung zum Kristallisieren auf seine Toxizität und Bindungsfähigkeit getestet werden.

Eine wertvolle Ergänzung der *in vitro* Experimente wären weitergehende *in vivo* Untersuchungen in der Zellkultur. Die Eignung von PC12 Zellen zu Versuchen mit Neurotoxinen sollte in dieser Arbeit untersucht werden: Sind Botulinum und Tetanus Neurotoxin überhaupt in der Lage, an diese Zellen zu binden, einzudringen und ihr Substrat zu spalten?

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Arbeiten

3.1.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli* Stämmen

Alle Arbeiten zur analytischen und präparativen Anzucht von *E. coli* Stämmen wurden gemäß den Protokollen von Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989 ausgeführt. Die Anzucht von *E. coli* Stämmen erfolgte bei 37 °C in 2YT-Medium, dem bei plasmidtragenden Stämmen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von 2YT-Agar-Platten angeimpft. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien zur Transformation

Aus einer 2 mL Übernachtskultur wurden 200 mL 2YT-Medium angeimpft. Die Bakterien wurden für 2 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert, bis sie bei 600 nm eine optische Dichte von 0,6 hatten. Die Bakterien wurden für 10 min bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 mL 10 mM Tris/HCL pH 8,0 / 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 3000 rpm für 8 min. Das Pellet wurde in 20 mL 50 mM CaCl₂ / 15 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei – 80°C eingefroren.

3.1.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Es wurden 1-5 ng Plasmid-DNA mit 50 µL kompetenter *E. coli* Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 5 min bei 37°C im Wasserbad. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden 300 µL 2YT-Medium dazugegeben und der gesamte Ansatz für 35 min bei 37°C geschüttelt. Die transformierten *E. coli* Bakterien wurden auf 2YT-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator aufbewahrt.

3.1.4 Plasmid-DNA Präparation

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle unabhängig von der chromosomalen DNA vermehrt werden. Auf den unterschiedlichen Eigenschaften von chromosomaler und Plasmid-DNA bei ihrer Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung beruhen die hier verwendeten Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA, die eine Abwandlung des Protokolls von Birnboim und Doly (1979) darstellen. Zur Plasmidpräparation wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet, dem eine modifizierte

Methode der alkalischen Lyse, sowie der Bindung von DNA an geeignete Säulenmaterialien zugrunde liegt. Die Plasmidlösung wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.5 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA auf einem 1 % Agarosegel und Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

3.1.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

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

3.1.7 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen können spezifische Sequenzen in einem DNA-Strang erkennen und unter Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spalten (McClarin *et al*, 1986). Die Spaltprodukte tragen an den 5'-Enden eine Phosphatgruppe, an den 3'-Enden eine Hydroxylgruppe. In der Gentechnologie werden am häufigsten Typ II-Endonukleasen verwendet. Diese schneiden die DNA innerhalb einer für das Enzym charakteristischen Erkennungssequenz aus 4-8 Basenpaaren. Sie erzeugen dabei glatte bzw. 3'- oder 5'-überhängende Enden.

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

Die Spaltung von DNA erfolgte nach den Vorschriften der Lieferanten der entsprechenden Enzyme unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Die Volumina betragen 20 μl für analytische Verdauung bis zu 1 μg DNA und 50 μl für präparative Verdauung bis 5 μg DNA. Die Enzyme wurden mit 2-5 U für 1 h bis 3 h eingesetzt.

3.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden

In linearisierte Plasmide, die kompatible Enden besitzen, lassen sich nur schwer DNA-Fragmente einsetzen, da der größte Teil der Plasmide religiert. Um diese Rückligation zu verhindern, werden die 5'-Phosphate der Plasmid-DNA durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Zur Dephosphorylierung wurden zur linearisierten DNA 1-2

Einheiten alkalischer Phosphatase hinzugegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt kann auch bereits parallel zum Verdau durchgeführt werden. Danach wurde eine Hitzeinaktivierung für 15 min bei 65°C durchgeführt. Durch diese Behandlung werden die Zn^{2+} -Ionen der Phosphatase, die für die Stabilität der Untereinheiten und seine katalytische Aktivität notwendig sind, chelatisiert. Das denaturierte Enzym kann dann durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aus der Probe entfernt werden.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und Mg^{2+} -Ionen die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen. Wurde der Vektor zuvor mit alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert, so besitzt das rekombinierte DNA-Molekül in beiden Strängen je einen Einzelstrangbruch, an dem eine 3'-Hydroxylgruppe des Inserts auf eine 5'-Hydroxylgruppe des Vektors trifft. Dennoch ist das DNA-Molekül stabil genug für eine Transformation in eine Bakterienzelle, in der Reparaturenzyme des Wirtes den Einzelstrangbruch beheben.

Für die Ligation wurden 20 ng Vektor-DNA pro Reaktionsansatz (20 µl) in 1 x Ligationspuffer mit 3 U T4-DNA-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 2-3 h bei Raumtemperatur oder für über Nacht bei 16°C. Die molaren Verhältnisse der Ligationspartner (Insert : Vektor) lagen bei 3 : 1. Standardmäßig wurden jeweils Kontrollen ohne Insert und ohne T4-Ligase mit durchgeführt. Sie zeigen, ob der Vektor ausreichend dephosphoryliert war und ob ungeschnittener Vektor in der Probe enthalten war.

3.1.10 DNA- Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde als Standardmethode zur Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale 1,0-1,5 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Kochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca 60°C wurde die entsprechende Menge Ethidiumbromid hinzugegeben und die Lösung in die Horizontalgelapparaturen gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 x TAE überschichtet, die DNA-Proben mit 6 x Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 65-90 V konstant. Als Längenstandard wurde parallel zu den Proben ein kommerzieller Standard elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht (254/302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1988) lassen sich beliebige Teile einer Nukleinsäuresequenz, der Matrize, *in vitro* selektiv vervielfältigen oder verändern. An hitzedenaturierte Matrize werden zwei zum Randbereich des zu amplifizierenden

Genbereiches komplementäre Oligonukleotide (Primer) bei niedriger Temperatur gebunden (Annealing). Dieser anhybridisierte doppelsträngige Bereich dient der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Polymerisation des komplementären DNA-Stranges. Die Polymerisation erfolgt in Anwesenheit von Desoxynukleotiden vom 5'- zum 3'-Ende. Die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge werden im nächsten Schritt durch Erhitzen wieder zu Einzelsträngen denaturiert, an die wiederum die Primer hybridisieren können. Da in allen folgenden Zyklen der PCR auch die neu synthetisierte DNA als Template-DNA dient, erfolgt die Amplifikation der DNA-Matrize exponentiell. Für die DNA-Polymerisation wird rekombinante *Pwo*-DNAPolymerase verwendet. Diese zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate (2×10^{-6}) aus, welche durch eine 3'→5' Exonukleaseaktivität erreicht wird.

Es wurden ca 10 ng des DNA-Templates mit je 25 pmol Plus- und Minusstrang-Primer, 5 µl 10 x *Pwo*-DNA-Polymerasepuffer, 1 µl dNTP-Mix sowie 2-3 U *Pwo*-Polymerase versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit H₂O aufgefüllt. Für Standardansätze wurden die PCR-Parameter abgeschätzt mit den Annahmen, dass *Pwo*-Polymerase etwa 1 kb je min synthetisiert und die Annealing-Temperatur der Primer mit der „2+4-Regel“ bestimmt werden kann.

Das Standardprogramm sah wie folgt aus:

Vorgang	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	1	93	1
Denaturierung	1	93	
Annealing	2	55	30
Elongation	3	72	
Elongation	10	72	1

Die PCR-Reaktion wird in einem dünnwandigen Reaktionsgefäß in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Personal Cycler oder T Gradient, Biometra) durchgeführt.

3.1.12 Ortsgerichtete Mutagenese (GeneTailor™)

Für ortsgerichtete Mutagenese wurde das GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System der Firma Invitrogen verwendet. Die Plasmid-DNA wird für 1 h bei 37°C mit DNA-Methylase methyliert. Anschließend wird das Plasmid in einer PCR-Reaktion mit zwei überlappenden Primern, von denen einer die Mutation trägt, amplifiziert. Das PCR-Produkt ist lineare doppelsträngige DNA, welche die Mutation enthält. Der gesamte PCR-Ansatz wird in *E. coli* transformiert und dort zirkularisiert. Die methylierte Template-DNA wird von der *E. coli* eigenen *McrBC* Endonuklease abgebaut, so dass nur noch das unmethylierte, mutierte Produkt in den Bakterien verbleibt.

Das Standardprogramm für die PCR sah wie folgt aus:

Vorgang	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	2	94	1
Denaturierung	0,5	94	
Annealing	0,5	55	20
Elongation	1min / kb DNA	72	
Elongation	10	72	1

3.1.13 Reinigung von PCR-Produkten

Bevor ein durch PCR gewonnenes DNA-Fragment durch Restriktionsendonukleasen geschnitten werden kann um es als Insert in einen Vektor zu ligieren, muss die DNA-Polymerase entfernt werden. Ansonsten würde die bei 37°C nur wenig aktive DNAPolymerase, die durch Restriktionsendonukleasen generierten überhängenden Enden wieder mit Nukleotiden zu einem glatten Ende auffüllen. Dadurch wäre eine nachfolgende Ligation des Inserts nicht mehr möglich. Die Reinigung erfolgt durch das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Vorschrift des Herstellers. Hierbei bindet selektiv die im PCR-Reaktionsgemisch enthaltene DNA an eine mit Silicagel beschichtete Membran. Die Membran bindet nur DNA-Fragmente von 100-10000 Bp, so dass Primer und Template-DNA entfernt werden.

3.1.14 Sequenzierung von DNA

Für Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurde der „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Perkin Elmer verwendet. Dabei handelt es sich um ein PCR-Kettenabbruch-System (Sanger et al., 1977), bei dem die zum Abbruch führenden Nukleotidderivate 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen (Smith et al., 1986). Die DNA-Fragmente werden durch eine Kapillargelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und beim Passieren eines Fensters durch Anregung mit LASER-Licht zur Fluoreszenz gebracht. Die je nach Nukleotid bzw. Fluorophor emittierten unterschiedlichen Wellenlängen werden fokussiert, von einem Spektrographen nach Wellenlänge zerlegt und simultan von einer CCD-Kamera (charge coupled device) aufgenommen und digitalisiert. Anschließend wurden die Rohdaten von der ABI Prism *DNA Sequencing Analysis 3.0* Software ausgewertet. Aus der Abfolge der Fluoreszenzsignale kann die Gesamtsequenz ermittelt werden.

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 200 ng DNA pro Ansatz verwendet.

Reaktionsansatz: 200 ng DNA
 1,5 pmol Oligonukleotid-Primer
 2,0 µl Reaktionsmix BigDye-Kit
 1,0 µL 5x BigDye Sequencing Puffer
 ad 10 µl HPLC-H₂O

Das Standardprogramm für die PCR sah wie folgt aus:

Vorgang	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	30	96	
Annealing	15	50	25
Elongation	240	60	

Zum Reaktionsansatz kamen anschließend an die PCR 90 µL HPLC-H₂O, 10 µL 3M NaAc pH 4,6 und 250 µL Ethanol (100 %). Nach gründlichem mixen wurde alles für 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 250 µL Ethanol (70 %) gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µL HPLC-H₂O aufgenommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

3.2 Produktion und Nachweis von Proteinen

3.2.1 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde mit dem „TNT Coupled Reticulocyte Lysate System“ gemäß den Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt. Ausgehend von zirkulärer Plasmid-DNA erfolgt hierbei in einem 12,5 µl Reaktionsansatz sowohl die *in vitro* Transkription der RNA mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase als auch die *in vitro* Translation. Die radioaktive Markierung der translatierten Proteine erfolgte mit [³⁵S]-Methionin. Ein typischer Ansatz sah wie folgt aus:

6,25 µL	Reticulozyten-Lysat
0,5 µL	TNT-Puffer
0,25 µL	Aminosäuremix ohne Methionin
0,25 µL	RNAse Inhibitoren
0,25 µL	SP6-Polymerase
0,5 µL	[³⁵ S]-Methionin
4,5 µL	DNA (ca. 400 ng)

3.2.2 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine aus *E. coli*

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine fand das Glutathion-S-Transferase (GST) System Anwendung. Die dazu in die Bakterien eingebrachten Konstrukte leiten sich vom Plasmid pGEX (Amersham Pharmacia Biotech) ab, das die Sequenz für GST (aus *Schistosoma japonicum*) unter der Kontrolle eines Promotors enthält, der mit Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) dauerhaft induzierbar ist. Das Gen für das aufzureinigende Protein wurde C-terminal an die GST-Sequenz kloniert.

Die Plasmide, welche für die GST-Fusionsproteine kodierten, wurden in kompetente *E. coli* BL21 DE3-Zellen transformiert. Jeweils eine Kolonie der zur Proteinexpression benötigten Bakterien wurde in 10 mL 2YT-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen

angeimpft und über Nacht (12-16 h) bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 mL 2YT-Medium mit 4 mL der Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Proteinsynthese mit 0,5 mM IPTG für 3 h bei 37°C induziert. Die Bakterienlösung wurde dann bei 4°C und 5000 rpm im GSA-Rotor 20 min abzentrifugiert und das Pellet in 23 mL Sonication Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall auf Eis (40 W, 2 x 1,5 min, 50 % Pulse). Das Bakterienlysat wurde für 25 min bei 4°C und 15000 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert und der Überstand auf die vorbereiteten Säulen gegeben. Diese wurden dazu vorher mit je 400 µL Glutathion-Sepharose 4B beladen und mit einem Säulenvolumen PBS äquilibriert. Nachdem das Bakterienlysat die Säule passiert hatte, wurde mit je zwei Säulenvolumen Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden in 6 - 8 Fraktionen von je 500 µL Elutionspuffer von der Säule eluiert. Während der Aufreinigung wurde bei allen Schritten ein Aliquot entnommen, um diese anschließend auf einem Coomassie-Gel zu analysieren. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinausbeute wurden vereinigt und gegen 10 mM Tris pH 7,5 / 100 mM NaCl dialysiert. Der Puffer wurde mehrmals gewechselt und enthielt bei den ersten beiden Malen noch zusätzlich 0,1 % Mercaptoethanol. Dieses entfernte das Glutathion aus der Proteinlösung. Nach der Dialyse wurde das Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Aufreinigung rekombinanter H₆-Fusionsproteine aus *E. coli*

Die für die H₆-tag Aufreinigung verwendeten Plasmide leiten sich vom pQE-Vektor ab. Dieser kodiert für eine Abfolge von 6 Histidinen, welche an Ni-NTA Agarose binden können. Das Gen für das aufzureinigende Protein kann N- oder C-terminal an die H₆-Sequenz kloniert werden.

Die Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4] transformiert. Die ersten Schritte bis einschließlich der Zentrifugation im SS34-Rotor sind analog denen der GST-Aufreinigung (siehe dort). Die Säulen wurden mit 400 µL Ni-NTA Agarose beladen und mit einem Säulenvolumen Sonication Puffer äquilibriert. Nachdem das Bakterienlysat die Säule passiert hatte, wurde zuerst mit zwei Säulenvolumen Sonication Puffer und anschließend mit einem Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die H₆-Fusionsproteine wurden in 6 - 8 Fraktionen von je 500 µL Elutionspuffer von der Säule eluiert. Während der Aufreinigung wurde bei allen Schritten ein Aliquot entnommen, um diese anschließend auf einem Coomassie-Gel zu analysieren. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinausbeute wurden vereinigt und gegen 10 mM Tris pH 7,5 / 100 mM NaCl dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Produktion von Proteinen mit *Strep-tag*® II in *E. coli*

Die Expression und Aufreinigung von *Strep-tag*® II Proteinen, die sowohl die proteolytisch aktive leichte Kette als auch schwere Kette enthielten, wurde unter speziellen Sicherheitsauflagen durchgeführt. Maßgeblich für die Produktion war die S2-Sicherheitsverordnung (Aktenzeichen: 501h-40654/3/57/3), die mit zusätzlichen

Sicherheitsauflagen, wie u.a. dem Tragen einer P3-Atmungs- und Schutzmaske bei einigen Arbeitsschritten, versehen war.

Die Neurotoxine werden als *Strep*-tag® II-Fusionsproteine exprimiert. Bei dem *Strep*-tag® II handelt es sich um ein aus acht Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) bestehendes Oligopeptid, das gentechnologisch an den C-Terminus der Proteine fusioniert wird. Die Aufreinigung der Proteine basiert auf der starken Affinität des *Strep*-tag® II zu einem modifizierten Streptavidin, das als *Strep*-Tactin® bezeichnet wird. Die Fusionsproteine binden während der Aufarbeitung an immobilisiertes *Strep*-Tactin®, wodurch sie von anderen Proteinen getrennt werden, die nicht an *Strep*-Tactin® binden können. Nach einem Waschschrift können die Fusionsproteine mit einer Lösung von Desthiobiotin von der *Strep*-Tactin®-Säulenmatrix eluiert werden. Desthiobiotin ist ein Analogon des Biotins, das den natürlichen Liganden des Streptavidins darstellt. Es bindet ebenfalls an *Strep*-Tactin® und verdrängt auf diese Weise die gebundenen Fusionsproteine von der Säulenmatrix.

3.2.4.1 Induktion der Genexpression in *E. coli*

Zur rekombinanten Expression der clostridiellen Neurotoxine wurden die jeweiligen Plasmide zunächst in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4] transformiert. Dieser enthält das Plasmid pREP4, welches die Expression des rekombinanten Proteins ohne IPTG-Induktion verhindert. Eine Einzelkolonie wurde in 5 mL 2YT-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) und Kanamycin (25 µg/mL) angeimpft. Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag unter gleichen Bedingungen eine 600 mL Kultur angeimpft, die bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wuchs, bevor die Expression der *Strep*-tag® II-Fusionsproteine mit IPTG induziert wurde. Die Induktion mit IPTG erfolgte stufenweise bis zu einer Konzentration von 0,2 mM und bei Raumtemperatur, um dem Expressionsapparat der Bakterien genügend Zeit für die korrekte Translation und Faltung der unnatürlich großen Neurotoxine zu geben.

Stufenweise Induktion mit IPTG:

Zeit [min]	Volumen [µL]	IPTG-Lösung [M]	IPTG-Konzentration [mM]
0	20	0,1	0,0033
30	40	0,1	0,0099
60	80	0,1	0,0231
90	150	0,1	0,0479
120	30	1,0	0,0974
150	60	1,0	0,1964

Die induzierten Kulturen schüttelten bei 200 rpm und Raumtemperatur über Nacht. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 4°C für 30 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder bis zur Aufarbeitung bei -20°C eingefroren oder direkt weiter verarbeitet.

3.2.4.2 Ultraschallaufschluss

Das Pellet wurde nach dem Auftauen in 23 mL 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 resuspendiert. Um die Proteolyse des rekombinant hergestellten Proteins zu verhindern, wurden die *E. coli*-eigenen Proteasen mit 115 µl Benzamidin [1 M], 58 µl PMSF [0,2 M] und 46 µl Pepstatin A [0,5 mg/mL] inhibiert.

Die resuspendierten Zellen wurden im Eisbad mit Ultraschall lysiert (7 min Duty cycle 30 %, jeweils 50 W). Anschließend wurden die Zelltrümmer 20 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Zytosolische Proteine, unter anderem das rekombinante Protein, verblieben dabei im Überstand. Ein Aliquot dieser Probe wurde mit 4 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und bei -20 °C gelagert. Aus dieser Kontrolle wurde nach Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels ersichtlich, ob das gesuchte Protein durch die Bildung von Einschlusskörpern oder ungenügendem Zellaufschluss in das Pellet gelangte, oder ob es sich in löslicher Form im Zytosol befand und durch die Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden konnte.

3.2.4.3 Aufreinigung durch Affinitätschromatographie

Der bei der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde in eine zuvor mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 äquilibrierte *Strep*-Tactin®-Säule überführt. Anschließend wurde die Säulenmatrix zweimal mit 5 mL 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 gewaschen und das an der Matrix gebundene Protein wurde dann fraktionsweise (6-8 Fraktionen, je 400 - 600 mL) mit 10 mM Desthiobiotin eluiert.

Die Säulen können mit 1 mM HABA in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 regeneriert und für weitere Aufreinigungen benutzt werden. Vom Säulendurchfluss sowie den Eluatzen werden jeweils 18 µl mit 6 µl 4 x Gelladepuffer versetzt und 10 µl auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, in Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.5 Aufkonzentration von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit Hilfe der AMICON Stirred Cells Series 8000 aufkonzentriert. Dabei wurde die Lösung mittels Druck durch eine Ultracel™ PLC Membran gepresst. Die Porengröße der Membran wurde so gewählt, dass das aufzureinigende Protein zurückgehalten wurde. Für Neurotoxine wurde generell eine Membran mit einem Molekulargewichtslimit von 30000 benutzt.

Die aufkonzentrierte Lösung wurde bei 4°C für 5 min und 14000 rpm abzentrifugiert, um ausgefallenes Protein zu entfernen. Anschließend wurde die neue Konzentration mittels SDS-PAGE bestimmt.

3.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

3.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgel

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

Zusammensetzung der Gießlösungen für je 1 Minigel:

Trenngel	10 %	12,5 %	15 %
30% AA-Bis-Mix 29:1	1,65 mL	2,063 mL	2,47 mL
1 M Tris pH 8,8	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL
dH ₂ O	2,035 mL	1,638 mL	1,23 mL
10% SDS	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
10% APS	30 µL	30 µL	30 µL
Sammelgel	5,7 %		
30% AA-Bis-Mix 29:1	0,415 mL		
1 M Tris pH 6,8	0,313 mL		
dH ₂ O	1,75 mL		
10% SDS	0,025 mL		
TEMED	5 µL		
10% APS	20 µL		

3.2.6.2 Probenvorbereitung

Die hier verwendeten Geltaschen nehmen ein Probenvolumen von 10 μl auf. Die Proteine oder Bakterienlysate wurden mit 1/3 des Probenvolumens an 4 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und 5 min bei 99°C denaturiert.

3.2.6.3 Elektrophorese

Zwei Gele wurden senkrecht in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Das dabei entstehende Kathoden-Pufferreservoir sowie das Anoden-Pufferreservoir wurden mit LaemmLi-Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden die Taschen des Sammelgels mit den Proben und Molekulargewichtsstandard beladen. Die Elektrophorese wurde bei 22 mA pro Gel durchgeführt, bis der Farbmarker des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

3.2.6.4 Coomassiefärbung

Das Gel wurde 30-45 min in Coomassie-Lösung geschwenkt und danach mehrere Stunden lang entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Während des Entfärbens wurde die Entfärbelösung von Zeit zu Zeit gegen frische ausgetauscht. Bis zum Trocknen wird das Gel dann in Wasser aufbewahrt. Zum Trocknen wurde ein Whatman-3MM-Papier mit Wasser angefeuchtet und das Gel darauf luftblasenfrei ausgebreitet. Danach wurde es 65 min lang unter Vakuum auf 74°C erwärmt, bis das Gel vollständig trocken war.

3.2.6.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration aufgereinigter Proteine erfolgte durch SDS-PAGE zusammen mit einer BSA-Standardreihe. Von den parallel zu bestimmenden Proteinen wurden je 2-3 Proben mit einem Volumen zwischen 0,5 und 5 μl sowie je 10 μl einer BSA-Standardreihe mit 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; und 1,6 mg/10 μl auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mit einer CCD-Kamera fotografiert. Die einzelnen Proteinbanden wurden mit dem Programm TINA detektiert und integriert. Durch lineare Regression wurde aus den so erhaltenen OD x mm^2 -Werten und den bekannten BSA-Konzentrationen eine Kalibrationsgerade erstellt, aus welcher unter der Annahme der gleichen Coomassie-Färbbarkeit von BSA und dem zu bestimmenden Protein die Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine errechnet wurden. Durch diese Methode können, im Gegensatz zur Bestimmung über photometrische Messungen, auch die Konzentrationen nicht 100 % reiner Proteine mit vergleichbarer Genauigkeit bestimmt werden, da wirklich nur die gewünschten Proteinbanden ausgewertet werden.

3.2.6.6 Bestimmung des Proteingehaltes nach Biorad

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration verschiedener Proben wurde mit dem *DC Protein Assay Kit* von Biorad durchgeführt. Es stellt eine Modifikation der Proteinbestimmung nach Lowry dar (Lowry *et al.*, 1951), bei der Proteine mit einer alkalischen Kupfertartratlösung und Folinreagenz reagieren. Es kommt zunächst zu einer Reaktion zwischen Protein und Kupfer. Das kupferbehandelte Protein bewirkt anschließend eine Reduktion des Folinreagenzes, das dabei 1, 2 oder 3 Sauerstoffatome verliert. So entsteht ein kolloidales, molybdän- und wolframhaltiges, lösliches Mischoxid mit einer charakteristischen blauen Farbe und einem Absorptionsmaximum bei 750 nm. Ein definiertes Volumen der Probe wurde mit dH₂O auf 25 µl aufgefüllt und mit 125 µl Reagenz A versetzt. Der Ansatz wird gemischt, 1 mL Reagenz B hinzupipettiert, erneut gemischt und vor der Messung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um Messfehler zu minimieren, werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve werden BSA-Probenstandards mit Konzentrationen von 0,2, 0,5, 0,8, 1,2 und 1,5 mg/mL verwendet.

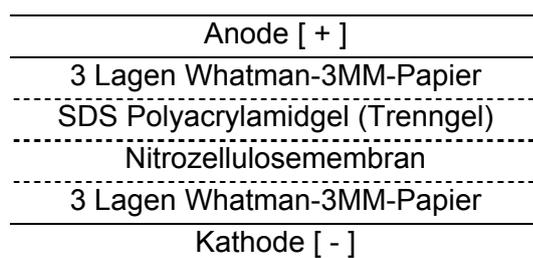
3.2.7 Westernblot

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

3.2.7.1 Transfer auf eine Blot-Membran

Der Proteintransfer erfolgte durch Naß-Blot-Verfahren in einer kühlbaren Westernblotkammer, in die vier Gestelle zur Aufnahme jeweils eines Blot-Ansatzes eingesetzt werden können. Zunächst wurden 6 Whatman-3MM-Papiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und mit Blotpuffer befeuchtet.

Der Schichtaufbau von Anode zu Kathode sah generell folgendermaßen aus:



Das Kunststoffgestell wurde vertikal in die mit Blotpuffer gefüllte Naß-Blotkammer gesteckt. Im Blotstapel dürfen sich keine Luftblasen befinden, da diese eine gleichmäßiges

elektrisches Feld und damit einen homogenen Transfer verhindern. Außerdem ist darauf zu achten, dass sich die Blotpapiere ober- und unterhalb des Polyacrylamidgels nicht berühren, da es sonst an dieser Stelle zu einem erleichterten Stromfluss kommt, was ebenfalls den Transfer des Proteins aus dem Gel auf die Membran behindert.

Der einzustellende Stromfluss hängt von der Fläche des Gels ab. Bei einem 40 cm² Gel wurde für 1 h 20 min bei 200 mA geblottet. Zur Überprüfung eines vollständigen Proteintransfers kann das Polyacrylamidgel anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt werden.

3.2.7.2 Immunodetektion von immobilisierten Proteinen

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

Die Immundetektion von immobilisierten Proteinen erfolgte nach SDS-PAGE und dem Proteintransfer auf Nitrozellulose. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran erfolgte die Behandlung mit Block-Lösung (5 % w/v Magermilchpulver, 0,05 % v/v Tween 20 in PBS) für 1 Stunde bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Danach wurde die Membran mit den in PBS-Puffer (0,05 % v/v Tween 20 in PBS) verdünnten Primär-Antikörpern ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3 x 20 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit 30 mL HRP-konjugiertem sekundärem Antikörper (1:10000 - 1:15000) in PBS-Puffer (0,05 % v/v Tween 20 in PBS) erfolgte für 2 Stunden bei RT. Danach wurde die Membran erneut 3 x mit PBS gewaschen. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mittels Immunodetektions-System SuperSignal® West Femto analog den Anweisungen des Herstellers. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase aus Meerrettich katalysiert die Oxidation von Luminol, einem Diacylhydrazin, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Nach der Oxidationsreaktion befindet sich das Produkt zunächst in einem energetisch angeregten Zustand. Beim Übergang eines Elektrons aus diesem angeregten Zustand in den Grundzustand wird Energie frei, die in Form eines Lichtquanten abgegeben wird. Diese aufgetretenden Lichtblitze wurden im LAS 3000 detektiert und als digitales Bild gespeichert.

3.3 Protein-Analyse

3.3.1 ELISA

Das ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurde 1971 erstmals von Engvall und Perlman dargestellt. Dieses Assay wird zur Bindungsanalyse eingesetzt. Ein Bindungspartner wird auf einer Oberfläche immobilisiert. Anschließend wird der zweite Partner dazugegeben und nach einigen Waschschrritten wird der gebundene zweite Partner mittels eines Antigens nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt durch eine

enzymkatalysierte Chromogenumwandlung. Das farblose Chromogen wird zu einem gefärbten und quantifizierbaren Farbstoff umgesetzt.

Die Wells einer 96-Well Platte wurden mit 1 μg G_T1b Gangliosid beschichtet und anschließend zweimal mit PBS / 0,05 % Tween gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde für 2 h mit 0,5 % BSA in PBS / 0,05 % Tween inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die zu testenden rekombinanten Neurotoxine für 2 h in die Wells gegeben. Diese wurden dann dreimal gewaschen, für 20 min mit Avidin (2 μg / mL) und dann für 2 h mit *Strep-Tactin*® AP (1:500) inkubiert. Für die Farbreaktion wurde 1 mg / mL PNPP in Glycinpuffer dazugegeben und nach 5 min mit 3 M Natronlauge abgestoppt. Bei 405 nm wurde die Platte im Plate-Reader ausgelesen und ausgewertet.

3.3.2 Aktivierung von clostridiellen Neurotoxinen

Zwischen L- und H-Kette clostridieller Neurotoxine befindet sich eine proteolytisch sensitive Region, die von zwei Cysteinen eingerahmt wird. Zur Freisetzung der katalytischen Funktion (LC) wird das Neurotoxin in diesem Bereich hydrolysiert. Rekombinant hergestellte Toxine müssen für einige Arbeiten nach der Aufreinigung noch aktiviert/genickt werden. Dazu werden sie an der proteolytisch sensitiven Region zwischen L- und H-Kette *in vitro* von Trypsin oder Thrombin gespalten.

3.3.2.1 Trypsinaktivierung

Es wurde mit auf Agarosekugeln immobilisiertem Trypsin gearbeitet, dessen Konzentration 12 U / mL betrug. Eingesetzt wurde das Trypsin mit 0,001 U / μg zu spaltenes Neurotoxin. Die optimale Inkubationsdauer wurde für jedes rekombinante Toxin durch Analyse verschiedener Zeitwerte ermittelt und lag zwischen 5 und 20 min. Die Spaltung erfolgte bei 30°C. Ein Aliquot jedes Spaltansatzes wurde auf einem Coomassie Gel aufgetragen, um die Effektivität der Spaltung und die neue Proteinkonzentration zu ermitteln.

3.3.2.2 Thrombinaktivierung

Es wurde mit biotinyliertem Thrombin gearbeitet, dessen Konzentration 1 U / μL betrug. Eingesetzt wurde das Trypsin mit 0,01 U / μg zu spaltenes Neurotoxin für 24 h bei 4°C. Anschließend wurde an Agarosekugeln gekoppeltes Benzamidin für 2 h dazugegeben. Das Biotin bindet an das Benzamidin und so kann das nun an die Agarosekugeln gebundene biotinylierte Thrombin durch einen Zentrifugationsschritt aus dem Ansatz entfernt werden. Ein Aliquot jedes Spaltansatzes wurde auf einem Coomassie Gel aufgetragen, um die Effektivität der Spaltung und die neue Proteinkonzentration zu ermitteln.

3.3.3 *In vitro* Toxizitätsassay am *Nervus phrenicus* der Maus

Um die Toxizität von clostridiellen Neurotoxinen zu bestimmen, kann das Toxin im Tierversuch gespritzt werden und eine LD50 bestimmt werden. Dieses Experiment kann auf einfache Weise durch Einsatz von Zwerchfellen der Maus nach Habermann *et al.* (1980) ersetzt werden. Man ermittelt die Dosis-abhängige Zeitkurve bis zur Vergiftung über die Paralyse elektrisch angeregter (1 Hz) Muskelzuckungen des *nervus phrenicus*. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass eine Wirksamkeit von rekombinanten Neurotoxin Präparationen deren Bindung und Internalisation in Motoneurone voraussetzt, d.h. es werden zusätzlich zur Proteaseaktivität auch die biologischen Aktivitäten der H-Ketten überprüft. Die Aussagekraft dieser Tests am Zwerchfell entspricht Toxizitätstests an lebenden Mäusen (persönliche Mitteilung: Prof. Dr. H. Bigalke). Diese Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Dr. H. Bigalke, in dessen Labor dieser Test standardmäßig etabliert ist, der Abteilung Toxikologie der MH-Hannover durchgeführt. Aus männlichen weißen Albinomäusen wird das Zwerchfell präpariert, in 4 mL physiologischem Krebs-Ringer Puffer gelagert und mit Toxinpräparationen in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Während des gesamten Versuchs wird das Zwerchfell mit einer Frequenz von 1 Hz über zwei Oberflächen-Ringelektroden elektrostimuliert, so dass über den *nervus phrenicus* Kontraktionen des Zwerchfells ausgelöst werden. Diese isometrischen Kontraktionen werden direkt über einen Kraftwandler auf ein Messgerät übertragen und mit der VitroDat Online Software (FMI GmbH) aufgenommen und ausgewertet. Nach Applikation des Toxins bestimmt man die Zeit, in der eine Abnahme der Kontraktionsamplitude auf 50 % beobachtet wird. Dieser Wert geht in die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven ein und ist ein direktes Maß für die Toxinkonzentration. Um die physiologische Toxizität verschiedener Mutanten zu berechnen, wird zunächst eine Dosis-/Wirkungskurve vom rekombinanten Wildtyp aufgenommen. Jede Konzentration wird dabei mehrfach gemessen, da sich jede Zwerchfellpräparation individuell verhält. Von den produzierten Mutanten wird jeweils mindestens ein Doppelwert einer Konzentration gemessen, bei der die Dosis-/Wirkungskurve des rekombinanten Wildtyps die größte Steigung aufweist. In diesem „linearen“ Bereich können die Toxizitäten verschiedener Proteine verglichen werden. An die aufgenommene Wildtypkurve wird eine Funktion angepasst, mit welcher die Paralysezeiten der mutierten Proteine in Relation gebracht werden. Daraus ergeben sich die Toxizitäten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

3.3.4 GST-Pull-Down Assays

Um Unterschiede in der Bindung einzelner Mutanten zu untersuchen, wurden GST-Pull-Down Assay durchgeführt. Dabei wurden die Bindungspartner der Mutanten als GST-Fusionsproteine hergestellt, aufgereinigt und an GT-Sepharosebeads gebunden. Nun wurden die Mutanten als radioaktiv markierte Proteine hinzugegeben und nach diversen Inkubations- und Waschschritten die gebundene Menge gemessen.

Über Nacht wurden je Ansatz 10 µL GT-Sepharosebeads mit 150 pmol GST-Fusionsprotein bei 4°C taumelnd inkubiert. Es wurde immer parallel eine Kontrolle nur mit GST Protein durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Beads dreimal mit TBS gewaschen und für 3 h mit den *in vitro* translatierten Mutanten bei 4°C taumelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit TBS gewaschen und die Flüssigkeit vollständig abgenommen. Die Beads wurden dann in 20 µL TBS sowie 10 µL 10x Loadingpuffer aufgenommen und für 2 min bei 95°C denaturiert. Jeweils 10 µL der Ansätze wurden auf einem SDS-Gel zur Analyse aufgetragen, anschließend auf einem Gel Trockner (Gel Dryer Model 543, BioRad) getrocknet und danach über Nacht zur Belichtung auf eine *phosphor imager*-Platte gelegt. Das Auslesen der belichteten Platten erfolgt am nächsten Tag mit Hilfe eines *phosphor imagers* (BAS 1500, FujiFilm). Die Proteinbanden werden mit Hilfe einer Software (Tina 2.0, RayTest Isotopen Messgeräte GmbH) quantifiziert.

3.3.5 Synaptosomen-Bindungsassay

3.3.5.1 Präparation von Rattenhirn Synaptosomen

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

Als Ausgangsmaterial für die Synaptosomenpräparation diente das Gehirn einer frisch getöteten WISTAR-Ratte (männlich, ca. 150 g, Zentrales Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover), der das Cerebellum, das Stammhirn und der größte Teil der weißen Substanz entfernt wurde. Die Aufreinigung erfolgte mit eisgekühlten Reagenzien bei 4°C. Das Gehirn wurde einmal mit Homogenisationspuffer (HB) gewaschen und in 10 mL HB, dem ein Proteaseinhibitorcocktail (AEL (1:250), ABP (1:250) und PMSF (40 mg/mL in 2-Propanol; 1:500) zugesetzt worden war, mit einem Glas/Teflon-Homogenisator bei 800 rpm durch acht- bis zehnmaliges Auf- und Abbewegen homogenisiert. Die anschließenden Zentrifugationen erfolgten in 15 mL Polycarbonat-Röhrchen (Kendro) in der Kühlzentrifuge Sorvall RC5C/B bei 4°C, SS-34 Rotor. Zunächst wurde das Homogenisat bei 2600 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet (P1) wurde mit 10 mL HB gewaschen, die Überstände (Ü1) vereinigt und bei 10000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Dieses Pellet (P2) wurde mit 10 mL HB gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das gewaschene Pellet, welches die Synaptosomen enthielt, wurde in 2 mL HB resuspendiert und vorsichtig auf einen dreilagigen Percoll Gradienten (10, 15 und 23% Percoll in HB, Volumen der Schichten jeweils 3 mL) pipettiert. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 16500 rpm für 7 min. Anschließend wurde die Synaptosomenfraktion an der Interphase der 15%- und der 23%-Stufe mit einer Pasteurpipette entnommen, mit physiologischem Puffer (PB) auf ein Volumen von 10 mL gebracht und bei 1000 rpm für 15 min zentrifugiert. Diese intakten Synaptosomen wurden im gewünschten Volumen PB oder PB-BSA Puffer aufgenommen und für weitere Experimente benutzt. Es wurde eine Gesamtproteinbestimmung nach Biorad (Kap. 3.2.6.) durchgeführt, um die Konzentration für folgende Experimente zu ermitteln.

Proteaseinhibitoren-Cocktails:

AEL: Aprotinin (1 mg/mL), E64 (1 mg/mL), Leupeptin (1 mg/mL) in dH₂O

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

3.3.5.2 Bindung an Synaptosomen

Um die Bindungseigenschaften der hergestellten Mutanten zu überprüfen, wurden Bindungsexperimente an frisch präparierten Rattenhirn-Synaptosomen durchgeführt. Die *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Mutanten wurden auf Eis mit je ungefähr 100 µg synaptosomalem Protein versetzt. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Es wurden mindestens Doppelwerte, eine Kontrolle ohne Synaptosomen sowie eine Translationskontrolle gemessen:

	Tr.-Kontrolle	+	+	-
Translationsmix	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Synaptosomen	-	30 µL	30 µL	-
PB/BSA Puffer	-	-	-	30 µL

Anschließend wurden die Ansätze auf Eis für 90 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze (außer der Translationskontrolle) zweimal mit PB/BSA gewaschen und bei 3500 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden mit Probenpuffer für Proteingele versetzt:

4x Puffer	8 µL			
1x Puffer		27 µL	27 µL	27 µL

Nach einem zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 95° wurden jeweils 10 µL auf einem SDS-Gel zur Analyse aufgetragen. Das Gel wurde anschließend auf einem Geltrockner (Gel Dryer Model 543, BioRad) getrocknet und danach über Nacht zur Belichtung auf eine *phosphor imager*-Platte gelegt. Das Auslesen der belichteten Platten erfolgt am nächsten Tag mit Hilfe eines *phosphor imagers* (BAS 1500, FujiFilm). Die Proteinbanden werden mit Hilfe einer Software (Tina 2.0, RayTest Isotopen Messgeräte GmbH) quantifiziert. Die Messgröße wird als *photo stimulated luminescence* (PSL) bezeichnet. Sie ist proportional zur vorhandenen ³⁵S-Aktivität in den Proteinbanden und kann deshalb zur Bestimmung der Menge an gebundenem Toxin herangezogen werden. Von den PSL-Werten jeder einzelnen Bande wird zunächst der PSL-Wert des Hintergrundes (Bkg) abgezogen. Um eine Aussage über die verbliebene Bindungsfähigkeit einer bestimmten Mutante machen zu können, wird der Anteil an bindendem Neurotoxin an der Gesamtmenge Neurotoxin im jeweiligen Translationsansatz berechnet. Vom Mittelwert der Messwerte wird dazu zunächst der Wert der Minuskontrolle abgezogen, wodurch unspezifische Bindung oder Präzipitation der Proteine berücksichtigt wird. Der dadurch erhaltene Wert wird in Relation zur Gesamtmenge an Toxin im Translationsansatz gesetzt. Dadurch wird berücksichtigt, dass in jedem Reaktionsgefäß die Translation zu einer unterschiedlichen Gesamtmenge an translatiertem Protein führen kann. Die so erhaltenen Werte werden schließlich mit denen des Wildtyp-Toxins verglichen.

3.4 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

Alle im folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen. Alle mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 90%igem Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

3.4.1 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Da das Einfriermedium DMSO enthält, was bei den aufgetauten Zellen zytotoxisch wirkt, müssen diese schnell aufgetaut und in frisches Medium überführt werden. Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde es etwa 1 min bei RT erwärmt und anschließend im Wasserbad bei 37°C aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde vorsichtig entnommen, in 5 mL kaltes Medium (4°C) überführt und 5 min bei 1000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 mL kaltem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale mit 9 mL Medium überführt. Am nächsten Tag wurde standardmäßig das Medium gewechselt, um restliches DMSO, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.4.2 Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 750 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit Medium zur Kryokonservierung (FCS mit 10 % DMSO) resuspendiert und in 1 mL Aliquoten in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einer dickwandigen Styroporbox auf -80°C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Nach 24 - 48 Stunden wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert.

3.4.3 Wachstumsbedingungen für PC-12 Zellen

Die Zellen wurden in 10 cm Zellkultur-Schalen gepflegt. Diese enthielten 10 mL RPMI 1640 - Medium mit 10 % Pferdeserum (HS), 5 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Poly-L-Lysin und 1 % Penicillin-Streptomycin. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator mit 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 100% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wachsen lose adhärent und können ohne Trypsinierung passagiert werden.

3.4.4 Trypsinieren adhärenter Zellen

Adhärente Zellen wachsen als zusammenhängende einschichtige Zellschicht unter Anheftung an eine inerte Oberfläche. Sie zeigen dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition). Weitere Zellvermehrung ist nur dann möglich, wenn „passagiert“ wird. Passagieren ist in regelmäßigen Abständen notwendig, damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und nicht durch die ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte sowie durch Mangel an Nährstoffen sterben. Dazu wurden adhärente Zellen mit Trypsin behandelt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 mL Trypsin-EDTA auf den Zellrasen gegeben und für 3 - 6 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellablösung wurde zwischenzeitlich unter dem Mikroskop kontrolliert und nach vollständiger Ablösung wurden 8 mL Medium hinzugegeben. Die Trypsinwirkung wurde durch das im Medium enthaltene Serum gestoppt und zytotoxisches EDTA wurde gebunden. Nun wurde die gesamte Flüssigkeit für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und auf neue Platten verteilt.

3.4.5 Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA kann mit Hilfe von positiv geladenen polykationischen Lipiden die Komplexierung und Aufnahme der negativ geladenen DNA in die Zellen erleichtert werden. Es wurde Lipofektamin™2000 Reagent von Invitrogen verwendet. Das Lipofektamin-Reagenz enthält zwei positiv geladene Komponenten: DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoro-acetate), ein polykationisches Lipid und DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine), ein Phospholipid. Beide Reagenzien zusammen umhüllen die Plasmid-DNA und ermöglichen über ihre hydrophoben Anteile die Fusion mit der Zellmembran. Für die Lipofektion mit Lipofektamin ist es wichtig, dass die Zellen am Vortag der Transfektion bereits in Medium ohne Antibiotika gehalten werden und dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion in hoher Zelldichte (90-95%) adhären vorliegen. Die PC-12-Zellen werden am Vortag der Transfektion ohne Antibiotika auf 10 cm Zellkultur-Schalen kultiviert. Für die Transfektion werden 12 µg DNA mit 750 µL serumfreiem Medium sowie 20 µL Lipofektamin mit 750 µL serumfreiem Medium gemischt. Die beiden Mischungen werden vereinigt, leicht geschüttelt und 20 min bei RT inkubiert. Das DNA-Lipofektamin-Gemisch wird anschließend auf die gewaschenen Zellen gegeben. Nach 16 h wird das Medium gewechselt werden und die Zellen können für weitere Assays eingesetzt werden.

3.4.6 PC-12 Zellen - Neurotoxin Assay

Mit diesem Assay wurde untersucht, ob PC-12 Zellen Neurotoxine aufnehmen und die entsprechenden Substrate in den Zellen gespalten werden. Es wurden alle Serotypen von BoNT sowie TeNT getestet. Die Toxine wurden rekombinant als volle Länge *Strep-tag*® Fusionsproteine hergestellt und für dieses Assay vorher aktiviert.

Die PC-12 Zellen wurden vor Toxinzugabe mit Gangliosiden behandelt. Dazu wurden 5 mL Gangliosidmix (250 µg / mL in MeOH) in einer 10 cm Zellkultur-Schale verdunsten lassen und anschließend die Ganglioside in 5 mL serumfreiem Medium aufgenommen.

In die so behandelte Schale wurde eine konfluente (>90 %) 10 cm Schale PC-12 Zellen gesplittet, so dass die Gangliosidkonzentration 250 µg / mL betrug. Die Zellen wurden für 24 h unter Standardbedingungen weitergepflegt.

Das Assay wurde in 24-Well Zellkultur-Platten durchgeführt. Alle Neurotoxine wurden mit 300 nM in einem Volumen von 400 µL Medium je Well vorgelegt. Nach 24 h wurden die PC-12 Zellen abzentrifugiert und in 200 µL Medium resuspendiert. In jedes Well wurden 20 µL dieser Zellsuspension verteilt und dann für 48 h unter Standardbedingungen inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die PC-12 Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 21 µL Lysispuffer resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelllysate für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit 7 µL 4x Ladepuffer versetzt und alles für 2 min bei 99°C denaturiert. 14 µL der Probe wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Für die Detektion wurden Anti-Synaptobrevin/VAMP 2 und Anti-SNAP-25 Antikörper verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierungen von Botulinum Neurotoxin Serotyp E, F und G

Im Rahmen der geplanten Arbeiten wurden zunächst die volle Länge Konstrukte von Botulinum Neurotoxin Serotyp E, F und G kloniert, da in bisherigen Experimenten nur mit einzelnen Fragmenten dieser Toxine gearbeitet wurde. Weiterhin stellte sich im Laufe der Arbeiten heraus, dass ein zweites N-terminales Affinitätspeptid (tag) ein reineres Protein lieferte. So wurden einige Konstrukte mit zusätzlichen *Tags* versehen. In den folgenden Abschnitten sind diese Arbeiten im Detail aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit erstellten volle Länge BoNT Konstrukte

Toxin	Bezeichnung	H ₆ -tag	Strep-tag®	Thrombin-schnittstelle
BoNT/E	pBoNTES-thro		✓	✓
	pH ₆ BoNTES-thro	✓	✓	✓
BoNT/F	pBoNTFS		✓	
	pH ₆ BoNTFS	✓	✓	
	pH ₆ BoNTFS-thro	✓	✓	✓
BoNT/G	pBoNTGS		✓	
	pH ₆ BoNTGS	✓	✓	
	pBoNTGS-thro		✓	✓

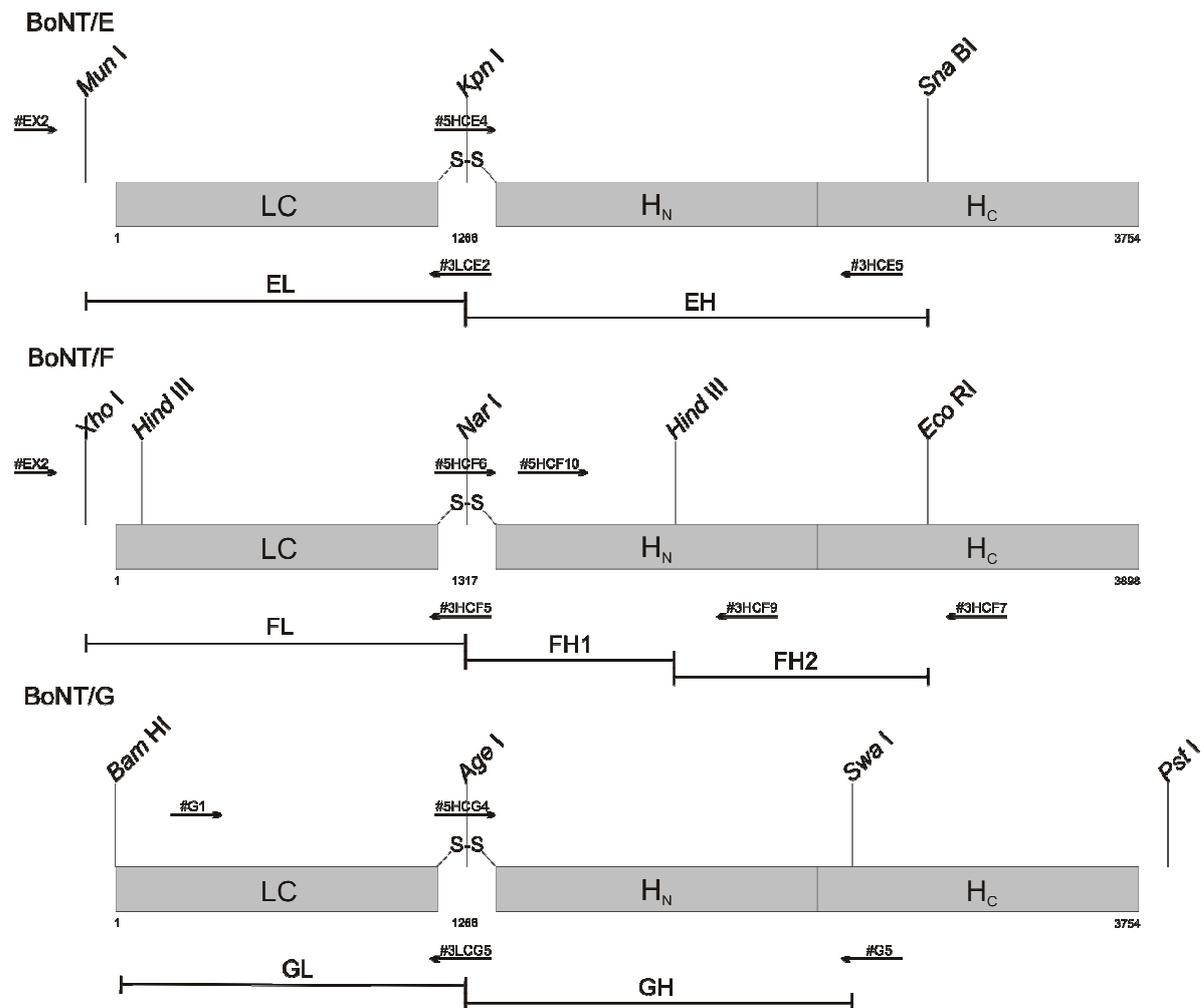


Abb. 4: Klonierungsstrategien für die volle Länge Konstrukte von BoNT/E, BoNT/F und BoNT/G. Gezeigt sind die einzelnen Domänen (LC, H_N und H_C), die Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette (S-S), die verwendeten Primer und Restriktionsschnittstellen sowie die Fragmente, welche mittels PCR erstellt wurden. Weitere Ausführungen siehe Text.

BoNT/E:

Das vorhandene Konstrukt p_HCES wt kodiert das H_C-Fragment von BoNT/E in einem pQE3 Vektor mit C-terminalem Strep-tag® (Rummel). Dieses Konstrukt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *MunI* und *SnaBI* geschnitten und der Vektor mit dem Restgen aufgereinigt. In diesen Vektor, welcher bereits den C-terminalen Bereich von BoNT/E samt *Strep-tag*® enthielt, wurden anschließend die noch fehlenden Bereiche inseriert (siehe Abb. 4). Die leichte Kette und die H_N-Domäne wurden mittels PCR-Reaktion erzeugt. An einem Konstrukt, welches die leichte Kette von BoNT/E enthält (pBN17), wurde Fragment EL hergestellt (Primer #Ex-2 und #3LCE2) und mit den Restriktionsendonukleasen *MunI* und *KpnI* geschnitten. Die H_N-Domäne EH (Primer #5HCE4 und #3HCE5) wurde am Konstrukt pGEXHE, welches die gesamte schwere Kette von BoNT/E enthielt, erzeugt und mit *KpnI* und *SnaBI* geschnitten. Alle Fragmente wurden aufgereinigt und ligiert.

Durch die Primer #3LCE2 und #5HCE4 wurde außer der *KpnI* Schnittstelle auch eine Thrombinschnittstelle in den Loop zwischen leichter und schwerer Kette eingefügt. Der Klon wurde pBoNTES-thro benannt, wobei das 'S' den C-terminalen *Strep-tag*® und 'thro' die Thrombinschnittstelle bezeichnet.

Da die Aufreinigung des neu klonierten BoNT/ES-thro bezüglich Reinheit und Menge des Proteins nicht zufriedenstellend war, wurde ein zusätzlicher Hexahistidin(H₆)-tag N-terminal eingefügt. Der Bereich, welcher den H₆-tag kodiert, wurde aus einem pQE9 Vektor mittels der Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *BamHI* ausgeschnitten. Die *BamHI* Schnittstelle liegt direkt hinter dem H₆-tag. Das Ausgangskonstrukt BoNT/ES-thro wurde ebenfalls mit diesen beiden Enzymen geschnitten, wobei die *BamHI* Schnittstelle direkt vor dem Translationsstart-Codon des Gens lag. So war sichergestellt, dass der H₆-tag ohne weitere Zwischensequenzen direkt N-terminal an das BoNT/ES-thro anschließt. Der Klon wurde pH₆BoNTES-thro benannt, wobei das 'H₆' den N-terminalen H₆-tag bezeichnet.

BoNT/F:

Ausgangspunkt für die Konstruktion von pBoNTF war das bereits existierende Konstrukt pHcFS wt (Rummel), das das H_C-Fragment von BoNT/F mit C-terminalem *Strep*-tag® im pQE3 Vektor (Qiagen) kodiert. Dieses Konstrukt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *EcoRI* geöffnet und um die die katalytische und die Translokationsdomäne codierenden Abschnitte ergänzt (siehe Abb. 4). Alle drei Fragmente (FL, FH1 und FH2) wurden mittels PCR-Reaktion erzeugt. An einem Konstrukt, welches die leichte Kette von BoNT/F enthält (pFB4), wurde Fragment FL hergestellt (Primer #Ex-2 und #3HCF5) und mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NarI* geschnitten. Die Fragmente FH1 (Primer #5HCF6 und #3HCF9) und FH2 (Primer #5HCF10 und #3HCF7) wurden an bakterieller chromosomaler DNA (Stamm NCTC10281) erzeugt und mit *NarI* und *HindIII*, beziehungsweise *HindIII* und *EcoRI* geschnitten. Das auf diese Weise hergestellte Expressionsplasmid wurde pBoNTFS benannt.

Bei der Produktion und Aufreinigung von BoNT/FS stellten sich bezüglich Reinheit und Menge des Proteins keine zufriedenstellenden Resultate ein (siehe 4.2). Deshalb wurde, mittels der bei BoNT/E beschriebenen Methode ein einen H₆-tag codierender DNA Abschnitt direkt vor dem Translationsstart-Codon des BoNT/F-Gens eingefügt. Es resultierte pH₆BoNTFS.

Bei der Aufreinigung des rekombinanten H₆BoNTFS wurde weiterhin festgestellt, dass das Toxin weder von *E. coli* eigenen Proteasen noch durch Trypsin-Behandlung nach Aufreinigung aktiviert wird. Das native Toxin besitzt eine proteolytisch sensitive Region, die von zwei Cysteinen eingerahmt wird. Zur Aktivierung, d.h. Spaltung einer Peptidbindung zwischen schwerer und leichter Kette, wird das Neurotoxin in diesem Bereich spezifisch von einer Protease aus *Clostridium botulinum* hydrolysiert. Um das rekombinante H₆BoNTFS ebenfalls gezielt zwischen L- und H-Kette hydrolysieren zu können, wurde in den Loop zwischen diesen beiden Cysteinen eine Thrombinschnittstelle eingefügt.

Am Konstrukt H₆BoNTFS wurde eine PCR Reaktion mit den Primern #Ex-2 und #3LCFthro durchgeführt. Mittels des zweiten Primers wurde die Erkennungssequenz für Thrombin eingefügt. Das PCR Produkt wurde mit *XhoI* und *NarI* geschnitten und aufgereinigt. Dieses Fragment, der codierende Abschnitt für die leichte Kette des Toxins mit Thrombinschnittstelle, wurde anschließend in den ebenfalls mit *XhoI* und *NarI* geschnittenen H₆BoNTFS Vektor inseriert. Das neue Konstrukt wurde mit pH₆BoNTFS-thro bezeichnet.

BoNT/G:

Das bereits existierende Konstrukt pHcGS wt (Rummel), welches das H_C-Fragment von BoNT/G mit C-terminalem *Strep*-tag® im pQE3 Vektor (Qiagen) kodiert, war Ausgangspunkt für die Klonierung von pBoNTG. Dieses Konstrukt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Swa*I und *Bam*HI geöffnet und um die die katalytische und die Translokationsdomäne codierenden Abschnitte ergänzt (siehe Abb. 4). Beide Fragmente (GL und GH) wurden mittels PCR-Reaktion erzeugt. An pBN18, welches die leichte Kette von BoNT/G enthält, wurde Fragment GL hergestellt (Primer #G1 und #3LCG5) und mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Age*I geschnitten. Fragment GH (Primer #5HCG4 und #G5) wurden an pGEXHG erzeugt und mit *Age*I und *Swa*I geschnitten. Der Klon wurde pBoNTGS benannt, wobei das `S` den C-terminalen *Strep*-tag® bezeichnet.

Bei der Aufreinigung von BoNT/GS stellte sich heraus, dass das Toxin noch zu stark durch proteolytische Abbauprodukte von *E. coli* Proteasen und unspezifisch gebundene *E. coli* Proteine verunreinigt war (siehe Abb. 6). Es wurde auf die bei BoNT/E beschriebene Weise ein zusätzlicher H₆-tag N-terminal eingefügt, um durch einen zweiten Aufreinigungsschritt diese Verunreinigungen vom Toxin zu trennen. Der Klon wurde pH₆BoNTGS benannt.

Durch die zweistufige Aufreinigung über eine Ni-NTA Säule und über eine *Strep*-Tactin® Säule konnten die Verunreinigungen vom Neurotoxin getrennt und Protein mit einer Reinheit >95% gewonnen werden (siehe Abb. 5). Das so gewonnene Toxin war in Reinheit und Konzentration sehr gut für die Kristallisationsexperimente geeignet.

Da für die Experimente mit PC12-Zellen aktiviertes Neurotoxin verwendet werden sollte, wurde noch ein Genkonstrukt mit Thrombinschnittstelle kloniert. Als Ausgangsvektor diente pBoNTGS, welches mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*XI und *Swa*I geschnitten wurde. An diesem Vektor wurden ausserdem mit den Primern #LCG3 und #G-Throm1 (Insert I), sowie mit #G-Throm2 und #G5 (Insert II) zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Mittels der zwei "Throm"-Primer wurde die Erkennungssequenz für Thrombin eingefügt. Die Inserts wurden mit *Bst*XI und *Kpn*I (Insert I) bzw. *Kpn*I und *Swa*I (Insert II) geschnitten und in den Vektor inseriert. Das neue Konstrukt wurde mit pBoNTGS-thro bezeichnet.

Allgemein:

Alle erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung des gesamten durch PCR erzeugten Genabschnittes auf mögliche Mutationen überprüft.

Beim Wildtyp von BoNT/A ist zu beobachten, dass während der Aufreinigung das Toxin bereits zum größten Teil von *E. coli* eigenen Proteasen aktiviert wird. Diese schneiden häufig an Lysinen und der Loop von BoNT/A enthält die Aminosäuresequenz KTKS. Vermutlich erfolgt die Hydrolyse an diesen Lysinen. Um bei den neu klonierten BoNT Serotypen die Aktivierung des Loops zu unterstützen, wurde deshalb bei allen Klonierungen direkt vor der Thrombinschnittstelle diese Sequenz eingefügt (siehe Tabelle 2). Bei der Produktion von BoNT/E wurde deutlich, dass *E. coli* eigene Proteasen das

Toxin schon während des Aufreinigens zu ca. 60% aktivieren (siehe Tabelle 4), was vermutlich auf diese zusätzlich eingefügte Sequenz zurückzuführen ist. Bei pH₆BoNTFS-thro führte diese zusätzliche Sequenz allerdings nicht zur Aktivierung durch *E. coli* eigene Proteasen während der Aufreinigung, so dass im Loop zwischen leichter und schwerer Kette im Anschluss mittels Thrombinbehandlung gespalten werden musste.

Tabelle 2: Aminosäuresequenzvergleich der Loops zwischen leichter und schwerer Kette aller erstellten Konstrukte von BoNT/E, BoNT/F und BoNT/G. Thrombinschnittstellen sind grau unterlegt, der bevorzugte Hydrolysebereich von *E. coli* eigenen Proteasen ist unterstrichen.

Konstrukt	Aminosäuresequenz des Loops
BoNT/ES-thro	CKNIVSKTKSLVPRGSKSIC
H ₆ BoNT/ES-thro	CKNIVSKTKSLVPRGSKSIC
BoNT/FS	CKSVIPRKGT KAPPRLC
H ₆ BoNT/FS	CKSVIPRKGT KAPPRLC
H ₆ BoNT/FS-thro	CKSVKTKSLVPRGSKAPPRLC
BoNT/GS	CKPVMYKNTG KSEQC
H ₆ BoNT/GS	CKPVMYKNTG KSEQC
BoNT/GS-thro	CKPVMYSKTKSLVPRGSKSEQC

4.2 Produktion und Reinigung der rekombinanten Neurotoxine

4.2.1 Isolation der CNT

Alle Neurotoxine wurden entweder in voller Länge als *Strep*-tag® II-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe einer *Strep*-Tactin®-Matrix aufgereinigt, oder enthielten zusätzlich einen H₆-tag und wurden vorher noch über eine H₆ bindende NiNTA-Matrix aufgereinigt. Dieses Verfahren ermöglichte die zeitsparende Aufreinigung bei gleichzeitig hoher Reinheit der Proteine.

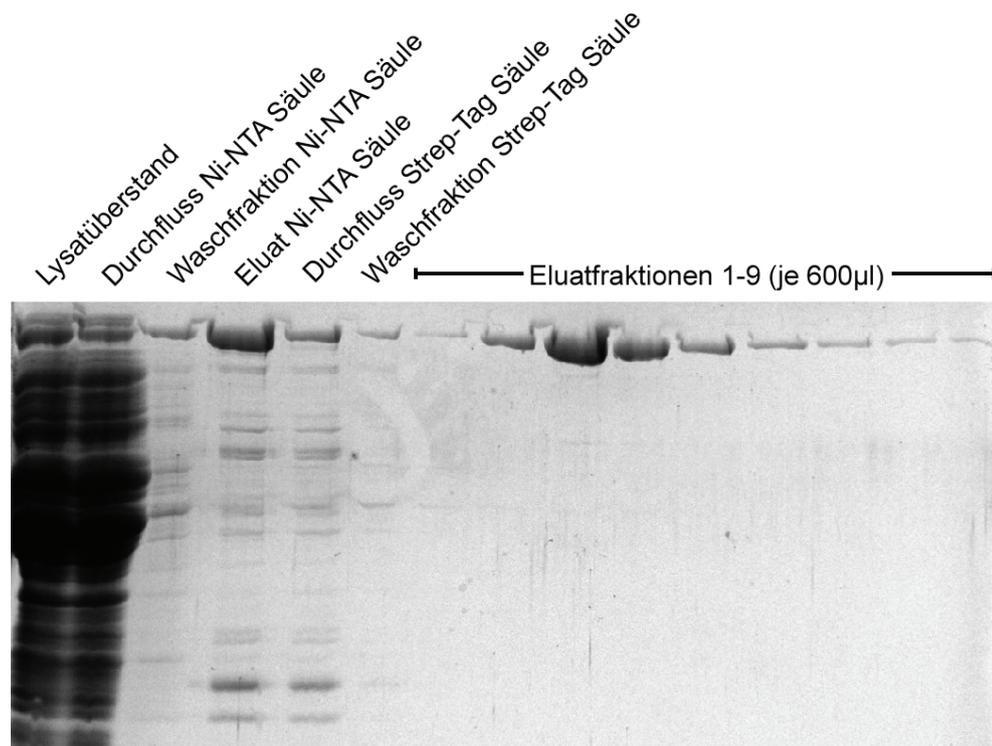


Abb. 5: Produktion und Isolierung von BoNT/G. Die Reinigung von H₆BoNT/GS aus *E. coli*-Lysat erfolgte gemäß Kapitel 3.2.4. Die erhaltenen Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert (siehe nachfolgender Text).

In Abb. 5 ist beispielhaft an H₆BoNT/GS der Verlauf einer Aufreinigung über beide *Tags* gezeigt. Zuerst wird über die Ni-NTA-Matrix und anschließend über die *Strep*-Tactin®-Matrix aufgereinigt. Der Überstand des zentrifugierten *E. coli*-Lysats enthält das exprimierte Neurotoxin sowie alle löslichen *E. coli* Proteine. In den folgenden Schritten bindet der größte Teil des mit entsprechenden *Tags* versehenen Toxins an die spezifische Matrix. Nur ein geringer Teil des überexprimierten Proteins und alle nicht mit Affinitätstag versehenen Proteine sind im Durchfluss und den Waschfraktionen zu finden. Durch das Hintereinanderschalten zweier Aufreinigungsschritte erhält man das Neurotoxin in hoher Reinheit: die zahlreichen Verunreinigungen, welche noch in der Eluatfraktion der Ni-NTA Säule zu finden sind, werden von der *Strep*-Tactin® Säule entfernt. Die Verunreinigungen können verschiedene Ursachen haben. Das Problem der verspäteten Initiation der Translation kann oft, wie auch hier, durch das Einfügen eines N-terminalen Affinitätstags

behalten werden. Ebenso sollten Proteine, deren Translation vorzeitig abgebrochen wurde, nicht an die Matrix des C-terminalen Affinitätstags binden. Um Verunreinigungen, die auf direkte Bindung an die Matrix oder tag-ähnliche Motive in Fremdproteinen zurückzuführen sind zu verhindern, sollten verschiedene Waschbedingungen (Salzgehalt, pH-Wert) getestet werden. Das Volumen der ersten Elutionsfraktion entspricht annähernd dem Totvolumen der Säule, so dass in einem ersten Schritt lediglich der verbliebene Waschpuffer von der Säule verdrängt wird, aber noch keine Elution des Proteins erfolgt. Es wurden die Elutionsfraktionen mit der höchsten Proteinmenge und den geringsten Verunreinigungen vereinigt und die Proteinkonzentration durch SDS-PAGE, Coomassie Blau-Färbung und Densitometrie bestimmt.

In Abb. 6 ist ein Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel zu sehen, auf welchem nebeneinander BoNT/G aufgetragen wurde, das einmal nur über einen *Strep*-tag® und zum Vergleich zusätzlich über einen H₆-tag gereinigt wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch den H₆-tag der größte Teil der Verunreinigungen abgetrennt werden konnte.

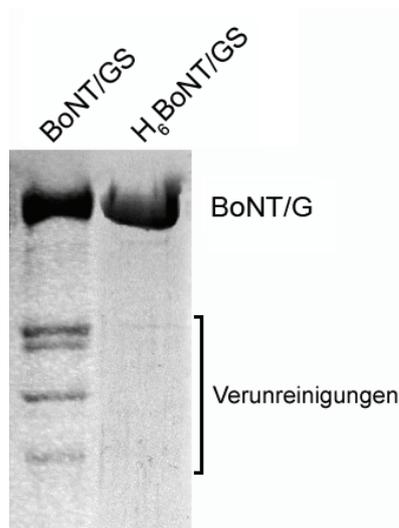


Abb. 6: Vergleich der Reinheit von scBoNT/GS wt (nur *Strep*-tag®) und scH₆BoNT/GS wt (H₆-tag und *Strep*-tag®). Die Verunreinigungen konnten durch den zusätzlichen Tag fast vollständig abgetrennt werden.

Die einzelnen clostridiellen Neurotoxine ließen sich unterschiedlich gut produzieren und reinigen. Die Ausbeuten lagen zwischen 0,025 mg/L (scH₆BoNT/FS wt) und 9,00 mg/L (scTeNTS wt) Endkonzentration.

Da die Konzentration von H₆BoNT/FS für Experimente mit PC12 Zellen zu gering war, wurde eine größere Menge produziert und anschließend mit Hilfe der AMICON Stirred Cells Series 8000 um den Faktor 10 aufkonzentriert.

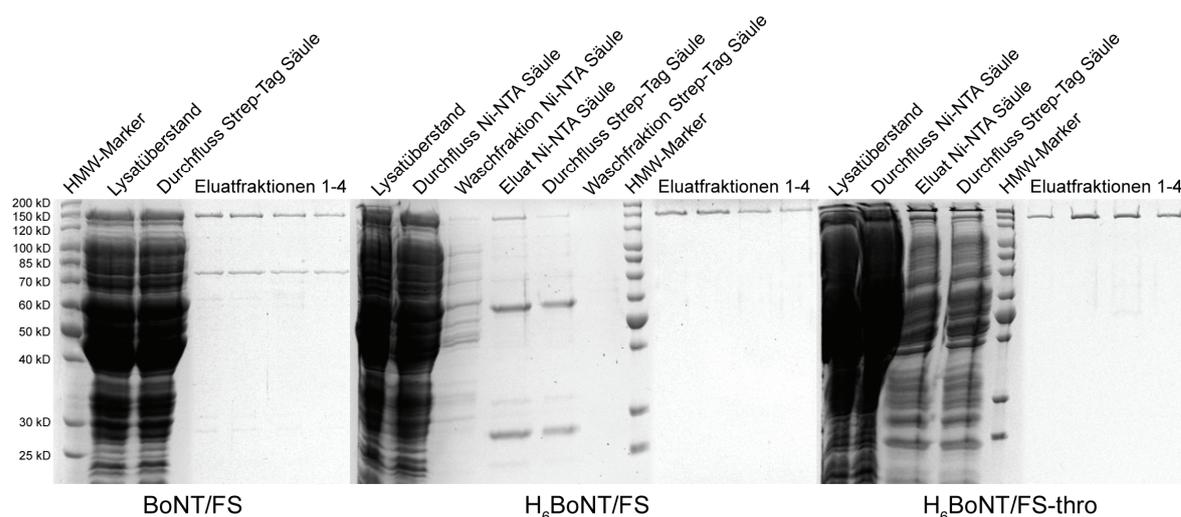


Abb. 7: Vergleich der Reinheit der drei Varianten von rekombinantem BoNT/F. Die Reinigung aus *E. coli*-Lysat erfolgte gemäß Kapitel 3.2.4. Die erhaltenen Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert. BoNT/FS enthielt nur einen *Strep-tag*[®], und man erkennt in den Elutionsfraktionen eine massive Verunreinigung bei ca. 70 kD. Diese konnte durch das Hinzufügen eines H₆-tags abgetrennt werden (siehe Eluatfraktionen bei Gel H₆BoNT/FS). Die nach H₆-tag Aufreinigung auftretenden Verunreinigungen bei 60 kD und 27 kD (siehe Eluat und Durchfluss *Strep-tag*[®] Säule bei Gel H₆BoNT/FS) werden durch den zweiten Aufreinigungsschritt über den *Strep-tag*[®] abgetrennt. Da dieses Konstrukt aber weder von *E. coli* eigenen Proteasen noch durch Trypsinbehandlung (siehe Abb. 9) aktiviert werden konnte, wurde im Loopbereich des Toxins zusätzlich eine Thrombinschnittstelle eingefügt.

4.2.2 Aktivierung der produzierten CNT

In Vorexperimenten zeigte sich, dass genicktes Neurotoxin im Vergleich zu single chain Toxin in geringerer Menge eingesetzt werden kann. Deshalb wurden für weitere Experimente in PC12 Zellen alle rekombinant hergestellten Neurotoxine aktiviert. Dies geschah auf drei verschiedene Arten: durch *E. coli* eigene Proteasen, direkt während der Aufreinigung oder durch Trypsin- bzw. Thrombinverdau.

Die proteolytisch sensitiven Regionen zwischen leichter und schwerer Kette von BoNT/AS-thro, H₆BoNT/ES-thro sowie BoNT/GS-thro besitzen einen lysinreichen Bereich, welcher von *E. coli* eigenen Proteasen hydrolysiert wird (siehe Tabelle 3). Diese Toxine werden direkt bei ihrer Aufreinigung zu 70% aktiviert.

Tabelle 3: Die Loopbereiche der von *E. coli* eigenen Proteasen während der Aufreinigung aktivierten Neurotoxine. Der lysinreiche Bereich ist grau unterlegt.

Konstrukt	Aminosäuresequenz des Loops
BoNT/AS-thro	CVRGIIITSKTKS LVPRGSKALNDLC
H ₆ BoNT/ES-thro	C KNIV SKTKS LVPRGSK SIC
BoNT/GS-thro	CKPVMY SKTKS LVPRGSK SEQC

Zur Aktivierung mussten BoNT/BS, BoNT/DS und TeNTS mit Trypsin verdaut werden. Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer für jedes Toxin wurden zunächst jeweils mehrere Zeitwerte untersucht (Beispiel siehe Abb. 8).

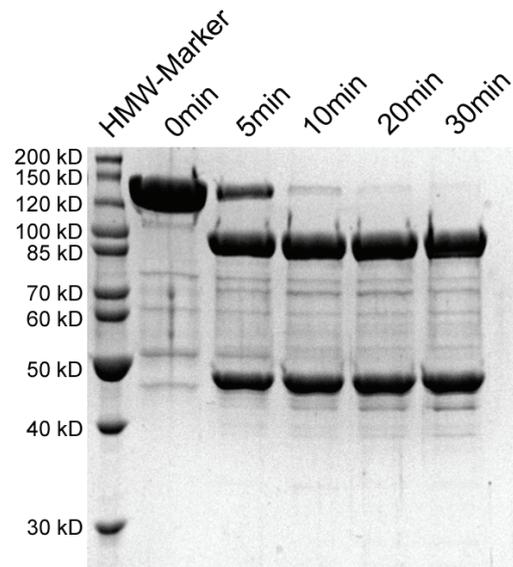


Abb. 8: Aktivierung von scBoNT/DS mit Trypsin (0,001 U/ μ g). Die Reinigung aus *E. coli*-Lysat erfolgte gemäß Kapitel 3.2.4. Die erhaltenen Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert. Es wurden verschiedene Zeitwerte analysiert, und es ist zu erkennen, dass nach 10 min bereits ca. 95% des Toxins aktiviert sind.

Für das neu klonierte BoNT/F war nicht bekannt, ob es mittels Trypsin aktiviert werden kann. Deshalb wurde dies am Konstrukt H₆BoNT/FS getestet (siehe Abb. 9).

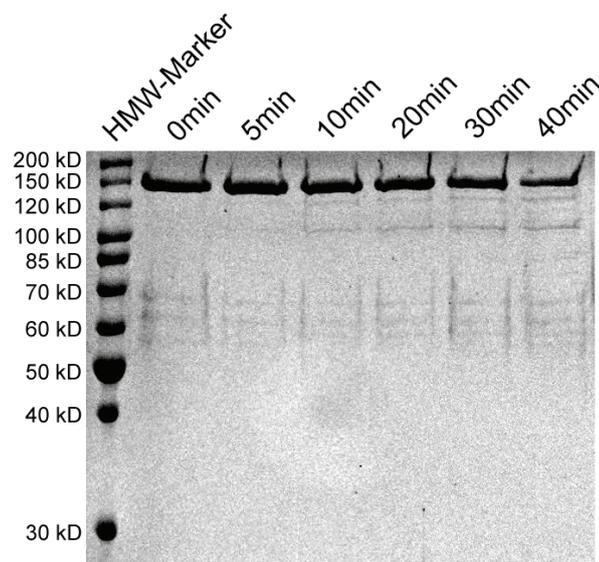


Abb. 9: Spaltung von H₆BoNT/FS mit Trypsin (0,01 U/ μ g). Die Reinigung aus *E. coli*-Lysat erfolgte gemäß Kapitel 3.2.4. Die erhaltenen Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine Aktivierung des Toxins stattfindet.

Da Trypsin das Toxin nicht zwischen leichter und schwerer Kette spaltet, wurde dort zu diesem Zweck noch eine Thrombinschnittstelle eingefügt. Durch Thrombinbehandlung wurden BoNT/CS-thro und H₆BoNT/FS-thro in ihre aktive Form überführt. Auch hier wurde vorher die günstigste Inkubationsdauer ermittelt (Beispiel siehe Abb. 10).

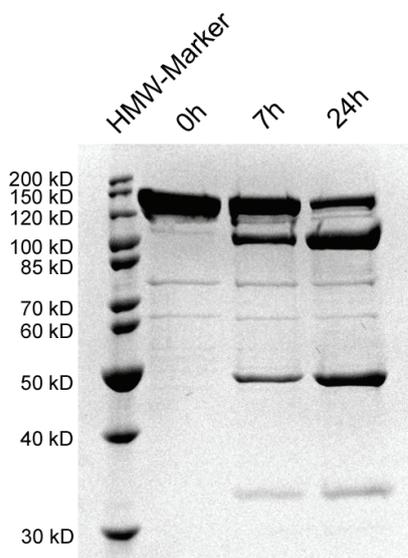


Abb. 10: Aktivierung von BoNT/CS-thro mit Thrombin (0,01 U/ μ g). Die Reinigung aus *E. coli*-Lysat erfolgte gemäß Kapitel 3.2.4. Die erhaltenen Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert. Die Aktivierung erfolgte hier für 7h bzw. 24h bei 4°C.

In der folgenden Tabelle sind die Konzentrationen und der Grad der Aktivierung der produzierten Neurotoxine aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über die aufgereinigten Neurotoxine, deren Konzentration und Aktivierungsgrad

Toxin	Aktivierung durch:	Konzentration [mg/mL]	Aktivierung [%]
BoNT/AS-thro	<i>E. coli</i>	0,13	95
BoNT/BS	Trypsin	0,40	85
BoNT/CS-thro	Thrombin	0,30	60
BoNT/DS	Trypsin	0,30	98
H ₆ BoNT/ES-thro	<i>E. coli</i>	0,185	60
H ₆ BoNT/FS-thro	Thrombin	0,18	96
BoNT/GS-thro	<i>E. coli</i>	0,17	85
TeNTS	Trypsin	6,40	50

4.3 Sind PC12 Zellen suszeptibel für alle clostridiellen Neurotoxine?

Eine Möglichkeit, die Wirkungsweise von Neurotoxinen genauer zu erforschen, ist deren Untersuchung an lebenden Zellen. Diese bieten eine wertvolle Ergänzung zu *in vitro* Experimenten. Die Eignung von PC12 Zellen zur Identifizierung der Proteinrezeptoren der CNT wurde in dieser Arbeit untersucht. Ratten phaeochromocytoma 12 Zellen besitzen die Proteine des neuronalen SNARE Komplexes und somit alle Substrate der Neurotoxine. Sie ähneln demnach den Zellen, in denen die Neurotoxine natürlicherweise wirken. Ob aber auch die für die Bindung und Aufnahme der Toxine nötigen Proteinrezeptoren vorhanden sind, ist nur für BoNT/A (Dong *et al.*, 2006), BoNT/B und BoNT/E bekannt (Dong *et al.*, 2003). Um dies zu untersuchen, wurden PC12 Zellen mit allen Botulinum Neurotoxin Serotypen sowie Tetanus Neurotoxin behandelt und anschließend deren gespaltene Substrate quantifiziert. Wenn Substratspaltung für ein Neurotoxin nachgewiesen werden kann, dann ist davon auszugehen, dass dieses auch vorher von den PC12 Zellen aufgenommen wurde und somit ein entsprechender Proteinrezeptor vorhanden ist. PC12 Zellen exprimieren Synaptotagmin-I, den Proteinrezeptor für BoNT/B und BoNT/G (Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004). Ob Rezeptoren für alle anderen Serotypen und Tetanus Neurotoxin ebenfalls bei PC12-Zellen vorhanden sind, sollte mit diesen Experimenten gezeigt werden: Mit Gangliosiden vorbehandelte PC12 Zellen 24 h mit 300 nM des jeweiligen Neurotoxins inkubiert. Das Toxin wurde durch Waschen entfernt und die Zellen anschließend 48 h weitergepflegt. Die PC12 Zellen wurden dann lysiert und die Abnahme der CNT Substrate wurde mittels Immunoblot mit substratspezifischen Antikörpern detektiert (siehe Abb. 11).

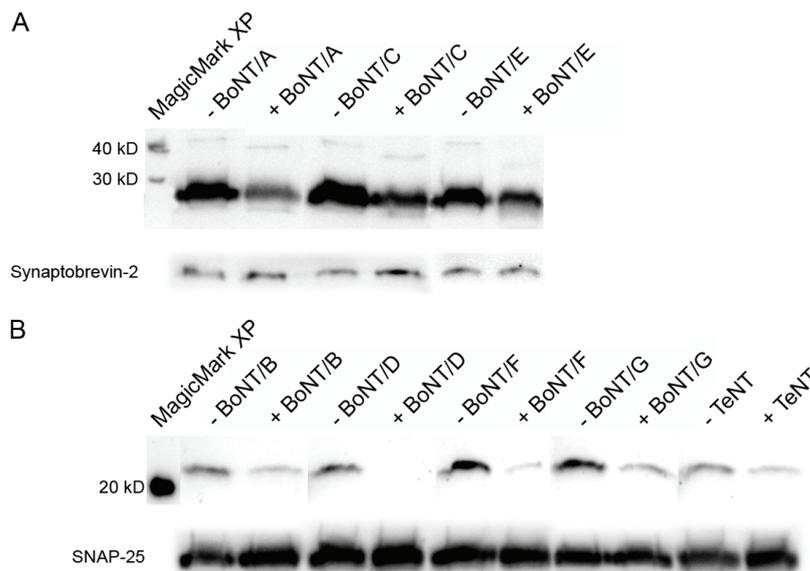


Abb. 11: Nachweis der Sensitivität von PC-12 Zellen gegen rekombinante clostridielle Neurotoxine. Teil A der Abbildung zeigt die Ergebnisse für BoNT/A, C und E, deren Substrat SNAP-25 ist (Ladekontrolle Synaptobrevin-2), Teil B die für CNT mit Synaptobrevin-2 als Substrat (Ladekontrolle SNAP-25). Die jeweiligen Substrate wurden durch Immunoblot aus einem Zelllysat von PC12 Zellen, welche 24 h mit oder ohne 300nM BoNT inkubiert wurden, mit einem substratspezifischen polyklonalen Antikörper detektiert. Die Abnahme von SNAP-25 bzw. Synaptobrevin-2 bei Toxinzugabe war bei den einzelnen CNT unterschiedlich stark ausgeprägt, ist aber überall deutlich zu erkennen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der PC12 - Neurotoxin Assays. Aufgeführt ist das gespaltene Substrat jedes Toxins, der Aktivierungsgrad der eingesetzten Neurotoxinpräparationen und in welchem Maß das Substrat gespalten wurde.

Toxin [300 nM]	Substrat	Aktivierung [%]	Spaltung [%]
BoNT/AS-thro	SNAP-25	95	45,9
BoNT/BS	Syb2	85	39,1
BoNT/CS-thro	SNAP-25	60	65,4
BoNT/DS	Syb2	98	0
H ₆ BoNT/ES-thro	SNAP-25	60	76,5
H ₆ BoNT/FS-thro	Syb2	96	25,7
BoNT/GS-thro	Syb2	85	36,6
TeNTS	Syb2	50	49,1

Es konnte Substratspaltung für alle Botulinum Neurotoxin Serotypen und Tetanus Neurotoxin nachgewiesen werden. PC12 Zellen eignen sich demnach für Experimente mit diesen Toxinen, da diese an die Zellen binden, aufgenommen werden und in den Zellen ihre entsprechenden Substrate umsetzen können. Wenn man davon ausgeht, dass zur Internalisation der Neurotoxine ein Proteinrezeptor notwendig ist, besitzen PC12 Zellen Proteinrezeptoren für alle getesteten Toxine. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die hergestellten rekombinanten Neurotoxine alle funktionstüchtig sind und ihr Substrat spalten.

Der Grad der Substratspaltung war bei den einzelnen Serotypen unterschiedlich stark ausgeprägt. BoNT/DS setzte das in den Zellen vorhandene Syb2 fast vollständig um, wogegen BoNT/CS-thro und H₆BoNT/ES-thro das SNAP-25 zu ca. einem Drittel spalteten.

4.4 Kristallisationsversuche mit BoNT/G, BoNT/B und Synaptotagmin-II

Die Kristallstruktur eines Proteins gibt wertvolle Hinweise zu dessen weiterer Erforschung: welche Domänen besitzt es, wie ist die Oberfläche modelliert oder welche Aminosäuren befinden sich dort als mögliche Bindungspartner? Wo könnte man durch gezielte Mutationen Interaktionen mit anderen Proteinen stören? Für die Suche nach möglichen Bindungstaschen für die Proteinrezeptoren der Neurotoxine sind Kristallstrukturen sehr nützlich. Hier wurde versucht, rekombinantes Botulinum Neurotoxin Serotyp G in einer ausreichend hohen Konzentration sowie Reinheit herzustellen, um dieses dann zu kristallisieren. Weiterhin war geplant, BoNT/B und BoNT/G gemeinsam mit ihrem Proteinrezeptor Synaptotagmin-II zu kristallisieren.

4.4.1 Konzentration von H₆BoNT/GS und BoNT/BSL

Für die Kristallisation wurden die Konstrukte H₆BoNT/GS sowie BoNT/BSL verwendet. H₆BoNT/GS ließ sich mit höherer Reinheit herstellen als BoNT/GS (siehe Abb. 6) Bei scBoNT/BSL handelt es sich um rekombinantes Toxin mit nativem Loopbereich. Die bei den Aufreinigungen erreichten Proteinkonzentrationen beider Toxine betragen ungefähr 1,6 mg/mL. Für eine Kristallisation ist eine Konzentration von >10 mg/mL (12 - 15 mg/mL) erforderlich. Die Proteinlösungen mussten also konzentriert werden (siehe 3.2.5). Aus 10 L *E. coli* Kulturvolumen erhielt man ca. 12 mg (BoNT/G) und 18 mg (BoNT/B) Neurotoxin. Die neuen Proteinkonzentrationen betragen 15 mg/mL für BoNT/G und 12 mg/mL für BoNT/B. Das Kristallisieren wurde von Professor Dr. K. Ravi Acharya, Department of Biology and Biochemistry, University of Bath übernommen.

4.4.2 Ergebnisse der Kristallisation von H₆BoNT/GS und BoNT/BSL

Bei BoNT/G bildeten sich lediglich kleine plattenförmige Strukturen und keine Kristalle, die vermessen werden konnten. Hier sind noch Tests weiterer Kristallisationsbedingungen notwendig.

Das rekombinante BoNT/B lieferte eine Kristallstruktur in 2,1 Å Auflösung (persönliche Mitteilung Prof. Dr. K. R. Acharya). Diese deckte sich mit der des nativen Toxins (Swaminathan und Eswaramoorthy, 2000), der RMSD betrug 1,04 Å (siehe Abb. 12 A und B). Die Unterschiede ergaben sich aus kleineren Abweichungen in einigen Loopbereichen, sowie dem Fehlen der Aminosäuren -KAP- im Loopbereich zwischen leichter und schwerer Kette des nativen Toxins (siehe Abb. 12 C). Das kristallisierte native Toxin aus Clostridien war aktiviert, d.h. der Loop zwischen leichter und schwerer Kette war hydrolysiert, daher flexibel und konnte nicht ganz aufgelöst werden. Bei dem rekombinanten BoNT/B war der Loop intakt und seine Struktur konnte hier erstmals dargestellt werden (siehe Abb. 12 C). Man erkennt in der Abbildung sehr gut, dass die Aminosäuren des Loops weit aus der Struktur herausstehen. Durch diese exponierte Lage sind sie leicht zugänglich für *E. coli* Proteasen, was die quantitative Aktivierung von

BoNT/BSL erklärt. Die Disulfidbrücke zwischen den beiden Loop-flankierenden Cysteinen war ebenfalls ausgebildet. Der *Strep*-tag® des rekombinanten Toxins war in der Struktur nicht sichtbar, da er flexibel ist und somit nicht mit der Toxinstruktur interagiert.

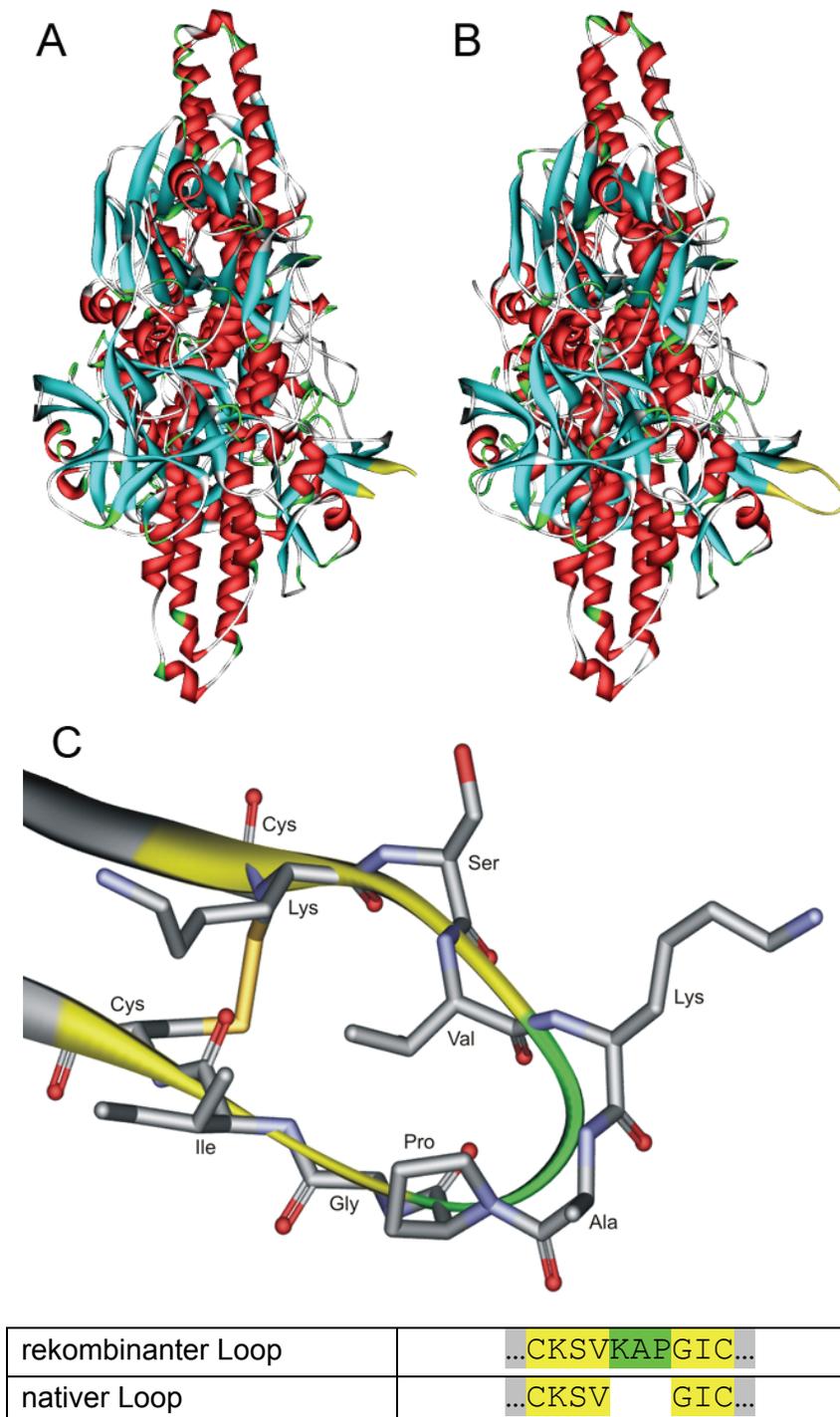


Abb. 12: Vergleich der Kristallstruktur von nativem BoNT/B (A, Swaminathan und Eswaramoorthy, 2000) und rekombinantem BoNT/BSL (B). Man blickt vom C-Terminus Richtung N-Terminus des Toxins. Teil C zeigt die genaue Lage der Aminosäuren des Loops sowie den Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen rekombinantem und nativem BoNT/B. Der Loop zwischen leichter und schwerer Kette ist gelb markiert. Beim rekombinanten Toxin konnte seine Struktur und Lage zum restlichen Toxin erstmals dargestellt werden. Das native Toxin war aktiviert, es fehlten die Aminosäuren KAP (grün markiert). In Teil C ist auch die Disulfidbindung der beiden Cysteine zu erkennen.

4.4.3 Reinigung von Synaptotagmin-II Peptid

Um eine Co-Kristallstruktur von Botulinum Neurotoxin Serotyp B mit seinem Proteinrezeptor Syt-II zu erhalten, wurde ein Konstrukt verwendet, welches nur die 61 N-terminalen Aminosäuren von Synaptotagmin-II enthält. Dieser Bereich befindet sich intraluminal und wird, wenn das Vesikel mit der Zellmembran fusioniert, um Transmitter freizusetzen, extrazellulär präsentiert. In diesem Moment binden BoNT/B oder BoNT/G an diesen Bereich und beim Abschnüren der neuen Vesikel gelangen sie ins Innere der Zelle. Es interagiert also nur dieser N-terminale Bereich von Synaptotagmin-II mit den Toxinen.

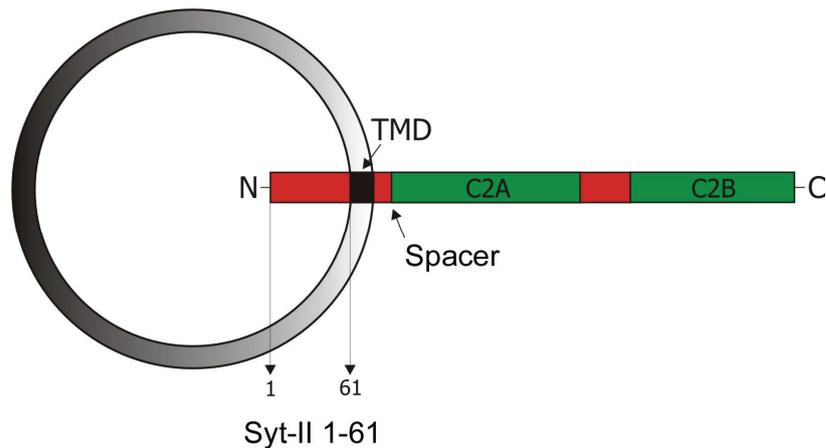


Abb. 13: Schematische Darstellung von Synaptotagmin-II. Das Molekül besitzt eine N-terminale intraluminal Domäne (Aminosäuren 1 - 61), eine Transmembrandomäne (TMD), einen "Spacer"-Abschnitt, sowie zwei Ca^{2+} bindende C2 Domänen (C2A und C2B).

Das Peptid wurde als GST-Fusionsprotein hergestellt und aufgereinigt. Zwischen dem GST und dem Peptid befindet sich eine Thrombinschnittstelle, so dass anschließend das GST abgespalten und vom Syt-II 1-61 Peptid getrennt werden konnte. Die Konzentration des aufgereinigten Peptids betrug 2,7 mg/mL.

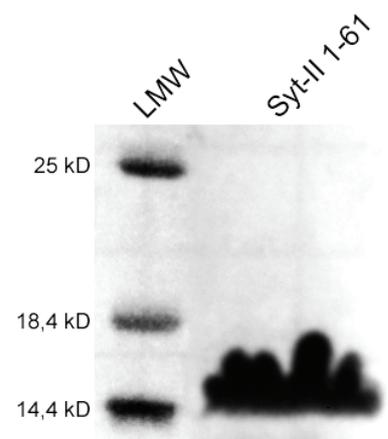


Abb. 14: Aufreinigung von Syt-II 1-61C Peptid. Die Reinigung aus *E. coli*-Lysat erfolgte gemäß Kapitel 3.2.2. Die erhaltenen Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert.

Das Syt-II 1-61 Peptid wurde in einem äquimolaren Verhältnis mit BoNT/BSL gemischt und zum Kristallisieren verwendet. Auf diese Weise konnten bisher keine Co-Kristalle erzeugt werden.

4.4.4 Test von BoNT/B-Syt-II Fusionsproteinen zur Toxin/Rezeptor Co-Kristallisation

Da das Mischen von separat hergestelltem BoNT/BSL und Syt-II 1-61 Peptid keine Co-Kristalle lieferte, wurden in einem neuen Ansatz Fusionsproteine aus BoNT/B und der intraluminale Domäne von Synaptotagmin erstellt. Die Toxizität und Bindungsfähigkeit der Fusionsproteine wurden getestet, um zu klären, ob das Syt-II Peptid auch richtig gefaltet die Bindungstasche erreicht.

4.4.4.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden für BoNT/B-Syt-II Fusionsproteine

Tabelle 6: Übersicht der erstellten BoNT/B-Syt-II Fusionsproteinkonstrukte

Bezeichnung	H ₆ -tag	Strep-tag®
pBoNTBSL-Syt-II		✓
pBoNTBSL-L-Syt-II		✓
pH _C BS-Syt-II		✓
pH ₆ H _C BS-Syt-II	✓	✓

Zur Klonierung eines Fusionsproteins von Botulinum Neurotoxin Serotyp B mit seinem Proteinrezeptor, Synaptotagmin, wurde das Plasmid pBoNTBSL wt (Rummel) verwendet (siehe 4.4.1). Von Synaptotagmin-II wurden die N-terminalen 7 Aminosäuren weggelassen. Sie enthalten zwei Arginine und ein Lysin, so dass *E. coli* eigene Proteasen dort mit großer Wahrscheinlichkeit angreifen und so das Syt-II wieder von BoNT/B abspalten würden.

N-Terminus von Syt-II	MRNIFKRNQEPDIVAPATTTAT...
verwendeter N-Terminus	NQEPDIVAPATTTAT...

Da sich die für die Bindung an BoNT/B wichtigen Aminosäuren (40-60) erst kurz vor der Transmembrandomäne von Synaptotagmin-II befinden (Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004), hat die N-terminale Verkürzung keine Auswirkung auf die Bindung.

Das Peptid von Syt-II wurde C-terminal hinter den den *Strep-tag*®-codierenden Abschnitt von pBoNTBSL kloniert. Dabei wurden 2 verschiedene Ansätze verfolgt: Beim Ersten wurde das Peptid direkt hinter den *Strep-tag*® gesetzt, beim Zweiten wurde zusätzlich ein Abstandshalter von 4 Glycin-Serin Abfolgen (-GSGSGSGS-) eingefügt. Da nicht vorhergesagt werden konnte, wie sich das Peptid falten würde und ob es seine Bindungstasche im H_C-Fragment von BoNT/B erreicht, wurde dieses Peptid eingefügt, um das Syt-II flexibler im Erreichen seiner Bindungstasche zu machen. Die beiden Klone

wurden pBoNTBSL-Syt-II und pBoNTBSL-L-Syt-II genannt, wobei das '-L-' den eingefügten Abstandshalter bezeichnet.

Weiterhin sollte ein verkürztes Fusionsprotein hergestellt werden, welches nur aus dem H_C-Fragment von BoNT/B und dem Syt-II Peptid besteht. Dazu wurde in ein bereits vorhandenes Plasmid, welches das H_C-Fragment von BoNT/B kodiert (pH_CBS wt), mittels *SpeI* und *NheI* Schnittstellen der Abschnitt aus pBoNTBSL-Syt-II kloniert, der den gewünschten Syt-II Anteil enthielt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pH_CBS-Syt-II. Um einen N-terminalen H₆-tag einzufügen, wurde aus diesem neuen Plasmid das Fusionsgen über die *Bam*HI und *NheI* Schnittstellen in einen entsprechend geschnittenen pQE9 Expressionsvektor umgesetzt, um das Konstrukt pH₆H_CBS-Syt-II zu erhalten.

4.4.4.2 Aufreinigung von BoNT/BSL-Syt-II und BoNT/BSL-L-Syt-II

Beide Konstrukte wurden zusammen mit BoNT/BSL testweise im kleinen Maßstab (500 mL *E. coli* Kulturen) aufgereinigt um zu sehen, ob die Aufreinigung von der Menge und Reinheit des Proteins zufrieden stellend ist:

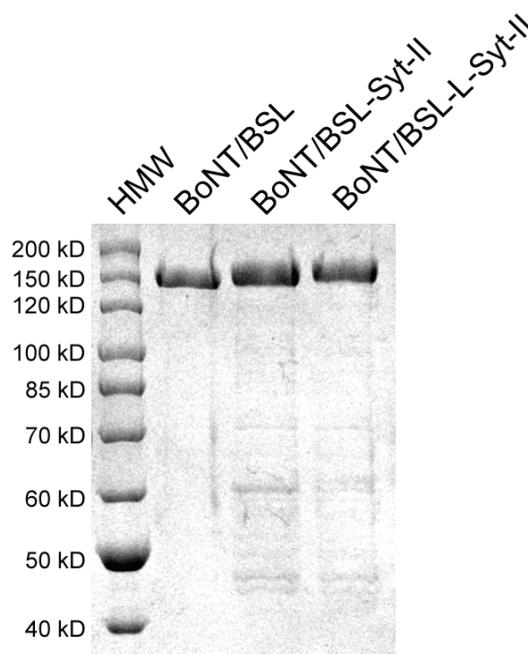


Abb. 15: Analyse der hergestellten BoNT/BSL-Syt-II Fusionsproteine durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung. Aufgetragen wurden 0,5µL BoNT/BSL, 5µL BoNT/BSL-Syt-II und 5µL BoNT/BSL-L-Syt-II.

Die Fusionsproteine ließen sich in ausreichender Reinheit produzieren. Die Ausbeute der Aufreinigung war um den Faktor 10 schlechter als bei reinem BoNT/BSL. Um die für die Kristallisation erforderliche Konzentration von 12-15 mg/mL zu erreichen, musste das Protein konzentriert werden.

4.4.4.3 GST-Pull-Down Assays mit BoNT/BSL-Syt-II

Ob das Syt-II 1-61 auch mit der Bindungstasche in BoNT/B interagiert, wurde mit einem GST-Pull-Down Assay überprüft. Sollte das Peptid im Fusionsprotein tatsächlich mit der Bindungstasche interagieren, dürfte zusätzlich dazugegebenes Syt-II 1-61 nicht mehr binden können, da die Tasche dann belegt wäre.

An GT-Sepharosebeads wurde GST-Syt-II 1-61 und zur Kontrolle nur GST gebunden. Anschließend wurde mit BoNT/BSL oder BoNT/BSL-Syt-II inkubiert. Nach Phasentrennung und Entfernen ungebundenen Proteins erfolgte die Analyse der Festphase mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung:

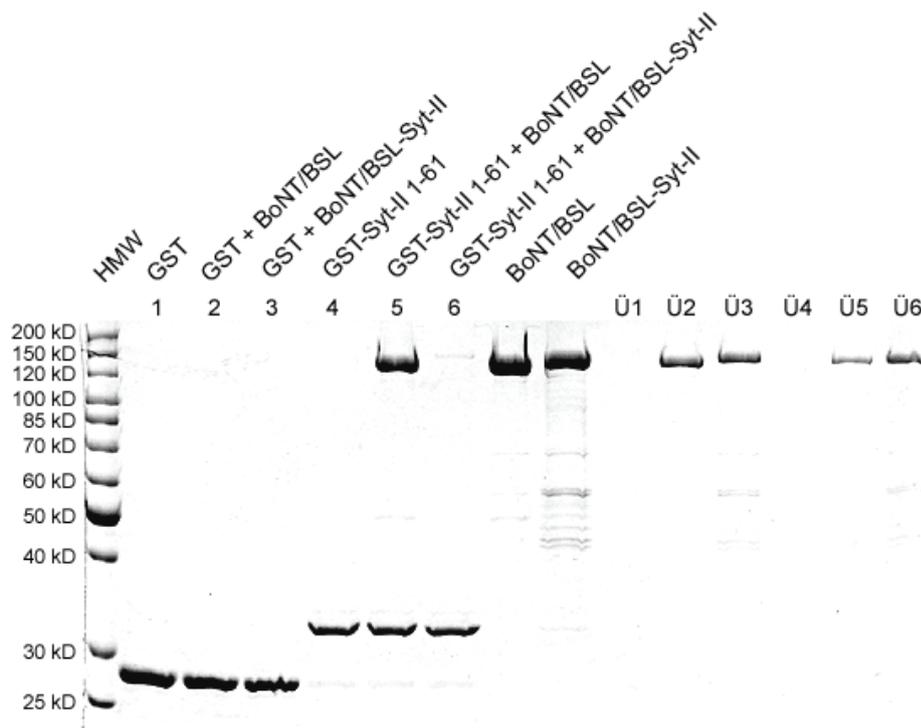


Abb. 16: Analyse der Proben des GST-Pull-Down Assays mit BoNT/BSL-Syt-II durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung. Gezeigt sind die an GT-Sepharosebeads gebundenen Proteine (Spuren 1-6), die eingesetzten Toxine (BoNT/BSL und BoNT/BSL-Syt-II) sowie die Überstände mit den ungebundenen Proteinen (Spuren Ü1-Ü6).

Es ist deutlich zu erkennen, dass BoNT/BSL an das GST-Syt-II 1-61 bindet (Spur 5), das Fusionsprotein BoNT/BSL-Syt-II allerdings nicht (Spur 6). Mehrwinkellichtreuungsexperimente (MALS) zeigen, dass zwischen den einzelnen Fusionsproteinen keine *trans*-Komplexe gebildet werden (persönliche Mitteilung Dr. Rongsheng Jin). Aus diesen beiden Beobachtungen lässt sich schließen, dass das Synaptotagmin-II Peptid im Fusionsprotein die Bindungstasche belegt, so dass zusätzliches Syt-II nicht mehr gebunden werden kann.

4.4.4.4 Toxizitätsassay am *Nervus phrenicus* der Maus

Einen weiteren Beweis für die intramolekulare Bindung des Synaptotagmin-II Peptids des Fusionsproteins an BoNT/B sollte das Toxizitätsassay am *Nervus phrenicus* der Maus (siehe 3.3.3) liefern. Dazu wurden parallel rekombinant hergestelltes BoNT/BSL sowie die beiden Fusionsproteine BoNT/BSL-Syt-II und BoNT/BSL-L-Syt-II getestet.

Tabelle 7: Toxizität der BoNT/BSL-Syt-II Fusionsproteine an Zwerchfellpräparationen der Maus. Gezeigt sind die erzielten Paralysezeiten bei verschiedenen Konzentrationen und die daraus berechnete Toxizität.

	2 nM [min ± SD]	Toxizität ^a [%]
scBoNT/BSL wt	53 ± 10	100
scBoNT/BSL-Syt-II	132	5,3
scBoNT/BSL-L-Syt-II	116	8,0

$$^a y=65,394x^{-0,3106}, R^2=0,9997$$

Beide Fusionsproteine zeigen eine mehr als zehnfache Verminderung der Toxizität im Vergleich zum BoNT/B Wildtyp. Offenbar kann das an den C-Terminus des Neurotoxin angehängte Syt-II auch unter *ex vivo* Bedingungen in der Rezeptorbindungstasche von BoNT/B binden, wodurch die Bindung des Neurotoxins an die Synaptotagmin-Rezeptoren des *Nervus phrenicus* der Maus weitgehend unterbunden wird.

Diese Beobachtung, zusammen mit den Ergebnissen des GST-Pull-Down Assays, lässt darauf schließen, dass das Synaptotagmin-II Peptid in beiden Fusionsproteinen so gefaltet wird, dass es in der richtigen Position in seiner Rezeptorbindungstasche von Botulinum Neurotoxin Typ B zu liegen kommt. Diese Konstrukte sind also für eine Co-Kristallisation geeignet, wobei bei scBoNT/BSL-L-Syt-II der längere Spacer auch eine korrekte Packung der Moleküle verhindern könnte. Daher wurde scBoNT/BSL-Syt-II zur Kristallisation ausgewählt.

4.4.4.5 Aufreinigung von H_CBoNT/BSL-Syt-II

Aufgrund von US-amerikanischen Sicherheitsbedenken wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, um die Kristallisation des Co-Komplexes von BoNT/B mit seinem Proteinrezeptor Synaptotagmin-II zu ermöglichen. Da für die Bindung des Rezeptors das H_C-Fragment des Toxins ausreichend ist, wurde ein Fusionsprotein konstruiert, welches lediglich dieses H_C-Fragment und das Syt-II Peptid enthält (siehe 4.4.4.1). Da das Fusionsprotein somit viel kleiner ist und keine für die Interaktion unnötigen Bereiche enthält, ist eine Kristallisation vielversprechender. Für die Aufreinigung von rekombinantem Fusionsprotein wurde wiederum ein Konstrukt mit N-terminalem H₆-tag (H₆H_CBS-Syt-II) eingesetzt, um eine möglichst große Reinheit erzielen zu können.

Die nach Konzentration erzielte Proteinkonzentration war mit 8 mg/mL für Kristallisationsversuche ausreichend und Aliquots dieser Präparation wurden an den Kooperationspartner weitergegeben.

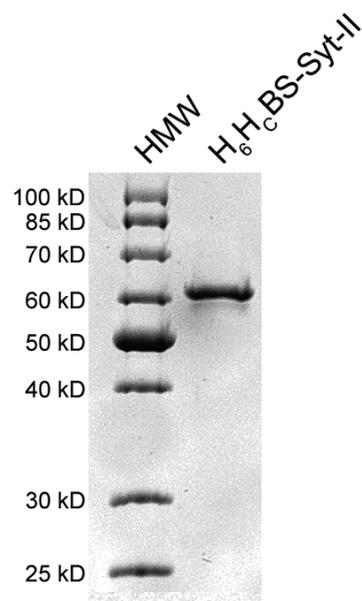


Abb. 17: SDS-PAGE von gereinigtem H₆H_CBS-Syt-II. Im hergestellten Fusionsprotein sind keine Verunreinigungen oder Abbauprodukte zu erkennen.

4.5 In welchem Bereich bindet BoNT/A seinen Rezeptor SV2?

Zu Beginn dieser Arbeit war weder der Proteinrezeptor von Botulinum Neurotoxin Serotyp A, noch die Position seiner Bindungstasche bekannt. Ziel war es, diesen Bindungsbereich auf dem Toxin zu finden oder einzugrenzen. Für BoNT/B und G konnte seitdem in detaillierten Mutationsstudien die Lage der Synaptotagminbindungstasche und die Rolle einzelner Aminosäuren aufgeklärt werden (Rummel *et al.*, 2007).

Zur Identifizierung des putativen Bereiches der Proteinrezeptorbindungstasche auf BoNT/A wurden aus den bekannten Kristallisationsdaten von BoNT/B und BoNT/A erstellte 3D-Modelle verglichen. Um zu testen, ob der Rezeptor in diesem Bereich bindet, wurden einzelne Aminosäuren, welche einen Einfluss auf die Bindung haben könnten, ausgewählt und mutiert. scBoNT/A Mutanten wurden produziert, isoliert und anschließend im *Mouse Phrenic Nerve Assay* (siehe 3.3.3) auf Toxizität getestet.

Zwischenzeitlich wurde SV2 als der Proteinrezeptor für BoNT/A entdeckt (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006). Daher konnte die Bindung der Mutanten, welche die ausgeprägtesten Effekte im MPN-Assay gezeigt hatten, auch direkt an SV2 mittels *GST-Pull-Down Assays* untersucht werden.

4.5.1 Bindet SV2 in der H_{CN}- oder H_{CC}-Domäne von BoNT/A?

Zur groben Lokalisierung der Proteinbindungstasche von BoNT/A wurde die Bindung von GST-SV2C an den isolierten H_{CN}- und H_{CC}-Domänen überprüft. Bei BoNT/B liegt der Bereich, welcher den Proteinrezeptor Synaptotagmin-II bindet, in der H_{CC}-Domäne (Rummel *et al.*, 2004). In einem *GST-Pull-Down Assay* wurde GST-SV2C mit *in vitro* translatierten radioaktiv markierten H_{CN}A und H_{CC}A inkubiert.

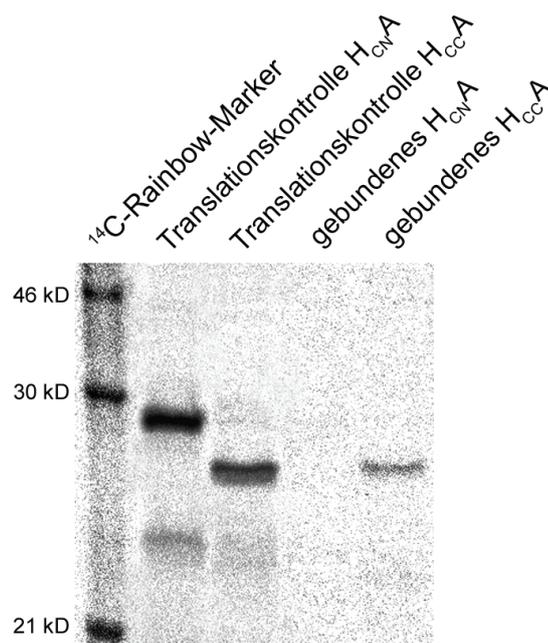


Abb. 18: GST-Pull-Down Assay mit GST-SV2C und den H_{CN}- und H_{CC}-Domänen von BoNT/A. Die Translationskontrolle dient als Referenz für die Menge an eingesetztem H_{CN}A und H_{CC}A. Die radioaktiven Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Es ist zu erkennen, dass nur die H_{CC} -Domäne an den Rezeptor bindet. Somit ist davon auszugehen, dass analog zu BoNT/B und G sich die Bindungstasche von SV2C auf der Oberfläche der H_{CC} -Domäne von BoNT/A befindet.

4.5.2 Mutagenese einzelner Aminosäuren in der H_{CC} -Domäne von BoNT/A

Den für die Rezeptorbindung wahrscheinlichsten Bereich in der H_{CC} -Domäne stellte eine flache Tasche distal zur H_{CN} -Domäne dar. Sie befindet sich an ähnlicher Position wie die für BoNT/B identifizierte Bindungstasche (Rummel *et al.*, 2007) und in der Nähe der Gangliosidbindungstasche. Durch die Lage an der äußersten Spitze des Toxins wäre die Bindung an einen membranständigen Rezeptor vermutlich nicht sterisch behindert und das Toxin durch die vorangehende Gangliosidbindung bereits richtig ausgerichtet (siehe Abb. 19).

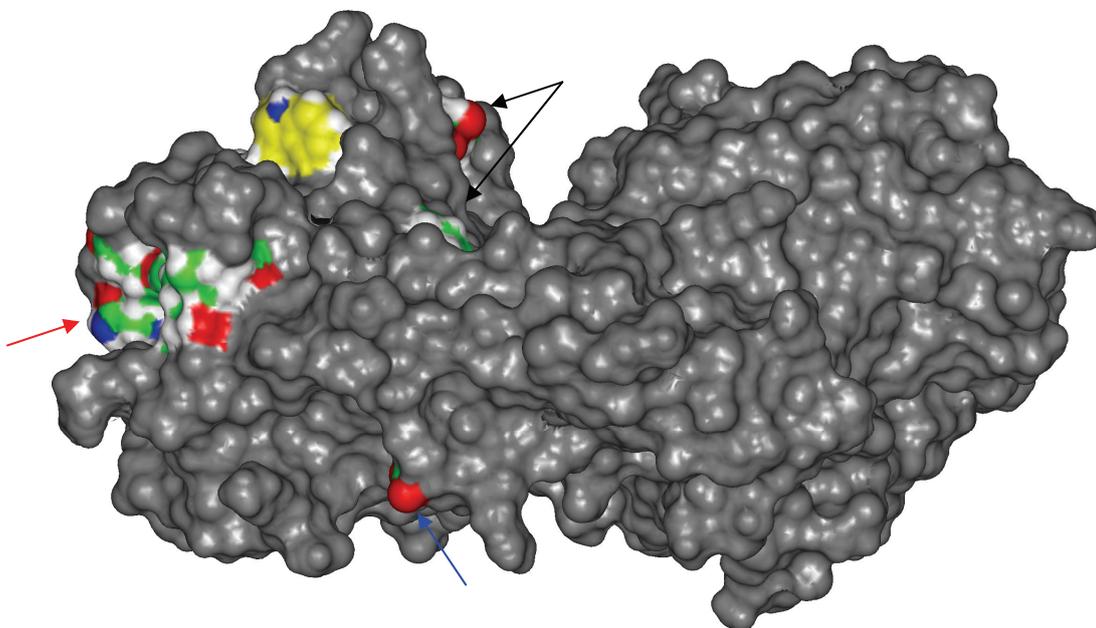


Abb. 19: 3D-Oberflächenmodell des H_C -Fragments von BoNT/A. Man erkennt die durch einen Spalt getrennten H_{CC} - (links) und H_{CN} -Domänen (rechts). Die zur Mutation ausgewählten Aminosäuren im potentiellen Rezeptor-Bindungsbereich der H_{CC} -Domäne (roter Pfeil), sowie zwei im Spalt zwischen den beiden Domänen (schwarze Pfeile) wurden farblich hervorgehoben. Die Aminogruppen sind blau, die Carboxyl-Gruppen rot, die Kohlenstoffatome grün und Wasserstoffe hellgrau dargestellt. Zur Orientierung ist das Tryptophan der Gangliosidbindungstasche (gelb) und der C-Terminus des Proteins ebenfalls eingefärbt (blauer Pfeil).

Dort wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese (siehe 3.1.12) einzelne Aminosäuren so verändert, dass die Bindung des Rezeptors vermutlich erschwert werden würde. Zur Absicherung wurden außerdem zwei Aminosäuren im Spalt zwischen H_{CN} - und H_{CC} -Domäne (P1119E und S1275R), sowie eine Aminosäure in der Nähe der Gangliosidbindungstasche (N1265R) mutiert. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der Mutationen:

Tabelle 8: Übersicht über die hergestellten Mutanten in der H_{CC}-Domäne von BoNT/A

Aminosäure	Wildtyp	Mutante	veränderte Eigenschaft
1119	Prolin / P	Glutaminsäure / E	unpolar → sauer
1133	Tyrosin / Y	Lysin / K Glutaminsäure / E	polar → basisch polar → sauer
1196	Asparagin / N	Glutaminsäure / E	polar → sauer
1199	Glutamin / Q	Tryptophan / W	sterische Behinderung
1205	Isoleucin / I	Tryptophan / W	sterische Behinderung
1207	Serin / S	Arginin / R Tyrosin / Y	polar → basisch sterische Behinderung
1255	Phenylalanin / F	Histidin / H	hydrophob → basisch
1258	Isoleucin / I	Histidin / H Glutaminsäure / E	hydrophob → basisch unpolar → sauer
1260	Lysin / K	Glutaminsäure / E	basisch → sauer
1265	Asparagin / N	Arginin / R	Abstoßung
1275	Serin / S	Arginin / R	Abstoßung

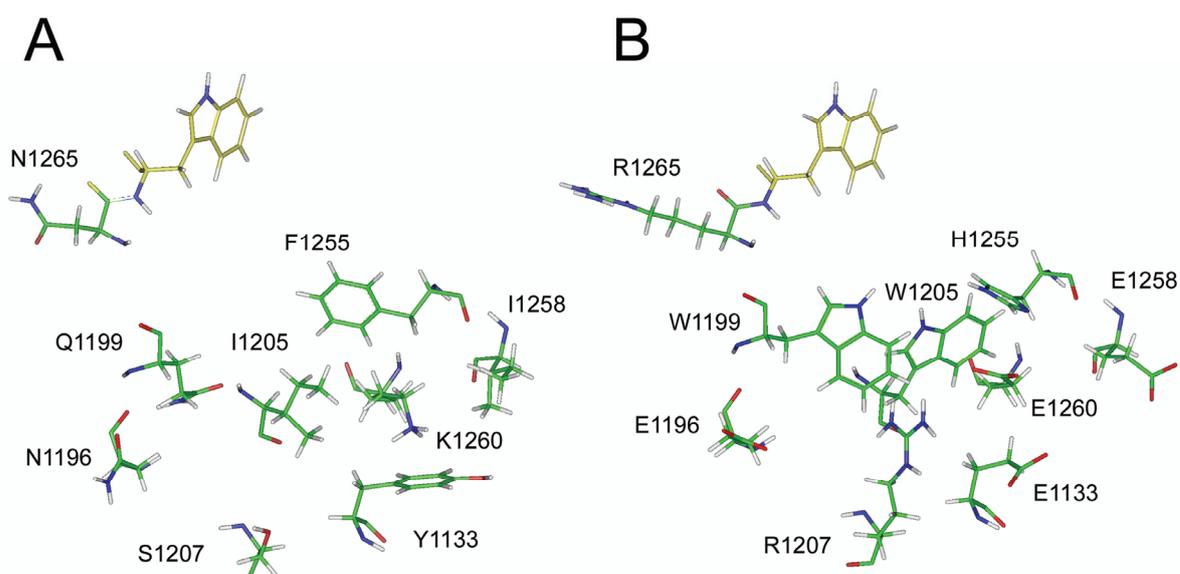


Abb. 20: Vergleich der Wildtyp- (A) und der mutierten Aminosäuren (B) in der potentiellen Rezeptorbindungstasche von BoNT/A in der direkten Draufsicht; Stickstoffatome sind blau, Sauerstoffatome rot, die Kohlenstoffatome grün und Wasserstoffe hellgrau dargestellt. Zur Orientierung ist das Tryptophan der Gangliosidbindungstasche (gelb) gezeigt. Die Kontrollmutanten im Spalt zwischen der H_{CN}- und der H_{CC}-Domäne (P1119E und S1275R) sind nicht dargestellt.

Die Mutanten wurden alle aus dem Plasmid pAtAAAS2 erzeugt und als volle Länge Toxin mit *Strep*-tag® aufgereinigt:

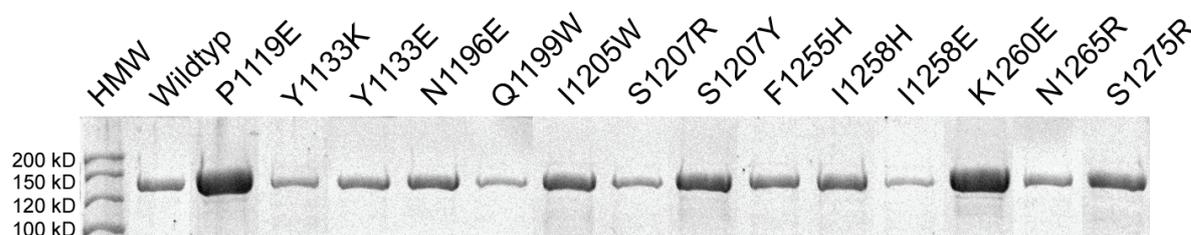


Abb. 21: SDS-PAGE der isolierten single chain Mutanten von BoNT/A und des Wildtyps (AtAAAS). Die Reinigung aus *E. coli*-Lysat erfolgte gemäß Kapitel 3.2.4. Die erhaltenen Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert. Aufgetragen sind jeweils 10 μ L der gepoolten Elutionslösung je Spur.

Tabelle 9: Übersicht der Ausbeute aller gereinigten BoNT/A-Mutanten.

Toxin / Mutante	Konzentration	
	[μ g / μ L]	[nM]
Wildtyp	0,027	178,2
P1119E	0,113	745,8
Y1133K	0,017	112,2
Y1133E	0,028	184,8
N1196E	0,037	244,2
Q1199W	0,014	92,4
I1205W	0,052	343,2
S1207R	0,019	125,4
S1207Y	0,064	422,4
F1255H	0,032	211,2
I1258H	0,043	283,8
I1258E	0,011	72,6
K1260E	0,113	745,8
N1265R	0,021	138,6
S1275R	0,053	349,8

Alle Mutanten waren unter physiologischen Bedingungen löslich, die Ausbeuten schwankten zwischen 0,011 μ g / μ L (I1258E) und 0,113 μ g / μ L (P1119E und K1260E). Keine Mutante war zu mehr als 5% durch *E. coli* Proteasen während der Reinigung aktiviert worden.

4.5.3 Toxizitätstest der BoNT/A Mutanten im *Mouse Phrenic Nerve Assay*

Mit dem *Mouse Phrenic Nerve* (MPN) Assay kann die Aktivität der Botulinum Neurotoxine an deren natürlichem Wirkort quantifiziert werden. Er eignet sich somit, die Auswirkung der vorgenommenen Mutationen quantitativ zu erfassen. Mit der Versuchsanordnung des MPN Assays (siehe 3.3.3) lassen sich Paralysezeiten zwischen ca. 40 min und 3-4 h messen. 30 min ist die Totzeit der Versuchsanordnung, die Zeit, die das Toxin mindestens

braucht, um durch Diffusion die neuromuskulären Endplatten des Zwerchfells zu erreichen, durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen zu werden, die katalytische Domäne in das Zytosol der Neuronen freizusetzen und Substratproteolyse zu katalysieren. Da die Lebensdauer des Zwerchfells im Organbad nicht unbegrenzt ist, stellen 3-4 h die Obergrenze für verlässliche Messungen der Toxizität dar.

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse des MPN-Assays des Wildtyps und der einzelnen Mutanten. Gezeigt sind die eingesetzten Konzentrationen und die erzielten Paralysezeiten mit Standardabweichungen. Es wurden in der Regel Doppelwerte für jede getestete Toxinkonzentration gemessen. Ist keine Standardabweichung angegeben, wurde nur ein Wert gemessen. Für die Messungen mit 100 pM Toxin wurde die Toxizität anhand einer scAtAAAS Wildtyp Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet.

Toxin / Mutante	Konzentration [pM]	Paralysezeit $t_{1/2}$ [min \pm SD]	Toxizität ^a [%]
Wildtyp	388	45,67 \pm 3,06	100
	100	74,5 \pm 7,19	
	38	99,67 \pm 11,93	
P1119E	373	52,5 \pm 6,36	125,5 \pm 5,1
	100	69 \pm 2,83	
Y1133K	234	68	108,4 \pm 5,3
	100	72,5 \pm 3,54	
	38	146 \pm 2,83	
Y1133E	444	52,5 \pm 4,95	61,1 \pm 7,9
	370	49	
	100	88 \pm 11,31	
N1196E	385	59	37,2 \pm 4,1
	122	69,67 \pm 5,13	
	100	104 \pm 11,31	
Q1199W	739	42	40,6 \pm 2,3
	439	43 \pm 4,24	
	100	101 \pm 5,66	
I1205W	362	48	125,5 \pm 12,9
	100	69 \pm 7,07	
S1207R	738	32,5 \pm 4,95	180,8 \pm 16,8
	369	33 \pm 1,41	
	100	61 \pm 5,66	
S1207Y	346	39,5 \pm 3,54	176,4 \pm 30,4
	100	61,5 \pm 10,61	
F1255H	330	69 \pm 9,9	28,7 \pm 0,2
	100	113,5 \pm 0,71	
I1258H	267	87 \pm 15,56	41,8 \pm 1,2
	100	100 \pm 2,83	
I1258E	279	49	81,0 \pm 10,0
	100	80 \pm 9,9	

K1260E	15537 2355 388 100	28 43 139,5 ± 7,78 > 240	4,0 ($y=1618,2x^{-0,4336}$)
N1265R	1823 388 100	36,5 ± 4,95 56,5 ± 7,78 115,5 ± 3,54	27,3 ± 0,8
S1275R	2180 100	31,5 ± 0,71 75 ± 1,41	98,0 ± 1,8

^a $y=344,93x^{-0,3377}$, $R^2=0,9975$

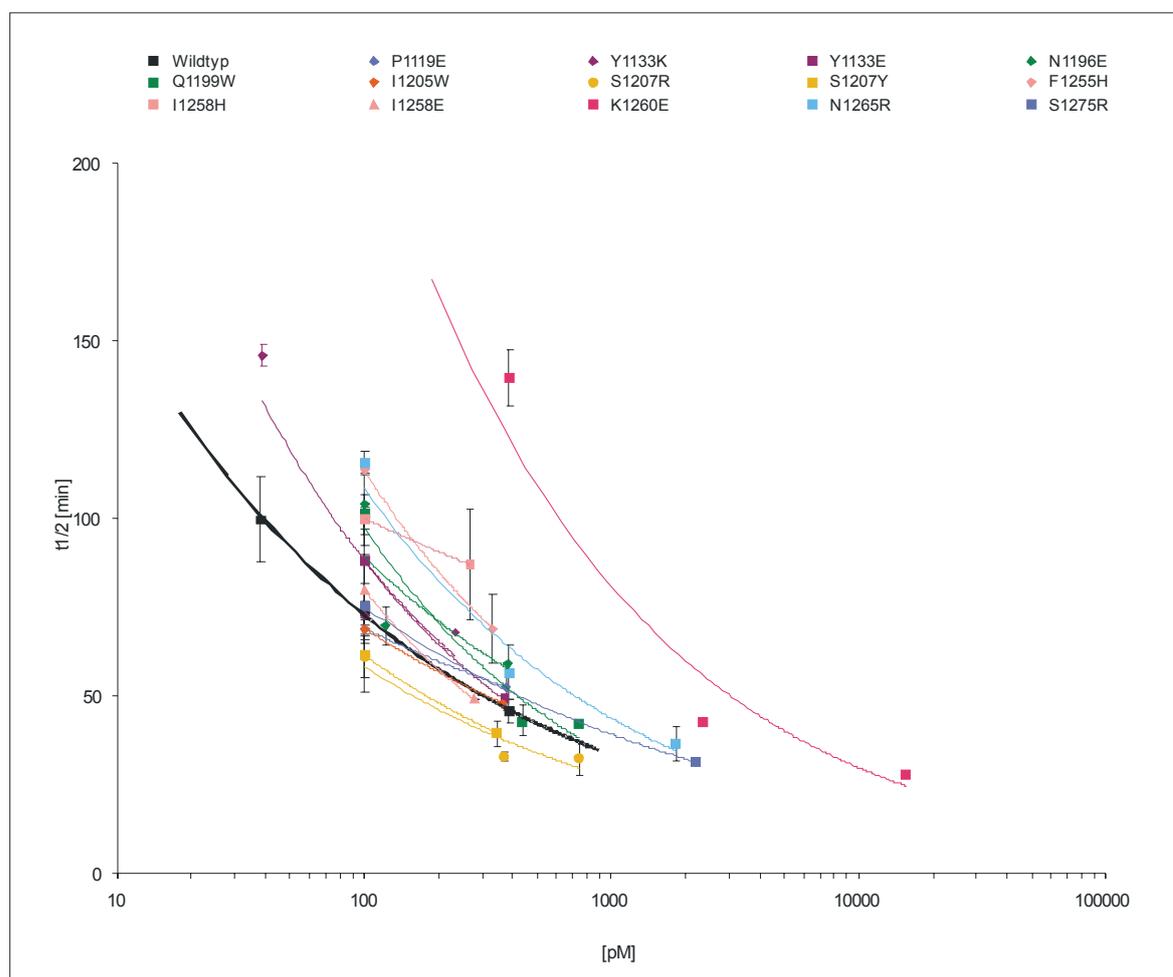


Abb. 22: Konzentrations-Wirkungskurven der im MPN-Assay eingesetzten BoNT/A Mutanten und des Wildtyps. Dargestellt sind die Paralysezeiten-Mittelwerte der getesteten Mutanten mit Standardabweichungen sowie die Kurven der daraus resultierenden Potenzfunktionen.

Die Konzentrations-Wirkungskurve des Wildtyps lässt sich mit der Potenzfunktion $y=344,93x^{-0,3377}$ beschreiben. Die für die Mutanten gemessenen Paralysezeiten wurden mittels dieser Funktion in entsprechende Wildtyp Konzentrationen umgerechnet. Die Toxizität wurde letztendlich als Prozentwert der Wildtyp Aktivität angegeben (siehe Abb. 23).

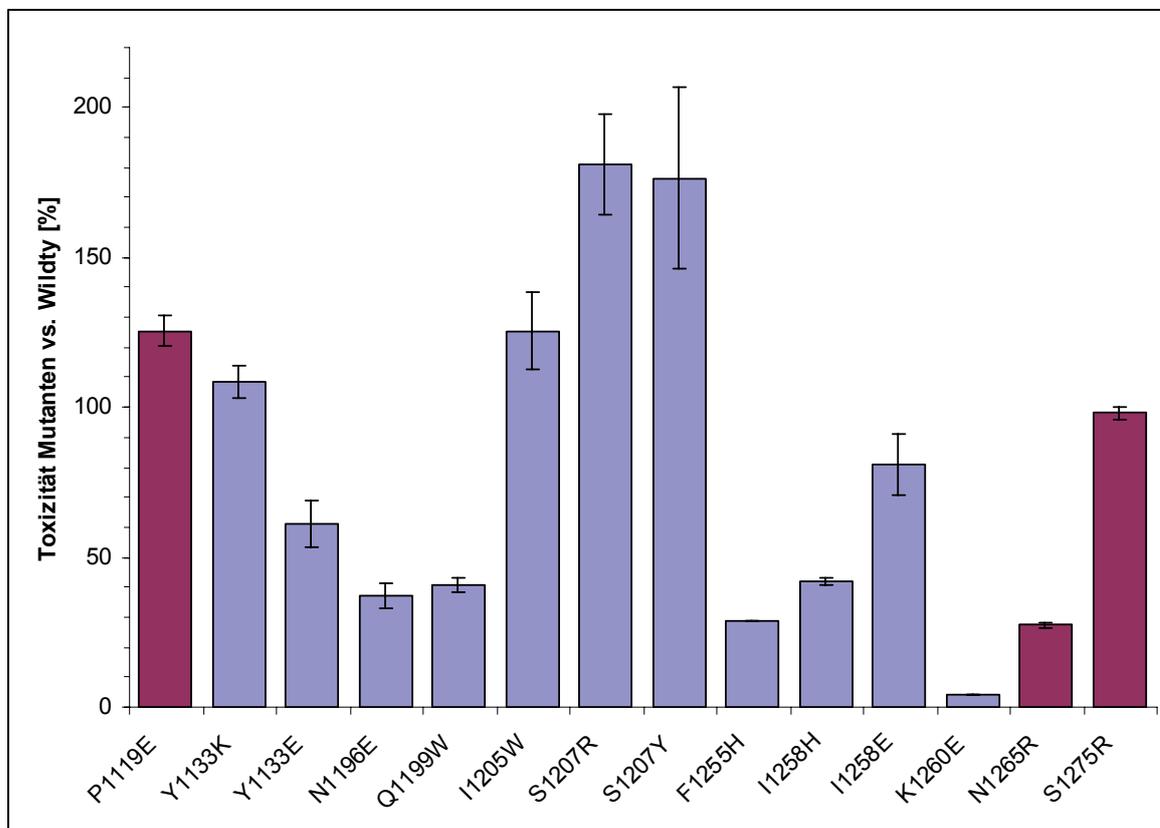


Abb. 23: Toxizität der einzelnen BoNT/A Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Toxizität des Wildtyps = 100 %). Die zur Kontrolle eingefügten Mutanten P1119E, S1275R und N1265R sind farblich abgesetzt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die eingefügten Mutationen unterschiedliche Auswirkungen auf die Toxizität von BoNT/A hatten. So zeigten die als Kontrolle im Spalt zwischen H_{CN} - und H_{CC} -Domäne eingefügten Mutationen (P1119E und S1275R) keine Veränderung der Aktivität, sie war ähnlich der des Wildtyps. Gleiches ließ sich auch bei den Mutanten I1205W und I1258E beobachten. Die Mutation N1265R in der Nähe der Gangliosidbindungstasche zeigte einen Effekt (~25% Restaktivität), der auf eine Beeinträchtigung der Gangliosidbindungstasche zurückzuführen sein könnte, und somit auch die Gangliosidbindung beeinflussen würde (siehe 4.5.5.2).

Die stärkste Verminderung der Toxizität ließ sich bei der Mutante K1260E erkennen, sie verringerte sich auf ca. 4%. Die Mutanten Y1133E, N1196E, Q1199W, F1255H und I1258H bildeten eine Gruppe mit verminderten Toxizitäten von 25% - 57%.

Bei den Mutanten Y1133K, S1207R und S1207Y war eine Steigerung der Toxizität im Vergleich zum Wildtyp festzustellen, was möglicherweise durch eine verbesserte Bindung an den Proteinrezeptor von BoNT/A erklärt werden könnte.

4.5.4 Bindungstest der BoNT/A Mutanten an SV2 mittels GST-Pull-Down Assay

Zwischenzeitlich wurde der Proteinrezeptor für Botulinum Neurotoxin A entdeckt (Dong *et al.*, 2006; Mahrhold *et al.*, 2006) und so war es möglich, die Bindung der Mutanten an den Rezeptor direkt zu messen. Die Mutanten, welche beim MPN Assay die größten Effekte gezeigt hatten, wurden in GST-Pull-Down Assays eingesetzt. Dies waren H_CA N1196E, Q1199W, F1255H, I1258H, K1260E und N1265R. Außerdem wurde S1207R gewählt, da diese Mutante beim MPN Assay eine höhere Aktivität als der Wildtyp zeigte. Im GST-Pull-Down Assay ließe sich möglicherweise herausfinden, ob diese Beobachtung auf eine verbesserte Bindung an den Rezeptor zurückzuführen sei.

4.5.4.1 Umklonierung der mutierten H_{CC}-Genfragmente von BoNT/A in pSP72 Vektor

Um die BoNT/A-Mutanten als radioaktiv markierte Proteine *in vitro* herstellen zu können, mussten sie in einen Vektor umkloniert werden, der die *in vitro* Transkription/Translation ermöglicht. Da an der Rezeptorbindung nur das H_C-Fragment von BoNT/A beteiligt ist, wurde auch nur dieser Genabschnitt des Toxins in den pSP72 Vektor kloniert. Verwendet wurde das pSP72-H_CAAS Konstrukt (siehe Abb. 24; Rummel), bei dem der Genabschnitt für die H_{CC}-Domäne elegant mittels eines *NheI*/*SmaI* Verdaus ausgetauscht werden kann.

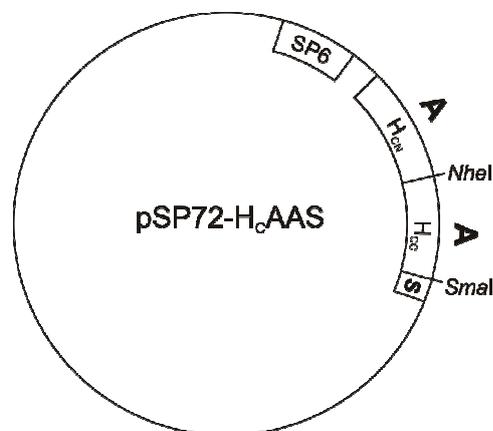


Abb. 24: pSP72-H_CAAS: enthält den SP6-RNA-Polymerasepromotor, die codierenden Abschnitte für die H_{CN}- und H_{CC}-Domänen von BoNT/A sowie den C-terminalen Strep-tag® (S). Die gezeigten Restriktionsendonukleasenschnittstellen dienen dem gezielten Austausch einzelner Toxin-Domänen.

Das Konstrukt leitet sich vom Plasmid pAtAAAS2 ab (Stefan Marhold, Diplomarbeit 2004). Dieses kodiert für das vollständige BoNT/A und wurde für einfaches Austauschen der einzelnen Toxin-domänen (LC, H_N, H_{CN}, H_{CC}) zwischen verschiedenen Serotypen konstruiert. Dazu wurde zwischen den Abschnitten, die einzelne Domänen kodieren, jeweils eine neue Restriktionsendonukleasenschnittstelle eingefügt. Der Name leitet sich von der Abfolge der einzelnen Domänen ab. Da hier mit BoNT/A gearbeitet werden sollte, wurde der Klon pAtAAAS2 verwendet, welcher nur Domänen von A enthält. Das `t`

bezeichnet eine eingefügte Thrombinschnittstelle zwischen leichter und schwerer Kette und die '2' einen Klon, bei dem eine *NheI* Schnittstelle hinter der MCS entfernt wurde.

4.5.4.2 Ergebnisse des GST-Pull-Down Assays

Für die GST-Pull-Down Assays wurde der Rezeptor SV2C als GST-Fusionsprotein benötigt. Es wurden zwei Konstrukte von SV2C eingesetzt: die intraluminale Domäne 4 mit und ohne C-terminaler Transmembrandomäne (AA 454-579; AA 454-603; Mahrhold *et al.*, 2006). Die Ausbeute betrug für das Konstrukt mit Transmembrandomäne (SV2C 454-603) 0,13 µg / µL und für das ohne Transmembrandomäne (SV2C 454-579) 2,0 µg / µL.

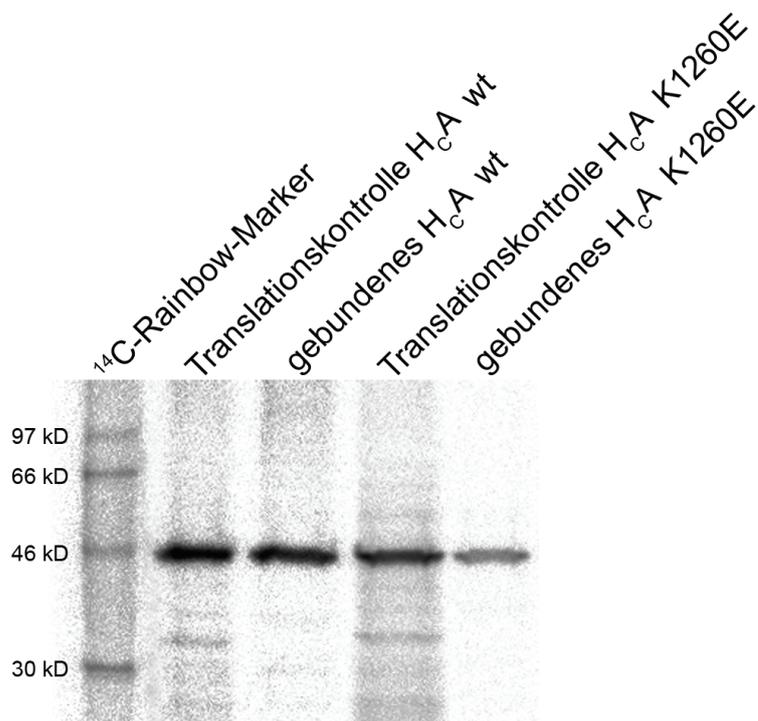


Abb. 25: GST-Pull-Down Assay mit GST-SV2C 454-579 und den H_c-Fragmenten von BoNT/A wt und der Mutante K1260E nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Hier ist beispielhaft für alle anderen analog durchgeführten GST-Pull-Down Assays der Wildtyp zusammen mit der den größten Effekt zeigenden Mutante dargestellt.

Die GST-Pull-Down Assays (siehe 3.3.4) wurden mit beiden SV2C-Konstrukten durchgeführt: Es war von ähnlichen Versuchen bekannt (Rummel *et al.*, 2007), dass die Bindungsaffinität der Konstrukte mit Transmembrandomäne geringer war als die von entsprechenden Konstrukten ohne diese Domäne. Der Grund dafür könnte sein, dass durch die Inkorporierung in Triton X-100 Micellen die membrannahen Aminosäuren nicht mehr ungehindert zugänglich sind und damit nicht mehr für die Bindung des Toxins zur Verfügung stehen. Weitere Versuche zeigten, dass dieser Effekt durch Zugabe von Gangliosiden überkompensiert werden kann, da dann auch der zweite Rezeptor in der Micelle präsent ist. Deshalb wurden die GST-Pull-Down Assays mit dem Konstrukt mit Transmembrandomäne (GST-SV2C 454-603) im Beisein von Gangliosiden durchgeführt. Abb. 26 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

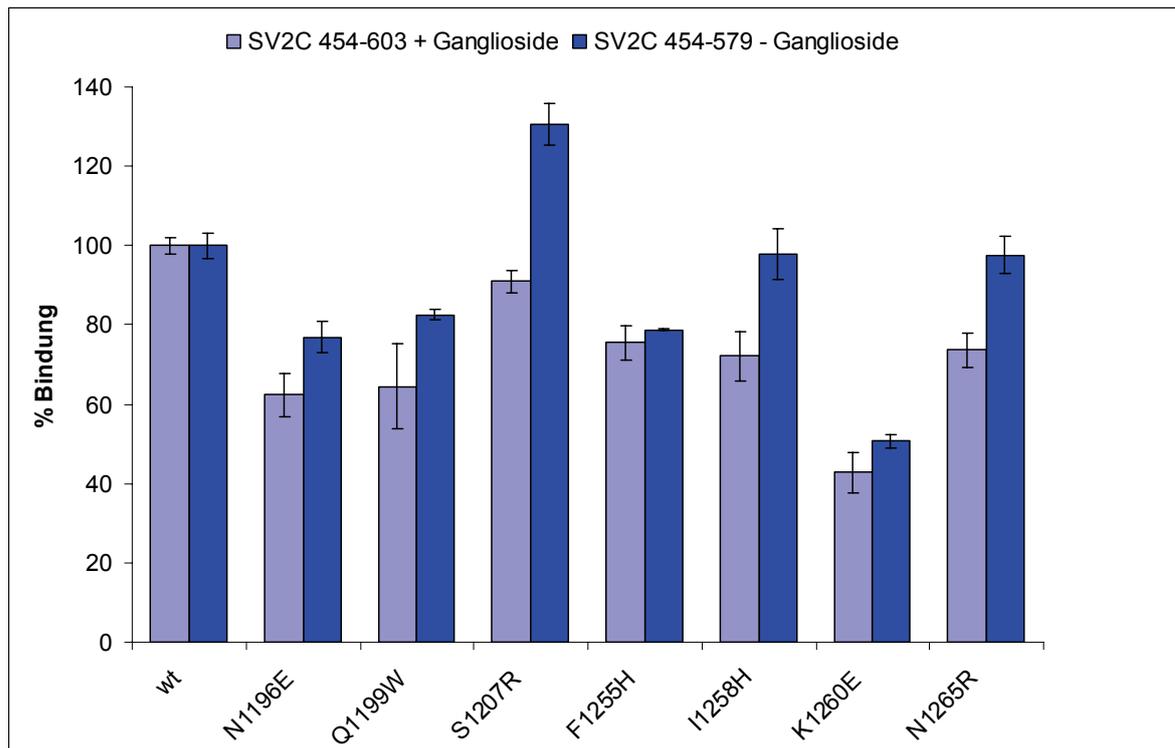


Abb. 26: Ergebnisse der *GST-Pull-Down Assays* mit *GST-SV2C 454-603* im Beisein von Gangliosiden, sowie mit *GST-SV2C 454-579* ohne Ganglioside. Dargestellt ist die Bindung der einzelnen BoNT/A Mutanten an SV2C im Vergleich zur Bindung des Wildtyps.

Die Ergebnisse des *Mouse Phrenic Nerve Assays* konnten durch diese *GST-Pull-Down Assays* bestätigt werden (siehe Abb. 23). Die Tendenzen in der Zu- oder Abnahme der Bindung der einzelnen Mutanten stimmten in beiden Versuchsansätzen überein. Auffällig ist, dass die Bindungsaffinitäten der H_CA Mutanten zu *GST-SV2C 454-603* insgesamt stärker abnahmen als die zu *GST-SV2C 454-579*. Eine Ausnahme bildete hier wiederum die Mutante S1207R, welche im Versuch ohne Transmembrandomäne und Ganglioside besser als der Wildtyp an SV2C band. Die anderen Mutanten wiesen eine geringere Affinität zum Rezeptor auf, wobei K1260E wiederum den stärksten Effekt zeigte. Es waren nur noch ca. 43% der Bindung des Wildtyps messbar. Bei den anderen Mutanten lagen die Werte zwischen 62% und 75%.

4.5.5 Kontrolle der Gangliosidbindung

Sind die Bindungsunterschiede der einzelnen Mutanten im GST-Pull-Down Assay wirklich jeweils auf die Behinderung der Proteinrezeptorbindung zurückzuführen, oder sind Beeinträchtigungen der Struktur der H_{CC}-Domäne ursächlich für die verminderte Bindung der Mutanten. Um dies zu untersuchen wurde überprüft, ob die Bindung an Ganglioside unbeeinträchtigt ist.

4.5.5.1 Bindungstest der BoNT/A Mutanten an Synaptosomen

Die Ergebnisse der Synaptosomenbindungs-Assays der radioaktiv markierten Mutanten (siehe 3.3.5) sind in Abb. 27 dargestellt:

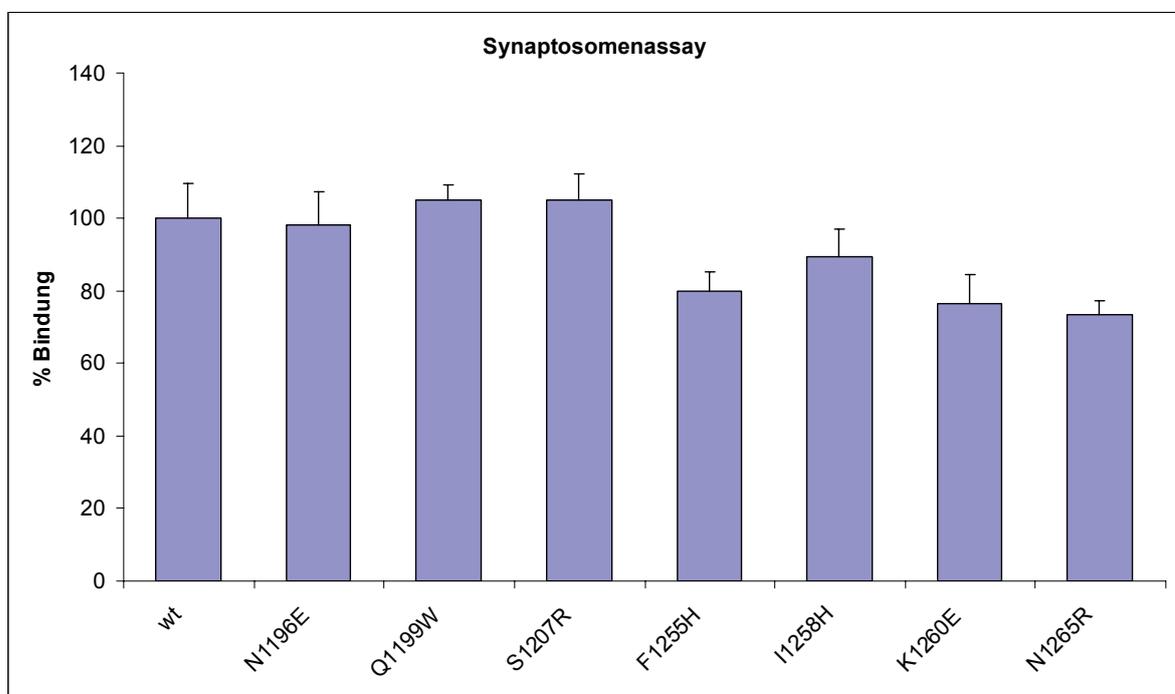


Abb. 27: Auswirkung von Mutationen in der Proteinrezeptorbindungstasche auf die Bindung an Rattenhirnsynaptosomen. Dargestellt ist die Bindung der *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten BoNT/A Mutanten an Synaptosomen im Vergleich zur Bindung des Wildtyps.

Keine der BoNT/A Mutanten zeigt eine auffallend verringerte Bindung an Synaptosomen im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Gangliosidbindung der Mutanten nicht beeinträchtigt ist, da bei unstimulierten Synaptosomen die Hauptinteraktion mit dem H_C-Fragment über Ganglioside läuft.

4.5.5.2 Test der BoNT/A Mutanten im ELISA

Der Test wurde mittels immobilisierten Gangliosiden durch ELISA (siehe 3.3.1) durchgeführt. Da die Gangliosidbindungstasche nicht mutiert wurde, sollten alle erzeugten Mutanten bis auf die Mutation N1265R genauso gut binden wie der Wildtyp, sofern die Struktur der H_{CC}-Domäne intakt wäre.

Die Wells einer 96-Well Platte wurden mit je 1 µg G_T1b Gangliosid beschichtet und für 2 Stunden mit 100 µL scBoNT/A Wildtyp/Mutanten (14 ng / µL) inkubiert.

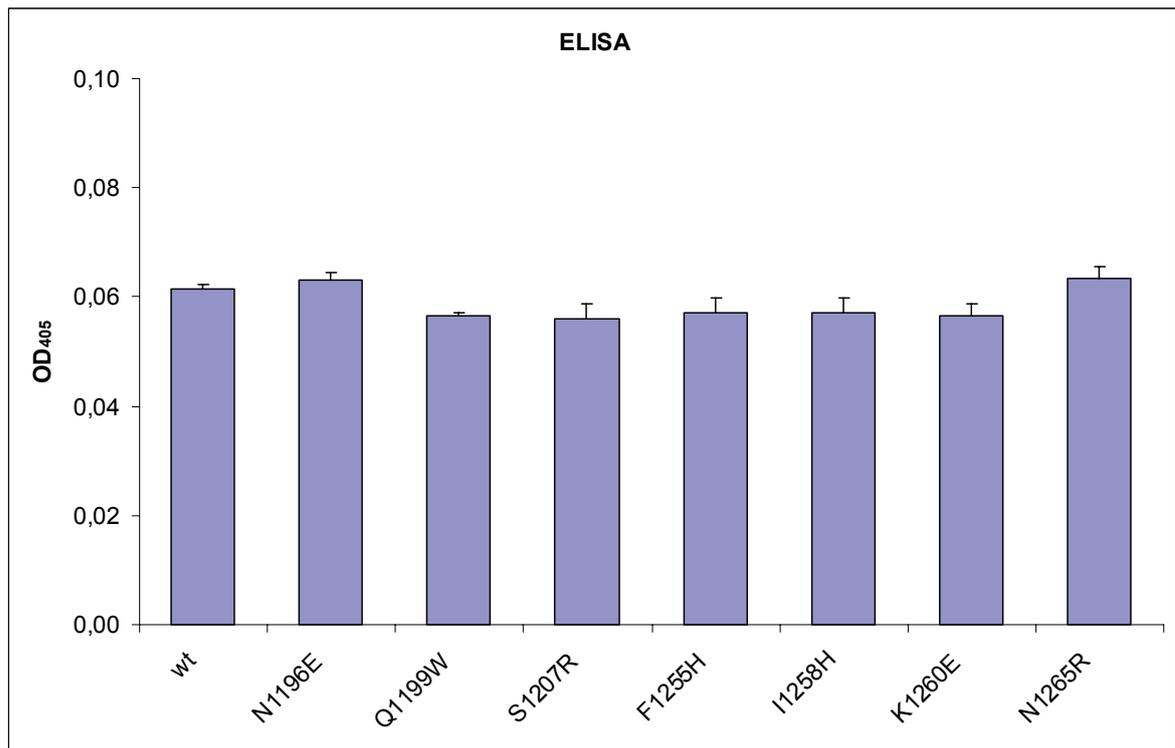


Abb. 28: Interaktion der BoNT/A-Mutanten mit immobilisierten Gangliosiden. Dargestellt ist die Bindung im Vergleich zur Bindung des Wildtyps. Es wurden für jede Mutante Doppelwerte bestimmt.

Es sind keine Abweichungen in der Gangliosidbindung zwischen den Mutanten und dem Wildtyp zu erkennen.

Sowohl beim Synaptosomenbindungs Assay als auch im ELISA wäre für die Mutante N1265R eine gestörte Synaptosomenbindung zu erwarten gewesen, denn sie befindet sich in der Nähe der Gangliosidbindungstasche und nicht in der vermuteten Proteinrezeptorbindungsdomäne. Da keine oder nur schwache Effekte in der Gangliosidbindung zu detektieren waren, ist die im MPN-Assay gemessene Abnahme der Toxizität dieser Mutante nicht auf eine Beeinträchtigung der Gangliosidbindungstasche zurückzuführen.

5 Diskussion

5.1 Rekombinantes BoNT/E und BoNT/G lassen sich in hoher Ausbeute und Reinheit in *E. coli* produzieren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals volle Länge Konstrukte von Botulinum Neurotoxin Serotyp E, F und G kloniert, rekombinant in *E. coli* produziert und isoliert. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der CNT-Suszeptibilität von PC12-Zellen (siehe 5.2), sowie für die Kristallisation der rekombinanten Proteine (siehe 5.3).

Die Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von rekombinanten Toxinfragmenten wurde in den letzten Jahren konzentriert verfolgt. Dabei wurden in den meisten Fällen die leichten Ketten von BoNT/A oder TeNT charakterisiert (Li & Singh, 1999; Tonello *et al.*, 1999; Kadkhodayan *et al.*, 2000) und in einigen Arbeiten versucht, diese rekombinanten Fragmente mit der nativen (Zhou *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1994) oder der rekombinanten (Li *et al.*, 1999) schweren Kette zu rekonstituieren. Die rekombinanten leichten Ketten waren katalytisch genauso aktiv wie die nativen, auch die rekonstituierten Toxine verhielten sich wie die nativen Toxine, jedoch waren die Ausbeuten an rekonstituiertem Toxin in allen Fällen sehr gering. Folgende Gesamttoxine konnten bisher in *E. coli* rekombinant hergestellt werden: aktives BoNT/A und BoNT/B (Rummel *et al.*, 2004a), BoNT/C als katalytisch inaktive Mutante (Kiyatkin *et al.*, 1997), aktives BoNT/D (Bade *et al.*, 2004) und TeNT (Li *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass auch Botulinum Neurotoxin Typ E, F und G rekombinant in *E. coli* produziert werden können, BoNT/E und BoNT/G in hoher Ausbeute und Reinheit. Die Ausbeute der BoNT/F Produktion war ungefähr um den Faktor 10 geringer als bei den anderen beiden Serotypen. Tests mit verschiedenen Aufreinigungsbedingungen (IPTG-Konzentration, Inkubationstemperatur, Induktion mittels Perfusor) führten zu keiner Erhöhung der Ausbeute. Der Promotorbereich wurde sequenziert und wies keine Mutationen auf. Ein weiterer möglicher Grund dieses Problems könnte die Verwendung des T5-Promotors des pQE-Plasmids sein. Doch auch die Umklonierung von BoNT/F in pSP73 unter die Kontrolle des T7-Promotors führte zu keiner Steigerung der Proteinausbeute. Ein Vergleich der Codon Nutzung von BoNT/F mit der von BoNT/A oder BoNT/E ergab keine Auffälligkeiten. Da für die verschiedenen Experimente eine vergleichbare Ausgangskonzentration aller BoNT Serotypen benötigt wurde, wurde BoNT/F konzentriert. Um die geringe Ausbeute der BoNT/F Produktion zu erhöhen, könnte man ein synthetisches Gen mit einer für *E. coli* optimierten Codon Nutzung erstellen und exprimieren.

Die volle Länge Konstrukte mit Wildtyp-Loop von BoNT/F und BoNT/G wurden nicht direkt bei der Aufreinigung in *E. coli* zwischen leichter und schwerer Kette aktiviert. Auf SDS-Polyacrylamidgelen konnte das ungenickte Einzelkettenprotein durch Auftreten der ~150 kDa großen Bande nachgewiesen werden. Für die Experimente an PC12-Zellen und an Zwerchfellpräparationen von Mäusen war aktiviertes Neurotoxin nötig, da dieses sehr viel toxischer ist als das Einzelkettenprotein. Diese Diskrepanz in der Toxizität zwischen dem Einzelkettentoxin und dem genickten Toxin wurde bereits bei anderen Serotypen beobachtet. Natives BoNT/E wird durch das Nicking ungefähr 100mal potenter (Datta &

DasGupta, 1988), natives BoNT/B (Maisey *et al.*, 1988) sowie rekombinantes BoNT/G (Rummel *et al.*, 2004) um den Faktor 10 (Maisey *et al.*, 1988) und auch rekombinantes TeNT ist als Zweikettenprotein 2 bis 2,5mal aktiver (Li *et al.*, 2001). Nach rezeptorvermittelter Endozytose durchlaufen die clostridiellen Neurotoxine saure Kompartimente (Williamson & Neale, 1994; Matteoli *et al.*, 1996). Diese pH-Wert Erniedrigung zieht vermutlich eine Exposition hydrophober Bereiche nach sich, die das Molekül befähigt, mit Membranen zu interagieren (Boquet *et al.*, 1984; Roa & Boquet, 1985). Die darauf folgende Bildung einer Pore oder eines Spaltes führt schließlich zur Translokation der leichten Kette (Boquet & Duflo, 1982; Cabiaux *et al.*, 1985; Montecucco *et al.*, 1986; Montecucco *et al.*, 1989). Die Steigerung der Toxizität durch die Überführung in die Zweikettenform des Proteins beruht nicht auf einer geänderten Bindungsaffinität (Kozaki & Sakaguchi, 1982) oder einer global geänderten Konformation des Moleküls (Datta & DasGupta, 1988; Singh & DasGupta, 1990). Teile der Struktur werden jedoch in eine flexiblere Konformation überführt (Cai & Singh, 2001), was bei einer pH-Wert Erniedrigung eine deutlich schnellere Freilegung eines hydrophoben membraninteragierenden Segmentes ermöglicht (Kamata *et al.*, 2000). Das *Nicking* ist somit für eine optimale Translokationskompetenz des Proteins unentbehrlich. Aus diesem Grund wurde in alle Loops die Aminosäuresequenz KTKS und eine Thrombinschnittstelle eingefügt. Es war bekannt, dass *E. coli* eigene Proteasen häufig an dieser lysinreichen Sequenz schneiden (z.B. bei BoNT/A, persönliche Mitteilung Dr. A. Rummel). Für den Fall, dass dies nicht ausreichend geschehen sollte, könnten die Toxine dann mittels Thrombin vollständig aktiviert werden. BoNT/E und BoNT/G wurden direkt während der Aufreinigung zu ca. 60% bzw. 85% genickt. Bei BoNT/F geschah dies nicht, so dass das Toxin später durch immobilisiertes Thrombin *in vitro* aktiviert wurde.

Bei der Aufreinigung der einfach „getaggt“ rekombinanten Toxine stellte sich heraus, dass das hergestellte Protein für Kristallisationsexperimente zu unrein war. Dieses Problem wurde gelöst, indem an den N-terminus der BoNT ein H₆-tag fusioniert wurde. Dieser zweite Reinigungsschritt über eine Ni-NTA Agarosematrix führte in allen Fällen zu einem sauberen rekombinanten Toxin ohne nennenswerte Verunreinigungen.

Toxizitätsanalysen am Zwerchfell zeigten, dass das aus *E. coli* isolierte Toxin physiologisch funktionell ist. Die neu produzierten BoNT/E, F und G von Botulinum Neurotoxin waren also alle proteolytisch aktiv und konnten für weitere Experimente, z.B. Suszeptibilitätstests an PC12-Zellen oder im MPN Assay (Rummel *et al.*, 2004), verwendet werden.

5.2 PC12-Zellen sind suszeptibel für alle Serotypen von Botulinum Neurotoxin

Ein gutes Modellsystem für Studien zu Neurotoxinen an lebenden Zellen stellen PC12-Zellen dar. PC12 Zellen stammen aus einem transplantierbaren Pheochromocytom des Nebennierenmarks der Ratte. Sie synthetisieren Catecholamine (Dopamin, Noradrenalin), können nach Induktion mit NGF (*Nerve Growth Factor*) einen neuronalen Phänotyp entwickeln und besitzen die Proteine des neuronalen SNARE Komplexes. Sie ähneln demnach den Zellen, in denen die Neurotoxine natürlicherweise wirken. Sie exprimieren nicht nur die Substrate aller CNT, sondern sie enthalten auch deren Proteinrezeptoren, wie

sich aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen schließen lässt. Somit ist es möglich, intakte PC12-Zellen für Versuche mit allen CNT zu verwenden. In vorangehenden Arbeiten wurden PC12-Zellen vor der Toxinbehandlung künstlich permeabilisiert um die Aufnahme der Neurotoxine sicherzustellen (Lomneth *et al.*, 1991).

Es war bekannt, dass der Proteinrezeptor von BoNT/B, Synaptotagmin-I, von PC12-Zellen exprimiert wird (Zhang *et al.*, 2002). Eine Spaltung von Synaptobrevin-2, dem Substrat von BoNT/B, war allerdings nur zu beobachten, wenn die Zellen vorher mit Gangliosiden beladen wurden (Dong *et al.*, 2003). Dem zweistufigen Bindungsprozess der CNT an neuronale Zellen zufolge ist eine ausreichende Menge von komplexen Gangliosiden auf der Zellmembran für den ersten Bindungsschritt nötig. Auf PC12-Zellen wurde das Vorhandensein von sieben verschiedenen Gangliosidspezies, welche in unterschiedlichen Mengen enthalten sind, bestätigt (Walton *et al.*, 1988). Anscheinend ist entweder die Menge oder die Zusammensetzung der auf der PC12-Zellmembran enthaltenen Ganglioside für eine Bindung von BoNT/B nicht ausreichend. Die Proteinrezeptoren der anderen CNT waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, weshalb auch keine Aussage über ihr Vorhandensein bei PC12-Zellen möglich war. Es gab Informationen, dass Tetanus Neurotoxin an PC12-Zellen bindet (Walton *et al.*, 1988) und BoNT/A und BoNT/E an PC12-Zellen binden, aufgenommen werden und ihr Substrat SNAP-25 spalten (Dong *et al.*, 2003). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde hier untersucht, ob diese Zelllinie alle Proteinrezeptoren der CNT exprimiert. Es konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die vorhandenen Ganglioside ausreichend für die Bindung jedes Serotyps waren (siehe BoNT/B). Aus diesem Grund wurden die Zellen in jedem Experiment vorher mit Gangliosiden behandelt, um sicherzustellen, dass die Bindung der CNT nicht am Fehlen ausreichender Mengen Ganglioside scheitert. Es konnte bei allen Versuchen Substratspaltung festgestellt werden, was beweist, dass sämtliche Proteinrezeptoren der CNT in PC12-Zellen vorhanden sind.

Der Grad der Substratspaltung war bei den einzelnen Serotypen unterschiedlich. Dies könnte zum einen am unterschiedlichen Grad der Aktivierung der CNT liegen. Eine vollständige Aktivierung erzeugt ein vielfach potenteres Toxin als eine nur teilweise Aktivierung (Li *et al.*, 2001). Die hier verwendeten rekombinanten CNT wurden auf 3 verschiedene Arten aktiviert, entweder durch Trypsin- oder Thrombinspaltung, bzw. durch *E. coli* eigene Proteasen. Ein weiterer Punkt wäre die Aufnahmeeffizienz der einzelnen Serotypen. Wahrscheinlich sind die verschiedenen Proteinrezeptoren nicht in gleicher Zahl auf der Zelloberfläche vorhanden, was zu unterschiedlich häufiger Bindung und Aufnahme führen kann. Für weiterführende, zwischen verschiedenen Serotypen vergleichende Experimente, sollten die experimentellen Bedingungen angepasst werden. So könnten die verschiedenen Serotypen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden. Die unterschiedlichen Aktivierungsgrade könnten mittels Kalibrierung am MPN ausgeglichen werden.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlich starke Substratspaltung könnten die bereits beschriebenen verschiedenen Anforderungen an die Gangliosidmenge und -zusammensetzung der einzelnen CNT sein. BoNT/B benötigt z.B. zusätzlich hinzugefügte Ganglioside (Dong *et al.*, 2003), TeNT hingegen bindet an unbehandelte PC12-Zellen (Walton *et al.*, 1988). Daher wurden möglicherweise unterschiedliche Mengen der verschiedenen CNT aufgenommen, da im ersten Bindungsschritt an Ganglioside manche Serotypen so in größerer Menge auf der Zellmembran angereichert wurden.

5.3 Kristallisation

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Kristallstrukturdaten von rekombinantem BoNT/B und G zu erhalten. Natives BoNT/B wurde bereits in 1,9 Å Auflösung kristallisiert (Swaminathan *et al.*, 2000). Hierbei handelte es sich um aktiviertes Toxin, so dass der Loop zwischen leichter und schwerer Kette hydrolysiert war. In dieser Arbeit wurde rekombinant hergestelltes BoNT/B zum Kristallisieren verwendet, welches eine Kristallstruktur in 2,1 Å Auflösung lieferte, die sich mit der des nativen Toxins deckte. Im Gegensatz zur bereits publizierten Struktur des nativen Neurotoxins gelang es hier, den Loopbereich darzustellen. Er steht weit aus der Struktur des Toxins heraus und ist somit gut zugänglich für Proteasen. Dies sichert eine effektive Aktivierung des Neurotoxins und erklärt den bevorzugten Angriff der Proteasen an dieser Stelle. Der C-terminale *Strep-tag*® des rekombinanten BoNT/B war in der Struktur nicht sichtbar, was auf seine flexible Lage hinweist und eine Interaktion mit dem H_C-Fragment unwahrscheinlich macht. Diese Beobachtung zeigt, dass der zur Aufreinigung der rekombinanten Neurotoxine angefügte *Strep-tag*® deren Kristallisation nicht behindert. Diese erfolgreiche Kristallisation eines rekombinanten Neurotoxins zeigt deutlich, dass sich deren Struktur nicht von der nativer Toxine unterscheidet.

Versuche, das rekombinante BoNT/G zu kristallisieren, schlugen bisher fehl. Unter zwei Bedingungen (2-Methyl-2,4-pentanediol (MPD) bzw. Ammoniumsulfat in Tris pH 8,0 mit PEG) bildeten sich Kristalloide, bzw. plattenförmige Kristallstrukturen. Es sind noch weitere Additive und Bedingungen zu testen, um vermessbare 3-D Strukturen zu erzeugen.

Für eine genaue Charakterisierung der Bindungsstelle von Neurotoxin und Proteinrezeptor ist ein Co-Kristall von sehr großem Nutzen. Aus diesem Grund wurde versucht, ein solches von BoNT/B und einem Synaptotagmin-II Peptid, welches die an der Bindung beteiligten 61 N-terminalen Aminosäuren enthält (Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004), zu erzeugen. Der erste Ansatz, das Mischen von BoNT/BSL und Syt-II 1-61 Peptid in äquimolarem Verhältnis, lieferte keine Co-Kristalle. Es konnten Kristallstrukturdaten gewonnen werden, die sich letztendlich als BoNT/B ohne gebundenes Synaptotagmin-II Peptid entpuppten. Möglicherweise ist das 1:1 Verhältnis der beiden Co-Kristallisationspartner von entscheidender Bedeutung für die Kristallbildung und durch einfaches Mischen nicht zu erreichen. In einem zweiten Ansatz sollte sichergestellt werden, dass beide Proteine wirklich in gleicher Kopienzahl vorliegen. Um dies zu gewährleisten, wurde das Synaptotagmin-II Peptid C-terminal an das BoNT/B fusioniert. Dabei wurden 2 verschiedene Ansätze verfolgt: beim ersten wurde das Peptid direkt hinter den *Strep-tag*® gesetzt, beim zweiten wurde zusätzlich ein Glycin-Serin 8mer als Abstandshalter eingefügt. Da nicht genau bekannt war, wie sich das Synaptotagmin falten würde, sollte so sichergestellt werden, dass das Synaptotagmin die Bindungstasche von BoNT/B in jedem Fall erreicht. GST-Pull-Down Assays und Tests am Mäusezwerchfell zeigten, dass die Bindung dieses Fusionsproteins an Synaptotagmin-II weitgehend unterbunden wird. Somit war sichergestellt, dass das Synaptotagmin-II Peptid so gefaltet wird, dass es in der richtigen Position in seiner Rezeptorbindungstasche von Botulinum Neurotoxin Typ B zu liegen kommt. Dieses Fusionsprotein konnte in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden. Die ersten Kristallisationsversuche wurden allerdings mit einem parallel erzeugten Konstrukt durchgeführt. Da für die Bindung des Rezeptors das H_C-Fragment des Toxins ausreichend ist, wurde ein Fusionsprotein konstruiert, welches

lediglich das H_C-Fragment und das Syt-II Peptid enthält. Da das Fusionsprotein somit viel kleiner ist und keine für die Interaktion unnötigen Bereiche enthält, schien dessen Kristallisation aussichtsreicher zu sein. In der Tat gelang letztendlich die Kristallisation des Konstruktes ohne den zusätzlich eingefügten Abstandshalter im Labor von Axel Brunger (Stanford, USA) und damit die präzise Charakterisierung der Bindungsstelle von BoNT/B und der an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren des Proteinrezeptors Synaptotagmin-II (Jin *et al.*, 2006). Bei der Bindung wird in der luminalen Domäne von Synaptotagmin eine Helix induziert, welche mit einer sattelförmigen Tasche am äußersten Ende von BoNT/B interagiert. Diese befindet sich direkt neben der Gangliosidbindungstasche. Die exakte Orientierung der CNT auf der Membranoberfläche ist wichtig für eine effiziente Aufnahme in die Zelle und die anschließende Translokation in das Zytosol. Die benachbarte Lage der beiden Bindungstaschen hat eine festgelegte günstige Ausrichtung des Toxins zur Membran zur Folge, was möglicherweise die Translokation begünstigt. Zu nahezu identischen Ergebnissen gelangte auch die Arbeitsgruppe von Raymond Stevens (La Jolla, USA), jedoch wurde in dieser Arbeit anstatt der vollständigen intraluminalen Domäne von Synaptotagmin-II nur ein synthetisches 20mer Peptid und natives BoNT/B verwendet (Chai *et al.*, 2006).

Kristallisationsversuche mit dem Konstrukt mit zusätzlichem Abstandshalter schlugen fehl. Die intraluminal Domäne von Synaptotagmin-II bildet in der Abwesenheit von BoNT/B keine Sekundärstruktur aus. Erst bei der Bindung des Neurotoxins wird die helikale Konformation erzeugt. (Jin *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2006). Vermutlich gelangt das Synaptotagmin-II wegen des längeren Spacers nicht in die richtige Position zur Bindungstasche, was die Bildung einer korrekten Kristallpackung verhindert.

5.4 BoNT/A bindet seinen Rezeptor SV2 in einer flachen Tasche am äußersten Ende der H_{CC}-Domäne

Die Bindung clostridieller Neurotoxine an neuronale Zellen ist ein zweistufiger Prozess. Sie binden an komplexe Ganglioside, welche auf der Zelloberfläche in größerer Menge in so genannten "lipid-rafts" vorkommen. Der Bereich, der die Bindung an die Ganglioside vermittelt, ist für viele CNT bekannt (Rummel *et al.*, 2003; 2004a) und innerhalb der meisten Botulinum Neurotoxine und Tetanus Neurotoxin konserviert. Im Gegensatz dazu gibt es kaum Informationen über die Bindungsstellen der neuronalen Proteinrezeptoren der CNT. Dieser zweite Schritt, den man als produktive Bindung bezeichnet, ist Voraussetzung für die Aufnahme der Toxine in die Zelle. Bisher sind Synaptotagmin I und II als Proteinrezeptoren für Botulinum Neurotoxin Typ B (Dong *et al.*, 2003) und Typ G (Rummel *et al.*, 2004), sowie SV2A, B und C für BoNT/A (Mahrhold *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2006) identifiziert worden. Für TeNT werden GPI-verankerte glykosylierte Proteine als Rezeptor diskutiert (Herrerros *et al.*, 2001; Munro *et al.*, 2001). Für alle anderen CNT liegen noch keine Erkenntnisse vor. Die genaue Position der Proteinrezeptorbindungstasche wurde kürzlich für BoNT/B und BoNT/G ermittelt (Rummel *et al.*, 2007). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Lage der Proteinrezeptorbindungstasche von BoNT/A. Mittels computergestützter Oberflächenanalyse und Auswertung gezielter Mutageneseexperimente konnte gezeigt werden, dass eine flache Tasche in der Nähe der Gangliosidbindungsstelle am äußersten Ende der H_{CC}-Domäne von BoNT/A die Bindung

an den Proteinrezeptor SV2 vermittelt: Veränderungen mehrerer Aminosäurereste in dieser Tasche verminderten die Bindung an den Proteinrezeptor sowie die Toxizität an Nervenzellen, dem natürlichen Wirkort von BoNT/A.

Die Lage der neu entdeckten Proteinrezeptorbindungstasche kann sehr gut mit dem zweistufigen Bindungsprozess der clostridiellen Neurotoxine in Einklang gebracht werden: Die Tasche befindet sich am äußersten Ende des Toxinmoleküls, in direkter Nähe zur Gangliosidbindungstasche. Bindet das Neurotoxin im ersten Schritt die Ganglioside auf der Oberfläche der Zelle, befindet sich die sperrige α -helikale H_N Translokationsdomäne in ausreichender Entfernung zur Zelloberfläche. Eine sterische Behinderung der Bindung ist in dieser Konstellation unwahrscheinlich. Ob die H_N Translokationsdomäne in paralleler Orientierung zur Zelloberfläche liegt, lässt sich allerdings nicht daraus schließen. Im Fall von BoNT/B und seinem Proteinrezeptor Synaptotagmin-II werden sowohl die parallele (Chai *et al.*, 2006) als auch die senkrechte (Jin *et al.*, 2006) Ausrichtung favorisiert. Für den zweiten Schritt, die Bindung des Proteinrezeptors SV2, ist keine Konformationsänderung des Neurotoxins nötig. Durch laterale Diffusion kann direkt an die membran nahen Aminosäuren der luminalen Domäne von SV2 gebunden werden.

Zu Beginn musste festgestellt werden, in welchem Bereich des H_C -Fragments der Rezeptor gebunden wird. In einer vorangehenden Arbeit wurde behauptet, H_{CN} - und H_{CC} -Domäne tragen gemeinsam zur Rezeptorbindung bei (Tavallaie *et al.*, 2004). Dort konnten Mäuse durch Immunisierung mit rekombinant hergestelltem H_C -Fragment geschützt werden, wogegen dies mit isolierten H_{CN} - und H_{CC} -Domänen nicht gelang. Es wurde postuliert, dass die für die Bindung des Rezeptors nötige Struktur nur vom intakten H_C -Fragment ausgebildet werden könne. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch in direkten Bindungsversuchen gezeigt, dass der Rezeptor SV2 nur an die H_{CC} -Domäne bindet, nicht jedoch an die H_{CN} -Domäne.

Die ausgewählten Aminosäuren in der angenommenen Bindungstasche wurden einzeln mutiert und die erzeugten Mutanten ließen sich alle in ausreichender Menge und Konzentration herstellen. Im *Mouse Phrenic Nerve* Assay zeigten sie unterschiedliche Toxizitäten, wobei die beiden Kontrollmutanten P1119E und S1275R, welche im Spalt zwischen der H_{CN} - und H_{CC} -Domäne liegen, keinen Effekt erkennen ließen. Dies widerspricht ebenfalls der Aussage, dass der Bereich zwischen diesen beiden Domänen essentiell für die Rezeptorbindung sei (Tavallaie *et al.*, 2004). Die Tendenzen der Effekte im MPN Assay ließen sich auch in *GST-Pull-Down* Assays mit dem Rezeptor beobachten. So zeigte die im Zentrum liegende Mutante K1260E bei allen Versuchen die stärksten Effekte (MPN Assay weniger als 3% Resttoxizität im Vergleich zum Wildtyp). Mutante I1205W in unmittelbarer Nähe hat allerdings keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung, sie befindet sich wahrscheinlich zu tief in der Tasche, um mit SV2 zu interagieren. Es kann vermutet werden, dass aufgrund der Ergebnisse der Bindungsversuche der Proteinrezeptor von BoNT/A flach in der Bindungstasche oder -mulde liegt. Die Tasche wird zur einen Seite von N1196 und Q1199, zur anderen Seite von F1255 und I1258 begrenzt. Einzelne Austausche dieser Aminosäuren führten ebenfalls zu verminderter Bindung, jedoch in keinem Fall zu einem derart starken Effekt wie bei K1260E. Mutationen an Aminosäure S1207, die sich an der von der Gangliosidbindungstasche aus gesehen unteren Seite der Rezeptorbindungstasche befindet (siehe Abb. 20), führten zu einer gesteigerten Toxizität im MPN Assay. Beide Mutationen an S1207 zeigten dieses Ergebnis, was darauf schließen lässt, dass das Serin an dieser Stelle für die Rezeptorbindung keine Rolle spielt. Die umfangreicheren Seitenketten von Arginin oder

Tyrosin „füllen“ die Bindungstasche an dieser Stelle effektiver, so dass neue Interaktionspunkte entstehen, und den Rezeptor so besser binden lassen.

Die Bindung der Mutanten an ihren Proteinrezeptor wurde mit zwei verschiedenen SV2-Konstrukten im *GST-Pull-Down* Assay getestet. Das erste enthielt den für die Bindung an das Toxin nötigen intraluminalen Loop und die daran anschließende Transmembrandomäne (SV2C 454-603), das zweite verfügte nicht über die Transmembrandomäne (SV2C 454-579). Aus vorangehenden Arbeiten war bekannt, dass die Bindungsaffinität der Konstrukte mit Transmembrandomäne geringer war als die von entsprechenden Konstrukten ohne diese Domäne. In den Versuchen in der vorliegenden Arbeit waren die Tendenzen in der Zu- und Abnahme der Bindungen zwischen den einzelnen Mutanten bei beiden verwendeten SV2C-Konstrukten ähnlich. Auffällig war jedoch, dass die Bindungsaffinitäten der H₆A Mutanten zu GST-SV2C 454-603 insgesamt stärker abnahmen als die zu GST-SV2C 454-579. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sich die ohnehin erschwerte Bindung an SV2C 454-603 durch die Mutationen innerhalb der Interaktionsstelle und eine möglicherweise damit einhergehende gestörte Membraninteraktion den Effekt noch weiter verstärkte. Diese insgesamt deutlichere Abnahme der Bindungsaffinität bei den Versuchen mit SV2C 454-603 war trotz Zugabe von Gangliosiden zu beobachten. Die im MPN Assay beobachtete gesteigerte Toxizität der S1207 Mutanten konnte durch die direkten Bindungsversuche mittels *GST-Pull-Down* Assay auf eine bessere Bindung an den Proteinrezeptor zurückgeführt werden. In den Versuchen mit SV2C 454-579 war für die S1207R Mutante eine ca. 30% gesteigerte Bindung an SV2C zu beobachten, verglichen mit dem Wildtyp. Dies unterstützt die zuvor getätigte Aussage, dass die Arginin-Seitenkette an dieser Stelle zusätzliche Interaktionspunkte für den Rezeptor bietet und somit die Bindung stabilisiert wird.

Die beobachteten Effekte sind nicht auf eine beschädigte Proteinstruktur der Mutanten zurückzuführen. Dies ließ sich anhand von Bindungsversuchen an Synaptosomen und ELISA an immobilisierten Gangliosiden nachweisen. Die Bindung der Mutanten an Ganglioside zeigte in beiden Tests keine großen Abweichungen zu der des Wildtyps. Die Proteine waren korrekt gefaltet und somit lassen sich die beobachteten Effekte mit einer Veränderung in der Proteinrezeptorbindung begründen.

6 Ausblick

Die Charakterisierung der SV2 Bindungstasche ermöglicht die Entwicklung von Inhibitoren, welche die Bindung des Rezeptors verhindern. So würde die Wirkung von Botulinum Neurotoxin A in einem sehr frühen Stadium behindert werden. Da nun die Gangliosid- und Proteinrezeptorbindungstaschen bekannt sind, wäre es auch möglich, Inhibitoren jeder Tasche miteinander zu kombinieren und durch Synergieeffekte dieser zweizähligen Inhibitoren eine überproportionale Erniedrigung des K_i -Wertes, d.h. einen stabileren Enzym-Inhibitor Komplex zu erhalten. Momentane Versuche, die Aktivität von CNT auf andere Zelltypen mit anderen Oberflächenrezeptoren zu lenken, könnten vereinfacht werden: Es ist nicht mehr nötig, die komplette H_C -Fragment durch Bindungsdomänen anderer Proteine zu ersetzen. Man könnte die beiden Bindungstaschen mittels zielgerichteter Mutagenese so verändern, dass sie anderen bekannten Bindungsrezeptoren gleichen und so deren Aufnahmeort für die CNT adaptieren. Dies würde verhindern, dass möglicherweise wichtige Interaktionen zwischen H_N -Domäne und H_C -Fragment verloren gehen, wie dies der Fall ist bei direkter kovalenter Verbindung der katalytischen Domäne mit einer anderen Bindungsdomäne. Eine andere Möglichkeit wäre die Bindungstaschen so weit zu optimieren, dass man ein noch potenteres Toxin erhält. Die Mutante S1207R wäre ein Beispiel, dass durch Mutationen eine noch höhere Toxizität zu erzielen ist. Auf diesem Wege könnten bei manchen Krankheiten die erforderlichen Dosen an CNT gesenkt werden.

Ein interessanter Ansatz, die angesprochenen Veränderungen der BoNT/A Bindung zu optimieren wäre die gerichtete Proteinevolution. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels computergestützter Oberflächenanalyse und Proteinmodellierung vielversprechende Aminosäuren ausgewählt und einzeln mutiert. Bei der gerichteten Proteinevolution werden die translatierten Proteine mutierter Genbanken auf die gewünschten Parameter systematisch durchsucht. Auf diese Weise können große Mengen an Mutanten überprüft werden und nach wenigen Mutageneserunden erstaunliche Ergebnisse erzielt werden. So konnte die Affinität eines Antikörpers gegen BoNT/A um das 1250-fache erhöht (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2007) oder die Produktivität einer bakteriellen Halohydrin Dehalogenase auf das 4000-fache gesteigert werden (Fox *et al.*, 2007). Eine Kombination dieser beiden Herangehensweisen wäre sicherlich sehr vielversprechend: Der neu identifizierte Bereich der Proteinrezeptortasche von BoNT/A könnte nun mutiert und in eine Genbank kloniert werden. Das Filtern dieser auf Mutanten mit starken Effekten könnte Bereiche offenbaren, welche bisher noch nicht analysiert wurden. So würden auch vorteilhafte Kombinationen verschiedener Aminosäuremutationen detektiert werden, was mittels gerichteter Mutagenese durch die große Anzahl möglicher Kombinationen sehr schwierig wäre.

Da zwischenzeitlich der Proteinrezeptor von BoNT/A entdeckt wurde (Mahrhold *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2006), wäre eine Co-Kristallisierung analog der in dieser Arbeit beschriebenen von BoNT/B und Synaptotagmin sinnvoll. So ließe sich die Bindungsstelle von Neurotoxin und Proteinrezeptor weiter charakterisieren. Die Produktion als Fusionsprotein ist nach den erhaltenen Ergebnissen der getrennten Herstellung und späteren äquimolaren Mischung beider Proteine vorzuziehen. Der *Strep*-tag sollte C-terminal hinter das SV2 kloniert werden und nicht, wie bei BoNT/B und Synaptotagmin, zwischen BoNT/A und SV2. So würde nur vollständiges Fusionsprotein aufgereinigt

werden und mögliche Verunreinigungen mit BoNT/A mit abgespaltenem SV2 würden vermieden.

Die Eignung von PC12-Zellen für Experimente mit CNT wurde in dieser Arbeit gezeigt. Sie könnten zum Testen weiterer Proteinrezeptorkandidaten eingesetzt werden. Die Translation des Kandidaten könnte mittels stabil transfizierter si-RNA geblockt werden. Nach Inkubation der PC12-Zellen mit dem entsprechenden Neurotoxin müsste das Zelllysate auf gespaltenes Substrat untersucht werden. Dies würde zeigen, ob das Toxin weiterhin an die Zellen binden und eindringen kann oder nicht.

Die neu klonierten volle Länge Konstrukte von Botulinum Neurotoxin Serotyp E, F und G könnten nicht nur für Kristallisationsversuche verwendet werden, sondern auch für die Suche nach ihrem Proteinrezeptorbindungsbereich. Versuche analog denen in dieser Arbeit beschriebenen mit BoNT/A wären denkbar.

7 Literatur

Aureli P, Fenicia L, Pasolini B, Gianfranceschi M, McCroskey LM, Hatheway CL (1986). Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *J Infect Dis* **154**: 207-11.

Bade S, Rummel A, Reisinger C, Karnath T, Ahnert-Hilger G, Bigalke H, Binz T (2004). Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *J Neurochem* **91**(6): 1461-72.

Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* **7**: 1513-23.

Boquet P, Duflot E (1982). Tetanus toxin fragment forms channel in lipid vesicles at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(24): 7614-8.

Boquet P, Duflot E, Hautecoer B (1984). Low pH induces a hydrophobic domain in the tetanus toxin molecule. *Eur J Biochem* **144**: 339-44.

Cabiaux V, Lorge P, Vandenbranden M, Falmange P, Ruyschaert JM (1985). Tetanus toxin induces fusion and aggregation of lipid vesicles containing phosphatidylinositol at low pH. *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 840-9.

Cai S, Singh BR (2001). Role of the disulfide cleavage induced molten globule state of type A botulinum neurotoxin in its endopeptidase activity. *Biochemistry* **40**(50): 15327-33.

Carle A, Rattone G (1884). Studio sperimentale sull'èziologia del tetano. *Giorn. Accad. Med. Torino* **32**: 174-9.

Chai Q, Arndt JW, Dong M, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER, Stevens RC (2006). Structural basis of cell surface receptor recognition by Botulinum neurotoxin B. *Nature* **444**(7122): 1096-100.

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

Dong M, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of Botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* **162**: 1293-303.

Dunkley PR, Heath JW, Harrison SM, Jarvie PE, Glenfield PJ, Rostas JA (1988). A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* **441**: 59-71.

- Engvall E, Perlman P** (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobuline G. *Immunochem* **8**(9): 871-4.
- Fishman PS, Carrigan DR** (1987). Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin. *Brain Res* **406**: 275-9.
- Fox RJ, Davis C, Mundorff EC, Newman LM, Gavrilovic V, Ma SK, Chung LM, Ching C, Tam S, Muley S, Grate J, Gruber J, Whitman JC, Sheldon RA, Huisman GW** (2007). Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nature Biotechnology* **25**(3): 338-44.
- Galazka A, Gasse F** (1989). The present status of tetanus and tetanus vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* **195**: 31-53.
- Gill DM** (1982). Bacterial Toxins: a Table of Lethal Amounts. *Microbiological Reviews* **46**(1): 86-94.
- Ginalski K, Venclovas C, Lesyng B, Fidelis K** (2000). Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides residue level information about the putative Ganglioside binding site. *FEBS Lett* **482**: 119-24.
- Garcia-Rodriguez C, Levy R, Arndt JW, Forsyth CM, Razai A, Lou J, Geren I, Stevens RC, Marks JD** (2007). Molecular evolution of antibody cross-reactivity for two subtypes of type A botulinum neurotoxin. *Nature Biotechnology* **25**(1): 107-16.
- Habermann E, Dreyer F, Bigalke H** (1980). Tetanus toxin blockst he neuromuscular transmission in vitro like botulinum A toxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **311**: 33-40.
- Hall JD, McCroskey LM, Pincomb BJ, Hatheway CL** (1985). Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. *J Clin Microbiol* **21**: 654-5.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Südhof TC, Niemann H** (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* **13**(21): 5051-61.
- Herreros J, Lalli G, Schiavo G** (2000). C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem J* **347**: 199-204.
- Herreros J, Nq T, Schiavo G** (2001). Lipid Rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* **12**(10): 2947-60.
- Herreros J, Schiavo G** (2002). Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. *Int J Med Microbiol* **291**(6-7): 447-53.

- Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P** (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* **96**: 1374-88.
- Jin R, Rummel A, Binz T, Brunger AT** (2006). Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature* **444**(7122): 1019-20.
- Kadkhodayan S, Knapp MS, Schmidt JJ, Fabes SE, B R Rupp B** (2000). Cloning, Expression and One-Step Purification of the Minimal Essential Domain of the Light Chain of Botulinum Neurotoxin Type A. *J Prot Expr Purif* **19**: 125-30.
- Kamata Y, Tahara R, Kozaki S** (2000). Difference in hydrophobicity between botulinum type B activated and non-activated neurotoxins under low pH conditions. *Toxicon* **38**(9): 1247-51.
- Kerner J** (1817). Medizinische Polizen. Vergiftung durch verdorbene Würste. *Tübinger Blätter* **3**: 1-25.
- Khyse-Anderson J** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* **10**: 203-9.
- Kiyatkin N, Maksymowych AB, Simpson LL** (1997). Induction of an immune response by oral administration of recombinant botulinum toxin. *Infect Immun* **65**(11): 4586-91.
- Knapp M, Segelke B, Rupp B** (1998). The 1.61 Ångström structure of the tetanus toxin ganglioside binding region: solved by MAD and MIR phase combination. *Am Cryst Assoc Abstr Papers* **25**: 90.
- Koriatzova LK, Montal M** (2003). Translocation of Botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol* **10**: 13-8.
- Kozaki S, Sakaguchi G** (1982). Binding to mouse brain synaptosomes of Clostridium botulinum type E derivative toxin before and after tryptic activation. *Toxicon* **20**(5): 841-6.
- Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC** (1998). Crystal structure of Botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* **5**(10): 898-902.
- Lalli G, Herreros J, Osborne SL, Montecucco C, Rosetto O, Schiavo G** (1999). Functional characterisation of tetanus and Botulinum neurotoxins binding domains. *J Cell Sci* **112**: 2715-24.
- Li L, Singh BR** (1999). High-level expression, purification and characterization of recombinant type A botulinum neurotoxin light chain. *Protein Expr Purif* **17**(3): 339-44.

- Li L, Singh BR** (2000). Spectroscopic analysis of pH-induced changes in the molecular features of type A botulinum neurotoxin light chain. *Biochemistry* **39**: 6466-74.
- Li Y, Foran P, Fairweather NF, DePaiva A, Weller U, Dougan G, Dolly JO** (1994). A single mutation in the recombinant light chain of tetanus toxin abolishes its proteolytic activity and removes the toxicity seen after reconstitution with native heavy chain. *Biochemistry* **33**: 7014-7020.
- Li Y, Aoki R, Dolly JO** (1999). Expression and characterization of the heavy chain of tetanus toxin: reconstitution of the fully-recombinant dichain protein in active form. *J Biochem* **125**(6): 1200-8.
- Li Y, Foran P, Lawrence G, Mohammed N** (2001). Recombinant Forms of Tetanus Toxin Engineered for Examining and Exploiting Neuronal Trafficking Pathways. *J Biol Chem* **276**(33): 31394-401.
- Lomneth R, Martin TF, DasGupta BR** (1991). Botulinum neurotoxin light chain inhibits norepinephrine secretion in PC12 cells at an intracellular membranous or cytoskeletal site. *J Neurochem* **57**: 1413-21.
- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265.
- Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T** (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into Phrenic nerves. *FEBS lett* **580**: 2011-4.
- Maisey EA, Wadsworth JD, Poulain B, Shone CC, Melling J, Gibbs P, Tauc L, Dolly JO** (1988). Involvement of the constituent chains of botulinum neurotoxins A and B in the blockade of neurotransmitter release. *Eur J Biochem* **177**(3): 683-91.
- Maksymowych AB, Simpson LL** (1998). Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **273**(34): 21950-7.
- Matteoli M, Verderio DM, Rossetto O, Iezzi N, Coco S, Schiavo G, Montecucco C** (1996). Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13310-5.
- McClarín JA, Frederick CA, Wang BC, Greene P, Boyer HW, Grable J, Rosenberg JM** (1986). Structure of the DNA - Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* **234**(4783): 1526-41.
- Montecucco C, Schiavo G, Brunner J, Duflot E, Boquet P, Roa M** (1986). Tetanus toxin is labeled with photoactivatable phospholipids at low pH. *Biochemistry* **25**(4): 919-24.
- Montecucco C, Schiavo G, Dasgupta BR** (1989). Effect of pH on the interaction of Botulinum neurotoxins A, B and E with liposomes. *Biochem J* **259**:47-53.

- Montecucco C, Schiavo G** (1995). Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys* **28**: 423-472.
- Munro P, Kojima H, Dupont JL, Bossu JL, Poulain B, Boquet P** (2001). High Sensitivity of Mouse Neuronal Cells to Tetanus Toxin Requires a GPI-Anchored Protein. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 623-9.
- Neale EA** (2003). Moving across membranes. *Nat Struct Biol* **10**: 2-3.
- Niemann H, Binz T, Grebenstein O, Kurazono H, Thierer J, Mochida S, Poulain B, Tauc L** (1991). Clostridial neurotoxins: from toxins to therapeutic tools? *Behring Inst Mitt* **89**: 153-62.
- Niemann H, Blasi J, Jahn R** (1994). Clostridial neurotoxins: New tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol* **4**: 179-85.
- Roa M, Boquet P** (1985). Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles at low pH. Protection of specific polypeptides against proteolysis. *J Biol Chem* **260**: 6827-35.
- Rummel A, Meder M, Binz T, Bigalke H** (2001). Binding and axonal transport of recombinant tetanus toxins and fragments in nerve cell culture. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol Suppl* **363**: R21.
- Rummel A, Bade S, Alves J, Bigalke H, 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, Mahrhold S, Bigalke H, Binz T** (2004a). The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol* **51**(3): 631-43.
- Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, Binz T** (2004b). Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem* **279**(29): 30865-70.
- Rummel A, Eichner T, Weil T, Karnath T, Gutcaits A, Mahrhold S, Sandhoff K, Proia R, Acharya KR, Bigalke H, Binz T** (2007). Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double receptor concept. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1): 359-64.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Sanger F, Nicklein S, Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-7.

Schiavo G, Papini E, Genna G, Montecucco C (1990). An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. *Infect Immun* **58**(12): 4136-41.

Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000). Neurotoxins affecting Neuroexocytosis. *Physiol Rev* **80**(2): 718-50.

Schwab ME, Thoenen H (1976). Electron microscopic evidence for a transsynaptic migration of tetanus toxin in spinal cord motoneurons: an autoradiographic and morphometric study. *Brain Res* **105**: 213-27.

Singh BR, DasGupta BR (1990). Conformational changes associated with the nicking and activation of botulinum neurotoxin type E. *Biophys Chem* **38**(1-2): 123-30.

Sinha K, Box M, Lalli G, Schiavo G, Schneider H, Groves M, Siligardi G, Fairweather N (2000). Analysis of mutants of tetanus toxin HC fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Mol Microbiol* **37**: 1041-51.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Conell CR, Heiner C, Kent SBH, Hood LE (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence determination. *Nature* **321**: 674-9.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**: 347-53.

Swaminathan S, Eswaramoorthy S (2000). Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol* **7**(8): 693-9.

Tavallaie M, Chenal A, Gillet D, Pereira Y, Manich M, Gibert M, Raffestin S, Popoff M, Marvaud JC (2004) Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the Botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. *FEBS Letters* **572**: 299-306.

Tonello F, Pellizzari R, Pasqualato S, Grandi G, Peggion E, Montecucco C (1999). Recombinant and truncated tetanus neurotoxin light chain: cloning, expression, purification and proteolytic activity. *Protein Expr Purif* **15**(2): 221-7.

Umland TC, Wingert LM, Swaminathan S, Furey WF, Schmidt JJ, Sax M (1997). Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat Struct Biol* **4**(10): 788-92.

Van Ermengem E (1897). Über ein neuen anaeroben *Bacillus* und seine Beziehungen zum *Botulismus*. *Z Hyg Infektkr* **26**: 1-56

Walton KM, Sandberg K, Rogers TB, Schnaar RL (1988). Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* **263**: 2055-63.

Wiener M, Freymann D, Ghosh P, Stroud RM (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature* **385**: 461-4.

Williamson LC, Neale EA (1994). Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. *J Neurochem* **63**: 2342-5.

Zhang X, Kim-Miller MJ, Fukuda M, Kowalchuk JA, Martin TF (2002). Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron* **34**: 599-611.

Zhou L, DePaiva A, Liu D, Aoki R, Dolly JO (1995). Expression and purification of the light chain of botulinum neurotoxin type A: a single mutation abolishes its cleavage of SNAP-25 and neurotoxicity after reconstitution with the heavy chain. *Biochemistry* **34**(46): 15175-81.

8 Anhang

8.1 Material

8.1.1 Chemikalien

2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure (HABA)	Sigma
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Roth
2-Mercaptoethanol, zur Synthese	Roth
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Applichem
Aceton, reinst	Riedel-DeHaën
Acrylamid/Bisacrylamid 4K Lösung 29:1 Mix	Applichem
Agar	ICN
Agarose	Roth
Aminosäuremix ohne Methionin	Promega
Ampicillin	Roth
Benzamidin	Sigma
Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow	Amersham
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva
Calciumchlorid, getrocknet (CaCl_2)	Merck
Coomassie Brilliant Blue R 250, für die Elektrophorese	Merck
D-Desthiobiotin	IBA
Dephosphorylierungspuffer 10x	Boehringer
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck
Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie (DMSO)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p. a. (Na_2HPO_4)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	Roth
Essigsäure, 99-100%	Roth
Ethanol, p. a.	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumsalz, p. a.	Serva
fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Gangliosidmix	Sigma
G _T -1b Gangliosid	Sigma
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma
Glycerin, doppelt destilliert, p. a.	Serva
Glycin, p. a.	Roth
Harnstoff, p. a.	Roth
Hefeextrakt	Roth
HPLC-H ₂ O	J.T.Baker
Imidazol	

Isopropanol, reinst	J.T.Baker
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Merck
Kaliumchlorid, p. a. (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, p. a. (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kanamycin	Sigma
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Magermilchpulver	Applichem
Methanol, p. a.	Roth
³⁵ S-Methionin	Amersham
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumacetat, wasserfrei, p. a.	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat, p. a. (NaHCO ₃)	Riedel DeHaën
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel-DeHaën
Nervenwachstumsfaktor (NGF)	Alomone Labs
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Nonidet® P40	Boehringer
para-Formaldehyd, reinst	Merck
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄), 85%	Riedel DeHaën
p-Nitro Phenyl Phosphat (PNPP)	Sigma
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	MBI Fermentas
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	Amersham
pre-Mix für Sequenzierung	Perkin Elmer
Pwo-DNA-Polymerasepuffer 10x	PeqLab
Rinderserumalbumin (BSA), lyophilisiert, pH 7,0	Serva
Restriktionsendonukleasepuffer A, B, L, M, H 10x	Boehringer
Restriktionsendonukleasepuffer B, G, O, R, Tango 10x	MBI Fermentas
Retikulozytenlysat	Promega
rRNasin®, RNase-Inhibitor	Promega
Salzsäure (HCl) 37%, p. a.	Merck
Strep-Tactin® Superflow®	IBA
T4-DNA-Ligasepuffer 10x	MBI Fermentas
Trichloressigsäure (TCA), p. a.	Roth
Triton® X-100, für Szintillationstechnik	Serva
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Roth
Tween 20®	Roth
Xylen Cyanol FF	Sigma

8.1.2 Standards

DNA-Standards:

Lambda-DNA / EcoRI + HindIII

Eigene Herstellung

Protein-Standards:

Proteinmolekulargewichtsstandard 14,4 kDa – 116 kDa	MBI Fermentas
Proteinmolekulargewichtsstandard 10 kDa – 200 kDa	MBI Fermentas
MagicMark XP Western Proteinstandard 20 kDa – 220 kDa	Invitrogen
¹⁴ C-Rainbow Marker	Amersham

8.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Boehringer
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PeqLab
RNAse Inhibitoren	
SP6-Polymerase	Promega
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T7-Polymerase	Promega
Thrombin	
Trypsin	

8.1.4 Puffer und Medien

Blotpuffer	48 mM	Tris
	380 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
	10 %	Methanol
PBS	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
TBS	150 mM	NaCl
	20 mM	Tris
	0,5 %	Triton
Ladepuffer 4x für PAGE	250 mM	Tris pH 6,8
	40 %	Glycerin
	8 %	SDS
	20 %	2-Mercaptoethanol
	0,08 %	Bromphenolblau
Ladepuffer 6x für Agarosegele	0,25 %	(w/v) Bromphenolblau
	0,25 %	(w/v) Xylencyanol FF
	30 %	Glycerin

TAE-Laufpuffer	40 mM Tris 0,11 % (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA
Entfärberlösung	10 % Essigsäure 30 % Methanol
LaemmLi Laufpuffer	250 mM Tris 2,5 M Glycin 1 % SDS
Coomassie Lösung	0,25 % (w/v) Coomassie Blau R250 45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
2YT-Medium (1 L)	16 g Trypton/Pepton 10 g Hefextrakt 5 g NaCl
2YT-Platten (1 L)	16 g Trypton/Pepton 10 g Hefextrakt 5 g NaCl 15 g Agar
HABA-Puffer	100 mM Tris pH 8,0 1 mM HABA
30%ige Acrylamid-/Bisacrylamidlösung	29 % (w/v) Acrylamid 1 % (w/v) N'-N'-Methylenbisacrylamid
Reagenz A (Biorad)	1 - 5 % Natriumhydroxid < 1 % Natriumtartrat < 0,1 % Kupfersulfat
Reagenz B (Biorad)	< 1 % Lithiumsulfat < 1 % Wolframsäure, Natriumsalz < 1 % Molybdänsäure, Natriumsalz < 1 % Phosphorige Säure < 1 % Chlorwasserstoffsäure
Glycinpuffer für ELISA	100 mM Glycin 1 mM MgCl ₂ 1 mM ZnCl ₂ pH 10,4 mit NH ₃ einstellen
Homogenisierungspuffer (HB)	320 mM Sucrose 5 mM HEPES/NaOH pH 7,3

Physiologischer Puffer (PB/PB-BSA)	140 mM NaCl 5 mM KCl 20 mM HEPES/NaOH pH 7,3 5 mM NaHCO ₃ 1 mM MgCl ₂ 1 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM Glucose 2 mM CaCl ₂ (optional: 0,5 % BSA)
Krebs-Ringer Puffer	118 mM NaCl 4,7 mM KCl 1,2 mM MgSO ₄ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 25 mM NaHCO ₃ 2,5 mM CaCl ₂ 11 mM Glucose, pH 7,5
Sonication Puffer (für GST-Aufreinigung)	1x PBS 5 mM EDTA 1 mM PMSF 10 mM Benzamidin 1 mg / mL Pepstatin A
Waschpuffer 1 (für GST-Aufreinigung)	1x PBS 5 mM EDTA 0,1 mM PMSF
Waschpuffer 2 (für GST-Aufreinigung)	50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl
Elutionspuffer (für GST-Aufreinigung)	50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 10 mM Glutathion
Sonication Puffer (für H ₆ -Aufreinigung)	50 mM Na-Phosphat, pH 8,0 300 mM NaCl 1 mM PMSF 10 mM Benzamidin 1 mg / mL Pepstatin A
Waschpuffer (für H ₆ -Aufreinigung)	50 mM Na-Phosphat, pH 8,0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol

Elutionspuffer (für H ₆ -Aufreinigung)	50 mM	Na-Phosphat, pH 8,0
	300 mM	NaCl
	100 mM	Imidazol
Lysispuffer (für PC-12 Zellen)	1x	PBS
	0,5 %	Triton X-100
	0,05 %	SDS
	1 mM	PMSF

8.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

RPMI 1640 - Medium	PAA
DMEM mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/L)– Medium	PAA
Fötale Kälberserum	PAA
hitzeinaktiviertes Pferdeserum	PAA
Penicillin-Streptomycin	PAA
Trypsin-EDTA	PAA
Poly-L-Lysin	PAA

8.1.6 Bakterienstämme

***E. coli* TG1**

Dieser Bakterienstamm wird zur Transformation von Plasmid-DNA verwendet. *E. coli* TG1 trägt das *lac*^q-Gen. Dieses hat einen mutierten Promotor, der zur Produktion von zehnmal mehr *lac*-Repressor als beim Wildtyp führt. Durch Zugabe von IPTG (Isopropylthiogalactosid) zum Medium wird der *lac*-Repressor gebunden und löst sich vom *lac*-Promotor, wodurch eine hocheffiziente Proteinexpression ermöglicht wird. TG1 ist ein EcoK⁻ Abkömmling vom JM101-Stamm, der transformierte DNA weder modifiziert noch schneidet.

Genotyp: *supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lac^q lacZΔM15]*

***E. coli* M15[pREP4]**

E. coli M15[pREP4] (Qiagen) wird für die rekombinante Expression der Toxine im pQE3-Vektor verwendet. M15[pREP4] basiert auf dem *E. coli*-Stamm K12. Die Zellen enthalten das Repressions-Plasmid pREP4. Dieses codiert neben einer Kanamycin-Resistenz für den *lac*-Repressor, wodurch die für die effiziente Repression von auf pQE-Vektoren codierten Genen notwendige hohe Konzentration an *lac*-Repressor zur Verfügung steht.

Genotyp: *nal^s str^s rif^s lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺*

***E. coli* BL21 DE3**

Dieser Stamm enthält ein Gen für die T7-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors. Das Plasmid pLys enthält zusätzlich ein konstitutiv schwach exprimiertes Gen für T7 Lysozym, welches die Hintergrundexpression durch Inhibition der T7-Polymerase verringert. Durch Zugabe des Galactosids IPTG zum Medium wird die Expression der T7-Polymerase durch den lacUV5-Promotor induziert, die anschließend die eingefügte DNA in Abhängigkeit des T7-Promotors transkribiert.

8.1.7 Humane Zelllinien

PC-12 Zellen

Diese Zelllinie stammt aus einem transplantierbaren Pheochromocytom des Nebennierenmarks der Ratte. Die Zellen gehen nach NGF-Gabe reversibel in einen neuronalen Phänotyp über (Greene und Tischler, 1976). Die bei dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden beim ATCC erworben (ATCC[®] Nummer: CRL-1721[™]).

8.1.8 Plasmide

pQE3-Vektor

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

pSP72-Vektor

Zur *in vitro* Translation wurde ein pSP72-Vektor (2462 bp) der Firma Promega benutzt. Er enthält je einen SP6- und T7-RNA Polymerasepromoter, welche die Multiple-Cloning-Site flankieren. Der pSP72-Vektor enthält ein β -Lactamasegen als Selektionsmarker.

pCMV-5

Der pCMV-5 Vektor ist ein 4700 bp großer Expressionsvektor für Säugerzellen mit CMV-Promotor.

pEGFP-C1,2,3

pEGFP-C1 enthält einen CMV-Promotor und wird als Expressionsvektor in Sägezellen eingesetzt. Das Plasmid ist 4700 bp groß und kodiert für grün-fluoreszierendes Protein (GFP). In die Multiple Cloning Site klonierte Gene werden als GFP-Fusionsprotein exprimiert.

pGEX-KG

Der pGEX-KG Vektor entstand durch Einfügen eines Linkers in die *EcoRI* Schnittstelle des pGEX-2T Vektors. Dieser Linker enthielt je eine *XbaI*-, *NcoI*-, *Sall*-, *XhoI*-, *SacI* und *HindIII*-Schnittstelle. pGEX-KG ist 5000 bp groß und kodiert für die Glutathione S-Transferase (GST). In die Multiple Cloning Site klonierte Gene werden als GST-Fusionsprotein exprimiert.

8.1.9 Antikörper

Anti-Synaptobrevin/VAMP 2	monoklonaler Antikörper (Maus), Klon 69.1, gegen ein N-terminales Peptid aus Ratten-VAMP 2 gerichtet Synaptic Systems
Anti-Synaptobrevin/VAMP 2	polyklonaler Antikörper (Kaninchen), gegen Ratten-VAMP 2 gerichtet Synaptic Systems
Anti-SNAP-25	polyklonaler Antikörper (Kaninchen), gegen Ratten SNAP-25 und H ₆ -tag gerichtet
Anti-Syntaxin 1A	polyklonaler Antikörper (Kaninchen), gegen Ratten Syntaxin 1A gerichtet Synaptic Systems
Anti-Synaptophysin	monoklonaler Antikörper (Maus), gegen zytoplasmatischen Teil gerichtet Synaptic Systems
Anti-GFP	Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern (Maus), Klon 7.1 und 13.1, gegen rekombinantes GFP gerichtet Roche
Anti-Kaninchen HRP	HorseRadishPeroxidase gekoppelter Antikörper (Ziege), gegen die leichte Kette des F(ab') ₂ -Fragmentes von Kaninchen IgG gerichtet Pierce

Anti-Maus HRP HorseRadishPeroxidase gekoppelter Antikörper (Ziege),
gegen das Fc-Fragment von Maus IgG gerichtet
Pierce

8.1.10 Oligonukleotide

Mutationen in BoNT/A (geänderte Aminosäuren in Kleinschreibung):

#3HcAP1119E

ATCATATAAATTTAACATATAGTATGGTTTATC

#5HcAP1119E

GTAAATTTATATGATgaAAATAAATATGTGCGAcGTAAATAATG

#3HcAY1133X

ATACCTACATTATTTACATCGACATATTTATTTGG

#5HcAY1133E

CGATGTAAATAATGTAGGTATccGcGGTgAaATGTATCTTAAAGG

#5HcAY1133K

CGATGTAAATAATGTAGGTATccGcGGTaAaATGTATCTTAAAGG

#3HcAN1196E

AGTAGCTAACCTATATTCTTTATTTTAAAC

#5HcAN1196E

ATATAGGTTAGCTACTgAaGCATCACAGGCAGGCGTAGAAAAA

#5HcAN1196E-2

GAATATAGGTTAGCTACTgAaGCtagcCAGGCAGGCGTAG

#3HcAQ1199W

GCATTAGTAGCTAACCTATATTCTTTATTTTAACTAC

#5HcAQ1199W

GAATATAGGTTAGCTACTAATGCtagctgGGCAGGCGTAG

#3HcAI1205W

TTTTTCTACGCCTGCCTGTGATGCATTAGTAGC

#5HcAI1205W

GGCGTAGAAAAATGGCTAAGTGCACTGGAAATACCTGATGTAGG

#5HcAS1207R

ACAGGCAGGCGTAGAAAAAATACTAagaGCtcTAGAAATACCTG

#5HcAS1207Y

ACAGGCAGGCGTAGAAAAATACTAtacGCgTTAGAAATACCTG

#3HcAF1255H

ACTTGCTACTAGcTTAGCTATATTATTAtgCTGATGAAATCC

#3HcAI1258H

ACTTGCTACTAGcTTAGCatgATTATTAAACTGATGAAATCC

#3HcAI1258E

ACTTGCTACTAGcTTAGCTtcATTATTAAACTGATGAAATCC

#3HcAK1260E

CTTGCTACTAGctcAGCTATATTATTAAACTGATG

#5HcAK1260E

CTAGTAGCAAGTAATTGGTATAATAGACAAATAG

#3HcAN1265R

TTAGCTATATTATTAAACTGATGAAATCC

#5HcAN1265R

GTTTAATAATATAGCTAAgCTAGTAGCAAGTagaTGGTATAATAG

#3HcAS1275R

CTAGATCTTTCTATTTGTCTATTATACCAATTAC

#5HcAS1275R

GACAAATAGAAAGATCTAGaAGGACTTTGGGTTG

Klonierung von SYT-II 1-61:

#SYT1 (*Bam*HI-Schnittstelle)

CTCGGATCCATGAGAAAACATCTTCAAGAGG

#rSYTII-61C (*Eco*RI-Schnittstelle)

TCTCTGAA7TCTTAGATCTTGTTGATCTCATTGAAG

Klonierung von BoNT/BSL plus SYT-II 1-61:

#BSL+SYT61fw1 (*Bst*BI-Schnittstelle)

TCTCT7TCGAAAAAAACCAGGAGCCCATTGTG

#BSL+SYT61fw2 (*Bst*BI-Schnittstelle)

TCTCT7TCGAAAAGGTAGCGGCTCGGGTTCTGGTAGCAACCAGGAGCCCATTGTG

#BSL+SYT61rev (*Bst*BI-Schnittstelle)

TCTCT77CGAATTAGATCTTGTTGATCTCATTGAAG

Klonierung von BoNT/E:

#5HCE4

CTCTTGGTACCGCGTGGTTCTAAATCAATATGTATCGAAATAAATAATG

#3LCE2

CTCTGGTACCAGAGATTTGGTTTTAGAAACAATATTTTTACAAAATCTAATG

#3HCE5

TTACTATCTTATTATCATAGTTAG

Klonierung von BoNT/F:

#5LCF1

CTCTCGGATCCATGCCAGTTGCAATAAATAGTT

#5LCF3

TCACTAGCTCATGAATTGATAC

#3LCF5

TCTCTCTGGCGCCTTTGTACCTTTTCTAG

#3LCF6

TAGTCTCTTTATAAGTAACTCC

#5LCF7

TAAAGGTCTAGTGGAAAAGATC

#5HCF6

TCTCTCTGGCGCCACCGCGACTATGC

#5HCF10

TACTTTTGATAAGATTGCAGACA

#5HCF8

GATGAGAAAAATAGACTTGAATC

#3HCF9

TTGAACCATATCCAGAGATATC

#5HCF4

GGACTTTACAAGATACTGCTG

#3HCF11
ATCAGATATACTAATCATTTGTG

#5HCF5
GAATTTACTAAGAACAGATAAGTC

#3HCF7
CAAATTATCTGTATTAGATATATC

#3LCFthro
CTCTCTGGCGCCTTACTTCCTCTTGGTACTAACTTTTTGTTTTAACGCTCTTACAAAA
TTTAACGATC

Klonierung von BoNT/G:

#G1
GATAGTAGATGCTATACCTTATC

#G5
GTCCTTACCCAAAAGTTAATGC

#5HCG4
TCTCTGGATCCACCGGTAAATCTGAACAGTGTATTATTGTTAATAA

#3LCG5
TCTCTCTGCAGACCGGTATTTTTGTACATTACAGG

#G-Throm1
CTCTGGTACCAGAGATTTGGTTTTAGAGTACATTACAGGCTTGACATTG

#G-Throm2
CTCTTGGTACCGCGTGGTTCTAAATCTGAACAGTGTATTATTGTTAA

Sonstige Oligonukleotide:

#Ex-2
TAGGCGTATCACGAGGC

#Ex-3
TGAGGTCATTACTIONGGATCTA

#SP6
CGATTTAGGTGACACTATAG

#T7
TAATACGACTCACTATAGGG

8.1.11 Geräte

Centrifuge 5403 Tischzentrifuge	Eppendorf AG
Centrifuge 5417R Tischzentrifuge	Eppendorf AG
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
RC 5B Plus Zentrifuge	Sorvall
Reserch Pipettensatz	Eppendorf AG
QIAprep Vacuum Manifold	Qiagen
Accu-jet Pro Pipette	Brand GmbH
Power Pac 3000	Biorad
Pharmacia LKB MultiDriveXL	Pharmacia
Feinwaage	Sartorius AG
Wasserbad Julabo PC	Julabo Labortechnik GmbH
Mini Protean™ Cell III Elektrophoresesystem	Biorad
Heidolph MR 3001 Heizrührer	Heidolph Instruments GmbH
Sterilarbeitsbank	ICN
Vibrofix VF1 Electronic Vortexer	IKA Labortechnik
Laborport Vacuumpumpe	KNF Neuberger
Ultraspec 2000 UV-Spektrometer	Pharmacia
LAS 3000 Fotodokumentationssystem	Fujifilm
BAS 1500 Phosporimager	Fujifilm
T-Gradient Thermoblock	Biometra
Gel Trockner Model 543	Biorad
InnOva 4230 Inkubator-Schüttler	New Brunswick Scientific
HeraSafe Zellkultur-Sterilbank	Heraeus
Zellkultur-Inkubator Model 3111	Forma Scientific
Sonifier 250 Ultraschallgerät	Branson

8.1.12 Firmen

Alomone Labs	Jerusalem, Israel
Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Applichem	Darmstadt, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
Biorad	Hercules, USA
Boehringer Mannheim	Mannheim, Deutschland
Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Branson	Danbury, USA
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Forma Scientific	Waltham, USA
Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland
Heidolph Instruments GmbH	Schwabach, Deutschland
Heraeus	Milford, USA
IBA GmbH	Göttingen, Deutschland
ICN	Eschwege, Deutschland

IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Invitrogen GmbH	Karlsruhe, Deutschland
J.T.Baker	Deventer, Niederlande
Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach, Deutschland
KNF Neuberger	Freiburg, Deutschland
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
MBI Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
New Brunswick Scientific	Edison, USA
PAA Laboratories GmbH	Cölbe, Deutschland
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Perkin-Elmer	Rodgau, Deutschland
Pharmacia	Freiburg, Deutschland
Promega	Madison, USA
Qiagen	Hilden, Deutschland
Riedel DeHaën	Seelze, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma	Hamburg, Deutschland
Sorvall	Langenselbold, Deutschland

Lebenslauf

Persönliche Daten

	Tino Karnath
	Allerstraße 11
	31303 Burgdorf
Telefon	05136 / 970 43 80
E-Mail	tik@gmx.com
Geburtsdatum, -ort	08. August 1975, Dessau
Familienstand	verheiratet, 1 Kind

Ausbildung

September 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Toxikologie, MHH
April 2007 – August 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter toxogen GmbH
Mai 2006 – März 2007	Verfassen der Dissertation
August 2002 - April 2006	Promotion im Institut für Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover, Arbeitsgebiet Neurotoxine
August 2002	Abschluss des Studiums mit Diplomarbeit im Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Diplom-Gesamtnote 1,5
Oktober 1999 - September 2002	Spezialisierung auf die Gebiete Molekularbiologie, Genetik und Biometrie an der Universität Hannover, der Technischen Universität Dresden und im IPK Gatersleben
Oktober 1997 - September 1999	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hannover, Vordiplom
August 1996 - August 1997	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Burgdorf
Mai 1996	Abitur
1989 - 1996	Gymnasium Burgdorf
1982 - 1989	Polytechnische Oberschule Dessau

Publikationen

Originalpublikationen in „peer reviewed“ Zeitschriften:

Rummel A, Eichner T, Weil T, Karnath T, Gutcaits A, Mahrhold S, Sandhoff K, Proia R, Acharya KR, Bigalke H, Binz T (2007). Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double receptor concept. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1): 359-64.

Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, Binz T (2004). Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem* **279**: 30865-70.

Bade S, Rummel A, Reisinger C, Karnath T, Ahnert-Hilger G, Bigalke H, Binz T (2004). Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *J Neurochem* **91**(6): 1461-72.

Buchbeitrag:

Binz T, Rummel A, Karnath T, Mahrhold S, Bigalke H (2007). Cell entry strategy of botulinum neurotoxins. *Toxines emergentes: nouveaux risques; LAVOISIER, 2007*

Poster:

Karnath T, Rummel A, Bigalke H, Binz T (2005). Mapping the Protein Receptor Binding Area of Botulinum Neurotoxin A.