

# Identifizierung neuronaler Proteinrezeptoren clostridieller Neurotoxine

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

*Dr. rer. nat.*

genehmigte Dissertation von  
Dipl.-Biochem. Stefan Mahrhold,  
geboren am 13. April 1976 in Hildesheim.

Hannover, im Juli 2008

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

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

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

## **Erklärung**

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

Hannover, im Mai 2008

Stefan Mahrhold

## Danksagung

Mein Dank geht ganz besonders an Herrn Dr. Thomas Binz für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft während der gesamten Doktorarbeit.

Besonderen Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme des Referates und Herrn Prof. Dr. H. Bigalke für die Übernahme des Korreferates, und für seine Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Bei Herrn Dr. Andreas Rummel bedanke ich mich für seine großartige Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Thomas Binz, Tina Henke, Gundhild Schmeding und Stefan Sikorra sowie bei Andreas Rummel, Tino Karnath, Martina Enge und Karsten Heidrich möchte ich mich für die Unterstützung, die lockere Arbeitsatmosphäre und für ihre Freundschaft bedanken.

Bei den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Bigalke, Beate Laske und Christina Knorr bedanke ich mich für die Präparation der Zwerchfelle.

Meinen Eltern und Schwiegereltern möchte ich für die fortwährende Unterstützung und die Motivation danken.

Meiner Frau Julia und meiner Tochter Greta Marie, die so häufig auf Papa verzichten mussten, danke ich für ihre Liebe, Geduld und ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und der Doktorarbeit.

*Für Greta Marie.*

## Zusammenfassung

Die Familie der clostridiellen Neurotoxine (CNT) besteht aus den sieben Serotypen des Botulinus Neurotoxins (BoNT/A-G) und dem Tetanus Neurotoxin (TeNT). Bei den CNT handelt es sich um Proteintoxine, die von Bakterien der Gattung *Clostridium* synthetisiert werden. Sie lassen sich in eine leichte (LC, 50 kDa) und eine schwere Peptidkette (HC, 100 kDa) unterteilen. Die LC besitzt die Aktivität einer zinkabhängigen Endoprotease. Sie hydrolysiert Proteinkomponenten der zellulären Exozytosemaschinerie, wodurch die Signalweiterleitung an der neuromuskulären Verbindung unterbrochen wird. Die HC lässt sich weiter unterteilen in eine N-terminale ( $H_N$ -Domäne, 50 kDa) und eine C-terminale Domäne ( $H_C$ -Fragment, 50 kDa). Während die  $H_N$ -Domäne eine wichtige Rolle bei der Translokation der LC in das Zytoplasma spielt, ist das  $H_C$ -Fragment verantwortlich für die neurospezifische Bindung der CNT. Nach gegenwärtiger Auffassung gilt für die Bindung und Aufnahme der CNT in ihre Zielzellen ein Zwei-Rezeptor-Modell. Dieses besagt, dass die Neurotoxine zunächst auf der Plasmamembran ihrer Zielzelle akkumulieren, indem sie mit Polysialylgangliosiden interagieren. Auf die Wechselwirkung mit Gangliosiden folgt die Bindung an einen spezifischen Proteinrezeptor, die schließlich zur Endozytose und Aufnahme des Holotoxins führt. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Synaptotagmin I und II, Proteine aus der Membran synaptischer Vesikel, den Proteinrezeptor für BoNT/B und G darstellen.

Hauptziel dieser Arbeit ist die Identifizierung der Proteinrezeptoren der verbleibenden CNT. Unter der Annahme, dass die gesuchten Proteine ebenfalls integrale Bestandteile synaptischer Vesikel sind, soll gezielt geprüft werden, ob Vesikelproteine an das  $H_C$ -Fragment der CNT binden können.

In dieser Dissertation kann erstmals mit Hilfe binärer Interaktionsexperimente gezeigt werden, dass das Membranprotein aus synaptischen Vesikeln SV2C die  $H_C$ -Domäne von BoNT/A bindet. Von SV2C abgeleitete Peptide sind außerdem in der Lage, die Toxizität von BoNT/A am isolierten *Nervus phrenicus* der Maus zu blockieren. Schließlich zeigen Zelllinien mit verminderter Expression von SV2 eine geringere Suszeptibilität gegenüber BoNT/A. Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse belegen, dass SV2 den Proteinrezeptor von BoNT/A darstellt.

Schlagworte: clostridielle Neurotoxine, Proteinrezeptor, SV2

## Abstract

The family of clostridial neurotoxins (CNT) consists of the seven serotypes of botulinum neurotoxin (BoNT/A-G) and the tetanus neurotoxin (TeNT). The CNTs are protein toxins, which are synthesized by bacteria of the genus *Clostridium*. They can be subdivided into a light (LC, 50 kDa) and a heavy peptide chain (HC, 100 kDa). The LC possesses the activity of a zinc-dependent endoprotease and hydrolyzes protein components of the vesicular fusion machinery, thereby blocking neurotransmission at the neuromuscular junction. The HC can further be subdivided into an N-terminal ( $H_N$  domain, 50 kDa) and a C-terminal domain ( $H_C$ -fragment, 50 kDa). While the  $H_N$  domain plays an important role in the translocation of the LC into the cytosol, the  $H_C$ -fragment is responsible for the neurospecific cell binding. According to the current hypothesis a two-receptor model applies to the binding and internalisation of the CNT. This means that in a first step the neurotoxins accumulate on the plasma membrane of the target cell by interacting with polysialogangliosides. After accumulation binding to a specific protein receptor finally leads to endocytosis and internalisation of the holotoxin. A few years ago, synaptotagmin I and II, integral proteins from synaptic vesicles, were identified as the specific protein receptor for BoNT/B and BoNT/G.

The main objective of this work is the identification of the protein receptors for the remaining CNTs. On the assumption that putative protein receptors are likewise integral components of the membranes of synaptic vesicles, it has to be examined whether synaptic vesicle proteins can bind to the  $H_C$ -fragment of the CNT.

Employing binary interaction experiments, this thesis demonstrates for the first time, that the membrane protein from synaptic vesicles, SV2C, can bind the  $H_C$ -fragment of BoNT/A. In addition, peptides derived from SV2C inhibit the toxicity of BoNT/A at mouse phrenic nerve preparations. Finally, cell lines with a decreased expression of SV2 exhibit a decreased susceptibility for BoNT/A. The data established in this thesis prove that SV2 represents the protein receptor of BoNT/A.

Keywords: clostridial neurotoxins, protein receptor, SV2

# Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	III
Danksagung.....	IV
Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VII
Inhaltsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Tetanus und Botulismus.....	1
1.2 Clostridielle Neurotoxine.....	3
1.2.1 Struktur clostridieller Neurotoxine.....	4
1.2.2 Wirkmechanismus clostridieller Neurotoxine .....	8
1.2.2.1 Enzymatische Aktivität.....	9
1.2.2.2 Translokation .....	11
1.2.2.3 Neurospezifische Bindung und Internalisation .....	12
1.2.2.4 Retrograd axonaler Transport.....	15
1.3 Clostridielle Neurotoxine in Medizin und Forschung.....	16
2 Material und Methoden .....	19
2.1 Arbeiten mit DNA.....	19
2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	19
2.1.2 Restriktionsspaltung .....	20
2.1.3 Dephosphorylierung .....	21
2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	22
2.1.5 Reinigung von PCR-Produkten .....	23
2.1.6 Ligation .....	24
2.1.7 Transformation .....	24
2.1.8 Plasmid-Präparation .....	25
2.1.9 Klonierungen .....	26
2.1.10 Sequenzierung .....	28
2.1.11 <i>In vitro</i> Transkription .....	30
2.2 Arbeiten mit Proteinen.....	31
2.2.1 Rekombinante Expression in <i>E. coli</i> .....	31
2.2.2 <i>Strep</i> -Tag®II-Aufarbeitung.....	31
2.2.3 GST-Aufarbeitung .....	33
2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	34
2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung .....	36
2.2.6 <i>In vitro</i> Translation.....	37
2.3 Analyse der Rezeptorkandidaten.....	37
2.3.1 GST-Pulldown-Experiment .....	37
2.3.2 GST-Pulldown aus solubilisierten synaptischen Vesikeln .....	39



2.3.2.1	Präparation von synaptischen Vesikeln aus Rattenhirn .....	39
2.3.2.2	GST-Pulldown .....	40
2.3.3	<i>Ex vivo</i> Toxizitätsbestimmung am <i>Nervus phrenicus</i> der Maus .....	41
2.3.4	Arbeiten mit Zelllinien .....	43
2.3.4.1	Haltung von Zelllinien .....	44
2.3.4.2	Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA und siRNA .....	45
2.3.4.3	Stabile Transfektion .....	46
2.3.4.4	Zellbasierte Toxizitätsbestimmung .....	46
2.3.4.5	Western Blot .....	48
3	Ergebnisse .....	50
3.1	Klonierung potentieller Proteinrezeptoren .....	50
3.2	Expression potentieller Proteinrezeptoren .....	52
3.3	Analyse rekombinanter Proteinrezeptoren .....	54
3.3.1	BoNT/A interagiert spezifisch mit SV2C .....	54
3.3.2	BoNT/A bindet den C-terminalen Bereich des luminalen Abschnitts von SV2C .....	56
3.3.3	SV2C inhibiert die Aktivität von BoNT/A im MPN-Toxizitätsassay .....	58
3.4	Zellsystem und RNA Interferenz (RNAi) .....	60
3.5	GST-Pulldown aus nativem Material .....	63
4	Diskussion .....	67
4.1	SV2 ist der Proteinrezeptor für Botulinus Neurotoxin A .....	67
4.2	Proteinrezeptoren als integraler Bestandteil der Membran synaptischer Vesikel .....	71
4.3	Die Identifizierung von SV2 als Proteinrezeptor für BoNT/A bestätigt das Zwei-Rezeptor-Modell .....	75
5	Ausblick .....	78
6	Literatur .....	79
7	Anhang .....	88
7.1	Publikationen .....	88
7.1.1	Publikationen in Zeitschriften .....	88
7.1.2	Buchartikel .....	88
7.1.3	Poster .....	88
7.2	Oligonukleotide .....	89
7.3	Abkürzungen .....	91
7.4	Chemikalien .....	93
7.5	Bakterienstämme .....	94
7.5.1	<i>E. coli</i> TG1 .....	94
7.5.2	<i>E. coli</i> M15[pREP4] (Qiagen) .....	95
7.5.3	<i>E. coli</i> BL21 (Stratagene) .....	95
7.6	Plasmide .....	95
7.6.1	pGEX-4T3 (GE Healthcare Life Sciences) .....	95
7.6.2	pCMV5 .....	96
7.6.3	pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen) .....	96

# 1 Einleitung

Den Kontaktpunkt zwischen zwei Neuronen, aber auch zwischen Neuron und Muskel- oder Drüsenzelle, bezeichnet man als Synapse. Man unterscheidet die Präsynapse, über die ein Aktionspotential eintrifft, von der Postsynapse, an der ein neues Aktionspotential entsteht und weitergeleitet wird. Zwischen Prä- und Postsynapse liegt der synaptische Spalt. Das ankommende Aktionspotential führt zu einer Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Diese binden an spezifische Rezeptoren der Postsynapse und rufen so eine Depolarisation hervor, die zu einem neuen Aktionspotential und damit zur Weiterleitung des Nervenimpulses führt. Die Ausschüttung der Neurotransmitter erfolgt durch schnelle regulierte Exozytose. Dabei fusionieren synaptische Vesikel mit der präsynaptischen Membran, wodurch der in den Vesikeln enthaltene Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. Zur Erzeugung neuer synaptischer Vesikel findet neben der Exozytose stets auch Endozytose unter Bildung clathrinbedeckter Vesikel statt. Nach dem Zerfall ihrer Clathrinhülle werden diese erneut mit Neurotransmitter befüllt und der Zyklus der Exo- und Endozytose kann von neuem beginnen. Die Exozytose und ihre Regulation sind für die korrekte Weiterleitung des Nervenimpulses von besonderer Bedeutung (Südhof, 2008).

Viele Nervengifte (Neurotoxine) verhindern die Weiterleitung von Nervenimpulsen, indem sie die Funktion von Synapsen beeinträchtigen. Dabei unterscheidet man Neurotoxine, die an der postsynaptischen Membran wirken von solchen, die ihre Aktivität an der präsynaptischen Membran entfalten. Einige Neurotoxine, die an der präsynaptischen Seite wirken, verhindern spezifisch die Exozytose des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt, wodurch die Reizweiterleitung an der betroffenen Synapse unterbrochen wird. Zu diesen Toxinen gehört die Gruppe der clostridiellen Neurotoxine (CNT), die aus dem Tetanus Neurotoxin (TeNT) und den sieben serologisch unterscheidbaren Botulinus Neurotoxinen (BoNT/A-G) besteht. Die CNT werden in der Natur von anaeroben Bakterien der Gattung *Clostridium* synthetisiert und verursachen die Krankheiten Tetanus bzw. Botulismus (Kap. 1.1).

## 1.1 Tetanus und Botulismus

Die Symptome des Tetanus wurden bereits von Hippokrates beschrieben. Er berichtete von einem gelähmten Patienten mit hyperkontrahierter Skelettmuskulatur, weshalb er der zugrunde liegenden Erkrankung den Namen Tetanus (griech. τετανος = Krampf) gab. Die

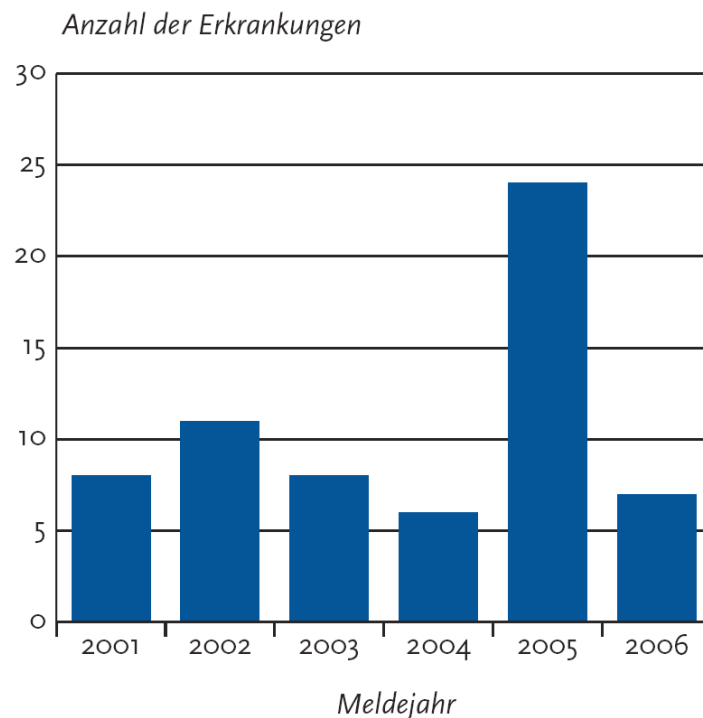
auch als Wundstarrkrampf bezeichnete Infektionskrankheit endet unbehandelt mit dem Tod durch Versagen der Atmung. Ende des 19. Jahrhunderts konnte als Ursache für die Krankheit ein Bakterium ausgemacht werden, das die Form eines Trommelstocks (lat. *closter*) besitzt. *Clostridium tetani* ist ein gram-positives, obligat anaerobes und sporenbildendes Bakterium, das auf der ganzen Welt im Erdboden vorkommt und das TeNT synthetisiert. Tetanus tritt in der Regel nach Infektion offener Wunden auf, die nach ihrem Verschluss optimale anaerobe Wachstumsbedingungen für die Bakterien und damit für die Produktion des Neurotoxins bieten. Verschiedene Formen des Tetanus sind in der ICD-10<sup>1</sup> der World Health Organization (WHO) klassifiziert (A33-A35). In Deutschland gibt es gegenwärtig weniger als 15 Erkrankungsfälle pro Jahr, wobei ältere Erwachsene häufiger betroffen sind als Kinder, was auf die hohe Impfquote (über 95% bei Vorschulkindern) zurückzuführen ist (Ratgeber Infektionskrankheiten: Tetanus, Robert-Koch-Institut, 2004). In den Entwicklungsländern, in denen die Immunisierung gegen TeNT wenig verbreitet ist, kommt es auch heute noch zu mehreren tausend Todesfällen pro Jahr durch Tetanus. Hier sind Neugeborene und Kinder häufiger betroffen als Erwachsene (Galazka & Gasse, 1995).

Die Symptome des Botulismus (ICD-10: A05.1) wurden von Justinus Kerner erst im Jahr 1817 beschrieben, was wahrscheinlich auf die im Vergleich zu Tetanus weniger dramatischen Symptome zurückzuführen ist. Akuter Botulismus äußert sich in einer generellen Erschlaffung der Skelettmuskulatur und endet in schweren Fällen mit dem Tod durch die Lähmung der Atemmuskulatur. Möglicherweise treten deutlich mehr Fälle von Botulismus auf als bekannt werden, da die Symptome leicht mit denen anderer Erkrankungen verwechselt werden können. Botulismus wird durch eines der sieben BoNT hervorgerufen, die von den gram-positiven, obligat anaeroben und sporenbildenden Bakterien *Clostridium botulinum*, *Clostridium barati* und *Clostridium butyricum* (Aureli *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 1985) synthetisiert werden. Erkrankungen beim Menschen werden häufig durch BoNT/A und B, seltener auch durch BoNT/E und F ausgelöst. Botulismusfälle bei Rindern werden durch BoNT/D, bei Vögeln, Nerzen und Frettchen durch BoNT/C verursacht. BoNT/G konnte bisher nicht mit Krankheitsfällen in Verbindung gebracht werden. Botulismus, hervorgerufen durch den Verzehr unsachgemäß produzierter und mit BoNT kontaminierter Fleisch- und Fischkonserven (lat. *botulus* = Wurst; „Lebensmittelvergiftung“), tritt in Deutschland und anderen europäischen Ländern nur noch sehr selten auf, was auf die hohe Qualität der

---

<sup>1</sup> International Classification of Diseases Revision 10 (<http://www.who.int/classifications/icd/en/>)

produzierten Lebensmittelkonserven zurückzuführen ist. Eine Infektion offener Wunden mit Clostridien (Wundbotulismus) analog zu Tetanus kommt in zunehmendem Maße bei Drogenkonsumenten durch die Verwendung kontaminierter Spritzen und Kanülen vor. Bei Neugeborenen kann es nach oraler Aufnahme der Sporen (z.B. in Bienenhonig) zu einer Besiedelung des Darmes mit *Clostridium botulinum* kommen, was zum Neugeborenenbotulismus (engl. *infant botulism*) führt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Übermittelte Botulismusfälle in Deutschland nach Meldejahr von 2001 bis 2006 (aus dem Infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006 des Robert-Koch-Institutes). Bei den wenigen Botulismusfällen pro Jahr handelt es sich in zunehmendem Maße um Wundbotulismus bei Drogenkonsumenten (16 von 24 Erkrankungen in 2005).**

## 1.2 Clostridielle Neurotoxine

Die CNT gehören zu den wirksamsten natürlich vorkommenden Giften überhaupt. Die LD<sub>50</sub> i.v. (intravenöse letale Dosis in 50% der Fälle) für die Maus beträgt je nach Serotyp zwischen 100 pg und 1 ng pro kg Körpergewicht<sup>2</sup> (Schiavo *et al.*, 2000). Die Grundlage für diese enorme Toxizität bildet die absolute Neurospezifität der Toxine. In den Organismus aufgenommen erreichen die CNT über Blutkreislauf und Lymphe die neuromuskulären

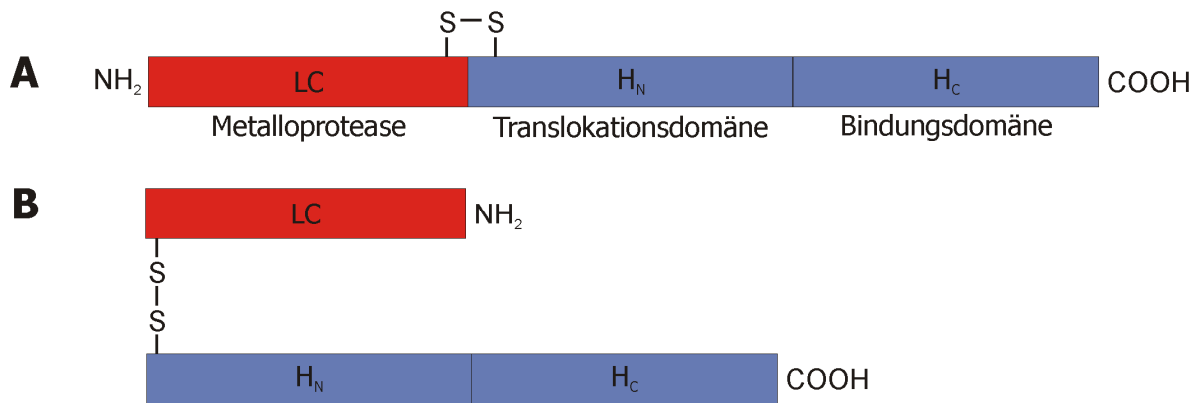
<sup>2</sup> Zum Vergleich: Die LD<sub>50</sub> i.v. von Natriumcyanid beträgt bei der Maus 10 mg pro kg Körpergewicht!

Verbindungen der quergestreiften Muskulatur. Dort angekommen binden sie mit außerordentlich hoher Spezifität an die präsynaptische Membran der Motoneurone, von denen sie anschließend durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden. Nach der Aufnahme blockieren die BoNT die Exozytose des Neurotransmitters Acetylcholin an den neuromuskulären Verbindungen, was zu der botulismustypischen Erschlaffung der Muskulatur führt. Im Gegensatz zu den BoNT wirkt TeNT nicht im peripheren Nervensystem. Nach der Aufnahme in ein Motoneuron wird es retrograd axonal in das Rückenmark transportiert, wo es das Motoneuron verlässt und in ein inhibitorisches Interneuron gelangt. Hier verhindert TeNT die Exozytose des Neurotransmitters Glycin bzw. GABA, was zum Verlust der negativen Kontrolle der Motoneurone und damit zur tetanustypischen dauerhaften Anspannung und Verkrampfung der Muskulatur führt. Die unterschiedlichen Symptome von Tetanus und Botulismus kommen also nicht durch verschiedene Wirkmechanismen zustande, sondern sind Resultat der verschiedenen Wirkorte von TeNT und BoNT im Nervensystem.

### **1.2.1 Struktur clostridieller Neurotoxine**

Die CNT sind Proteintoxine, die aufgrund ihres Aufbaus den AB-Toxinen zugeordnet werden können. Die A-Untereinheit der AB-Toxine vermittelt die (enzymatische) Aktivität innerhalb der Zelle, während die B-Untereinheit für die (neuro-) spezifische Bindung des Toxins an die Zielzellen, die rezeptorvermittelte Endozytose und die Translokation der A-Untereinheit in das Zytoplasma der Zielzelle verantwortlich ist (Kap. 1.2.2.2).

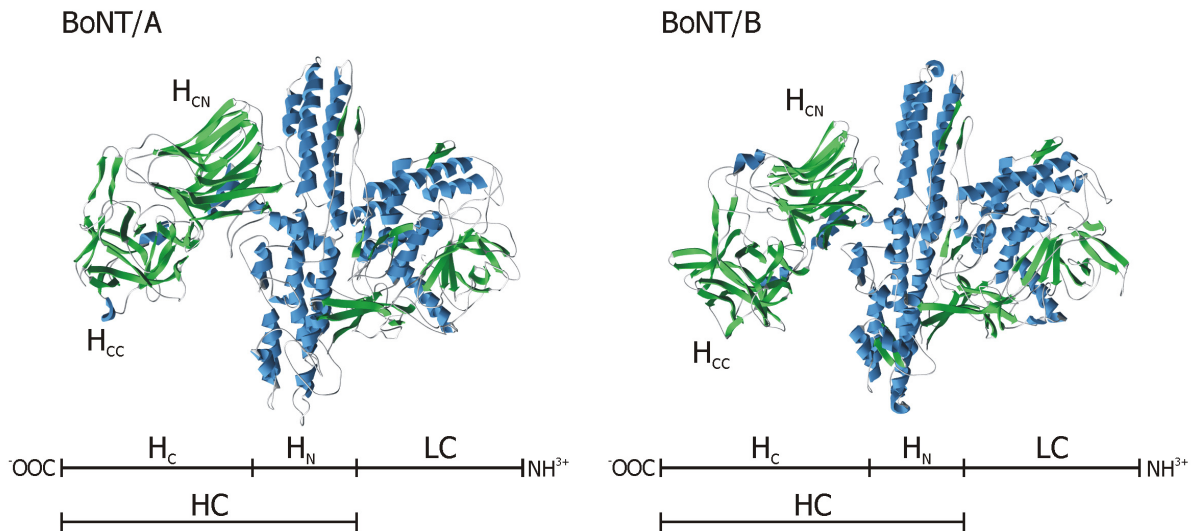
Die CNT besitzen ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Die Anzahl der Aminosäuren variiert zwischen 1251 (BoNT/E) und 1315 (TeNT). Im Gegensatz zu TeNT sind die BoNT mit nichttoxischen Proteinen assoziiert. Diese 300-900 kDa großen Komplexe, die auch als Progenitortoxine bezeichnet werden, verhindern den Abbau des jeweiligen Neurotoxins im Magen-Darm-Trakt nach oraler Aufnahme (Kubota *et al.*, 1998; Mutoh *et al.*, 2003). Die Neurotoxine werden von den Clostridien als ein großes Polypeptid synthetisiert, später aber durch Proteasen hydrolysiert, wobei eine leichte und eine schwere Polypeptidkette entsteht (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der CNT: (A) Inaktive *single chain* Form der CNT. (B) Die aktive *di-chain* Form der CNT entsteht durch Proteolyse zwischen der leichten und schweren Kette. Beide Polypeptidketten bleiben in dieser Form durch die Disulfidbrücke miteinander verbunden, was essentiell für den Intoxikationsprozess ist (Schiavo *et al.*, 1990).

Die leichte Kette (ca. 50 kDa, *light chain*, LC) bildet die N-terminale Domäne des Proteins. Sie enthält das Zinkbindungsmotiv zinkabhängiger Endopeptidasen (HExxH, Superfamilie Gluzincin; Schiavo *et al.*, 1992). Die Entdeckung dieses Aminosäuresequenzmotivs und die Beobachtung, dass die CNT in Anwesenheit von Chelatbildnern (z.B. Ethylendiamintetraacetat, EDTA) ihre Toxizität verlieren, führte zu der Erkenntnis, dass ihr Katalysemechanismus auf der Aktivität einer zinkabhängigen Endopeptidase beruht (Jongeneel *et al.*, 1989; Schiavo *et al.*, 1992). Im Sinne der AB-Toxine entspricht damit die leichte Kette der katalytisch aktiven A-Untereinheit (Kap. 1.2.2.1). Die schwere Kette (ca. 100 kDa, *heavy chain*, HC) entspricht dagegen der B-Untereinheit. Sie lässt sich in zwei weitere Domänen unterteilen. Die N-terminale Hälfte, die als H<sub>N</sub>- oder Translokationsdomäne bezeichnet wird, gewährleistet nach der Endozytose des Holotoxins die Translokation der leichten Kette vom Inneren des Endosoms in das Zytosol des Neurons (Kap. 1.2.2.2). Die C-terminale Hälfte, das H<sub>C</sub>-Fragment, bildet die Bindungsdomäne. Sie ist für die neurospezifische Bindung der CNT verantwortlich (Kap. 1.2.2.3).

Die Kristallstrukturen von BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998), BoNT/B (Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000) und die des H<sub>C</sub>-Fragmentes von TeNT (TeNT-H<sub>C</sub>; Umland *et al.*, 1997) sind mit zum Teil hoher Auflösung aufgeklärt worden. Die dreidimensionalen Strukturen von BoNT/A und BoNT/B (Abbildung 3) sind sich untereinander sehr ähnlich, wengleich die Aminosäuresequenzen mit nur 39% Identität einen verhältnismäßig geringen Verwandtschaftsgrad aufweisen.



**Abbildung 3:** Vergleich der Kristallstrukturen von BoNT/A (PDB-ID: 3BTA) und BoNT/B (PDB-ID: 1EPW). Dargestellt sind die Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helix, blau;  $\beta$ -Faltblatt, grün; *turn* und *random coil*, grau). Die Grenzen zwischen den drei funktionell eigenständigen Domänen LC,  $H_N$  und  $H_C$  sind am unteren Bildrand markiert. Das  $H_C$ -Fragment lässt sich noch feiner in  $H_{CN}$ - und  $H_{CC}$ -Domäne unterteilen. Die Kristallstrukturen von BoNT/A und BoNT/B weisen eine hohe Ähnlichkeit auf, obwohl die Sequenzhomologie zwischen beiden mit 39% eher gering ist.

Vergleicht man die Primärsequenzen der CNT untereinander, so ergeben sich zum Teil auch deutlich höhere Identitäten (Abbildung 4, oberhalb der Diagonale). Der größte Verwandtschaftsgrad besteht mit 64% identischen Aminosäuren zwischen BoNT/E und BoNT/F, gefolgt von BoNT/B und BoNT/G mit 57% Identität. Auch BoNT/C und BoNT/D weisen mit 52% identischen Aminosäuren einen hohen Verwandtschaftsgrad auf.

		% Identität							
	BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/D	BoNT/E	BoNT/F	BoNT/G	TeNT	Holotoxin
BoNT/A		39	30	32	38	39	38	33	
BoNT/B	41		30	33	37	38	57	40	
BoNT/C	29	27		52	31	32	33	31	
BoNT/D	28	31	39		33	32	34	31	
BoNT/E	48	35	26	28		64	37	37	
BoNT/F	50	37	29	27	62		38	36	
BoNT/G	39	50	29	31	35	35		40	
TeNT	34	29	26	21	32	30	34		
		H <sub>c</sub> -Fragment							

**Abbildung 4:** Sequenzvergleiche der Holotoxine und der H<sub>c</sub>-Fragmente der CNT. Angegeben ist der Prozentsatz identischer Aminosäuren des jeweiligen paarweisen Sequenzvergleichs (Algorithmus: ClustalW<sup>3</sup>; Verwendete Parameter: *end gaps penalty*: -1, *gap extension penalty*: 0.2, *gap distances penalty*: 4, *gap open penalty*: 10). Besonders die Paarungen BoNT/E und F, BoNT/B und G und BoNT/C und D weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie auf (grau hinterlegte Felder). *Accession*-Nummern der verwendeten Sequenzen: BoNT/A, YP\_001253342; BoNT/B, P10844; BoNT/C, P18640; BoNT/D, P19321; BoNT/E, Q00496; BoNT/F, AAA23210; BoNT/G, Q60393; TeNT, NP\_783831.

Die leichten Ketten bestehen zu etwa gleichen Teilen aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Das Zn<sup>2+</sup>-Ion, das essentiell für die katalytische Aktivität ist, befindet sich etwa in der Mitte der LC in einem tiefen Spalt des Proteins. Dort wird es von den Imidazolringen der Histidine des HExxH-Motivs und der Carboxylgruppe eines etwa 25 Aminosäuren weiter stromabwärts gelegenen Glutamates koordiniert. Die vierte Koordinationsstelle wird durch ein Wassermolekül besetzt, das an das Glutamat des HExxH-Motivs gebunden ist. Die leichten Ketten weisen eine sehr hohe Substratspezifität auf und benötigen, im Gegensatz zu anderen Zn<sup>2+</sup>-Proteasen, eine über weite Proteinabschnitte ausgedehnte spezifische Interaktion mit ihren Substraten (Sikorra *et al.*, 2006; Breidenbach & Brunger, 2004). BoNT/C spaltet als einziges CNT zwei verschiedene Substrate, während alle anderen spezifisch für ein einziges Substrat sind (Kap. 1.2.2.1). Die Sequenzhomologie der leichten Ketten der verschiedenen CNT liegt zwischen 32% und 61% (Niemann *et al.*, 1994).

Das auffälligste Merkmal der H<sub>N</sub>-Domäne sind die zwei ca. 100 Å langen  $\alpha$ -Helices, die denen des Colicin Ia ähneln (Wiener *et al.*, 1997), das in der Plasmamembran von Bakterien Ionenkanäle bildet. Ein anderes bedeutendes Merkmal der H<sub>N</sub>-Domäne ist der N-terminale

<sup>3</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>



unstrukturierte Bereich, der sich wie ein Gürtel um die leichte Kette schlingt und dabei die Bindung der Substrate (Kap. 1.2.2.1) an die leichte Kette nachahmt (Brunger *et al.*, 2007). Die Ähnlichkeit zwischen den H<sub>N</sub>-Domänen auf Aminosäureebene beträgt 34% bis 62%. Damit ist die Aminosäuresequenz der H<sub>N</sub>-Domäne ähnlich konserviert wie die der leichten Kette.

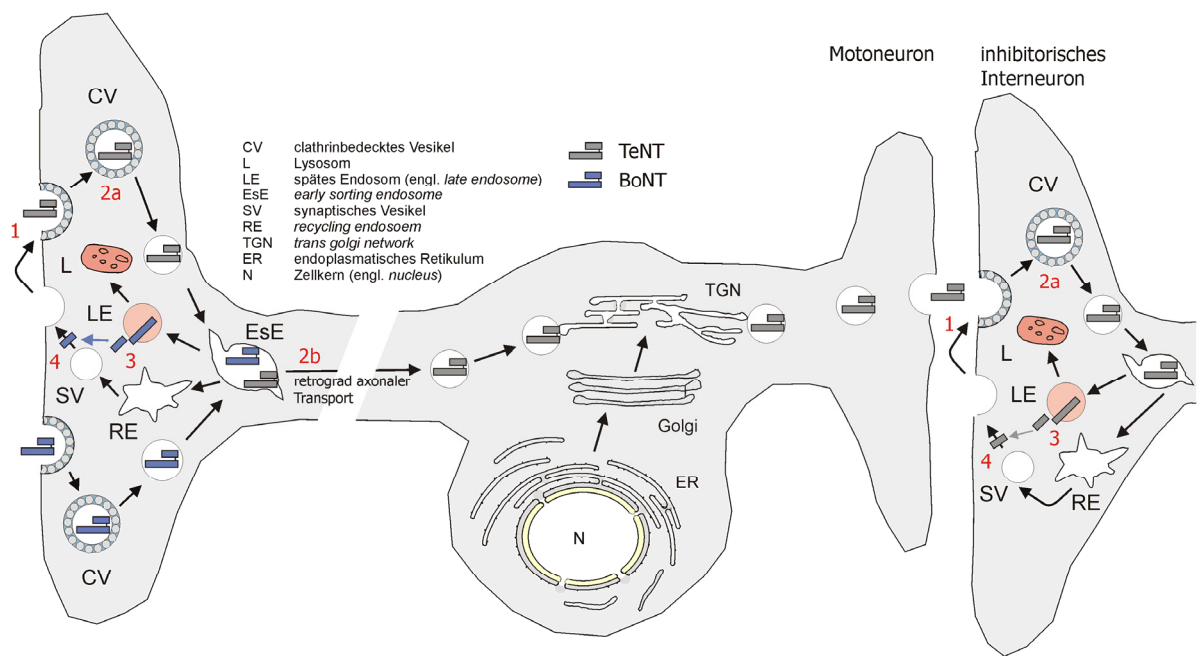
H<sub>N</sub>-Domäne und leichte Kette sind durch eine exponierte Schleife miteinander verbunden, die zwei konservierte Cysteine enthält. Die Disulfidbrücke zwischen beiden Cysteinen ist innerhalb der CNT hoch konserviert und für den Intoxikationsprozess essentiell (Schiavo *et al.*, 1990). Innerhalb der Schleife werden die Neurotoxine von bestimmten bakteriellen und gewebespezifischen Proteasen hydrolysiert, wobei aus der inaktiven, einkettigen (*single chain*, sc) Form das aktive zweikettige (*di-chain*) Neurotoxin entsteht (Turton *et al.*, 2002; Abbildung 2). Leichte und schwere Kette bleiben in dieser Form weiterhin durch die Disulfidbrücke und zusätzliche nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden.

Die Sequenzhomologie der H<sub>C</sub>-Fragmente der CNT liegt zwischen 21% und 62% (Abbildung 4) und ist damit weniger stark ausgeprägt als die der leichten Ketten und der H<sub>N</sub>-Domänen. Das H<sub>C</sub>-Fragment, das hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblättern besteht, setzt sich aus zwei weiteren Domänen zusammen (Abbildung 3). Die Sequenzhomologie innerhalb der N-terminalen, lectinähnlichen *jelly roll* Domäne (H<sub>CN</sub>) ist mit 26% bis 65% relativ hoch, während die C-terminale  *$\beta$ -trefoil* Domäne (H<sub>CC</sub>) eine weniger stark konservierte Aminosäuresequenz besitzt (16-44%). Trotzdem sind sich die dreidimensionalen Strukturen der H<sub>CC</sub>-Domänen von BoNT/A, B und TeNT aufgrund von zwölf konservierten Aminosäureclustern einander sehr ähnlich (Ginalski *et al.*, 2000). Während die Funktion der H<sub>CN</sub>-Domäne unbekannt ist, ist die H<sub>CC</sub>-Domäne für die Interaktion mit Polysialylgangliosiden und Proteinrezeptoren verantwortlich (Fotinou *et al.*, 2001; Rummel *et al.*, 2003, Rummel *et al.*, 2004; Rummel *et al.*, 2007; Kap. 1.2.2.3).

## 1.2.2 Wirkmechanismus clostridieller Neurotoxine

Der Wirkmechanismus der clostridiellen Neurotoxine lässt sich grob in vier Schritte unterteilen (Schiavo *et al.*, 2000; Simpson, 2004; Abbildung 5). Auf die neurospezifische Bindung (1) folgt die Internalisation durch rezeptorvermittelte Endozytose (2a). TeNT wird

anschließend retrograd axonal transportiert (2b), während BoNT im Motoneuron verbleibt. 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).

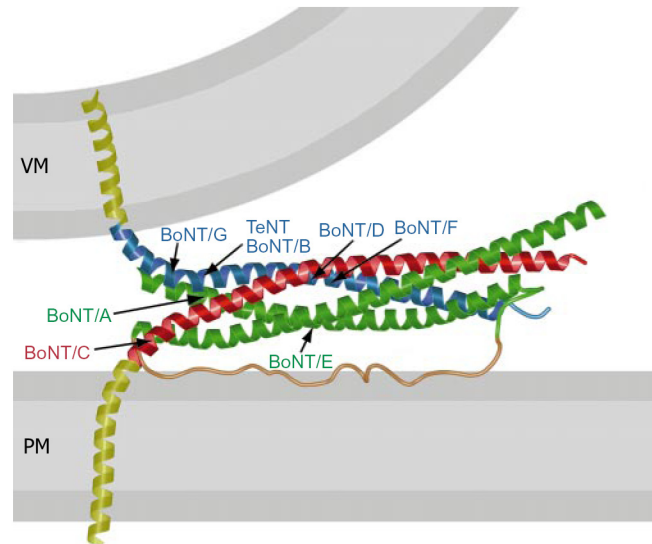


**Abbildung 5: Wirkmechanismus der clostridiellen Neurotoxine TeNT und BoNT.** Nach neurospezifischer Bindung (1) und rezeptorvermittelter Endozytose (2a) trennen sich die Wege von BoNT und TeNT vermutlich am *early sorting endosome*. Während BoNT im Motoneuron verbleibt, gelangt TeNT durch retrograd axonalen Transport (2b) und Transzytose zu einem inhibitorischen Interneuron. Nach seiner Endozytose ist der weitere Wirkmechanismus von BoNT und TeNT in beiden Neuronen exakt der gleiche: Translokation der LC (3) und Entfaltung ihrer enzymatischen Aktivität (4).

### 1.2.2.1 Enzymatische Aktivität

Ist die leichte Kette in das Zytosol des Neurons gelangt, hydrolysiert sie spezifisch ihr Substrat. Die verschiedenen Substrate der CNT gehören alle zur Familie der SNARE-Proteine (SNAREs, *soluble NSF attachment protein receptors*), die essentiell für die Exozytose synaptischer Vesikel und damit für die Ausschüttung der Neurotransmitter an den Synapsen sind (Jahn & Scheller, 2006). Zu den SNAREs gehören Syntaxin 1A, ein Transmembranprotein der präsynaptischen Membran, SNAP-25 (*synaptosome associated protein of 25 kDa*), ein membranassoziiertes Protein der präsynaptischen Membran und VAMP 2 (*vesicle associated membrane protein*, auch: Synaptobrevin 2), ein Transmembranprotein, das in der Membran synaptischer Vesikel zu finden ist. Zur Fusion eines synaptischen Vesikels mit der präsynaptischen Membran muss sich ein so genannter

trans-SNARE-Komplex aus dem VAMP 2 der Vesikelmembran und den SNARE-Proteinen der präsynaptischen Membran (SNAP-25 und Syntaxin) bilden. Dieser Komplex entsteht durch die Zusammenlagerung von vier  $\alpha$ -helicalen Abschnitten der SNARE-Proteine zu einer so genannten *coiled coil* Struktur (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Der trans-SNARE-Komplex und seine Bestandteile VAMP 2 (blau), Syntaxin (rot) und SNAP-25 (grün). Die Zusammenlagerung von vier  $\alpha$ -helicalen Abschnitten der SNARE-Proteine führt zur Ausbildung einer *coiled coil* Struktur. Eingezeichnet sind die Spaltstellen der leichten Ketten der verschiedenen CNT. VM, Vesikelmembran; PM, Plasmamembran (aus Sutton *et al.*, 1998).**

Das Eintreffen eines Aktionspotentials führt zur Depolarisation der Präsynapse und zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Plasmamembran. Der Einstrom von Calcium in die Zelle löst schließlich die Umlagerung vom trans-SNARE-Komplex zum cis-SNARE-Komplex aus, was zur Fusion des synaptischen Vesikels mit der präsynaptischen Membran führt (Weber *et al.*, 1998). Als Folge der Fusion sind alle SNAREs in derselben Membran verankert (deshalb cis-SNARE-Komplex), während VAMP 2 zuvor in der Vesikelmembran lokalisiert war. Der cis-SNARE-Komplex ist thermisch außergewöhnlich stabil und, im Gegensatz zum trans-SNARE-Komplex, SDS- und proteaseresistent (Hayashi *et al.*, 1994). Es wird vermutet, dass die bei der Entstehung des stabilen cis-SNARE-Komplexes freiwerdende Energie die Fusion der Membranen antreibt. Hydrolyse nur eines der SNARE-Proteine (Tabelle 1) führt dazu, dass der trans-SNARE-Komplex nicht mehr korrekt gebildet wird. Als Folge davon ist die Fusion der synaptischen Vesikel mit der

präsynaptischen Membran blockiert und somit die Reizweiterleitung an der Synapse unterbrochen (Hayashi *et al.*, 1994; Jahn *et al.*, 2003).

Die leichten Ketten von BoNT/A, C und E hydrolysieren SNAP-25, während die von BoNT/B, D, F, G und TeNT VAMP 2 spalten. Mit Syntaxin ist die leichte Kette von BoNT/C als einzige in der Lage ein zweites Substrat zu hydrolysieren. Mit Ausnahme der leichten Ketten von BoNT/B und TeNT, die VAMP 2 an der exakt gleichen Peptidbindung spalten, besitzen alle anderen leichten Ketten eigene Spaltstellen (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Die Spaltstellen der verschiedenen Substrate der clostridiellen Neurotoxine. VAMP, vesicle-associated membrane protein; SNAP-25, synaptosome-associated 25kDa protein (aus Schiavo *et al.*, 2000).**

<b>Substrate der clostridiellen Neurotoxine</b>		
<b>CNT</b>	<b>Substrat</b>	<b>Spaltstelle (~)</b>
BoNT/A	SNAP-25	Glu-Ala-Asn-Gln <sup>197</sup> ~Arg-Ala-Thr-Lys
BoNT/B	VAMP 2	Gly-Ala-Ser-Gln <sup>76</sup> ~Phe-Glu-Thr-Ser
BoNT/C	Syntaxin 1A	Asp-Thr-Lys-Lys <sup>253</sup> ~Ala-Val-Lys-Phe
BoNT/C	SNAP-25	Ala-Asn-Gln-Arg <sup>198</sup> ~Ala-Thr-Lys-Met
BoNT/D	VAMP 2	Arg-Asp-Gln-Lys <sup>59</sup> ~Leu-Ser-Glu-Leu
BoNT/E	SNAP-25	Gln-Ile-Asp-Arg <sup>180</sup> ~Ile-Met-Glu-Lys
BoNT/F	VAMP 2	Glu-Arg-Asp-Gln <sup>58</sup> ~Lys-Leu-Ser-Glu
BoNT/G	VAMP 2	Glu-Thr-Ser-Ala <sup>81</sup> ~Ala-Lys-Leu-Lys
TeNT	VAMP 2	Gly-Ala-Ser-Gln <sup>76</sup> ~Phe-Glu-Thr-Ser

### 1.2.2.2 Translokation

Bevor die leichte Kette mit ihrem Substrat zusammentreffen kann, muss sie in das Zytosol des Motoneurons gelangen. Dazu muss sie die hydrophobe Membran des Endosoms überwinden. Dieser als Translokation bezeichnete Prozess zählt neben dem retrograd axonalen Transport von TeNT (Kap. 1.2.2.4) zu den am wenigsten verstandenen Mechanismen des Intoxikationsprozesses der CNT. Allgemein anerkannt ist, dass die CNT nach ihrer Endozytose endosomale Kompartimente mit niedrigem pH-Wert (Abbildung 5, spätes Endosom) passieren und dort durch das saure Milieu ihre Konformation ändern (Montecucco *et al.*, 1989). Das führt wahrscheinlich dazu, dass die schwere Kette (HC) einen Kanal (HC-Kanal) in der Vesikelmembran bilden kann, durch den die leichte Kette (LC) in das Zytosol des Neurons gelangt. Für BoNT/A konnten die chemischen und strukturellen Voraussetzungen für diesen Vorgang genauer aufgeklärt werden (Koriazova & Montal, 2003; Neale, 2003). Demnach besitzt der HC-Kanal einen Durchmesser von ca. 15 Å. Die globuläre

LC (55 Å x 55 Å x 62 Å) muss sich also vor dem Transport durch den Kanal teilweise entfalten, was vermutlich durch den niedrigen pH-Wert ausgelöst wird (Li & Singh, 2000). Anschließend sorgt der HC-Kanal sowohl für den Transport der LC durch die Membran, als auch für die korrekte Zurückfaltung der LC in ihre native Konformation (Chaperon). Dem N-terminalen unstrukturierten Bereich der HC, der sich wie ein Gürtel um die LC schlingt (Kap. 1.2.1) kommt dabei möglicherweise eine besondere Bedeutung bei diesem Vorgang zu. Man nimmt an, dass dieser Proteinabschnitt als molekulares Chaperon funktioniert, indem er als Pseudosubstrat an die LC bindet und so als Gerüst für eine korrekte Zurückfaltung der LC nach ihrer Translokation dient (Brunger *et al.*, 2007). Am Ende des Translokationsvorganges sorgt das reduzierende Milieu im Zytosol schließlich dafür, dass die Disulfidbrücke zwischen HC und LC reduziert und die LC in das Zytosol freigesetzt wird.

### 1.2.2.3 Neurospezifische Bindung und Internalisation

Voraussetzung für die Aufnahme der CNT durch rezeptorvermittelte Endozytose und die Translokation der leichten Kette in das Zytosol ist die Bindung der Neurotoxine an die präsynaptische Membran der Zielzelle (Schiavo *et al.*, 2000; Lalli *et al.*, 1999). Diese absolut neurospezifische Bindung wird durch das H<sub>C</sub>-Fragment der CNT vermittelt.

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Polysialylganglioside, eine Klasse komplexer Glykosphingolipide, die im äußeren Blatt neuronaler Membranen zu finden sind, an der neurospezifischen Bindung der CNT beteiligt sind (Halpern & Loftus, 1993). So verhindert zum Beispiel die Vorbehandlung von neuronalen Membranen mit Neuraminidase<sup>4</sup> die Aufnahme und damit die toxische Wirkung der CNT (Montecucco, 1986). Außerdem sind Mäuse, die keine komplexen Ganglioside bilden können, nahezu resistent gegen BoNT/A, B, E und TeNT (Kitamura *et al.*, 1999, Bullens *et al.*, 2002, Dong *et al.*, 2007). BoNT und TeNT binden besonders die Ganglioside GD1b, GD1a, GT1b und GQ1b (Halpern & Neale, 1995, Abbildung 7).

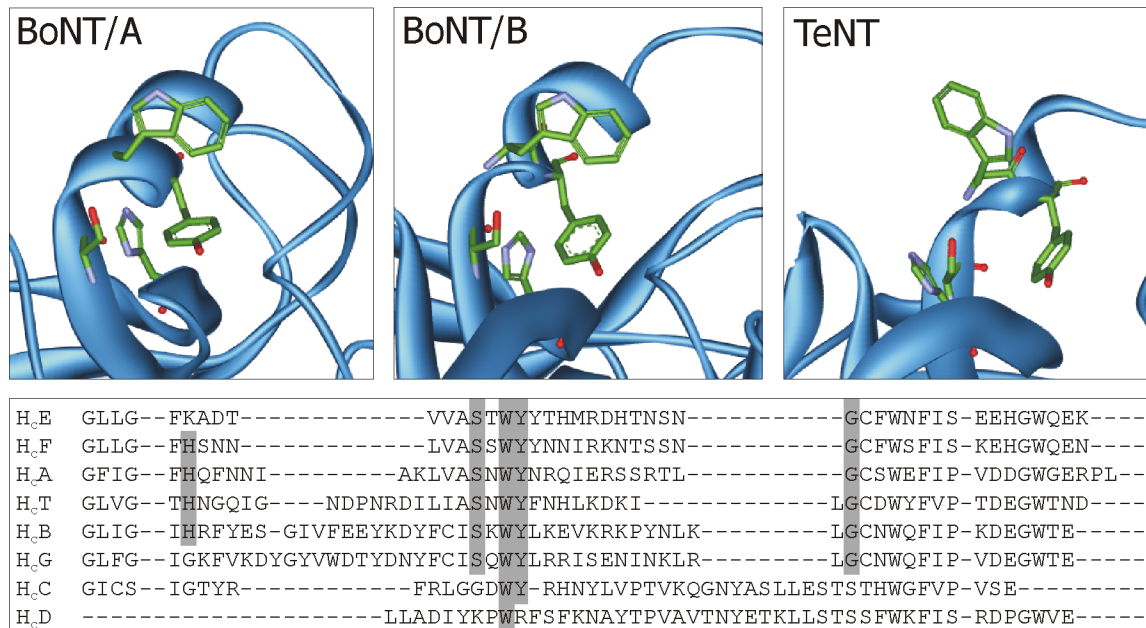
---

<sup>4</sup> Neuraminidase ist ein Enzym, das Sialinreste von Polysialylgangliosiden abspaltet.

Gal-Glc-Cer <b>LacCer</b>	Gal-Glc-Cer SA <b>GM3</b>	Gal-Glc-Cer SA SA <b>GD3</b>	Gal-Glc-Cer SA SA SA <b>GT3</b>
GalNAc-Gal-Glc-Cer <b>GA2</b>	GalNAc-Gal-Glc-Cer SA <b>GM2</b>	GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA <b>GD2</b>	GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA SA <b>GT2</b>
Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer <b>GA1</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA <b>GM1</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA <b>GD1b</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA SA <b>GT1c</b>
Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA <b>GM1b</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA <b>GD1a</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA SA <b>GT1b</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA SA SA <b>GQ1c</b>
Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA <b>GD1</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA <b>GT1a</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA SA <b>GQ1b</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer SA SA SA SA <b>GP1c</b>
<b>Asialoserie</b>	<b>a-Serie</b>	<b>b-Serie</b>	<b>c-Serie</b>

**Abbildung 7: Schematische Darstellung der (Polysialyl-)ganglioside.** Ganglioside bestehen aus einem Ceramid (ein Fettsäureamid des Sphingosins) und verschiedenen Zuckerresten. Die verschiedenen Formen der Ganglioside bauen hierarchisch aufeinander auf und unterscheiden sich in der Länge der Grundkette und Anzahl und Position anhängender Sialinsäuren. Die Ganglioside mit der höchsten Affinität zu den BoNT sind rot gekennzeichnet. Abkürzungen: Cer, Ceramid; Glc, Glukose; Gal, Galaktose; GalNAc, N-Acetylgalaktosamin; SA, Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure).

Durch Co-Kristallisation des H<sub>C</sub>-Fragments von TeNT mit verschiedenen Zuckerresten konnten vier unterschiedliche Bindungstaschen für Zuckerstrukturen identifiziert werden, die alle innerhalb der H<sub>CC</sub>-Domäne liegen (Emsley *et al.*, 2000; Abbildung 8). Zwei der Bindungstaschen können Ganglioside binden (Fotinou *et al.*, 2001) und sind für den Intoxikationsprozess essentiell (Rummel *et al.*, 2003). Die H<sub>CC</sub>-Domäne der BoNT enthält dagegen nur eine dieser beiden Bindungstaschen (Rummel *et al.*, 2004; Abbildung 8). Obwohl sich die Aminosäuresequenzen der H<sub>CC</sub>-Domänen von TeNT, BoNT/A und BoNT/B relativ stark unterscheiden (Abbildung 4), wird die Gangliosidbindungstasche in fast allen Serotypen durch das konservierte Aminosäuresequenzmotiv H...SxWY...G gebildet (Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000; Louch *et al.*, 2002; Rummel *et al.*, 2003).



**Abbildung 8: Obere Tafel: Die Strukturen der Gangliosid-Bindungstaschen von BoNT/A, BoNT/B und TeNT. Einige der mit Zuckerresten interagierenden Aminosäuren, wie beispielsweise das konservierte Tryptophan, das hydrophobe Wechselwirkungen mit Zuckerresten eingehen kann und das Tyrosin, das polare Wechselwirkungen ausbildet, sind im Detail gezeigt. Untere Tafel: Alignment der C-Termini der H<sub>C</sub>-Fragmente. In vier von acht H<sub>C</sub>-Fragmenten kommt das H...SxWY...G Motiv in unveränderter Form vor. Das Histidin kann gegen Lysin oder Glycin ersetzt sein (H<sub>C</sub>E, H<sub>C</sub>G, H<sub>C</sub>C). In H<sub>C</sub>C ist zusätzlich das Serin mit Glycin vertauscht. H<sub>C</sub>D enthält kein entsprechendes Aminosäuremotiv zur Bindung von Gangliosiden. Gegenwärtig ist nicht bekannt, ob BoNT/D an Ganglioside binden kann.**

TeNT, BoNT/A, B, C, E und F zeigen in Bindungsversuchen mit immobilisierten Polysialylgangliosiden Affinitäten im hohen nM Bereich, während die Bindung der CNT an neuronale Membranen mit deutlich höherer Affinität erfolgt ( $K_D = 1.2$  nM; Halpern & Neale, 1995). Diese und andere Entdeckungen, wie die proteasesensitive Bindung von TeNT an präsynaptische Membranen (Pierce *et al.*, 1986), führten zu der Annahme, dass es neben den Gangliosiden einen zusätzlichen Proteinrezeptor gibt (Montecucco, 1986). Ein spezifischer Proteinrezeptor für die einzelnen CNT könnte neben den verschiedenen Bindungsaffinitäten an Ganglioside und neuronale Membranen auch den unterschiedlichen Wirkort von BoNT und TeNT erklären (Kap. 1.2.2.4). Für den Bindungsmechanismus hat sich seither ein Zwei-Rezeptor-Modell durchgesetzt: Die Toxinmoleküle binden demnach zunächst mit geringer Affinität an Polysialylganglioside, die in den *lipid rafts* angereichert sind (Herreros *et al.*, 2001). Auf diese Weise werden die Toxinmoleküle aus dem dreidimensionalen Raum der extrazellulären Matrix auf die zweidimensionale Ebene der Zellmembran konzentriert, was die Wahrscheinlichkeit einer Begegnung zwischen Proteinrezeptor und Neurotoxin drastisch erhöht. Nach der Bindung des in sehr viel geringerer Konzentration vorliegenden Proteinrezeptors kommt es schließlich zur rezeptorvermittelten Endozytose der CNT.

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden als mögliche Proteinrezeptoren für TeNT GPI-verankerte glykosylierte Proteine der Plasmamembran diskutiert (Herreros *et al.*, 2000). Außerdem gab es Hinweise darauf, dass sowohl die Wechselwirkung mit dem Gangliosid als auch die mit dem Proteinrezeptor in der H<sub>CC</sub>-Domäne des TeNT stattfindet (Herreros *et al.*, 2000). Die Ergebnisse zahlreicher Arbeiten deuteten darauf hin, dass Synaptotagmin I und II (Syt I und II) die Proteinrezeptoren für BoNT/B darstellen (Nishiki *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2003). Die Frage, ob Synaptotagmin auch für BoNT/A und E als Rezeptor fungieren kann, wurde bislang nur widersprüchlich beantwortet (Li & Singh, 1998; Dong *et al.*, 2003). Für alle verbleibenden Serotypen der CNT lagen zu dieser Zeit noch keine Erkenntnisse in Bezug auf ihre spezifischen Proteinrezeptoren vor. Da einige der BoNT aktivitätsabhängig in neuronale Zellen aufgenommen werden (Hughes & Whaler, 1962; Black & Dolly, 1986; Dong *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2004), wurde vermutet, dass spezifische Proteinrezeptoren der CNT in der Membran synaptischer Vesikel zu finden sind. Neue Erkenntnisse, die aus den experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation gewonnen wurden, sowie Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen aus dem Bereich spezifischer Proteinrezeptoren, werden im Ergebnissteil (Kap. 3) bzw. in der Diskussion (Kap. 4) detailliert beschrieben.

#### **1.2.2.4 Retrograd axonaler Transport**

Während die BoNT ihre Wirkung direkt am Ort ihrer Aufnahme in den Motoneuronen entfalten, wird TeNT nach seiner Endozytose zunächst retrograd axonal transportiert, bevor es schließlich in ein inhibitorisches Interneuron gelangt. Dort angekommen, ist der molekulare Wirkmechanismus exakt der gleiche wie bei den BoNT im Motoneuron. Welche strukturellen Eigenschaften von TeNT und BoNT die Präferenz für die verschiedenen Transportwege innerhalb des Motoneurons bestimmen, ist gegenwärtig nicht bekannt. Möglicherweise ist der spezifische (Protein-)Rezeptor, mit dem das jeweilige CNT in Wechselwirkung tritt, verantwortlich für die Wahl des Transportweges innerhalb des Neurons. Dementsprechend konnte schon vor einigen Jahren gezeigt werden, dass das isolierte H<sub>C</sub>-Fragment von TeNT (TeNT H<sub>C</sub>) retrograd axonal transportiert wird (Fishman & Carrigan, 1987; Sinha *et al.*, 2000; Lalli & Schiavo, 2002). Einige experimentelle Daten deuten inzwischen sogar darauf hin, dass bereits die H<sub>CC</sub>-Domäne (Abbildung 3) allein alle strukturellen Eigenschaften besitzt, um zu einem inhibitorischen Interneuron transportiert zu werden (Rummel *et al.*, 2001).



Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem TeNT H<sub>C</sub> (Lalli & Schiavo, 2002) ergaben weiterhin, dass TeNT Myosin-V-abhängig (Lalli *et al.*, 2003) in Vesikeln unterschiedlicher Morphologie und unterschiedlicher Geschwindigkeit (1,0-2,1  $\mu\text{m s}^{-1}$ ) transportiert wird. Kolokalisationsuntersuchungen zeigten ferner, dass der Transport von TeNT H<sub>C</sub> zusammen mit dem Neurotrophin-Rezeptor p75<sup>NTR</sup> erfolgt (Lalli & Schiavo, 2002), der NGF (*nerve growth factor*) von der Synapse zum Zellkörper bringt.

### 1.3 Clostridielle Neurotoxine in Medizin und Forschung

Die clostridiellen Neurotoxine (CNT) binden mit außerordentlich hoher Spezifität an die Motoneurone der neuromuskulären Endplatten. Sie blockieren mit hoher Effizienz die Freisetzung von Neurotransmittern durch Inhibierung der neuronalen Exozytose. Diese Eigenschaft machte die CNT in den 1990er Jahren zu einem wichtigen Werkzeug zellbiologischer Forschung und zu einem wirksamen Medikament zur Behandlung neuromuskulärer Erkrankungen. Ihre außerordentliche Toxizität führte allerdings auch zu Überlegungen, die CNT als Mittel zur biologischen Kriegsführung und bei Terroranschlägen einzusetzen.

Die Aufklärung der konstitutiven und regulierten Exozytose (wie z.B. der Neurotransmitterfreisetzung) auf molekularer Ebene erforderte in den 1990er Jahren die Identifizierung der an diesen Prozessen beteiligten Proteine und Proteinkomplexe. Durch Homologievergleiche zwischen Hefen und Säugern, aber auch durch funktionelle Assays und Charakterisierung der Proteine synaptischer Vesikel konnten schließlich Proteine (SNAREs) beschrieben werden, die an der konstitutiven oder regulierten Exozytose beteiligt sind. Aber besonders durch die Identifizierung der SNARE-Proteine als spezifische Substrate der CNT gelang schließlich der Beweis, dass die identifizierten Proteine *in vivo* an der Exozytose beteiligt sind (Sollner & Rothman, 1994).

Wie die vorliegende Dissertation beschäftigt sich die Forschung rund um clostridielle Neurotoxine heute insbesondere mit der Identifizierung der Rezeptormoleküle auf der Oberfläche von Zielzellen und den zugrunde liegenden Aufnahmemechanismen. Ein umfassendes Verständnis der Aufnahmemechanismen der CNT und anderer Proteintoxine auf molekularer Ebene wird Wissenschaftler und Mediziner möglicherweise eines Tages in die Lage versetzen, die Exozytose beliebiger (Nerven-)Zellen mit modifizierten CNT

beeinflussen zu können. Es wird außerdem versucht, die Wirksamkeit der CNT durch gezielte Mutagenese zu verbessern, was dazu führen würde, dass zur Behandlung von neuromuskulären Erkrankungen geringere Gesamtproteinmengen eingesetzt werden könnten. Geringere Proteinmengen würden wiederum das Risiko der Bildung neutralisierender Antikörper reduzieren, die einer Fortsetzung der Behandlung mit CNT entgegenstehen würden.

BoNT/A nimmt unter den BoNT eine besondere Rolle ein, weil es als erstes entdeckt wurde und für die weitaus meisten Fälle von Botulismus beim Menschen verantwortlich ist. Es ist weiterhin das erste Proteintoxin, das von der *USA Federal Drug Administration* (FDA) als Medikament zugelassen wurde. Der Amerikaner Alan Scott experimentierte in den 1970er Jahren mit minimalen Dosen von BoNT/A an Primaten und konnte schließlich zeigen, dass kontrollierte Injektionen in hyperaktive Muskeln zu einer lokalen, mehrere Monate andauernden Entspannung ohne Nebenwirkungen führten. 1989 wurde BoNT/A schließlich unter dem Markennamen Oculinum als Medikament zur Behandlung von Lidspasmen (Blepharospasmen) und Schielen (Strabismus) von der FDA zugelassen. Heute wird BoNT/A unter verschiedenen Markennamen und in verschiedenen Formulierungen hergestellt. Die Firmen Allergan und Ipsen verkaufen das aus Clostridien aufgereinigte native Progenitortoxin unter den Markennamen BOTOX bzw. DYSPORT, während die Merz Pharma GmbH das reine Neurotoxin unter der Bezeichnung XEOMIN vertreibt. Auch BoNT/B wird inzwischen als Medikament eingesetzt und unter der Bezeichnung MYOBLOCK von der Firma Solstice hergestellt. Die Liste der Indikationen ist in den letzten Jahren rasant gewachsen und umfasst heute Dystonien, wie den chronischen Schiefhals (Torticollis) oder Lidspasmen (Blepharospasmus) genauso wie übermäßiges Schwitzen (Hyperhidrose) und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Ein Nebeneffekt der Anwendung von BoNT/A am Auge ist das vorübergehende Verschwinden von Falten, was dazu führte, dass BoNT/A heute routinemäßig für kosmetische Zwecke eingesetzt wird. Das Aufkommen sogenannter BOTOX-Partys in den letzten Jahren ist die Grundlage für die große Bekanntheit von BOTOX und seine Anwendung in der Kosmetik (Turton *et al.*, 2002, Davletov *et al.*, 2005).

Die besondere Toxizität der BoNT führte auch zu Versuchen, diese als Mittel zur biologischen Kriegsführung einzusetzen (Arnon *et al.*, 2001; Bigalke & Rummel, 2005). Dabei wurde BoNT/A als Aerosol fein verteilt, was aber aus verschiedenen technischen Gründen nicht zu einer massenhaften Erkrankung von Menschen geführt hat. Trotzdem hat

zum Beispiel die Regierung der USA Studien in Auftrag gegeben, die die Risiken einer Verbreitung von BoNT/A über die Luft oder durch Kontamination der Milch- oder Wasserversorgung in terroristischer Absicht bewerten und Möglichkeiten der Vorbereitung und Reaktion auf solche Anschläge aufzeigen sollen (Arnon *et al.*, 2001).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeiten mit DNA

#### 2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR; Saiki *et al.*, 1988) können bestimmte Abschnitte einer DNA-Matrize (engl. *template-DNA*) spezifisch und *in vitro* amplifiziert und verändert (mutiert) werden. Eine PCR lässt sich in verschiedene Schritte unterteilen: Zunächst wird die Template-DNA hitzedenaturiert, wobei der DNA-Doppelstrang in seine beiden Einzelstränge zerfällt. Danach binden Oligonukleotide (engl. *primer*) an die Einzelstränge (engl. *annealing*) und bilden so kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte, die der Polymerase als Startpunkte für die Polymerisation der komplementären DNA-Stränge dienen. Die Polymerisation benötigt Desoxynukleotide und verläuft vom 5'- zum 3'-Ende. Nach der Synthesephase werden die entstandenen DNA-Doppelstränge hitzedenaturiert, so dass die Primer erneut binden und die Reaktion von vorne ablaufen kann. 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 PCR wird rekombinante *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab) verwendet. Dieses Enzym besitzt neben einer 5' → 3' Polymeraseaktivität auch eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität, die zu einer geringen Fehlerrate ( $2 \times 10^{-6}$ ) der Reaktion beiträgt. Ein typischer Reaktionsansatz für eine PCR hat folgende Zusammensetzung:

<b>PCR-Ansatz</b>	
1,0 µl	Template-DNA ( $\approx 200 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ )
1,5 µl	5'-Primer ( <i>forward primer</i> ; $25 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ )
1,5 µl	3'-Primer ( <i>reverse primer</i> ; $25 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ )
2,5 µl	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase ( $1,0 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ )
1,0 µl	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; jeweils 10 mM)
5,0 µl	10x <i>Pwo</i> -Polymerase-Puffer (Peqlab)
37,5 µl	HPLC-Wasser (J. T. Baker)
50,0 µl	Σ

Der Reaktionsansatz wird in einem dünnwandigen Reaktionsgefäß in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Personal Cycler oder T Gradient, Biometra) den für die verschiedenen Stufen der PCR notwendigen Temperaturen ausgesetzt. Ein typisches Temperaturprogramm besteht aus den folgenden Schritten:

<b>PCR-Temperaturprogramm</b>			
<b>Schritt</b>	<b>Zeit [min:sec]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Beschreibung</b>
1	2:00	94	Denaturierung
2	1:00	94	Denaturierung
3	2:00	55	Annealing der Primer
4	2:30	72	Polymerisation
5	10:00	72	Polymerisation unfertiger Stränge
6	∞	4	Kühlung bis zur Aufarbeitung

Die Schritte 2 bis 4 werden 34 Mal wiederholt. Nach Abschluss des Temperaturprogramms wird das Reaktionsgemisch bis zur Aufarbeitung bei 4°C gekühlt (Schritt 6). Die synthetisierte DNA wird gereinigt und analysiert (Kap. 2.1.5).

### 2.1.2 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Nukleotiden in beiden Strängen eines DNA-Doppelstrangs, wodurch die DNA gespalten wird. Besonders wertvoll für die Gentechnologie sind die Typ-II-Restriktionsendonukleasen. Sie spalten DNA spezifisch innerhalb einer für das Enzym charakteristischen Erkennungssequenz. Die Namen und Bezeichnungen der Typ-II-Restriktionsendonukleasen basieren auf dem jeweiligen Herkunftsorganismus. *Eco* RI wurde beispielsweise aus *Escherichia coli* isoliert, während *Bam* HI in *Bacillus amyloliquefaciens* gefunden wurde. Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen erzeugen an den Spaltstellen charakteristische Enden, die entweder keinen (engl. *blunt ends*) oder einen 3'- bzw. 5'-Überhang (engl. *sticky ends*) besitzen. Enden, die durch die Reaktion des gleichen Enzyms entstanden sind, können sich während einer Ligationsreaktion (Kap. 2.1.6) wieder verbinden. Auf diese Weise ist das Klonieren eines DNA-Fragments (engl. *insert*) in einen Vektor möglich.

Die Restriktionsspaltung kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden. Im analytischen Fall wird eine geringe Menge DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut und die entstehenden Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.1.4) analysiert. Aus den gefundenen Fragmentgrößen lässt sich auf die Identität der analysierten DNA schließen. Im präparativen Fall wird eine größere Menge an DNA, beispielweise aus einer PCR (Kap. 2.1.1), mit Restriktionsendonukleasen verdaut,

um DNA-Fragmente mit definierten Enden zu erhalten. Typische analytische oder präparative Restriktionsansätze haben die folgende Zusammensetzung:

<b>Analytischer Ansatz</b>	<b>Präparativer Ansatz</b>
4,8 µl DNA ( $\approx 200 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ )	43,0 µl
2,0 µl 10x Reaktionspuffer	5,0 µl
0,3 µl Restriktionsendonuklease	1,5 µl
12,9 µl HPLC-Wasser (J. T. Baker)	-
20,0 µl $\Sigma$	50,0 µl

Restriktionsendonukleasen entfalten ihre volle Aktivität nur unter charakteristischen Pufferbedingungen. Die verschiedenen Enzyme werden daher vom jeweiligen Hersteller mit eigenen 10x Reaktionspuffern ausgeliefert, die für die Reaktionen der Enzyme eingesetzt werden. Die Inkubation erfolgt bei einer für das Enzym optimalen Temperatur (i.d.R. 37°C) für 1 h und 30 min.

Zur Isolation oder Analyse der entstanden Spaltprodukte wird nach einer Restriktionsspaltung eine Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.1.4) durchgeführt. Im präparativen Fall werden die gewünschten DNA-Banden über einer UV-Lampe (NU-4 KL, Roth) sichtbar gemacht, mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA gemäß dem *QIAquick Spin Handbook* (Qiagen, 1997) unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) aus dem Gel isoliert und gereinigt.

### 2.1.3 Dephosphorylierung

Nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (Kap. 2.1.2) verbleiben an den 5'-Enden der Spaltprodukte freie Phosphatgruppen und an den 3'-Enden freie Hydroxylgruppen. Solche Enden können von DNA-Ligasen wieder zu einem Strang verknüpft werden (Kap. 2.1.6). Um aber Inserts mit hoher Effizienz in einen Vektor klonieren zu können, muss eine Ligation des Vektors ohne Insert verhindert werden. Zu diesem Zweck wird ein linearisierter Vektor mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, besonders wenn er nur mit einem einzelnen Enzym verdaut wurde. Bei dieser Reaktion werden die freien 5'-Phosphatgruppen entfernt, wodurch eine Ligation des Vektors ohne Insert verhindert wird.

Alkalische Phosphatase aus Shrimp (engl. *shrimp alkaline phosphatase*; SAP; 1,0 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ; Boehringer Mannheim) stellt weit weniger Anforderungen an die Pufferbedingungen als die Restriktionsendonukleasen. Die Dephosphorylierung eines Vektors kann daher sofort im Anschluss an eine präparative Restriktionsspaltung erfolgen. Dazu wird 1,0  $\mu\text{l}$  SAP direkt in den Restriktionsansatz gegeben und das Reaktionsgemisch bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wird dem Ansatz abermals 1,0  $\mu\text{l}$  SAP hinzugefügt. Nach weiteren 30 min Inkubation wird die SAP durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 65°C für 15 min inaktiviert. Die DNA wird nach der Dephosphorylierung durch Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.1.4) gereinigt. Bereits aufgereinigte DNA kann nachträglich dephosphoryliert werden. Ein typischer Ansatz zur Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors hat folgende Zusammensetzung:

<b>Dephosphorylierungsansatz</b>
40,0 $\mu\text{l}$ DNA ( $\approx 200 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ )
4,7 $\mu\text{l}$ 10x SAP-Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim)
1,0 $\mu\text{l}$ SAP
1,0 $\mu\text{l}$ SAP (nach 30 min)

#### 2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Da DNA negativ geladene Phosphatgruppen enthält, wandert sie in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die Mobilität der DNA hängt dabei neben der Dichte des Mediums, in dem sich die DNA bewegt, auch von der Molekülgröße der DNA ab. Die Konformation der DNA-Moleküle (engl. *supercoiled*, *nicked circle*, *concatamere*) nimmt ebenfalls Einfluss auf ihre Mobilität. Besonders gut geeignet für die Identifizierung, Trennung und Reinigung von DNA- und RNA-Fragmenten sind Agarosegele. Für analytische und präparative Zwecke werden in dieser Arbeit für DNA 1%ige und für RNA 2%ige Gele benutzt. Den Agarosegelen wird Ethidiumbromid (Boehringer Mannheim; 8  $\mu\text{g}$  pro 25 ml Gel) zugesetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Ethidiumbromid ist ein Fluorophor mit einem ausgedehnten, planaren und aromatischen Ringsystem, der zwischen die Basen der DNA interkalieren kann. Durch die Wechselwirkung mit den aromatischen Ringen der Basen verstärkt sich die Fluoreszenzintensität des Ethidiumbromids, so dass die Färbung der DNA auch in Gegenwart des freien Ethidiumbromids im Gel gut zu erkennen ist.

Auf jedes Gel wird zusätzlich zu den eigentlichen Proben immer auch ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen ( $\lambda$ -Marker; eigene Herstellung). Dieser Standard

enthält DNA-Fragmente bekannter Größe in bekannter Menge und ermöglicht so die Bestimmung der Molekülgröße unbekannter DNA-Fragmente durch Vergleich der Laufstrecke im Gel und die Abschätzung der Molekülmenge durch Vergleich der Bandenintensität.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose (Agarose MEE0, Roth) durch kurzes Aufkochen in TAE-Laufpuffer in der Mikrowelle gelöst und anschließend die entsprechende Menge Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Lösung wird in ein horizontales Gelbett (Eigenbau bzw. Easy Cast Electrophoresis System, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH) gegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Um ein Absinken der Proben in die Taschen des Gels zu gewährleisten, werden die Proben mit einem Fünftel ihres Volumens an Auftragspuffer versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Je nach Gelbett wird die Elektrophorese für die ersten 5 min bei 45 V (65 V), anschließend für 40 min bei 65 V (85 V) (Power Pac 3000, Biorad) durchgeführt. Die fertigen Agarosegele werden in einem Photodokumentationssystem (Digit Store Duo, Intas) fotografiert.

<b><math>\lambda</math>-Molekulargewichtsstandard</b>	
200,0 $\mu\text{l}$	$\lambda$ -Phage DNA (0,25 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ )
40,0 $\mu\text{l}$	10x Reaktionspuffer R <sup>+</sup> (Fermentas)
7,5 $\mu\text{l}$	<i>Hind</i> III (Fermentas)
4,0 $\mu\text{l}$	<i>EcoR</i> I (Biolabs)
148,5 $\mu\text{l}$	HPLC-Wasser (J. T. Baker)
400,0 $\mu\text{l}$	$\Sigma$

<b>TAE-Laufpuffer</b>	<b>Auftragspuffer (6x)</b>
40 mM Tris	0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,11% (v/v) Essigsäure	0,25% (w/v) Xylencyanol FF
1 mM EDTA	30% (w/v) Glycerin

### 2.1.5 Reinigung von PCR-Produkten

Nach Beendigung der PCR (Kap. 2.1.1) enthält das Reaktionsgemisch neben unverbrauchten Desoxynukleotiden und Primern auch noch aktive *Pwo*-Polymerase. Damit die Polymerase nicht die durch Restriktionsendonukleasen in einer folgenden Restriktionsspaltung (Kap. 2.1.2) erzeugten Überhänge wieder mit Nukleotiden zu einem glatten Ende (engl. *blunt end*) auffüllt, muss sie von der neu synthetisierten DNA getrennt werden, bevor diese weiter



verarbeitet werden kann. Die Reinigung erfolgt gemäß dem *QIAquick Spin Handbook* (Qiagen, 1997) unter Verwendung eines *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen). Das Verfahren beruht auf der selektiven Bindung von DNA an eine mit Silicagel beschichteten Membran. Die Membran bindet DNA-Fragmente mit Längen zwischen 100 bp und 10000 bp, so dass neben der Polymerase auch Desoxynukleotide und Primer aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden.

### **2.1.6 Ligation**

Durch die Aktivität des Enzyms T4-DNA-Ligase werden DNA-Fragmente mit glatten Enden oder Enden mit komplementären Überhängen (engl. *sticky ends*) wieder miteinander verknüpft. Dabei katalysiert das Enzym die Veresterung eines 5'-Phosphorsäureesters mit einer 3'-Hydroxylgruppe, wobei eine Phosphodiesterbindung gebildet wird. Wurde der Vektor zuvor mit alkalischer Phosphatase behandelt, so besitzt das neukombinierte DNA-Molekül in beiden Strängen je einen Einzelstrangbruch (engl. *nick*), da hier die Ligationsreaktion nicht stattfinden konnte. Dennoch ist ein solches Molekül stabil genug für die Transformation in eine Bakterienzelle (Kap. 2.1.7), in der Enzyme die Einzelstrangbrüche reparieren.

In einem Ligationsansatz werden 2-6 fmol des Vektors und soviel Insert eingesetzt, dass sich ein molares Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 ergibt. Parallel zu jedem Ligationsansatz wird eine Kontrolle mitgeführt, die zwar Vektor und DNA-Ligase, aber kein Insert enthält. Nach der Transformation lässt sich anhand der Kolonienzahl (Kap. 2.1.7), die aus dieser Kontrolle hervorgegangen ist, eine Aussage über das Ausmaß der Religation des Vektors treffen. Ligationsansätze werden für mindestens 2 h bei 22°C inkubiert, bevor sie in den *Escherichia coli*-Stamm TG-1 (Kap. 7.5) transformiert werden.

### **2.1.7 Transformation**

Unter physiologischen Bedingungen nehmen Bakterienzellen DNA von außen nur mit sehr geringer Effizienz auf. Die Aufnahmefähigkeit der Zellen für DNA (Kompetenz) kann allerdings durch hohe Konzentrationen zweiwertiger Kationen oder durch kurzzeitiges Anlegen hoher Spannungen (Elektroporation) verbessert werden. In dieser Arbeit werden

verschiedene Stämme des gramnegativen Bakteriums *E. coli* (Kap. 7.5) eingesetzt, die nach der Calciumchlorid-Methode (Dagert & Ehrlich, 1979) kompetent gemacht und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren wurden.

Nach dem Auftauen werden die Bakterien mit einem Ligationsansatz oder  $1\ \mu\text{l}$  einer Plasmidlösung ( $\approx 200\ \text{ng}\ \mu\text{l}^{-1}$ ) gemischt und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Nach dieser Zeit erfolgt für 5 min ein Hitzeschock bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad. Anschließend werden die Bakterien für 10 min auf Eis abgekühlt und danach mit  $300\ \mu\text{l}$  2YT-Medium versetzt und für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 1400 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können die Bakterien den durch das transformierte Plasmid vermittelten Resistenzfaktor exprimieren, bevor sie schließlich auf einer 2YT-Agarplatte, die die entsprechenden Antibiotika enthält, ausplattiert werden. Im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  wachsen die Bakterien über Nacht zu Kolonien heran.

<b>2YT-Medium (800 ml)</b>	<b>2YT-Agar (400 ml)</b>
12,8 g Pepton	6,4 g Pepton
8,0 g Hefeextrakt	4,0 g Hefeextrakt
4,0 g NaCl	2,0 g NaCl
ad 800 ml dH <sub>2</sub> O	6,0 g Agar (1,5%)
	ad 400 ml dH <sub>2</sub> O

### 2.1.8 Plasmid-Präparation

Plasmide, ringförmige und doppelsträngige DNA-Moleküle, liegen neben der chromosomalen DNA in der Bakterienzelle vor und replizieren sich unabhängig von dieser. Die Isolation von Plasmiden aus einem Bakterienlysat beruht auf den unterschiedlichen Eigenschaften von chromosomaler und Plasmid-DNA bei der Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung (Birnboim & Doly, 1979). Während Plasmid-DNA beim raschen Absenken des pH-Wertes nach einer alkalischen Lyse der Bakterien schnell renaturiert und daher in Lösung bleibt, fällt chromosomale DNA aus und bleibt an Proteinen und Zellwandbestandteilen haften, so dass sie abzentrifugiert werden kann. Zur Präparation von Plasmid-DNA kommt je nach benötigter DNA-Menge und Größe der Bakterienkultur entweder das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (5-15  $\mu\text{g}$  DNA, Qiagen) oder das *Qiagen Plasmid Midi Kit* (100  $\mu\text{g}$ , Qiagen) zum Einsatz, wobei jeweils das Protokoll des Herstellers beachtet wird (*QIAprep Miniprep Handbook* (1997), *Plasmid Purification Handbook* (2003)).

## 2.1.9 Klonierungen

Für die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation werden Fusionsproteine aus GST (Glutathion-S-Transferase) und den luminalen Abschnitten diverser Proteine aus synaptischen Vesikeln benötigt. Dazu werden die kodierenden Sequenzen dieser Abschnitte im korrekten Leserahmen (engl. *in frame*) hinter das Gen für GST kloniert, das in den Vektoren der pGEX-Serie (GE Healthcare Life Sciences) bereits enthalten ist. Zur Überexpression von Genen in eukaryontischen Zellen werden die kodierenden Sequenzen durch PCR amplifiziert und in den Vektor pCMV5 kloniert. Die Genexpression steht dabei unter der Kontrolle des humanen Cytomegalievirus (CMV) *immediate early* Promotors, was zu einer starken konstitutiven Expression der klonierten Gene führt. Plasmide zur Erzeugung stabil transfizierter knock-down Zelllinien werden mit dem BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) hergestellt. Dazu werden entsprechende pre-miRNAs in den Vektor pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen) ligiert. Plasmide zur rekombinanten Expression bzw. *in vitro* Transkription und Translation von BoNT/A, B und C bzw. diversen BoNT H<sub>C</sub>-Fragmenten werden an anderer Stelle beschrieben (Rummel *et al.*, 2004). Alle erzeugten DNA-Konstrukte werden durch Fluoreszenzsequenzierung überprüft (Sanger *et al.*, 1977). In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Plasmide und ihre Klonierung zusammengefasst.

**Tabelle 2: Übersicht über die Klonierungen der von den Tetraspaninen abgeleiteten DNA-Konstrukte. Angegeben sind der Name des jeweiligen Konstruktes, das Ausgangsplasmid bzw. PCR-Template, die verwendeten Oligonukleotide und Restriktionsendonukleasen und der eingesetzte Zielvektor. Abkürzungen: RE, Restriktionsendonukleasen; mcDNA, eine in diesem Labor hergestellte cDNA aus Mausembryonen; IRAKp961C072Q, ein vom RZPD bezogener cDNA-Klon für Synaptogyrin 1.**

Konstrukt	Template oder Ausgangsvektor	Oligonukleotide	RE	Zielvektor
pGEXSypLD1	pCMVb25-1a	5Syp-TGEL 3Syp-LQNK	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSypLD2	pCMVb25-1a	5Syp-AGGL 3Syp-VFKE	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSyoLD1	pCMV5p37.1b	5SyoSGGL 3SyoYIFF	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSyoLD2	mcDNA	5SyoKGLS 3SyoWFVF	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSyg1LD1	mcDNA	5Syg-NEGY 3Syg-ISSV	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSyg1LD2	IRAKp961C072Q	5Syg-ANQW 3Syg-VLAF	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSyg3LD1	pCMV5-SgyrIII	5Syg3EGYV 3Syg3FLLL	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSyg3LD2	pCMV5-SgyrIII	5Syg3NQWQ 3Syg3VKAL	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)

**Tabelle 3: Übersicht über die Klonierungen der von SV2 abgeleiteten DNA-Konstrukte. Angegeben sind der Name des jeweiligen Konstruktes, das Ausgangsplasmid bzw. PCR-Template, die verwendeten Oligonukleotide und Restriktionsendonukleasen und der eingesetzte Zielvektor. Abkürzungen: RE, Restriktionsendonukleasen; IRAKp961O24100Q, ein vom RZPD bezogener cDNA-Klon für SV2A.**

Konstrukt	Template oder Ausgangsvektor	Oligonukleotide	RE	Zielvektor
pGEXSV2A-468-618	IRAKp961O24100Q	5SV2aFPDM 3SV2aSALL	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSV2A-468-594	pGEXSV2A-468-618	5SV2aFPDM 3SV2aGEGA	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pCMV5-SV2A-ATG	SV2A-SK	5SV2aMEEG 3SV2aQVLG	<i>Xho</i> I <i>Xba</i> I	pCMV5 ( <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I)
pcDNA-miR-SV2A		NM_057210_101 NM_057210_2449 NM_057210_2754		pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR
pGEXSV2B-413-560	SV2B-SK	5SV2bDMIR 3SV2bALLM	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSV2B-413-535	pGEXSV2B-413-560	5SV2bDMIR 3SV2bEDND	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pCMV5-SV2B-ATG	SV2B-SK	5SV2bMDDY 3SV2bQVLM	<i>Sal</i> I <i>Xba</i> I	pCMV5 ( <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I)
pGEXSV2C-454-603	pCMV-SV2C	5SV2cFPDV 3SV2cSALL	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSV2C-454-579	pGEXSV2C-454-603	5SV2cFPDV 3SV2cDYSA	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSV2C-454-553	pGEXSV2C-454-603	5SV2cFPDV 3SV2cYKFI	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSV2C-454-528	pGEXSV2C-454-603	5SV2cFPDV 3SV2cVTSV	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSV2C-454-503	pGEXSV2C-454-603	5SV2cFPDV 3SV2cGRFL	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXSV2-C/A	pGEXSV2C-454-603 pGEXSV2A-468-594	5SV2cFPDV 3SV2cKFIN	<i>Bam</i> HI, <i>Nae</i> I, <i>Nae</i> I, <i>Aat</i> II	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Aat</i> II)
pCMV5-SV2C-ATG	pCMV-SV2C	5SV2cMEDS 3SV2cQVLM	<i>Xho</i> I <i>Xba</i> I	pCMV5 ( <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I)

**Tabelle 4: Übersicht über die Klonierungen der von Neurotransmittertransportern abgeleiteten DNA-Konstrukte. Angegeben sind der Name des jeweiligen Konstruktes, das Ausgangsplasmid bzw. PCR-Template, die verwendeten Oligonukleotide und Restriktionsendonukleasen und der eingesetzte Zielvektor. Abkürzungen: RE, Restriktionsendonukleasen; PC12 cDNA, eine in diesem Labor hergestellte cDNA aus PC12-Zellen; mcDNA, eine in diesem Labor hergestellte cDNA aus Mausembryonen.**

<b>Konstrukt</b>	<b>Template oder Ausgangsvektor</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>RE</b>	<b>Zielvektor</b>
pGEXVACHT-58-146	PC12 cDNA	5mVACHTPDYI 3rVACHTGPFI	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXVACHT-58-123	PC12 cDNA	5mVACHTPDYI 3mVACHTEDVK	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXVACHTLD1SLD4TD	PC12 cDNA	5mVACHTPDYI 3mVACHTEDVK-NS 5StrepTagIII 3StrepTagIII-NS	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I <i>Sma</i> I, <i>Age</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI)
	PC12 cDNA	5rVACHTEPTI 3rVACHTYLTV	<i>Age</i> I, <i>Eco</i> RI	
pGEXVACHTLD1SLD4	PC12 cDNA	5mVACHTPDYI 3mVACHTEDVK-NS 5StrepTagIII 3StrepTagIII-NS	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I <i>Sma</i> I, <i>Age</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI)
	PC12 cDNA	5rVACHTEPTI 3rVACHTSEWE	<i>Age</i> I, <i>Eco</i> RI	
pcDNA-miR-VACHT		NM_021712_538 NM_021712_1144 NM_021712_1691		pcDNA6.2- GW/EmGFP- miR
pGEXVIAAT-163-226	pcDNA3-mVIAAT98	5mVIAATGKIL 3mVIAATVVSG	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXVIAAT-163-209	pcDNA3-mVIAAT98	5mVIAATGKIL 3mVIAATVNVA	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXVIAAT-400-455	pcDNA3-mVIAAT98	5mVIAATAAVE 3mVIAATHFAL	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXVIAAT-400-435	pcDNA3-mVIAAT98	5mVIAATAAVE 3mVIAATELTL	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXmVATPaseA1-463-561	mcDNA	5mVATPaseA1IYND 3mVATPase A1FNHI	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXmVATPaseA1-463-539	mcDNA	5mVATPaseA1IYND 3mVATPaseA1FKMK	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXmVATPaseA1-598-654	mcDNA	5mVATPaseA1YDAH 3mVATPase A1MLLF	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXmVATPaseA1-598-636	mcDNA	5mVATPaseA1YDAH 3mVATPaseA1QKGI	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXmVATPaseA1-770-838	mcDNA	5mVATPase_A1LAGG 3mVATPaseA1KFDE	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)
pGEXmVATPaseA1-806-838	mcDNA	5mVATPaseA1LHWV 3mVATPaseA1KFDE	<i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I	pGEX-4T-3 ( <i>Bam</i> HI, <i>Sma</i> I)

### 2.1.10 Sequenzierung

Die Identität der klonierten DNA-Konstrukte wird außer durch analytische Restriktionsspaltungen auch durch Fluoreszenzsequenzierung überprüft. Dabei kommt der ABI 310-*Sequencer* (Applied Biosystems) und das zugehörige BigDye™ *Terminator Cycle*

*Sequencing Ready Reactions Kit* zum Einsatz. Das Verfahren ist eine Abwandlung der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Anstatt radioaktiv markierter 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) kommen hierbei fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Einsatz (Lee *et al.*, 1992), wobei jedes der vier ddNTPs einen anderen Fluoreszenzfarbstoff trägt. Da diesen Nukleotiden die 3'-OH-Gruppe fehlt, bricht eine PCR nach dem statistischen Einbau eines solchen Moleküls ab, wodurch unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, die jeweils am 3'-Ende ein markiertes Didesoxynukleotid tragen. Im *Sequencer* werden diese DNA-Fragmente durch Kapillargelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und danach durch Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt. Ein CCD (*charge-coupled device*) detektiert das gesamte emittierte Fluoreszenzlicht. Anschließend berechnet eine Software (ABI Prism *DNA Sequencing Analysis* 3.0) die Frequenz, die mit der höchsten Intensität im Fluoreszenzlicht vertreten ist und ermittelt aus der entsprechenden Emissionswellenlänge das entsprechende Didesoxynukleotid. Abschließend wird die gewonnene Sequenzinformation in einer Chromatogramm-Datei (\*.scf) abgelegt, die mit der Software Chromas (Version 1.51, Technelysium Pty Ltd) gelesen und überprüft werden kann.

Für eine Sequenzierreaktion werden 180-200 ng Plasmid-DNA mit 1 pmol Sequenzierprimer und 2 µl vorbereiteter Reaktionslösung (BigDye® *Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems) versetzt und mit HPLC-Wasser aus 10 µl aufgefüllt. Danach wird das folgende PCR-Temperaturprogramm durchlaufen:

<b>PCR-Temperaturprogramm</b>			
<b>Schritt</b>	<b>Zeit [min:sec]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Beschreibung</b>
1	0:30	96	Denaturierung
2	0:15	50	<i>Annealing</i> der Primer
3	4:00	60	Polymerisation
4	∞	4	Kühlung bis zur Aufarbeitung

Das Programm wird 25 Mal durchlaufen. Anschließend wird die DNA durch Ethanol-Präzipitation gereinigt. Dazu werden 90 µl HPLC-Wasser, 10 µl 3 M NaOAc-Lösung (pH 4,6) und 250 µl abs. Ethanol zum Reaktionsansatz gegeben. Nach gründlichem Mischen wird für 15 min bei 14000 rpm (5415 C, Eppendorf) zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wird mit 250 µl 70% (v/v) Ethanol/HPLC-Wasser gewaschen und erneut 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 5 min lang bei 37°C getrocknet und in 25 µl HPLC-Wasser aufgelöst. Abschließend

wird die DNA für 2 min bei 90°C denaturiert, bevor die Probe vom *Sequencer* analysiert werden kann.

### 2.1.11 *In vitro* Transkription

Bei der *in vitro* Transkription wird die mRNA eines bestimmten Gens *in vitro* durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase (SP6-RNA-Polymerase) synthetisiert. Dazu wird das Plasmid mit dem gewünschten Gen in *E. coli* amplifiziert und mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen) in hoher Konzentration ( $\approx 1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) isoliert. Danach werden die Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *Sma* I (Fermentas) linearisiert. Die *Sma* I-Schnittstelle liegt in allen DNA-Konstrukten singular vor und spaltet die Plasmide direkt am 3'-Ende des Neurotoxingens, wodurch der *Strep*-Tag®II (Kap. 2.2.2) vom Rest des Gens getrennt und daher nicht transkribiert wird. Außerdem wird durch die Linearisierung erreicht, dass die Transkription nach dem Ende des Gens spezifisch terminiert wird. Die linearisierte DNA wird durch mehrfache Phenol- bzw. Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung gereinigt, bevor sie für die Synthese von RNA eingesetzt wird. Ein typischer Ansatz zur *in vitro* Transkription hat folgende Zusammensetzung:

<b>Transkriptionsansatz</b>	
3,0 $\mu\text{l}$	linearisierte DNA ( $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) $\approx 3 \mu\text{g}$
5,0 $\mu\text{l}$	10x Transkriptionspuffer (DTT-haltig, Boehringer Mannheim)
5,0 $\mu\text{l}$	BSA ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , Biolabs)
5,0 $\mu\text{l}$	5 mM rATP
5,0 $\mu\text{l}$	5 mM rCTP
5,0 $\mu\text{l}$	0,5 mM rGTP
5,0 $\mu\text{l}$	5 mM rUTP
5,0 $\mu\text{l}$	5 mM <i>Capping Reagent</i> (7m-3'gppp5'G, Biolabs)
10,6 $\mu\text{l}$	HPLC-Wasser (DEPC behandelt)
0,7 $\mu\text{l}$	rRNasin (Ribonukleaseinhibitor, Fermentas)
0,7 $\mu\text{l}$	SP6-RNA-Polymerase ( $20 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ , Boehringer)
50,0 $\mu\text{l}$	$\Sigma$

Die Transkriptionsansätze werden für 60-90 min bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 min noch einmal 0,5  $\mu\text{l}$  RNA-Polymerase zugegeben wird. Zur Kontrolle der RNA-Ausbeute werden jeweils 2,5  $\mu\text{l}$  des Transkriptionsansatzes auf einem 2%igen Agarosegel (Kap. 2.1.4) analysiert. Bevor die so gewonnene RNA für eine *in vitro* Translation (Kap. 2.2.6) eingesetzt

werden kann, wird sie durch zweimalige Phenol-Extraktion mit anschließender Chloroform-Extraktion und abschließender Ethanol-fällung gereinigt.

## **2.2 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.2.1 Rekombinante Expression in *E. coli***

In dieser Arbeit werden verschiedene Proteine durch rekombinante Expression in *E. coli* hergestellt, wobei alle Proteine mit Affinitätstags ausgestattet sind, um die spätere affinitätschromatographische Reinigung der Proteine aus den Bakterienlysaten zu ermöglichen. Zur rekombinanten Expression der BoNT und der BoNT H<sub>C</sub>-Fragmente werden die jeweiligen Plasmide in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4] (Qiagen, Kap. 7.5) transformiert, wohingegen zur Expression von GST-Fusionsproteinen die Plasmide in den *E. coli*-Stamm BL21 (Kap. 7.5) transformiert werden (Kap. 2.1.7). Eine antibiotikaresistente Einzelkolonie dieser Bakterien wird in 5 ml 2YT-Medium, das die entsprechenden Antibiotika enthält, angeimpft. Aus dieser Vorkultur wird am nächsten Tag unter den gleichen Bedingungen eine 600 ml Kultur angeimpft, die bei 37°C und 200 rpm (Innova 4230, New Brunswick Scientific) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 (Ultraspec 2000, Amersham Pharmacia Biotech) inkubiert, bevor die rekombinante Expression durch Zugabe von 0,25 mM IPTG (Isopropylthiogalactosid, AppliChem) induziert wird. Zur Expression schütteln die Kulturen bei 200 rpm über Nacht. Anschließend wird die Bakteriensuspension bei 4°C zentrifugiert (GSA-Rotor, 6000 rpm, 5858 x g, RC2-B Superspeed, Sorvall). Das entstandene Pellet wird entweder bis zur Aufarbeitung bei -20°C eingefroren oder direkt weiter verarbeitet (Kap. 2.2.2 und 2.2.3).

### **2.2.2 Strep-Tag®II-Aufarbeitung**

Die rekombinante Expression und Aufarbeitung der BoNT wird unter S2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Wegen der besonderen Gefahr der Entstehung von neurotoxinhaltigen Aerosolen (Ultraschall-Aufschluss, Zentrifugationen, Kap. 1.3) wird während der Aufarbeitung innerhalb einer Sicherheitswerkbank gearbeitet und zusätzlich eine P3-Atemschutzmaske getragen. Die Aufreinigung der BoNT H<sub>C</sub>-Fragmente erfolgt unter S1-Sicherheitsbedingungen.



Die BoNT und BoNT H<sub>C</sub>-Fragmente werden als *Strep-Tag*®II-Fusionsproteine (IBA GmbH Göttingen) exprimiert. Bei dem *Strep-Tag*®II handelt es sich um ein aus acht Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) bestehendes Peptid, 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 Säulenmatrix eluiert werden. Desthiobiotin ist ein Derivat des Biotins, dem natürlichen Liganden des Streptavidins. Es bindet ebenfalls an *Strep-Tactin*® und verdrängt auf diese Weise die gebundenen Fusionsproteine von der Säulenmatrix.

Zur Aufreinigung eines *Strep-Tag*®II-Fusionsproteins wird das Bakterienpellet (Kap. 2.2.1) zunächst in 30 ml Puffer W resuspendiert. Um proteolytischen Abbau des Proteins durch Proteasen aus *E. coli* zu verhindern, werden dem Puffer verschiedene Proteaseinhibitoren zugesetzt (60 µl Pepstatin A [0,5 mg ml<sup>-1</sup>], 76 µl PMSF [0,2 M], 150 µl Benzamidin [1,0 M]). Da die leichten Ketten der CNT Zn<sup>2+</sup>-Metalloproteasen sind (Kap. 1.2.1), darf bei der Aufreinigung der BoNT an dieser Stelle kein Chelatbildner (z.B. EDTA) als Inhibitor für *E. coli*-Metalloproteasen eingesetzt werden. Die BoNT würden dadurch ihre Toxizität verlieren. Die Bakterienzellen werden mit Hilfe von Ultraschall (Labsonic M; *Duty Cycle* 0,6; Amplitude 100%, B. Braun Biotech International) aufgeschlossen. Anschließend werden die Zelltrümmer 45 min lang bei 4°C abzentrifugiert (SS34-Rotor, 17000 rpm, 34540 x g, RC5C Superspeed, Sorvall). Der klare Überstand des Zelllysates, der neben den zytosolischen *E. coli*-Proteinen auch das rekombinante *Strep-Tag*®II-Fusionsprotein enthält, wird auf eine mit *Strep-Tactin*®-Matrix (IBA GmbH Göttingen) gefüllte und mit 10 ml Puffer W äquilibrierte Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säulenmatrix mit zweimal 5 ml Puffer W wird das gebundene Fusionsprotein mit Puffer E von der Matrix eluiert und in einzelnen Fraktionen aufgefangen. Vom Überstand des Bakterienlysates, vom Säulendurchfluss und von allen Elutionsfraktionen werden Proben von 18 µl mit 6 µl 4x Gelladepuffer versetzt und mit Hilfe einer SDS-PAGE (Kap. 2.2.4) analysiert. Die Säulen werden nach der Elution mit einem Vielfachen ihres Volumens an Puffer R bis zur Rotfärbung der Säulenmatrix regeneriert und vor der nächsten Benutzung erneut mit Puffer W äquilibriert.

<b>Puffer W</b>	<b>Puffer E</b>	<b>Puffer R</b>
100 mM Tris/HCl (pH 8,0)	100 mM Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	10 mM Desthiobiotin	1 mM HABA

### 2.2.3 GST-Aufarbeitung

Die luminalen Abschnitte von Proteinen aus der Membran synaptischer Vesikel werden als GST-Fusionsproteine rekombinant exprimiert, wobei das fusionierte GST sowohl als Affinitätstag bei der Aufreinigung als auch bei den GST-Pulldown-Experimenten (Kap. 2.3.1) Verwendung findet. Die selektive Aufreinigung der Proteine basiert auf der starken Affinität des GST zu Glutathion. Die Proteine binden während der Aufreinigung spezifisch an immobilisiertes Glutathion. Nach einem Waschschrift werden die GST-Fusionsproteine mit einem Überschuss an Glutathion von der Säulenmatrix eluiert. Die eluierten Fusionsproteine enthalten allerdings gebundenes Glutathion und sind zunächst nicht mehr in der Lage, wieder an immobilisiertes Glutathion zu binden. Um die Fusionsproteine in GST-Pulldown-Experimenten einsetzen zu können, müssen sie daher gegen  $\beta$ -Mercaptoethanol dialysiert werden, wobei das gebundene Glutathion entfernt wird.

Zur Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins wird das Bakterienpellet (Kap. 2.2.1) zunächst in 23 ml Ultraschallpuffer suspendiert. Um proteolytischen Abbau des Proteins durch *E. coli* Proteasen zu verhindern, werden dem Puffer verschiedene Proteaseinhibitoren zugesetzt (46  $\mu$ l Pepstatin A [0,5 mg ml<sup>-1</sup>], 58  $\mu$ l PMSF [0,2 M], 115  $\mu$ l Benzamidin [1,0 M]). Die Bakterienzellen werden mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen (Sonifier 250, Branson, *Duty Cycle*: 50, *Output Control*: 5, *Time*: 4 min). Anschließend werden die Zelltrümmer 45 min lang bei 4°C abzentrifugiert (SS34-Rotor, 17000 rpm, 34540 x g, RC5C Superspeed, Sorvall). Der klare Überstand des Zellysates, der das rekombinante GST-Fusionsprotein enthält, wird auf eine mit 300  $\mu$ l Glutathion-Sepharose-4B (Amersham Biosciences) gefüllte und mit 10 ml Äquilibrierungspuffer äquilibrierte Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit Waschpuffer I und Waschpuffer II wird das gebundene Fusionsprotein mit Elutionspuffer von der Säule eluiert und in einzelnen Fraktionen aufgefangen. Vom Überstand des Bakterienlysates, vom Säulendurchfluss und von allen Elutionsfraktionen wird eine Probe von 18  $\mu$ l mit 6  $\mu$ l 4x Gelladepuffer versetzt und mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 2.2.4) der Proteingehalt analysiert.

<b>Ultraschallpuffer</b>	<b>Äquilibrierungspuffer</b>	<b>Waschpuffer I</b>
1x PBS (pH 7,4)	1x PBS (pH 7,4)	1x PBS (pH 7,4)
5 mM EDTA	100 mM EDTA	5 mM EDTA
0,5% Triton X-100	0,5% Triton X-100	0,5% Triton X-100
<b>Waschpuffer II</b>	<b>Elutionspuffer</b>	
50 mM Tris/HCl (pH 7,4)	50 mM Tris/HCl (pH 7,4)	
5 mM EDTA	10 mM Glutathion	
0,5% Triton X-100	0,5% Triton X-100	

Proteine, die in GST-Pulldown-Experimenten analysiert werden sollen, werden gegen 20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl und 0,5% Triton X-100 dialysiert (TBS-Puffer). Proteine, deren inhibitorische Wirkung im MPN-Toxizitätsassay (Kap. 2.3.3) bestimmt werden soll, werden gegen Krebs-Ringer-Puffer (Kap. 2.3.3) dialysiert. In beiden Fällen wird der Dialysepuffer zunächst mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, um das gebundene Glutathion zu entfernen. Überschüssiges  $\beta$ -Mercaptoethanol wird schließlich durch weitere Dialyseschritte ebenfalls entfernt.

## 2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es, ein Gemisch von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen anhand der unterschiedlichen Molekülgrößen aufzutrennen. In dieser Arbeit werden für allgemeine Zwecke selbstgegossene Polyacrylamidgele nach einer Abwandlung der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet. Für spezielle Zwecke werden industriell hergestellte Gele verwendet, die sich durch eine besonders hohe Trennschärfe auszeichnen (NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gele, Invitrogen).

Bei der SDS-PAGE lagern sich SDS-Moleküle an die Proteine an und verleihen ihnen eine negative Gesamtladung. Alle Proteine wandern in der SDS-PAGE daher zur positiv geladenen Anode. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit SDS erhitzt, wobei die Struktur der Proteine zerstört wird. Zur Reduktion von Disulfidbindungen zwischen Cysteinen wird den Proben  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt. Die selbstgegossenen Gele bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften (diskontinuierliche Gelelektrophorese), wodurch eine höhere Trennschärfe erreicht wird. Im

weitporigen Sammelgel (pH 6,8) werden die Proteine zwischen schnell laufenden Chlorid- und langsam laufenden Glycin-Anionen fokussiert und konzentriert. Im Sammelgel besitzen alle Proteine die gleiche Mobilität und werden daher nicht voneinander getrennt. Erst im engporigen Trenngel (pH 8,8), wo die Molekülgröße einen erheblichen Einfluss auf die Mobilität hat, erfolgt eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe.

Die Gele werden in geeigneten Gelsystemen (Mini Protean™, Biorad, 0,5 mm Stärke bzw. Eigenbau, 0,75 mm Stärke) gegossen und haben die in den folgenden Tabellen aufgeführte Zusammensetzung:

<b>Sammelgel</b>		<b>Trenngel</b>		
	<b>6,3%</b>		<b>10%</b>	<b>12,5%</b>
30% AA-Bis-Mix (29:1) [ml]	0,42	30% AA-Bis-Mix (29:1) [ml]	1,65	2,06
1 M Tris pH 6,8 [ml]	0,31	1 M Tris pH 8,8 [ml]	1,25	1,25
dH <sub>2</sub> O [ml]	1,75	dH <sub>2</sub> O [ml]	2,04	1,64
10% SDS [μl]	25,0	10% SDS [μl]	50,0	50,0
TEMED [μl]	5,0	TEMED [μl]	7,5	7,5
10% APS [μl]	20,0	10% APS [μl]	30,0	30,0

Nachdem Trenn- und Sammelgel polymerisiert sind, werden die Pufferreservoirs des Gelsystems mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Die zu analysierenden Proben werden mit einem Drittel ihres Volumens an 4x Gelladepuffer versetzt und entweder 5 min bei 99°C oder 30 min bei 37°C denaturiert und anschließend zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Der Standard erlaubt die Abschätzung der Molekülgröße unbekannter Proteinproben. Die Elektrophorese wird bei konstantem Strom (20 mA pro Gel) so lange fortgeführt, bis der Farbmarker des Gelladepuffers das Ende des Trenngels erreicht hat. Die Proben für industriell gefertigte Gele (NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gele, Invitrogen) werden gemäß den Angaben des Herstellers vorbereitet und analysiert.

Die Proteinbanden der Polyacrylamidgele werden entweder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 oder, im Falle radioaktiv markierter Proteine (Kap. 2.2.6), durch Autoradiographie auf einer *phosphor imager*-Platte (BAS-MP 2040S, FujiFilm), oder, nach Transfer der Banden auf eine Membran, durch Färbung mit Antikörpern (Western Blot, Kap. 2.3.4.5) detektiert.

<b>4x Gelladepuffer</b>	<b>Laemmli-Laufpuffer</b>
25 mM Tris/HCl (pH 6,75)	25 mM Tris
40% (w/v) Glycerin	250 mM Glycin
8% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS
0,004% (w/v) Bromphenolblau	
0,004% (w/v) Xylencyanol FF	
<b>Coomassie-Lösung</b>	<b>Entfärbelösung</b>
0,25% (w/v) Coomassie Blau R250	30% (v/v) Methanol
45% (v/v) Methanol	10% (v/v) Essigsäure
10% (v/v) Essigsäure	

## 2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der rekombinant exprimierten Proteine erfolgt mit Hilfe eines BSA-Standards per SDS-PAGE (Kap. 2.2.4). Im Gegensatz zu photometrischen Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration kann durch dieses Verfahren auch die Konzentration verunreinigter Proteinproben mit vergleichbarer Genauigkeit bestimmt werden. Da beispielsweise die BoNT auf ihre Toxizität hin untersucht werden sollen (Kap. 2.3.3), ist für eine genaue Dosierung eine exakte Konzentrationsbestimmung besonders wichtig.

Die zu bestimmenden Proteinproben werden zusammen mit einer BSA-Verdünnungsreihe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese werden die Proteinbanden mit Coomassie Blue R250 angefärbt. Anschließend werden die SDS-Gele mit einem LAS-3000 (Fujifilm) Fotodokumentationssystem fotografiert und die einzelnen Proteinbanden mit einer Software (Advanced Image Analyzer 2.11, Raytest) quantifiziert. Aus den erhaltenen Messwerten und den bekannten BSA-Konzentrationen wird eine Kalibrierungsgerade erstellt, aus der durch lineare Regression die Konzentration der unbekannt Proteinproben berechnet wird. Das Verfahren setzt voraus, dass sich BSA und die zu bestimmenden Proteine gleich gut mit Coomassie Blue R250 anfärben lassen.

<b>BSA-Verdünnungsreihe</b>
0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,8 1,0 1,2 1,4 1,6 [ $\mu\text{g } 10 \mu\text{l}^{-1}$ ]

## 2.2.6 *In vitro* Translation

Für die Synthese von radioaktiv markierten H<sub>C</sub>-Fragmenten werden die entsprechenden mRNAs (Kap. 2.1.11) *in vitro* translatiert. Der Translationsansatz enthält gereinigte mRNA und aminosäurefreies Retikulozytenlysat. Dieses Zelllysat enthält die zur Translation benötigten Ribosomen, tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sowie die Initiations- bzw. Elongationsfaktoren der Translation. Die Aminosäuren werden dem Reaktionsansatz in Form eines Aminosäuregemischs ohne Methionin zugesetzt. Letzteres wird dem Ansatz in Form von radioaktivem <sup>35</sup>S-Methionin zugegeben. Ein typischer Reaktionsansatz zur *in vitro* Translation hat folgende Zusammensetzung:

<b>Translationsansatz</b>	
17,0 µl	Retikulozytenlysat (Promega)
1,0 µl	Aminosäuregemisch (minus Methionin, Promega)
2,0 µl	<sup>35</sup> S-Methionin (Amersham)
4,0 µl	mRNA
24,0 µl	Σ

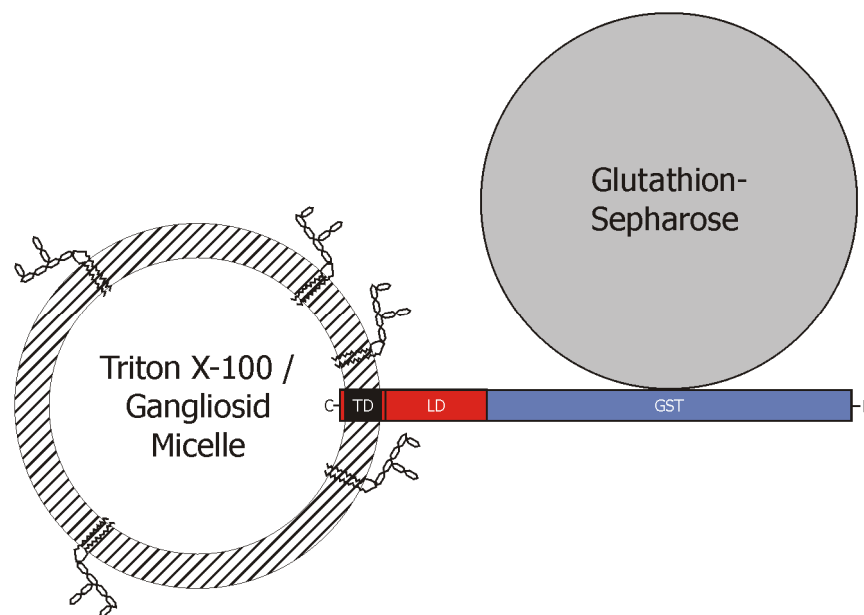
Nach einer Inkubationszeit von 60-90 Minuten bei 30°C wird der Translationsansatz, der nun das radioaktiv markierte Protein enthält, direkt für GST-Pulldown-Experimente eingesetzt (Kap. 2.3.1).

## 2.3 Analyse der Rezeptorkandidaten

### 2.3.1 GST-Pulldown-Experiment

GST-Pulldown-Experimente (von engl. *to pull down* = niederreißen) stellen ein einfaches experimentelles System für den Nachweis von Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen dar. Ein Fängerprotein (engl. *bait*) wird über einen Affinitätstag (z.B. GST) an eine feste Matrix (z.B. Glutathion-Sepharose-4B, Amersham Biosciences) gebunden und anschließend zusammen mit einem potentiellen Liganden (engl. *prey*) inkubiert. Im Falle einer Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen wird bei einer Zentrifugation der Ligand zusammen mit der festen Matrix und dem daran gebundenen Fängerprotein in die Festphase (engl. *pellet*) gerissen. Bei einer Analyse der in diesem Pellet enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE mit anschließender Färbung (Kap. 2.2.4), Western Blot (Kap. 2.3.4.5) oder Autoradiographie erscheint der Ligand als zusätzliche Proteinbande. Um die Spezifität eines

GST-Pulldown-Experimentes beurteilen zu können, müssen etliche Kontrollen mitgeführt werden. So sollte überprüft werden, ob der Ligand nicht auch unspezifisch mit dem Affinitätstag bzw. der festen Matrix in Wechselwirkung treten kann. Des Weiteren sollten, wenn möglich, je eine Positiv- und Negativkontrolle mit bekanntermaßen bindendem bzw. nicht bindendem Liganden mitgeführt werden. Da es sich bei einem GST-Pulldown um ein reines *in vitro* Experiment handelt, müssen identifizierte und spezifische Wechselwirkungen mit geeigneten *in vivo* (Kap. 2.3.4.4) bzw. *ex vivo* (Kap. 2.3.3) Experimenten auf ihre physiologische Relevanz hin untersucht werden.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung eines der in dieser Arbeit durchgeführten GST-Pulldown-Experimente. Ein luminaler Abschnitt (LD, engl. *luminal domain*) eines potentiellen Rezeptorproteins wird samt der C-terminal folgenden Transmembrandomäne (TD) als GST-Fusionsprotein rekombinant exprimiert und zusammen mit Triton X-100 und Gangliosiden in Pulldown-Experimenten eingesetzt. Das Detergenz Triton X-100 bildet zusammen mit den Gangliosiden eine gemischte Micelle, die die Situation an der Plasmamembran nachbilden soll (GST-Pulldown-Experiment nach Dong *et al.*, 2003).

Bei der Durchführung eines GST-Pulldown-Experimentes werden unbeschichtete oder mit 5 µg Gangliosidgemisch (Calbiochem) beschichtete Reaktionsgefäße (500 µl, Sarstedt) verwendet. Außerdem werden 150 pmol eines GST-Fusionsproteins an 10 µl Glutathion-Sepharose-4B (Amersham Biosciences) gebunden und zusammen mit 100 pmol rekombinantem oder *in vitro* translatiertem BoNT H<sub>C</sub>-Fragment für drei Stunden bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 100 µl TBS-Puffer inkubiert. Anschließend wird die feste Matrix

zusammen mit den daran gebundenen Proteinen abzentrifugiert und dreimal mit 160 µl TBS-Puffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Das gewaschene Pellet wird mit 20 µl TBS-Puffer versetzt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem es schließlich mit 10 µl 4x Gelladepuffer versetzt und aufgekocht wird. Die gebundenen Proteine werden per SDS-PAGE voneinander getrennt und anschließend durch Färbung mit Coomassie Blue R250 (Kap. 2.2.4), Western Blot (Kap. 2.3.4.5) oder durch Autoradiographie detektiert.

### **2.3.2 GST-Pulldown aus solubilisierten synaptischen Vesikeln**

Grundsätzlich handelt es sich bei den GST-Pulldown-Experimenten aus Solubilisaten synaptischer Vesikel um ein gewöhnliches GST-Pulldown-Experiment mit vertauschten Rollen von *bait* und *prey*. Statt luminaler Abschnitte von Proteinen aus der Membran synaptischer Vesikel kommen BoNT H<sub>C</sub>-Fragmente als *bait* zum Einsatz. Als *prey* dient nicht ein einzelnes Protein, sondern ein Gemisch nativer Proteine aus synaptischen Vesikeln. Mit diesem experimentellen Ansatz sollte es möglich sein, gänzlich unbekannte Proteine, die mit den BoNT H<sub>C</sub>-Fragmenten interagieren, aus einem Pool nativer Proteine zu „angeln“. Zusätzliche Proteinbanden, die bei der Analyse der Pellets detektiert werden, können durch Massenspektroskopie oder, im Falle eines bestimmten Verdachtes, durch Verwendung spezifischer Antikörper im Western Blot (Kap. 2.3.4.5) identifiziert werden.

#### **2.3.2.1 Präparation von synaptischen Vesikeln aus Rattenhirn**

Synaptische Vesikel werden nach einer Methode von Hell *et al.*, 1988 aus den Gehirnen von Ratten präpariert. Die Gehirne werden direkt nach ihrer Präparation zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, pulverisiert und anschließend homogenisiert. Größere Zellfragmente werden danach durch niedrig- und mitteltourige Zentrifugationen entfernt. Zum Schluss werden die synaptischen Vesikel durch ein Saccharosekissen zentrifugiert, wobei Myelinfragmente entfernt werden. Das entstehende Pellet wird resuspendiert und in geeigneten Aliquots bei -70°C tiefgefroren.

Zur Präparation synaptischer Vesikel aus den Gehirnen von Ratten (Wistar, je 150 g Körpergewicht, Zentrales Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover) werden zunächst bis zu zehn Ratten geschlachtet und die Gehirne einschließlich des Kleinhirns entnommen. Nach dem Abspülen mit Homogenisierungspuffer werden die Gehirne sofort in



flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend werden bis zu drei Gehirne in einen speziellen, in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Stahlmörser (Eigenbau) gegeben und durch mehrere kräftige Hammerschläge auf den Stahlpistil pulverisiert. Das entstehende Pulver wird in einen vorgekühlten Porzellanmörser mit Pistil überführt und unter flüssigem Stickstoff weiter zerkleinert. Nachdem der Stickstoff vollständig verdampft ist, wird das Pulver im achtfachen Volumen Homogenisierungspuffer suspendiert. Dieser und alle folgenden Schritte werden bei 4°C durchgeführt. Die entstehende Suspension wird in einem Glas/Teflonhomogenisator mit Spiel bei 900 bis 1000 rpm eine Minute lang homogenisiert. Das Homogenisat wird anschließend für zwölf Minuten zentrifugiert (SS34-Rotor, 19000 rpm, 47000 x g, RC5C Superspeed, Sorvall), um größere Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand Ü1 dieser ersten Zentrifugation wird abgenommen in Polycarbonatröhrchen überführt und erneut 40 Minuten lang zentrifugiert (70 Ti, 34145 rpm, 120000 x g, L8-70M Ultracentrifuge, Beckman). Anschließend werden je 19 ml des Überstands Ü2 in neue Polycarbonatröhrchen überführt, mit einem Saccharosekissen (5,5 ml) unterschichtet und zentrifugiert (70 Ti, 50000 rpm, 260000 g, L8-70M Ultracentrifuge, Beckman). Der Überstand Ü3 dieser Zentrifugation wird verworfen, während das Pellet P3 die synaptischen Vesikel enthält und in einem geeigneten Volumen Resuspendierungspuffer aufgenommen wird. Das Pellet wird mehrere Male durch eine Kanüle (erst 20 Gauge, dann 27 Gauge) in eine Spritze aufgezogen und dadurch resuspendiert. Die Suspension wird aliquotiert und bei -70°C tiefgefroren.

<b>Homogenisierungspuffer</b>		<b>Saccharosekissen</b>	
320 mM	Saccharose	750 mM	Saccharose
1 µg/ml	Pepstatin A	5 mM	MOPS/KOH (pH 7,3)
1 µg/ml	Leupeptin		

<b>Resuspensionspuffer</b>	
320 mM	Saccharose
10 mM	MOPS/KOH (pH 7,3)

### 2.3.2.2 GST-Pulldown

Zur Solubilisierung synaptischer Vesikel werden 200 µl Vesikelsuspension (entsprechend ca. 120 µg Gesamtprotein, Kap. 2.3.2.1) auf 2% Triton X-100 eingestellt und für eine Stunde bei 4°C und gelegentlichem Vortexen inkubiert. Die Lösung wird schließlich für zehn Minuten

bei 4°C zentrifugiert (14000 rpm, Centrifuge 5417R, Eppendorf) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Gleichzeitig werden 150 pmol GST-BoNT H<sub>C</sub>-Fragment an 10 µl Glutathion-Sepharose-4B (Amersham Biosciences) gebunden und danach mit 50 µl Vesikelsolubilisat (entsprechend ca. 25 µg Gesamtprotein) für drei Stunden bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 150 µl TBS-Puffer (Kap. 2.2.3) inkubiert. Anschließend wird die feste Matrix zusammen mit den daran gebundenen Proteinen abzentrifugiert und dreimal mit 160 µl TBS-Puffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Das gewaschene Pellet wird mit 20 µl TBS-Puffer versetzt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem es schließlich mit 10 µl 4x Gelladepuffer versetzt und aufgeköcht wird. Die gebundenen Proteine werden per SDS-PAGE voneinander getrennt und anschließend durch Färbung mit Coomassie Blue R250 (Kap. 2.2.4) oder Western Blot (Kap. 2.3.4.5) detektiert.

### **2.3.3 Ex vivo Toxizitätsbestimmung am *Nervus phrenicus* der Maus**

Die Toxizität der Neurotoxine und die inhibitorische Wirkungsamkeit der luminalen Abschnitte vesikulärer Proteine wird nach einer Methode von Habermann *et al.* (1980) *ex vivo* an isolierten Zwerchfellen von Mäusen bestimmt (MPN-Toxizitätsassay, *mouse phrenic nerve assay*). Dazu wird aus einer Maus (NMRI, ♂, Zentrales Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover) ein halbes Zwerchfell einschließlich *Nervus phrenicus* und des letzten Rippenbogens präpariert und in einem Organmessplatz (FMI GmbH) in 4 ml physiologischem Krebs-Ringer-Puffer (KRP) fixiert. Der *Nervus phrenicus* wird dabei durch eine Ringelektrode geführt. Der KRP wird nun mit BoNT/A, B oder C versetzt, während der Nerv mit 5 mA und einer Frequenz von 1 Hz elektrostimuliert wird. Die Kontraktionen des Zwerchfells werden über einen Kraftmesser registriert und von einem PC aufgezeichnet (VitroDat Online Software, FMI GmbH). Gemessen wird die Zeit, in der die Kontraktionsamplitude durch die Wirkung der Neurotoxine auf 50% des Startwertes (Kontraktionsamplitude zum Zeitpunkt der Neurotoxinzugabe) abgenommen hat (paralytische Halbwertszeit,  $t_{1/2}$  [min]).

Das MPN-Toxizitätsassay bietet die Möglichkeit, die Aktivität der CNT in einem *ex vivo* System zu bestimmen. Dadurch kann zur Charakterisierung der Toxizität der Neurotoxine größtenteils auf Versuche am lebenden Tier verzichtet werden. Außerdem wird das Zwerchfell durch cholinerge Synapsen innerviert, die den natürlichen Wirkort der BoNT

darstellen. Mit der Versuchsanordnung (Kap. 2.3.3) lassen sich Paralysezeiten zwischen ca. 40 und 180 min messen. 30 min ist die Totzeit der Versuchsanordnung, die das Neurotoxin 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 die Substratproteolyse zu katalysieren. Da die Lebensdauer des Zwerchfells im Organbad nicht unbegrenzt ist, stellen 3-4 h die Obergrenze für verlässliche Messungen der paralytischen Halbwertszeit dar.

---

---

**Krebs-Ringer-Puffer, pH 7,5**

---

---

118,0 mM	NaCl
4,7 mM	KCl
1,2 mM	MgSO <sub>4</sub>
1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
25,0 mM	NaHCO <sub>3</sub>
2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
11,0 mM	Glucose

---

---

Zur Bestimmung der inhibitorischen Wirksamkeit der luminalen Abschnitte vesikulärer Proteine werden die BoNT zunächst zusammen mit entsprechenden GST-Fusionsproteinen oder isolierten luminalen Abschnitten vorinkubiert und anschließend dem Organbad hinzugefügt. Aus den gemittelten Paralysezeiten der vorbehandelten Neurotoxine wird mit Hilfe einer Konzentrations-Wirkungskurve (Abbildung 10) die verbleibende Toxizität in Prozent vom unbehandelten Neurotoxin berechnet und schließlich in Prozent Neutralisation umgewandelt. Eine Konzentrations-Wirkungskurve erhält man durch Bestimmung der Paralysezeiten verschiedener Konzentrationen eines BoNT und Auftragung dieser Werte gegen die Konzentration. Anschließend wird eine Potenzfunktion durch Variation ihrer Parameter an die Kurve angepasst. Mit Hilfe der ermittelten Parameter lässt sich aus den Paralysezeiten der vorbehandelten Neurotoxine ihre neue effektive Konzentration berechnen. Das prozentuale Verhältnis von eingesetzter zu effektiver Konzentration entspricht der verbleibenden Toxizität, die zu der des unbehandelten Neurotoxins ins Verhältnis gesetzt wird. Abbildung 10 zeigt die verwendeten Konzentrations-Wirkungskurven von BoNT/A und BoNT/B. In Tabelle 5 sind die Parameter der entsprechenden Potenzfunktionen angegeben.

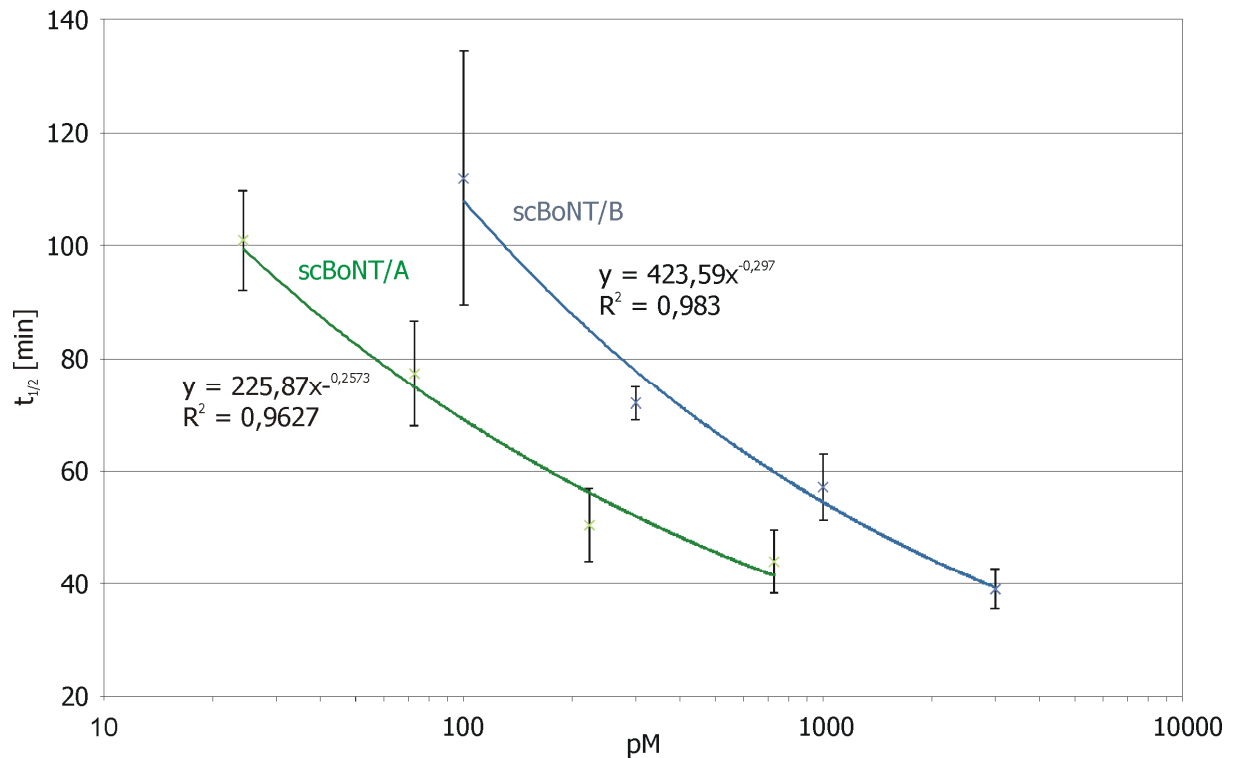


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungskurven (engl. dose response curve) von scBoNT/A und scBoNT/B. Die Kurven gelten jeweils für das nicht aktivierte *single chain* (sc) Neurotoxin.

Tabelle 5: Parameter der ermittelten Potenzfunktionen für die Konzentrations-Wirkungskurven von scBoNT/A und scBoNT/B.

Parameter einer Potenzfunktion der Form $y = A \cdot x^B$		
Konstrukt	A	B
scBoNT/A	225,87	-0,2573
scBoNT/B	423,59	-0,297

### 2.3.4 Arbeiten mit Zelllinien

Zwei neuronale Zelllinien werden routinemäßig zur Aktivitätsbestimmung CNT eingesetzt. Die PC12-Zelllinie (ATCC<sup>5</sup>, CRL 1721) wurde 1976 aus einem transplantierbaren Phäochromozytom der Ratte etabliert (Greene & Tischler, 1976). PC12-Zellen nehmen unter Behandlung mit dem Neurotrophin NGF (*nerve growth factor*) reversibel einen neuronalen Phänotyp an und werden deshalb auch häufig für die Erforschung der Signaltransduktion des NGF-Rezeptors TrkA herangezogen. PC12-Zellen synthetisieren die Katecholamine Dopamin und Noradrenalin und exprimieren die Substrate der CNT (SNARE-Proteine, Kap. 1.2.2.1).

<sup>5</sup> American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org>

Da PC12-Zellen sensitiv gegenüber allen CNT sind, geht man davon aus, dass alle zur Aufnahme der CNT erforderlichen (Protein-)Rezeptoren vorhanden sind. PC-Zellen adhären nicht an unbehandelte Zellkulturschalen, sondern wachsen in Suspension und bilden dabei bisweilen größere Aggregate. Für die Behandlung mit Neurotoxinen und/oder Differenzierung mit NGF (Kap. 2.3.4.4) werden die PC12-Zellen auf mit Collagen und Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturschalen umgesetzt, auf denen sie adhären wachsen, was die Versuchsdurchführung erheblich vereinfacht.

Die Zelllinie Neuro-2a (N2A, DSMZ<sup>6</sup>, ACC 148) wurde aus einem spontanen Neuroblastom der Maus etabliert (Klebe & Ruddle, 1969). N2A-Zellen sind zumindest gegenüber BoNT/A und C suzeptibel und exprimieren dementsprechend die SNARE-Proteine SNAP-25 und Syntaxin 1A. N2A-Zellen wachsen auch auf unbeschichteten Zellkulturschalen adhären, wobei die meisten Zellen rund sind und kurze Ausläufer tragen. N2A-Zellen nehmen durch Behandlung mit Retinsäure oder Entzug von Serum einen neuronalen Phänotyp an, was allerdings in dieser Arbeit nicht ausgenutzt wurde.

#### **2.3.4.1 Haltung von Zelllinien**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden unter einer *laminar flow* Werkbank (Heraeus HERAsafe Type HS12) durchgeführt. PC12-Zellen werden als Suspensionszellen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ohne Beschichtung (TPP) in RPMI-Wachstumsmedium kultiviert und alle sieben Tage je nach Zelldichte in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 subkultiviert. Dazu wird die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen (Greiner bio-one) überführt, zentrifugiert (1100 rpm, 200 x g, Eppendorf Centrifuge 5403) und das entstandene Zellpellet in 1 ml frischen RPMI-Wachstumsmedium gründlich resuspendiert. Anschließend wird eine entsprechende Menge dieser Zellsuspension in neue Kulturschalen mit frischem RPMI-Wachstumsmedium ausplattiert. Die Zellkulturen wachsen in einem Wassermantelinkubator (Forma Scientific, CO<sub>2</sub> *Water Jacketed Incubator Type* 3111) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

N2A-Zellen wachsen adhären in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser ohne Beschichtung (TPP) in DMEM-Wachstumsmedium. Alle 3-4 Tage werden die Zellen je nach

---

<sup>6</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; <http://www.dsmz.de>

Zelldichte in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:40 subkultiviert. Dazu wird zunächst das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA (0,5 mg/ml bzw. 0,22 mg/ml, PAA) von der Zellkulturschale gelöst und durch Zugabe von 8 ml frischem DMEM-Wachstumsmedium ab gespült. Danach wird eine entsprechende Menge dieser Zellsuspension in neue Kulturschalen mit frischem DMEM-Wachstumsmedium ausplattiert. Die Zellkulturen wachsen in einem Wassermantelinkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

<b>RPMI-Wachstumsmedium</b>		<b>DMEM-Wachstumsmedium</b>	
85%	RPMI 1640-Medium (PAA)	90%	DMEM-Medium (PAA)
10%	Pferdeserum (PAA)	10%	fötales Kälberserum (PAA)
5%	fötales Kälberserum (PAA)	2 mM	L-Glutamin (PAA)
2 mM	L-Glutamin (PAA)	100 U/ml	Penicillin (PAA)
100 U/ml	Penicillin (PAA)	100 µg/ml	Streptomycin (PAA)
100 µg/ml	Streptomycin (PAA)		

<b>PBS (phosphate buffered saline)</b>	
2,7 mM	KCl
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
137 mM	NaCl
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O

#### 2.3.4.2 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA und siRNA

Ein Vorteil der Arbeit mit Zelllinien im Vergleich zur Arbeit mit Organpräparaten (Kap. 2.3.3) besteht in der Möglichkeit der einfachen genetischen Manipulation von Zellen durch Transfektion von Plasmid-DNA und/oder siRNA (*short interfering RNA*). Die Transfektion von Plasmid-DNA ermöglicht die (Über-)Expression von Genen, die die Zelllinie natürlicherweise nicht oder nur in geringem Ausmaß exprimiert. Die Transfektion von siRNA (Elbashir *et al.*, 2001) ermöglicht dagegen die transiente Inhibierung der Expression eines Gens (engl. *knock-down*) durch einen als RNA Interferenz (RNAi, Meister & Tuschl, 2004) bezeichneten Prozess. Neben der Elektroporation und viralen Infektion eukaryontischer Zellen hat sich die als Lipofektion bezeichnete Transfektion unter Verwendung kationischer Lipide durchgesetzt. Dabei bilden die Nukleinsäuren und das Transfektionsreagenz einen positiv geladenen Komplex, der in der Lage ist, mit der Zellmembran zu fusionieren und dadurch die Nukleinsäuren in die Zellen zu transportieren.

PC12-Zellen und N2A-Zellen werden in dieser Arbeit mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen), entsprechend der Angaben des Herstellers zur Kotransfektion von Plasmid-DNA und siRNA, in einer 12-Well Zellkulturschale transient transfiziert. Die Transfektionseffizienz für PC12-Zellen beträgt dabei zwischen 30-40%, während die für N2A-Zellen über 80% beträgt.

#### **2.3.4.3 Stabile Transfektion**

Es gibt verschiedene experimentelle Ansätze, um sich den Effekt der RNAi in der Zellkultur zu Nutze zu machen. Neben der transienten Transfektion von siRNA oder shRNA (*short hairpin RNA*, Kap. 2.3.4.2) hat sich die stabile Transfektion von Plasmiden etabliert, die die *in situ* Expression von shRNA bzw. miRNA ermöglicht. Diese Plasmide tragen eine Antibiotikaresistenz und erlauben so die Selektion auf positiv transfizierte Zellen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist eine höhere Effizienz der Inhibierung der Genexpression (engl. *knock-down*), was unter Umständen eine biochemische Analysemethode überhaupt erst ermöglicht. Der Nachteil bei der Etablierung stabil transfizierter Zelllinien ist allerdings ein erhöhter Arbeits- und Zeitaufwand.

Weil die Transfektionseffizienz von PC12-Zellen bei transients Transfektion mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) mit 30-40% zu gering für biochemische Analysemethoden wie dem Nachweis der Substratspaltung (Kap. 2.3.4.4) ist, werden in dieser Arbeit stabil transfizierte PC12-Zelllinien etabliert, in denen die Expression bestimmter Gene durch Expression von miRNAs inhibiert ist. Dazu werden PC12-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden (pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR, Invitrogen) zunächst transient transfiziert (Kap. 2.3.4.2) und nach 24 Stunden durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Blasticidin, Invitrogen) einem Selektionsdruck ausgesetzt. Die Klonierung der verwendeten Plasmide ist in Kapitel 2.1.9 beschrieben. Die Etablierung stabil transfizierter Zelllinien erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers im Handbuch des BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits von Invitrogen.

#### **2.3.4.4 Zellbasierte Toxizitätsbestimmung**

Neben der Toxizitätsbestimmung am isolierten *Nervus phrenicus* der Maus (Kap. 2.3.3) werden in dieser Arbeit zellbasierte Toxizitätsbestimmungen durchgeführt. Da Zelllinien mit verhältnismäßig geringem Aufwand genetisch manipulierbar sind, erlaubt die zellbasierte

Toxizitätsbestimmung die Messung der Aktivität der CNT in Abhängigkeit der Rezeptorausstattung der verwendeten Zellen. Dazu wird die Zahl der vorhandenen Rezeptormoleküle entweder durch Transfektion von siRNA (RNAi) verringert oder durch Überexpression eines entsprechenden Gens erhöht (Kap. 2.3.4.2 und 2.3.4.3) und die Aktivität der CNT im Vergleich zu unveränderten Wildtypzellen bestimmt. Als Maß für die Aktivität der CNT wird die Menge an gespaltenem Substrat durch einen Western Blot (Kap. 2.3.4.5) detektiert.

Zur Durchführung einer zellbasierten Toxizitätsbestimmung müssen die verwendeten Zellen adhärent wachsen. PC12-Zellen werden dazu auf mit Collagen A (100 µg/ml, Biochrom AG) und Poly-L-Lysin (10 µg/ml, Biochrom AG) beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert. Alle Experimente werden in 12-Well-Zellkulturschalen durchgeführt, wobei 1 ml Zellkulturmedium pro Well verwendet wird. Bei Experimenten mit differenzierten PC12-Zellen werden 20.000 Zellen pro Well ausplattiert und sieben Tage lang mit 62,5 ng/ml NGF (*nerve growth factor*, Alomone Labs) in Wachstumsmedium inkubiert, bevor die eigentliche Toxizitätsbestimmung durchgeführt wird. Bei Experimenten mit undifferenzierten PC12-Zellen und N2A-Zellen werden 24 Stunden vor einer transienten Transfektion mit Plasmid-DNA und siRNA (Kap. 2.3.4.2) 50.000 Zellen pro Well ausplattiert. 24 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen mit 62,5 µg/ml Gangliosidgemisch (Calbiochem) in Wachstumsmedium behandelt. Nach weiteren 24 Stunden (48 Stunden nach der Transfektion) werden die Zellen zunächst mit Wachstumsmedium gewaschen, um überschüssiges Gangliosid zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit 30 nM BoNT/A bzw. 60 nM BoNT/C in Wachstumsmedium bis zu 48 Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubation wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 250 µl Trypsin/EDTA (0,5 mg/ml bzw. 0,22 mg/ml, PAA) von der Zellkulturschale gelöst und durch Zugabe von 500 µl Wachstumsmedium abgespült. Die Zellsuspension wird in Reaktionsgefäße (1,5 ml, Eppendorf) überführt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (4000 rpm, 5415 C, Eppendorf). Das entstandene Pellet wird einmal mit PBS gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Zur Analyse der Proben werden die Pellets je nach Größe in 30-50 µl PBS-Lysispuffer resuspendiert und bei 4°C unter gelegentlichem Vortexen für eine Stunde inkubiert und schließlich zentrifugiert (14000rpm, Centrifuge 5417R, Eppendorf). Der Überstand wird in neue Reaktionsgefäße (1,5 ml, Eppendorf) überführt und die Proteinkonzentration der Lysate



photometrisch (D<sub>C</sub> Protein Assay, Bio-Rad) bestimmt. Anhand der ermittelten Proteinkonzentrationen werden Proben für die SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mit gleicher Proteinkonzentration vorbereitet. Dabei wird eine Gesamtproteinmenge in der SDS-PAGE von 25 µg pro Laufspur nicht überschritten.

<b>PBS-Lysispuffer</b>	
1x	PBS (Kap. 2.3.4.1)
0,5%	Triton X-100
0,05%	SDS (Natriumdodecylsulfat)
1x	Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
3 µg/ml	Pepstatin A

### 2.3.4.5 Western Blot

Die bei den zellbasierten Aktivitätsassays entstehenden Spaltprodukte der SNARE-Proteine und die entsprechenden Rezeptorproteine werden proteinchemisch durch einen sogenannten Western Blot nachgewiesen. Dabei werden die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbestandteile der Zelllysate durch eine Elektrophorese aus dem Gel heraus auf eine proteinbindende Membran (PVDF, Polyvinylidenfluorid) übertragen. Anschließend werden die SNARE- und Rezeptorproteine immunologisch durch Verwendung spezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

Entsprechend der Angaben des Herstellers werden die Zelllysate auf NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gelen (12% bzw. 4-12%, Invitrogen) in einer XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des XCell II™ Blot Module (Invitrogen) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Roti®-PVDF, Roth) übertragen. Die Membran wird anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blocklösung passiviert, um unspezifische Signale zu unterdrücken. Anschließend wird die Membran mit dem ersten in Blocklösung verdünnten Antikörper für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wird die Membran mindestens sechs Mal für je fünf Minuten mit PBS/Tween gewaschen, bevor sie mit dem zweiten, in PBS/Tween verdünnten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wird. Um unspezifische Signale durch ungebundenen zweiten Antikörper zu reduzieren, wird die Membran als nächstes mindestens zehn Mal für je fünf Minuten gründlich mit PBS/Tween gewaschen. Da das Detergenz Tween die Chemolumineszenzausbeute verringert, wird es vor der Entwicklung des Western Blots mit reinem PBS (Kap. 2.3.4.1) gewaschen. Die

Entwicklung der Western Blots erfolgt mit dem SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) für HRP-gekoppelte (*horseradish peroxidase*) zweite Antikörper entsprechend der Angaben des Herstellers in einem LAS-3000 (Fujifilm) Fotodokumentationssystem. Charakteristische Belichtungszeiten für Western Blots der Proteinrezeptoren und Substrate der CNT liegen zwischen 30 und 90 Sekunden. Die Fotos der Western Blots werden als Datei im TIFF-Format (*Tagged Image File Format*) gespeichert. Helligkeit und Kontrast werden anschließend durch elektronische Bildverarbeitung mit Photoshop (Version 6, Adobe) angepasst.

<b>Blocklösung</b>	<b>PBS/Tween</b>
1x PBS (Kap. 2.3.4.1)	1x PBS (Kap. 2.3.4.1)
5% Magermilchpulver	0,5% Tween
0,5% Tween	

**Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten spezifischen Antikörper. Angegeben ist neben Bezeichnung, Typ, Hersteller und Antigen auch die im Western Blot eingesetzte Verdünnung des jeweiligen Antikörpers.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Antigen</b>	<b>Verdünnung</b>
GAPDH (6C5): sc-32233	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen GAPDH	1:7500
Anti <i>Strep</i> - Tag®II	Kaninchen, polyklonal	IBA GmbH	<i>Strep</i> -Tag® II	1:5000
Anti-SV2A	Kaninchen, polyklonal	Synaptic Systems	Peptid 2-17 in hSV2A	1:1000
SV2C (P-20): sc-11946	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology	C-terminales Peptid	1:1000
Anti-VACHT	Kaninchen, polyclonal	Sigma	Peptid 512-530 rVACHT	1:1000
Anti-SNAP-25	Maus, monoklonal, Klon 71.2	Synaptic Systems	Peptid 1-20 rSNAP-25	1:10000
Anti-Syntaxin	Maus, monoklonal, Klon HPC-1	Sigma	Plasmamembran	1:10000

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung potentieller Proteinrezeptoren

BoNT/B und G binden den luminalen Abschnitt der vesikulären Membranproteine Synaptotagmin I und II und werden auf diese Weise in ihre Zielzellen aufgenommen (Kap. 1.2.2.3 und 4.2; Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde deshalb gezielt überprüft, ob andere Proteine aus der Membran synaptischer Vesikel ebenfalls in der Lage sind, mit einem der verbleibenden BoNT H<sub>C</sub>-Fragmente oder dem TeNT H<sub>C</sub>-Fragment zu interagieren und als Proteinrezeptoren zu fungieren. Dabei galt die Arbeitshypothese, dass ein potentieller Proteinrezeptor mindestens einmal die Vesikelmembran durchspannen und einen etwa 20 Aminosäuren großen luminalen Abschnitt besitzen muss, um mit den CNT in Wechselwirkung treten zu können. Anhand der Charakterisierung ihrer Membrantopologie in der Literatur wurden Proteine, die diese Kriterien erfüllen, ausgewählt und ihre Funktion als potentieller Proteinrezeptor für die CNT analysiert.

Proteine aus der Membran synaptischer Vesikel, die die vorgenannten Kriterien erfüllen, sind neben Synaptotagmin die Mitglieder der Familie der Tetraspanine, Synaptophysin, Synaptoporin (Synaptophysin II), Synaptogyrin I und Synaptogyrin 3. Die Funktion der Tetraspanine ist weitgehend unbekannt. Ihr Name leitet sich von der Struktur ihrer Mitglieder ab, denn alle durchspannen die Vesikelmembran vier Mal. Ihre N- und C-Termini liegen im Zytosol, so dass es zwei schleifenförmige luminalen Abschnitte gibt, die gemäß der Arbeitshypothese beide als potentielle Proteinrezeptoren für die CNT in Frage kamen. Weiterhin wurden die drei Isoformen des synaptischen Vesikelproteins 2 (SV2A, SV2B und SV2C) als mögliche Proteinrezeptoren in Betracht gezogen. Alle SV2 durchspannen die Vesikelmembran zwölf Mal und besitzen zwischen der siebten und achten Transmembrandomäne einen ausgedehnten luminalen Abschnitt, der möglicherweise mit den CNT interagieren kann. Während die bisher genannten Proteine alle zu den sogenannten *trafficking proteins* synaptischer Vesikel gehören (Abbildung 18; Fernandez-Chacon & Sudhof, 1999), findet man weitere potentielle Proteinrezeptoren auch in der Gruppe der Neurotransmittertransporter, die den im Zytosol synthetisierten Neurotransmitter in die synaptischen Vesikel hinein transportieren. Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT), der für den Transport von Acetylcholin verantwortlich ist, durchspannt die Vesikelmembran zwölf Mal und besitzt zwischen der ersten und zweiten

Transmembrandomäne einen ausgedehnten luminalen Abschnitt. Ein deutlich kleinerer luminaler Abschnitt zwischen der siebten und achten Transmembrandomäne könnte möglicherweise ebenfalls an einer Interaktion mit CNT beteiligt sein. Der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT, auch: VIAAT für engl. *vesicular inhibitory amino acid transporter*), der  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Glutamat transportiert, durchspannt die Vesikelmembran zehn Mal und besitzt größere luminalen Abschnitte zwischen der ersten und zweiten und der siebten und achten Transmembrandomäne. Neurotransmittertransporter sind in der Regel Protonen-Antiporter, die den Neurotransmitter im Austausch gegen Protonen durch die Vesikelmembran befördern. Der dazu erforderliche Protonengradient wird durch die vesikuläre ATPase erzeugt. Auch dieser aus mehreren Komponenten bestehende Proteinkomplex besitzt in seiner A1-Untereinheit luminal exponierte Abschnitte, die als Proteinrezeptoren in Frage kamen. Alle anderen Komponenten der vesikulären ATPase sind zytosolisch exponiert und wurden nach der Arbeitshypothese nicht als potentielle Proteinrezeptoren in Betracht gezogen.

In dieser Arbeit wurden Plasmide zur rekombinanten Expression der luminalen Abschnitte potentieller Proteinrezeptoren als GST-Fusionsproteine konstruiert. Die Plasmide enthalten neben der kodierenden Sequenz für GST, die des jeweiligen luminalen Abschnitts einschließlich der sich in C-terminaler Richtung anschließenden Transmembrandomäne. Die Klonierungen erfolgten wie in Abschnitt 2.1.9 angegeben. Abbildung 11 fasst die in dieser Arbeit initial klonierten und exprimierten Konstrukte zusammen.

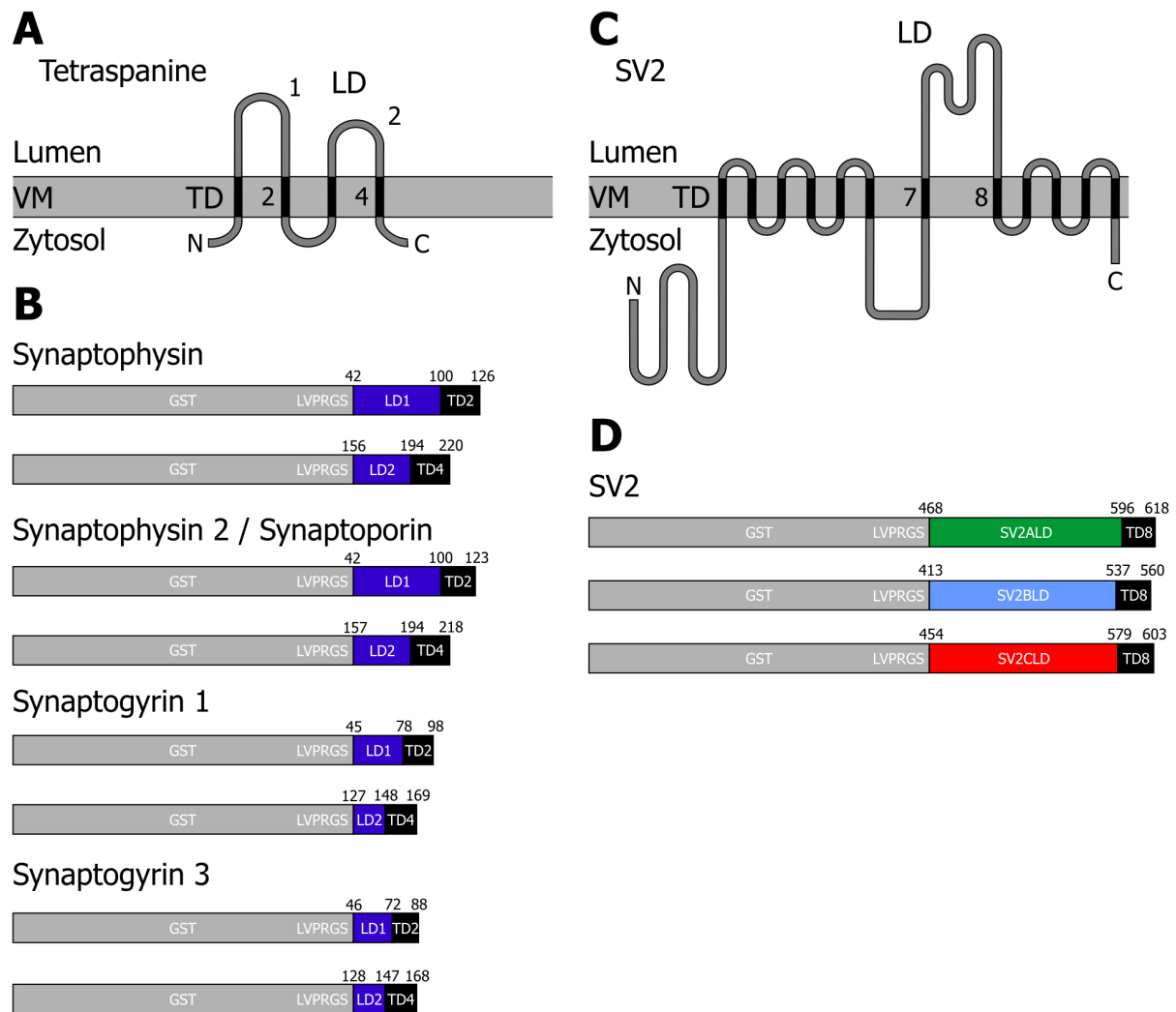
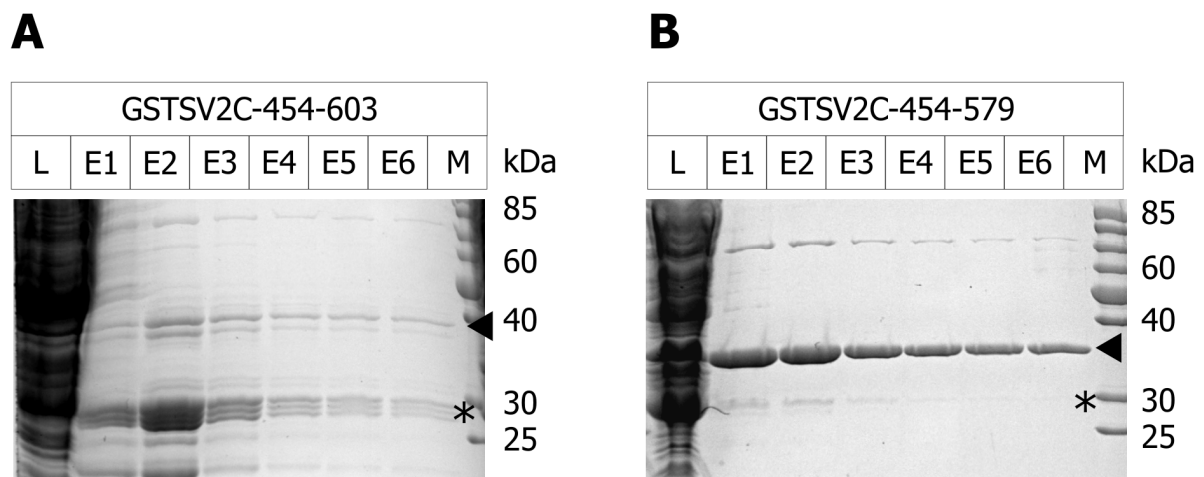


Abbildung 11: Übersicht über die ausgewählten potentiellen Rezeptorproteine und die in dieser Arbeit initial klonierten DNA-Konstrukte. (A) Schematische Darstellung der Membrantopologie der Tetraspanine. Tetraspanine durchspannen die Vesikelmembran (VM) vier Mal und besitzen zytosolische N- und C-Termini. (B) Von den Tetraspaninen abgeleitete DNA-Konstrukte zur Expression von GST-Fusionsproteinen ihrer luminalen Abschnitte (LD, engl. *luminal domain*). (C) Schematische Darstellung der Membrantopologie der SV2 Proteine. Die SV2 enthalten zwölf Transmembrandomänen (TD) und einen großen luminalen Abschnitt zwischen der siebten und achten Transmembrandomäne. (D) Von den SV2 abgeleitete DNA-Konstrukte zur Expression von GST-Fusionsproteinen der luminalen Abschnitte.

### 3.2 Expression potentieller Proteinrezeptoren

Die in Abschnitt 3.1 beschriebenen GST-Fusionsproteine wurden gemäß der Abschnitte 2.2.1 und 2.2.3 rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Die Ausbeuten betragen dabei in der Regel nur etwa 300 µg/l Kulturvolumen an löslichem GST-Fusionsprotein. Im Fall von SV2 lagen die Ausbeuten mit 50-100 µg/l sogar noch deutlich darunter (Abbildung 12A). In den meisten Fällen dürfte die C-terminale Transmembrandomäne zu einer hohen Hydrophobizität des gesamten Fusionsproteins geführt haben, wodurch das Löslichkeitsprodukt relativ schnell

überschritten wurde und überschüssiges Protein präzipitierte. Im Fall von SV2 kommt hinzu, dass die luminalen Bereiche als solche bereits stark hydrophoben Charakter besitzen, was die Ausbeute an löslichem Protein zusätzlich vermindert hat. Abbildung 12 zeigt beispielhaft den Unterschied in der Expression des luminalen Abschnitts von SV2C mit und ohne C-terminale Transmembrandomäne.



**Abbildung 12:** Vergleich der Expression von luminalen Abschnitten mit und ohne Transmembrandomäne am Beispiel von GST-SV2C-454-603 bzw. GST-SV2C-454-579. (A) Bei der Aufreinigung des Konstruktes mit Transmembrandomäne lag die Ausbeute an löslichem Protein bei etwa 50-100 µg/l Kulturvolumen. Die Proteinpräparation war außerdem durch das Auftreten von Abbauprodukten verunreinigt. (B) Die Expression des entsprechenden Konstruktes ohne Transmembrandomäne lieferte deutlich höhere Ausbeuten von etwa 2,5 mg/l Kulturvolumen und eine reinere Proteinpräparation. Das \* markiert Abbauprodukte verschiedener Größe.

Das vermehrte Auftreten von Abbauprodukten bei der Expression von Konstrukten mit Transmembrandomäne (Abbildung 12) kann zusätzlich ein Hinweis auf eine falsche oder unvollständige Faltung des Fusionsproteins sein. Missgefaltete Proteine können leichter durch Proteasen hydrolysiert werden, was sich in der SDS-PAGE im Auftreten zahlreicher zusätzlicher Proteinbanden bemerkbar macht.

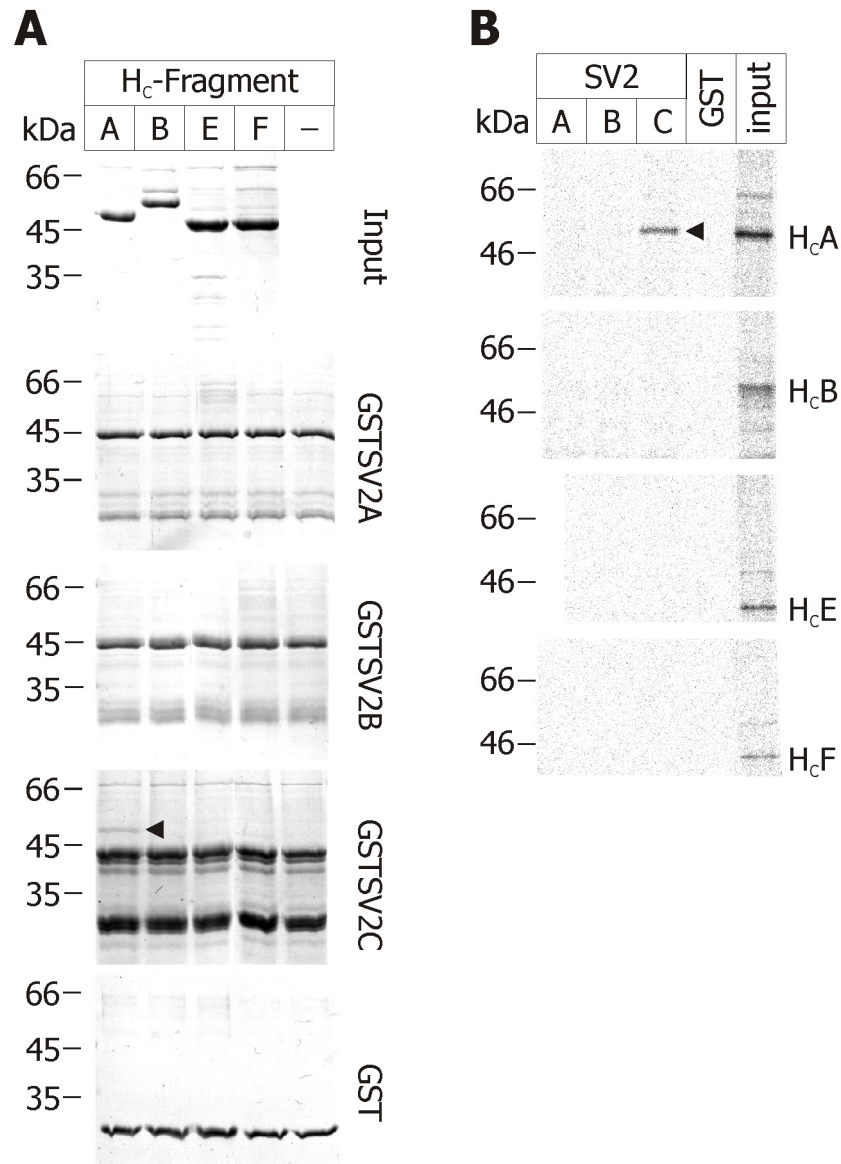
Um die Ausbeute an löslichem Protein zu steigern, wurden die Kulturen teilweise mit einer geringeren Konzentration von IPTG (0,1 mM, Kap. 2.2.1) induziert und bei niedrigeren Temperaturen inkubiert, damit das entsprechende Fusionsprotein möglichst langsam gebildet und nicht in Einschlusskörperchen abgelagert wird. Die Aufreinigung von Fusionsproteinen, die nicht für den Einsatz im MPN-Toxizitätsassay vorgesehen waren, wurde mit tritonhaltigen Puffern durchgeführt. Das Detergenz Triton X-100 kann schwer lösliche Proteine (z.B. auch Transmembranproteine) in Lösung halten und führte auch bei der rekombinanten Expression

der GST-Fusionsproteine zu einer höheren Ausbeute an löslichem Protein. Da Triton X-100 allerdings toxisch auf die Zwerchfellpräparationen (Kap. 2.3.3) wirkt und zu einem schnellen, neurotoxinunabhängigen Abfall der Kontraktionsamplitude führte, wurde das Detergenz nur dann eingesetzt, wenn die Fusionsproteine für den Einsatz in GST-Pulldown-Experimenten vorgesehen waren. Durch diese Maßnahmen konnten alle luminalen Abschnitte in ausreichender Menge produziert und für GST-Pulldown-Experimente eingesetzt werden.

### **3.3 Analyse rekombinanter Proteinrezeptoren**

#### **3.3.1 BoNT/A interagiert spezifisch mit SV2C**

Um zu untersuchen, ob die luminalen Abschnitte der ausgewählten potentiellen Proteinrezeptoren mit den BoNT bzw. TeNT H<sub>C</sub>-Fragmenten in Wechselwirkung treten können, wurden GST-Pulldown-Experimente, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die luminalen Abschnitte der potentiellen Proteinrezeptoren wurden als GST-Fusionsproteine rekombinant exprimiert, aufgereinigt und mit rekombinantem BoNT/A, B, C, D, E, F, G und TeNT H<sub>C</sub> inkubiert. Die im Pellet enthaltenen Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Autoradiographie der <sup>35</sup>S-markierten H<sub>C</sub>-Fragmente analysiert.



**Abbildung 13: Das H<sub>C</sub>-Fragment von BoNT/A (BoNT/A H<sub>C</sub>) bindet an SV2C.** GST-SV2-Konstrukte, die in diesem Experiment eingesetzt wurden, enthielten den kompletten luminalen Abschnitt einschließlich der C-terminal folgenden Transmembranomäne (Abbildung 11D). (A, B) GST-Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und in der Gegenwart von Gangliosiden mit rekombinanten (A) oder *in vitro* translatierten <sup>35</sup>S-markierten (B) BoNT H<sub>C</sub> inkubiert. Gebundenes Protein wurde durch Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue* (A) oder durch Autoradiographie (B) sichtbar gemacht. Gebundenes BoNT/A H<sub>C</sub> ist durch ein ◀ markiert.

Keines der untersuchten Proteine aus der Familie der Tetraspanine (Synaptophysin, Synaptoporin (Synaptophysin II), Synaptogyrin I und Synaptogyrin 3) war in der Lage mit einem BoNT H<sub>C</sub> in Wechselwirkung zu treten (Daten nicht gezeigt). Von den analysierten Isoformen der SV2 Proteine konnte allein GST-SV2C-454-603 BoNT/A H<sub>C</sub> binden (Abbildung 13A). Weder BoNT/E und F H<sub>C</sub>, die die nächsten Verwandten zum BoNT/A H<sub>C</sub>



darstellen (Abbildung 4), noch BoNT/C und D H<sub>C</sub> interagierten mit einem der hier untersuchten Proteine (Abbildung 13 bzw. Daten nicht gezeigt). Um die Sensitivität der Experimente zu verbessern, wurden die Untersuchungen mit *in vitro* translatierten <sup>35</sup>S-markierten BoNT H<sub>C</sub> ohne Affinitätstags wiederholt. Wiederum wurde eine Wechselwirkung nur zwischen BoNT/A H<sub>C</sub> und GST-SV2C-454-603 detektiert (Abbildung 13B). Diese Wechselwirkung war spezifisch, da BoNT/B und G H<sub>C</sub>, die in diesen Experimenten als Negativkontrollen dienten, nicht mit SV2C interagierten. Anders als die Interaktion zwischen BoNT/B und Syt I, die von der Anwesenheit von Gangliosiden abhängig ist (Rummel *et al.*, 2004), scheint die Wechselwirkung zwischen BoNT/A H<sub>C</sub> und SV2C unabhängig von Gangliosiden zu sein (Daten nicht gezeigt).

### **3.3.2 BoNT/A bindet den C-terminalen Bereich des luminalen Abschnitts von SV2C**

Um den Bereich des luminalen Abschnitts von SV2C zu ermitteln, der die Interaktion mit BoNT/A H<sub>C</sub> vermittelt, wurden C-terminale Verkürzungen des luminalen Abschnitts von SV2C als GST-Fusionsproteine exprimiert, aufgereinigt und in GST-Pulldown-Experimenten auf Bindung an BoNT/A H<sub>C</sub> getestet (Abbildung 14). Die Wechselwirkung zwischen BoNT/B H<sub>C</sub> und Syt II diente dabei als Positivkontrolle.

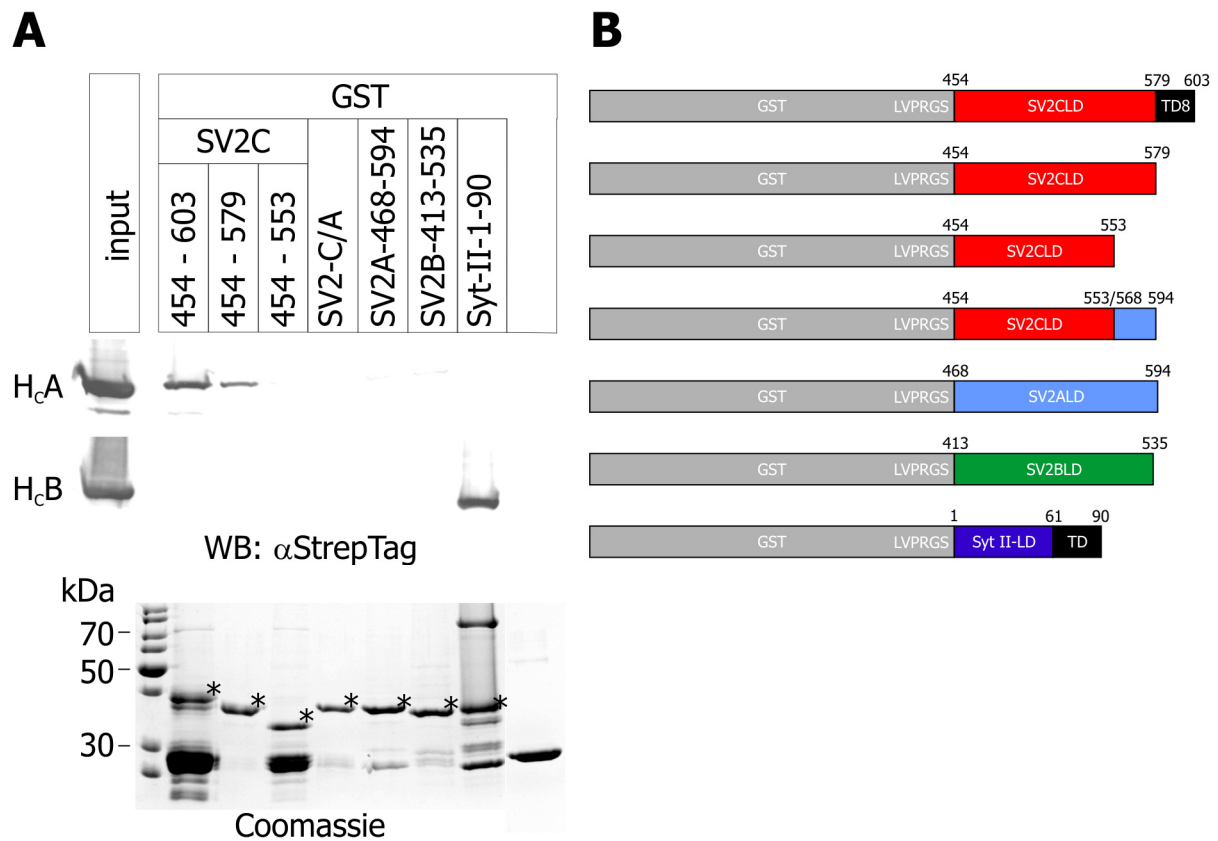


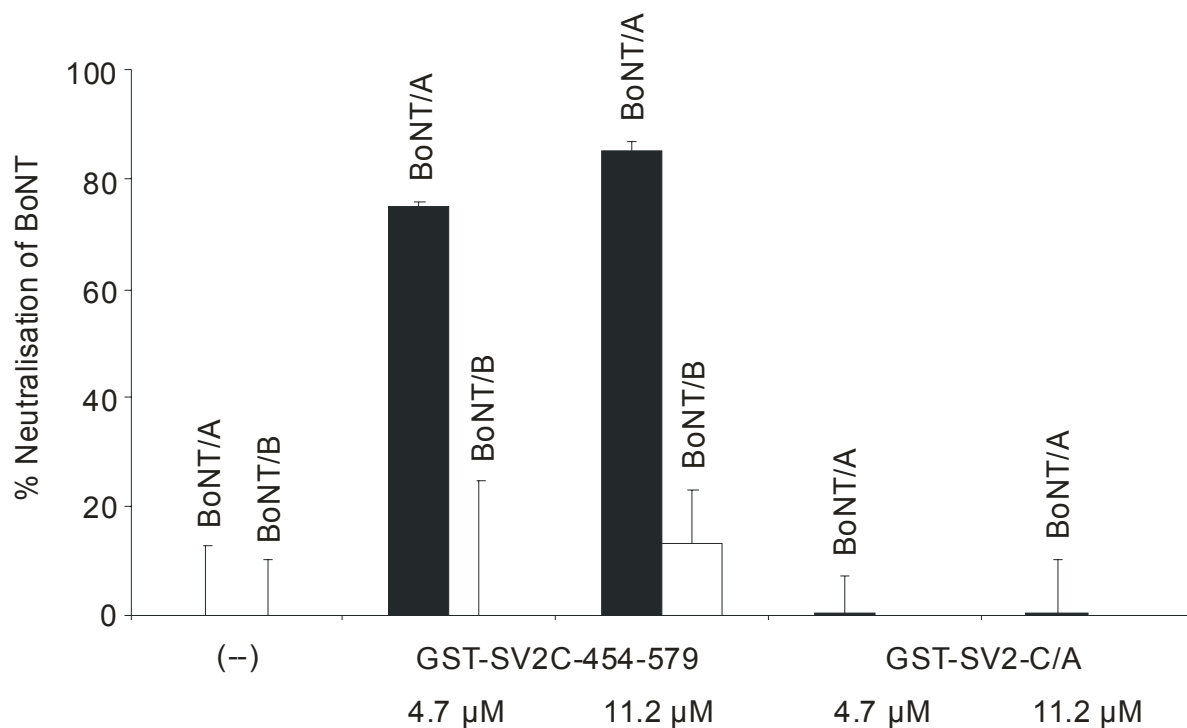
Abbildung 14: Die Bindungsstelle von BoNT/A H<sub>C</sub> im luminalen Abschnitt von SV2C befindet sich innerhalb der C-terminalen 26 Aminosäuren. (A, obere Tafel) Gebundenes BoNT H<sub>C</sub> wurde im Western Blot durch ein polyklonales Antiserum gegen den im Protein enthaltenen *Strep-Tag*®II detektiert. (A, untere Tafel) Zur Kontrolle wurden die eingesetzten Fusionsproteine durch Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue* sichtbar gemacht. Das \* markiert die gewünschten GST-Fusionsproteine. (B) Übersicht über die analysierten C-terminalen Verkürzungen des luminalen Abschnitts (LD) von SV2C. Diese wurden als GST-Fusionsproteine aufgereinigt, an Glutathion-Sepharose gebunden und in der Gegenwart von Gangliosiden mit rekombinanten BoNT H<sub>C</sub> inkubiert.

BoNT/A H<sub>C</sub> bindet an GST-SV2C-454-603 und an GST-SV2C-454-579, das um die Transmembrandomäne verkürzt wurde, nicht aber an eine der weiteren C-terminalen Verkürzungen des luminalen Abschnitts von SV2C (Abbildung 14A). Wie schon bei der Wechselwirkung zwischen Syt I und II und BoNT/B und G sind auch bei der Interaktion zwischen BoNT/A und SV2C die direkt an die Transmembrandomäne angrenzenden Aminosäuren essentiell für die Bindung. Um auszuschließen, dass die C-terminalen Verkürzungen die Struktur des luminalen Abschnitts zerstören und auf diese Weise eine Bindung des BoNT/A H<sub>C</sub> verhindern, wurde ein hybrider luminaler Abschnitt konstruiert, in dem die 26 C-terminalen Aminosäuren von SV2C gegen die homologen Aminosäuren aus SV2A ausgetauscht wurden (GST-SV2-C/A, Abbildung 14B). Weil damit die Bindungsstelle für BoNT/A H<sub>C</sub> zumindest teilweise verändert ist, kann GST-SV2-C/A nicht an BoNT/A H<sub>C</sub>

binden, was die Ergebnisse der GST-Pulldown-Experimente mit den C-terminalen Verkürzungen unterstützt.

### **3.3.3 SV2C inhibiert die Aktivität von BoNT/A im MPN-Toxizitätsassay**

Vom luminalen Abschnitt von Synaptotagmin I oder II abgeleitete Peptide sind in der Lage, die Toxizität von BoNT/B und G im MPN-Toxizitätsassay zu reduzieren, da die Peptide die Rezeptorbindungsstelle im H<sub>C</sub>-Fragment blockieren (Rummel *et al.*, 2004). Eine solche Reduktion der Neurotoxizität durch vom Proteinrezeptor abgeleitete Peptide ist ein Hinweis auf die physiologische Relevanz der untersuchten Wechselwirkung zwischen Proteinrezeptor und BoNT H<sub>C</sub>. Um die physiologische Bedeutung der neu entdeckten Interaktion zwischen BoNT/A H<sub>C</sub> und SV2C für die Endozytose und Aufnahme des Neurotoxins zu demonstrieren, wurde überprüft, ob der luminale Abschnitt von SV2C die Neurotoxizität von BoNT/A blockieren kann.



**Abbildung 15:** Der luminale Abschnitt von SV2C reduziert die Aktivität von BoNT/A im MPN-Toxizitätsassay. BoNT/A (0,22 nM) oder BoNT/B (1 nM) wurde mit GST-SV2C-454-579 oder GST-SV2-C/A für 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend dem Organbad hinzugefügt. Die Kontraktionen des Zwerchfells wurden aufgezeichnet und analysiert. Die Zeit, die erforderlich ist, um die Kontraktionsamplitude auf 50% des Anfangswertes (paralytische Halbwertszeit) zu verringern, wurde bestimmt und in die verbleibende Toxizität im Verhältnis zum unbehandelten Neurotoxin gemäß Abschnitt 2.3.3 umgerechnet. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei bis neun Messungen.

Im ersten Experiment wurde BoNT/A alleine in einer Konzentration von 0,22 nM eingesetzt. Dies führte zu einer paralytischen Halbwertszeit von  $50 \pm 7$  Minuten. In Gegenwart von  $4,7 \mu\text{M}$  GST-SV2C-454-579 verlängerte sich die paralytische Halbwertszeit von BoNT/A auf  $72 \pm 3$  Minuten, was einer 75%igen Reduktion der Neurotoxizität entspricht. Die Erhöhung der Konzentration von GST-SV2C-454-579 auf  $11,2 \mu\text{M}$  verlängerte die paralytische Halbwertszeit abermals auf  $83 \pm 8$  Minuten, entsprechend einer 85%igen Reduktion der Neurotoxizität (Abbildung 15). Die inhibitorische Wirksamkeit von GST-SV2C-454-579 ist spezifisch für BoNT/A, da die gleichen Konzentrationen des Fusionsproteins nicht zu einer Verlängerung der paralytischen Halbwertszeit von 1 nM BoNT/B führten (Abbildung 15), das erwiesenermaßen nicht mit SV2C interagiert (Abbildung 14A). Um die Spezifität des MPN-Toxizitätsassays weiter zu dokumentieren, prüften wir die inhibitorische Wirksamkeit des GST-SV2-C/A Hybrids. In Übereinstimmung mit den Resultaten der GST-Pulldown-Experimente (Abbildung 14) hatte das hybride Molekül keinen Einfluss auf die Neurotoxizität

---

von BoNT/A. Die paralytischen Halbwertszeiten blieben unverändert bei  $51 \pm 4$  oder  $51 \pm 5$  Minuten in Anwesenheit von  $4,7 \mu\text{M}$  bzw.  $11,2 \mu\text{M}$  GST-SV2-C/A und entsprachen damit der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 15). Dieses Resultat und die Wirkungslosigkeit des luminalen Abschnitts von Syt II auf die Toxizität von BoNT/A (Rummel *et al.*, 2004) zeigen in einem physiologischen Testsystem, dass die Inhibition von BoNT/A durch GST-SV2C-454-579 spezifisch ist und keine anderen physiologischen Prozesse im Testsystem behindert.

### 3.4 Zellsystem und RNA Interferenz (RNAi)

Das vorangegangene Experiment zeigt, dass von SV2C abgeleitete Peptide in der Lage sind, an BoNT/A zu binden und die Toxizität von BoNT/A zu blockieren. Es beweist allerdings nicht, dass SV2C für die Intoxikation mit BoNT/A absolut notwendig ist. Eine solche Demonstration wäre mit Hilfe des MPN-Toxizitätsassays nur durch Verwendung von Mäusen möglich, denen das Gen für SV2C fehlt (engl. *knock-out*) und die folglich kein SV2C mehr exprimieren können. Derart gentechnisch veränderte Mäuse standen im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Um trotzdem demonstrieren zu können, dass SV2C essentiell für die Aufnahme von BoNT/A ist, wurden in dieser Arbeit Zelllinien verwendet (Kap. 2.3.4), in denen die Expression von SV2C durch transiente Transfektion von siRNA (Kap. 2.3.4.2) reduziert war (engl. *knock-down* durch RNA Interferenz (RNAi), Meister & Tuschl, 2004). Derart veränderte Zellen wurden mit BoNT/A behandelt und die Aktivität des Neurotoxins anhand der Hydrolyse seines Substrates SNAP-25 bestimmt. Gleichzeitig wurde das Ausmaß der Substratspaltung durch BoNT/A in Kontrollzellen bestimmt, die mit einer unspezifischen siRNA transfiziert wurden (Kap. 2.3.4.4).

Zelllinien, wie die in dieser Arbeit verwendeten PC12- und N2A-Zelllinien, besitzen im Vergleich zu kultivierten primären Neuronen oder neuromuskulären Präparaten wie dem Zwerchfell der Maus eine verhältnismäßig geringe Sensitivität gegenüber den CNT. Zum einen handelt es sich bei diesen Zelllinien nicht um ausdifferenzierte, aktive Neurone, sondern lediglich um ruhende Zellen neuronaler Herkunft. Zum anderen synthetisieren Zellen in Kultur möglicherweise weniger Gangliosid und (Protein-)Rezeptor als ausdifferenzierte Neurone. Da die Aufnahme von CNT aktivitätsabhängig erfolgt und Gangliosid- und (Protein-)Rezeptoren erfordert (Kap. 1.2.2.3), ergibt sich für Zelllinien eine geringere Sensitivität gegenüber den CNT. N2A- und PC12-Zellen wurden deshalb in dieser Arbeit vor

der Durchführung von Aktivitätsbestimmungen mit gangliosidhaltigem Medium inkubiert, um ihre Sensitivität zu steigern. Zusätzlich zur Gangliosidbehandlung wurden PC12-Zellen durch Behandlung mit NGF differenziert, was ihre Sensitivität weiter erhöhte.

Die in dieser Arbeit verwendete Neuro-2A-Zelllinie (Kap. 2.3.4) wurde zunächst durch die Verwendung isoformspezifischer Antikörper im Western Blot auf die Expression der SV2-Isoformen überprüft. Neuro-2A-Zellen exprimieren neben SV2C auch SV2A, aber kein SV2B (Abbildung 16A). Da BoNT/A H<sub>C</sub> weder SV2A noch SV2B binden konnte (Abbildung 13B), wurden Neuro-2A-Zellen mit SV2C-spezifischer siRNA transfiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Verminderung der Expression von SV2C durch RNAi nur eine sehr geringe Abnahme der Substratspaltung zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass SV2A nicht doch einen Beitrag zur Bindung und Aufnahme von BoNT/A in Neuro-2A-Zellen leistet, wurden Neuro-2A-Zellen gleichzeitig mit siRNA gegen SV2A und SV2C transfiziert. Die Ergebnisse dieser zellbasierten Toxizitätsbestimmungen sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

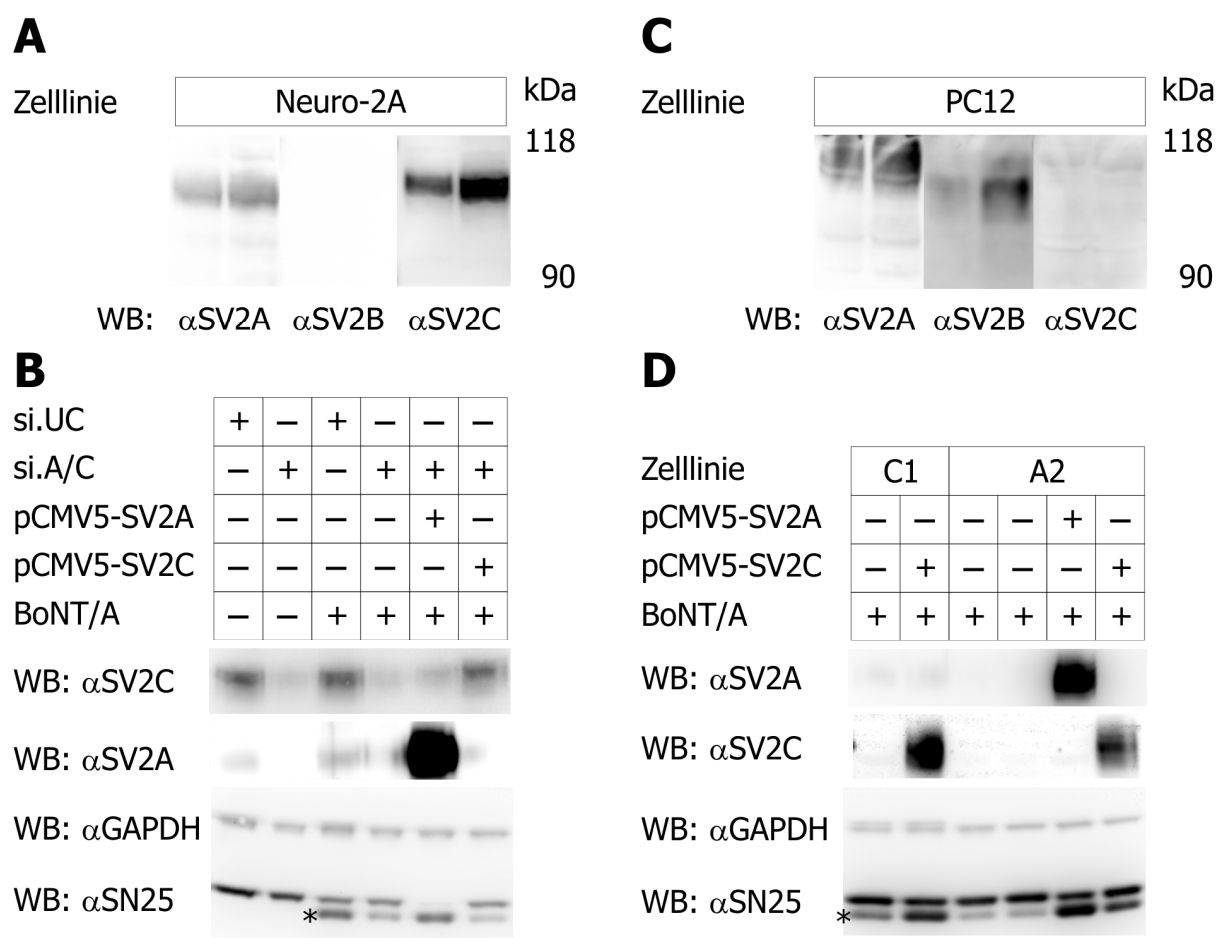


Abbildung 16: Die Reduktion von SV2A bzw. SV2C in PC12- bzw. Neuro-2A-Zellen durch RNAi führt zu einer Verminderung der Suszeptibilität gegenüber BoNT/A. (A, C) Die Expression der SV2-Isoformen in den verwendeten PC12- und Neuro-2A-Zelllinien wurde im Western Blot analysiert, wobei jeweils 25 und 50  $\mu$ g Gesamtprotein auf das SDS-Gel aufgetragen wurden. (B) Neuro-2A-Zellen wurden mit einem Pool von siRNAs gegen SV2A und SV2C (si.A/C) oder mit unspezifischer siRNA (si.UC) transient transfiziert und mit BoNT/A behandelt. (D) PC12-Zellen wurden stabil mit einem Plasmid transfiziert, das die *in situ* Expression zweier SV2A-spezifischer miRNAs erlaubt. Zelllinien mit reduzierter SV2A-Expression und Kontrollzellen wurden mit BoNT/A behandelt. (B, D) Die verbleibende Suszeptibilität der *knock-down*-Zellen gegenüber BoNT/A wurde anhand der Spaltung von SNAP-25 bestimmt. Das \* markiert das Spaltprodukt, das durch Hydrolyse von SNAP-25 durch BoNT/A entsteht. Abkürzungen: A2, stabil transfizierte Zelllinie, die ein Plasmid enthält, das die *in situ* Expression zweier SV2A-spezifischer miRNAs erlaubt; C1, stabil transfizierte Kontrollzelllinie, die ein entsprechendes Plasmid mit unspezifischer miRNA enthält; WB, Western Blot mit den angegebenen Antikörpern (Kap. 2.3.4.5); SN25, SNAP-25; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase als Ladekontrolle.

Die Reduktion der Expression von SV2A und SV2C durch transiente Transfektion von entsprechender siRNA führte in Neuro-2A-Zellen zu einer deutlich verringerten Spaltung von SNAP-25 (Abbildung 16B, Spur 4 im Vergleich zu Spur 3). Der Effekt dieses *knock-downs* ließ sich durch die zusätzliche Transfektion eines Plasmids, das die Überexpression von SV2A erlaubt, umkehren (engl. *knock-down & rescue*), so dass wieder deutlich mehr SNAP-25 gespalten wurde (Abbildung 16B, Spur 5). Die analoge Überexpression von SV2C führte in Neuro-2A-Zellen erstaunlicherweise nicht zu einer Wiederherstellung der

Substratspaltung (Abbildung 16B, Spur 6, Kap. 4.1). Trotzdem deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass nicht nur SV2C, sondern auch SV2A die Bindung und Aufnahme von BoNT/A vermitteln kann.

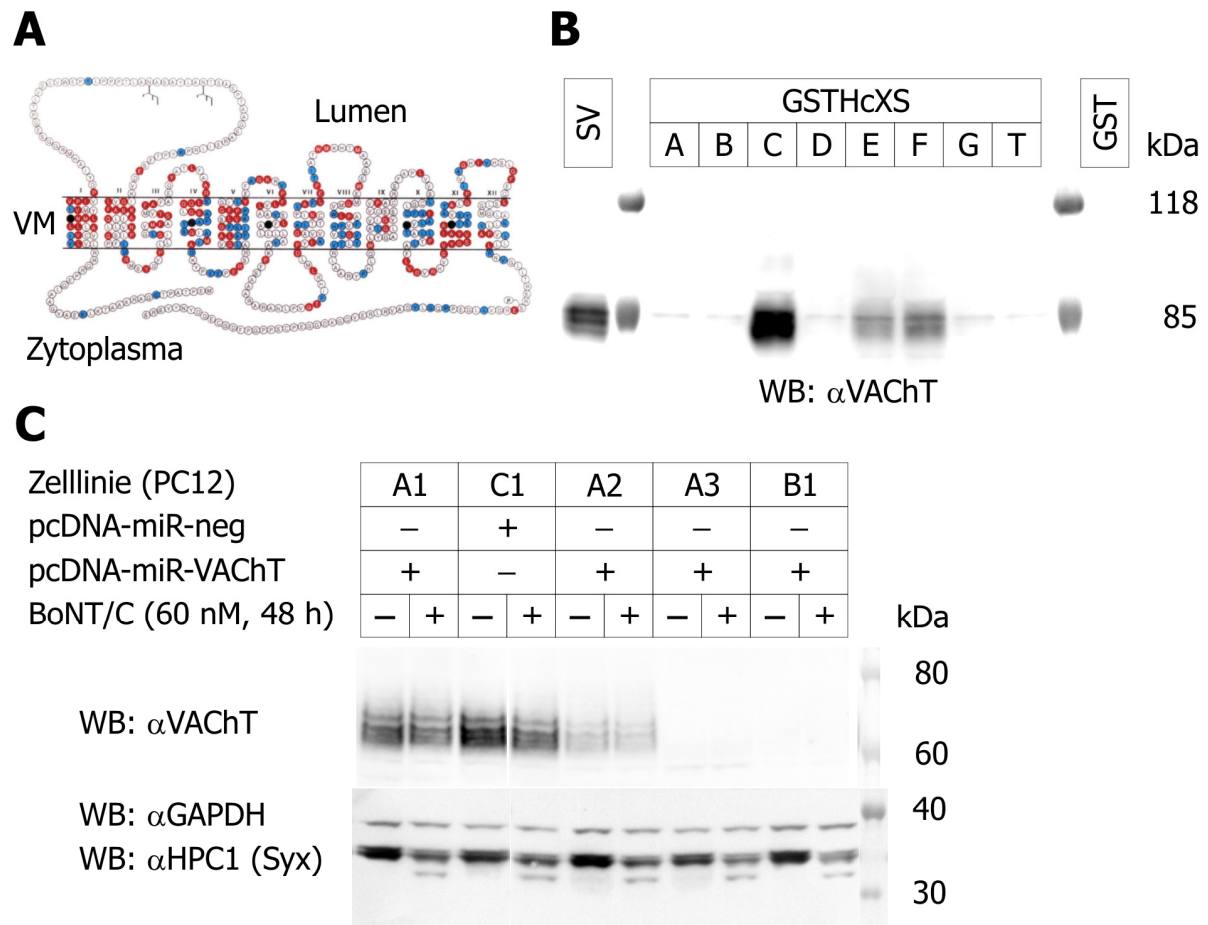
Da PC12-Zellen, ebenso wie Neuro-2A-Zellen suszeptibel gegenüber BoNT/A sind, wurden auch PC12-Zellen mit Hilfe eines Western Blots auf die Expression der SV2-Isoformen überprüft. Die in dieser Arbeit verwendete PC12-Zelllinie (Kap. 2.3.4) exprimiert SV2A und geringe Mengen SV2B (Abbildung 16C (Mitte), der Western Blot gegen SV2B ist etwa zehn Mal länger exponiert als der gegen SV2A), aber kein SV2C. Die transiente Transfektion von Plasmid-DNA und/oder siRNA mit Hilfe der üblichen Transfektionsreagenzien liefert in PC12-Zellen nur sehr geringe Transfektionseffizienzen und damit nur geringe Abnahmen der Expression von SV2A. In dieser Arbeit wurden deshalb stabil transfizierte PC12-Zelllinien etabliert, in denen die Expression von SV2A konstitutiv verringert war. Die Reduktion der Expression von SV2A in PC12-Zellen führte zu einer Abnahme der Spaltung von SNAP-25 (Abbildung 16D, Spur 3 und 4 im Vergleich zu Spur 1). Anders als in Neuro-2A-Zellen führte in PC12-Zellen die Überexpression sowohl von SV2A als auch SV2C zu einer Umkehrung des Effekts und zu einer deutlich gesteigerten Spaltung von SNAP-25 (engl. *knock-down & rescue*, Abbildung 16D, Spur 2, 5 und 6). Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl SV2A als auch SV2C Bindung und Aufnahme von BoNT/A vermitteln können.

### **3.5 GST-Pulldown aus nativem Material**

Einen alternativen experimentellen Ansatz zur Identifikation weiterer Proteinrezeptoren für die CNT stellt das in Abschnitt 2.3.2 beschriebene im Vergleich zu Abschnitt 2.3.1 quasi umgekehrte GST-Pulldown-Experiment dar. Nicht die luminalen Abschnitte ausgewählter potentieller Proteinrezeptoren werden als GST-Fusionsproteine verwendet, sondern die BoNT bzw. TeNT H<sub>C</sub>-Fragmente werden als GST-Fusionsproteine produziert, an Glutathion-Sepharose gebunden und schließlich mit solubilisierten synaptischen Vesikeln inkubiert. Proteine, die mit den BoNT bzw. TeNT H<sub>C</sub>-Fragmenten interagieren, sollten sich auf diese Weise isolieren lassen. Die Identifikation von isolierten Proteinen kann schließlich wahlweise durch massenspektroskopische Methoden oder, wie in dieser Arbeit, durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Proteinkomponenten synaptischer Vesikel im Western Blot erfolgen. Die Proteine aus solubilisierten synaptischen Vesikeln sind posttranslational modifiziert und besitzen ihre native Konformation. Da nicht auszuschließen ist, dass zum



Beispiel Glykosylierungen oder bestimmte Tertiärstrukturelemente für die Interaktion mit den CNT essentiell sind, ist die Verwendung von Proteinen aus einer nativen Quelle ein Vorteil gegenüber binären GST-Pulldown-Experimenten mit rekombinant in *E.coli* produzierten luminalen Abschnitten, die unmodifiziert vorliegen und möglicherweise nicht ihre native Faltung besitzen. Abbildung 17 fasst die Ergebnisse eines GST-Pulldown-Experimentes mit solubilisierten synaptischen Vesikeln und die der nachfolgenden Untersuchungen zusammen.



**Abbildung 17:** Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT) ist nicht der Proteinrezeptor für BoNT/C. (A) Schematische Darstellung des VACHT aus Erickson *et al.*, 1994. Das Protein durchspannt die Vesikelmembran (VM) zwölf Mal und besitzt größere luminalen Abschnitte zwischen der ersten und zweiten und der siebten und achten Transmembrandomäne. VACHT ist ein spezifischer Marker für cholinerge Neurone, wie beispielweise Motoneuronen. Nach der Arbeitshypothese stellt VACHT damit einen idealen Proteinrezeptor für die CNT dar. (B) GST-Pulldown-Experiment aus nativem Material. GST-BoNT H<sub>C</sub>-Fragmente wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und mit solubilisierten synaptischen Vesikeln inkubiert. Gebundenes VACHT wurde im Western Blot detektiert. (C) Es wurden stabil transfizierte PC12-Zelllinien etabliert, die ein Plasmid enthalten, das die *in situ* Expression dreier VACHT-spezifischer (Zelllinie A1, A2, A3 und B1) oder einer unspezifischen miRNA (Zelllinie C1) erlaubt. Die Zellen wurden mit BoNT/C behandelt und die Spaltung von Syntaxin im Western Blot detektiert. Die Abnahme der VACHT-Expression ist im Western Blot gezeigt. Die Suszeptibilität der PC12-Zelllinien gegenüber BoNT/C ist unabhängig von der VACHT-Expression. Abkürzungen: VM, Vesikelmembran; SV, synaptische Vesikel; WB, Western Blot; Syx, Syntaxin.

---

Alle BoNT und TeNT H<sub>C</sub>-Fragmente wurden gemäß Abschnitt 2.3.2 auf Bindung an Proteine aus synaptischen Vesikeln untersucht. GST-BoNT/C, E und F H<sub>C</sub>, für die bisher keine Proteinrezeptoren indentifiziert werden konnten, waren in der Lage, den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VACHT) zu binden (Abbildung 17B). Allerdings konnte im umgekehrten binären GST-Pulldown-Experiment nach Abschnitt 2.3.1 keine Wechselwirkung zwischen GST-VACHT-58-146 und BoNT/C, E und F H<sub>C</sub> nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch ein GST-Fusionsprotein, das neben dem luminalen Abschnitt zwischen Transmembrandomäne eins und zwei zusätzlich den Abschnitt zwischen Transmembrandomäne sieben und acht enthält (GST-VACHTLD1SLD4, Abbildung 17A), zeigte keine Affinität zu BoNT/C, E und F H<sub>C</sub> (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde versucht, die Neurotoxizität von BoNT/C und E im MPN-Toxizitätsassay durch Inkubation mit GST-VACHT-58-123 oder gar mit isoliertem Peptid VACHT-58-123, das durch Spaltung des GST-Fusionsproteins mit Thrombin erzeugt wurde, zu blockieren. Weder das GST-Fusionsprotein noch das isolierte Peptid besaßen eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber BoNT/C oder E (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass die beschriebenen Experimente nicht durch das Fehlen posttranslationaler Modifikationen oder falsche Faltung des luminalen Abschnitts des vesikulären Acetylcholin-Transporters scheiterten, wurden schließlich stabil transfizierte PC12-Zelllinien etabliert, in denen drei VACHT-spezifische miRNAs konstitutiv exprimiert werden. Die Abnahme der Expression von VACHT in den verschiedenen etablierten Zelllinien durch RNAi ist in Abbildung 17C gezeigt. In einigen Zelllinien war die Expression von VACHT so stark reduziert, dass das Protein im Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 17, Zelllinien A3 und B1). Die Analyse der Spaltung von Syntaxin, nach Behandlung der Zellen mit BoNT/C, zeigte allerdings, dass unabhängig von der Ausstattung der Zellen mit VACHT das Ausmaß der Substratspaltung immer gleich ist. Daher ist davon auszugehen, dass Aufnahme und Aktivität von BoNT/C und E unabhängig vom vesikulären Acetylcholin-Transporter sind und dieser deshalb nicht den spezifischen Proteinrezeptor für BoNT/C, E oder F darstellt.

In dieser Arbeit wurden weiterhin die luminalen Abschnitte des Glycin- und GABA-Transporters VIAAT (Kap. 3.1) auf Bindung, besonders des TeNT H<sub>C</sub>-Fragments, überprüft. Da TeNT im Verlauf seines Wirkmechanismus in inhibitorische Interneurone (Kap. 1.2.2.4) gelangt, stellt der VIAAT einen möglichen Proteinrezeptor für TeNT auf der Oberfläche dieser Neurone dar. Schließlich wurden die drei luminalen Abschnitte der A1-Untereinheit der vesikulären ATPase (Kap. 3.1) auf Bindung an BoNT und TeNT H<sub>C</sub>-Fragmente

untersucht. Keiner dieser Proteinabschnitte war jedoch in der Lage, mit einem BoNT oder dem TeNT H<sub>C</sub>-Fragment in Wechselwirkung zu treten (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

Die Familie der clostridiellen Neurotoxine (CNT) besteht aus den sieben Serotypen des Botulinus Neurotoxins (BoNT/A-G) und dem Tetanus Neurotoxin (TeNT). Unter den bekannten natürlich vorkommenden Toxinen gehören die CNT zu den wirksamsten. Ihre LD<sub>50</sub> für den Menschen betragen nur wenige Nanogramm pro Kilogramm Körpergewicht (Schiavo *et al.*, 2000). Diese enorme Toxizität führte dazu, dass die CNT als potentielle Biowaffen (Kap. 1.3) klassifiziert wurden und ihre Verbreitung und Verwendung dem Kriegswaffenkontrollgesetz unterliegen (KrWaffKontrG<sup>7</sup>). Auf der anderen Seite werden die BoNT erfolgreich als Medikament gegen Krankheiten eingesetzt, deren Symptome durch hyperaktive Nervenendigungen hervorgerufen werden (Kap. 1.3). Die extreme Wirkung der CNT auf den lebenden Organismus beruht nicht nur auf ihrer enzymatischen Aktivität (Kap. 1.2.2.1) sondern auch auf ihrer Fähigkeit, spezifisch an die Membran neuronaler Zellen zu binden, von denen sie schließlich aufgenommen werden (Kap. 1.2.2.3). Daher ist es von großem wissenschaftlichem Interesse, die Rezeptormoleküle auf den Zelloberflächen zu identifizieren und ihre Wechselwirkung mit den CNT zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurden deshalb gezielt Membranproteine aus synaptischen Vesikeln auf ihre Fähigkeit hin untersucht, mit den CNT zu interagieren und als Proteinrezeptoren zu fungieren.

### 4.1 SV2 ist der Proteinrezeptor für Botulinus Neurotoxin A

Botulinus Neurotoxin A (BoNT/A) ist für die meisten Fälle von Botulismus beim Menschen verantwortlich. Gleichzeitig ist es heute vor BoNT/B das am häufigsten als Medikament eingesetzte BoNT (Kap. 1.3). Im Gegensatz zu BoNT/B, dessen Proteinrezeptor als Synaptotagmin I bzw. II identifiziert werden konnte, wurde der Bindungspartner von BoNT/A bisher nicht beschrieben. Die Identifizierung des Proteinrezeptors von BoNT/A ist der wichtigste Schritt bei der Aufklärung seiner Aufnahme in Neuronen und deshalb ein wichtiges Ziel bei der Erforschung des Wirkmechanismus von BoNT/A.

Die in dieser Arbeit durchgeführten GST-Pulldown-Experimente zeigen, dass BoNT/A H<sub>C</sub> in der Lage ist, den großen luminalen Abschnitt des synaptischen Vesikelproteins 2C (SV2C) zu binden (Abbildung 13). Die Interaktion wird dabei von einem Bereich innerhalb der

---

<sup>7</sup> <http://bundesrecht.juris.de/krwaffkontrg/index.html>

C-terminalen 26 Aminosäuren dieses luminalen Abschnitts von SV2C vermittelt (Abbildung 14). Von SV2C abgeleitete Peptide sind weiterhin in der Lage, die Neurotoxizität von BoNT/A am isolierten *Nervus phrenicus* effektiv zu blockieren (Abbildung 15). Schließlich zeigen Zelllinien, in denen die Expression von SV2C und/oder SV2A durch RNAi vermindert oder durch Überexpression gesteigert wird, eine verringerte bzw. erhöhte Suszeptibilität gegenüber BoNT/A (Abbildung 16). Diese Ergebnisse demonstrieren die physiologische Relevanz der Wechselwirkung zwischen BoNT/A und SV2C und beweisen, dass SV2A und SV2C *in vivo* als Proteinrezeptoren für BoNT/A fungieren.

Überraschend ist, dass der in dieser Arbeit aus Gründen der besseren rekombinanten Expression in *E. coli* konstruierte hybride luminaler Abschnitt GST-SV2-C/A nicht ebenfalls in der Lage war, die Aktivität von BoNT/A am isolierten *Nervus phrenicus* zu blockieren. Die Proteinstruktur, die möglicherweise für eine Wechselwirkung mit BoNT/A erforderlich ist, könnte in diesem luminalen Abschnitt nicht korrekt ausgebildet sein. Für das Vorliegen einer solchen Sekundärstruktur der luminalen Abschnitte von SV2 spricht eine bemerkenswerte Primärsequenz dieser Bereiche. Beginnend mit Aminosäure 475 in SV2A hat jede fünfte Aminosäure hydrophoben Charakter mit einer starken Präferenz für Phenylalanin. Diese Aminosäuresequenz bildet möglicherweise eine Sekundärstruktur aus, in der die hydrophoben Aminosäuren miteinander interagieren (Janz & Sudhof, 1999). Auch wenn der N-terminale Bereich der luminalen Abschnitte von SV2 wahrscheinlich keine wichtigen Aminosäuren für die Interaktion mit BoNT/A enthält (Abbildung 14; Dong *et al.*, 2006), so könnte dieser Bereich jedoch für die Aufrechterhaltung einer Sekundärstruktur des luminalen Abschnitts erforderlich sein. Durch das Zusammenfügen inkompatibler Peptidbereiche aus SV2C und SV2A in GST-SV2-C/A kann diese Sekundärstruktur möglicherweise nicht mehr ausgebildet werden, wodurch die Interaktion mit BoNT/A verhindert würde. Durch den Austausch der Aminosäuren im luminalen Abschnitt von SV2C gegen entsprechende Aminosäuren aus SV2A in GST-SV2-C/A geht beispielweise ein Cysteinrest verloren, der für die Ausbildung einer strukturell bedeutenden Disulfidbrücke verantwortlich sein könnte.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit (Mahrhold *et al.*, 2006) wurden zeitgleich mit den Daten einer amerikanischen Arbeitsgruppe publiziert, die die in dieser Dissertation beschriebenen Resultate bestätigen und erweitern. Dong *et al.*, 2006 zeigten zum Beispiel durch immunzytochemische Untersuchungen, dass die Verminderung der Expression von SV2C in Neuro-2A-Zellen (Kap. 2.3.4.1) durch Transfektion von siRNA dazu führt, dass BoNT/A

---

nicht mehr von den Zellen aufgenommen wird. Im Gegensatz dazu zeigte eine in dieser Arbeit durchgeführte zellbasierte Toxizitätsbestimmung in Neuro-2A-Zellen mit ebenfalls verminderter SV2C-Expression nur eine geringe Abnahme der Hydrolyse von SNAP-25. Eine signifikante Verminderung der Substratspaltung konnte erst nachgewiesen werden, als die Expression der Isoformen SV2A und SV2C gleichzeitig durch die Transfektion von entsprechender siRNA reduziert wurde (Abbildung 16B). Diese Diskrepanz zwischen beiden Arbeiten ist darauf zurückzuführen, dass die hier verwendete Neuro-2A-Zelllinie (Kap. 2.3.4; Passage drei bis 13), im Gegensatz zu der von Dong und Kollegen, eine signifikante Menge an SV2A exprimiert (Abbildung 16A), die nach SV2C-*knock-down* die Endozytose und Aufnahme von BoNT/A weiterhin vermitteln kann.

Dong *et al.*, 2006 konnten belegen, dass zusätzlich zu SV2A und SV2C auch SV2B als Proteinrezeptor für BoNT/A fungieren kann (Dong *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der GST-Pulldown-Experimente jedoch keine Wechselwirkung zwischen BoNT/A H<sub>C</sub> und den luminalen Abschnitten von SV2A und SV2B nachgewiesen werden. Da die Wechselwirkung zwischen BoNT/A und SV2A bzw. SV2B wahrscheinlich deutlich geringer ist als zwischen BoNT/A und SV2C (Dong *et al.*, 2006), reichte die Sensitivität der hier durchgeführten GST-Pulldown-Experimente möglicherweise nicht aus, um die schwächeren Wechselwirkungen detektieren zu können. Eventuell erklärt der Befund von Dong und Kollegen allerdings, warum die in dieser Arbeit etablierten stabil transfizierten PC12-Zelllinien, in denen die Expression von SV2A vermindert ist, eine geringere Reduktion der Suzeptibilität gegenüber BoNT/A zeigen als entsprechend etablierte PC12-Zelllinien von Dong und Kollegen. Die in dieser Arbeit verwendete PC12-Zelllinie (Kap. 2.3.4; Passage zehn bis 20) exprimiert, anders als die von Dong und Kollegen verwendete, neben SV2A auch geringe Mengen SV2B (Abbildung 16C), was sich mit anderen Berichten über die Expression von SV2B in PC12-Zellen deckt (Couesnon *et al.*, 2008). Die zusätzliche Expression von SV2B in diesen Zellen führt demnach bei einem SV2A-*knock-down* zu einer weniger dramatischen Reduktion der Substratspaltung, als bei der ausschließlichen Expression von SV2A.

Erstaunlicherweise führte die Überexpression von SV2C in Neuro-2A-Zellen mit reduzierter Rezeptorexpression nicht zu einer erneuten Zunahme der Suzeptibilität gegenüber BoNT/A, obwohl das zusätzlich synthetisierte SV2C im Western Blot nachweisbar war (Abbildung 16B, Spur 6). Da die Transfektion des gleichen Plasmids in PC12-Zellen aber zu einer

---

Zunahme der Suszeptibilität gegenüber BoNT/A führte (Abbildung 16D, Spur 6), bleibt als mögliche Erklärung nur die Vermutung, dass exogen exprimiertes SV2C von Neuro-2A-Zellen zwar synthetisiert, aber nicht korrekt prozessiert und in synaptische Vesikel eingebaut wird.

In der Literatur sind verschiedentlich Berichte zu finden, nach denen Synaptotagmin I nicht nur als Proteinrezeptor für BoNT/B und später BoNT/G, sondern auch für BoNT/A und BoNT/E fungiert (Li & Singh, 1998; Yowler *et al.*, 2002). Zwar legen Vergleiche der Primärsequenzen der BoNT/A, E und auch F<sub>HC</sub>-Fragmente (Abbildung 4) aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades tatsächlich einen gemeinsamen Proteinrezeptor nahe, die Ergebnisse dieser Arbeit und die anderer Arbeitsgruppen (Dong *et al.*, 2006) zeigen aber eindeutig, dass Synaptotagmin nicht in der Lage ist, Bindung und Aufnahme von BoNT/A zu unterstützen. Der Grund für Berichte dieser Art dürfte vielmehr in Wechselwirkungen der Membranproteine synaptischer Vesikel untereinander liegen (Bennett *et al.*, 1992). So wird zum Beispiel berichtet, dass SV2A und SV2C spezifische Bindungsstellen für Synaptotagmin enthalten (Schivell *et al.*, 2005). Die Wechselwirkung mit SV2 soll dabei die freie Verfügbarkeit von Synaptotagmin und damit die Fusionswahrscheinlichkeit eines synaptischen Vesikels mit der präsynaptischen Membran regulieren (Custer *et al.*, 2006).

Auf der internationalen Konferenz zum Thema „*Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins*“ im Jahr 2005 in Denver, Colorado<sup>8</sup> wurde ein Poster vorgestellt (Fernández-Salas *et al.*, 2005), das die Identifikation des Proteins FGFR3 (*fibroblast growth factor receptor 3*) als putativen Proteinrezeptor für BoNT/A beschreibt. Für die entsprechende Konferenz in diesem Jahr in Baveno, Italien<sup>9</sup> wurde ein weiteres Poster der gleichen Autoren angekündigt. In der Zusammenfassung heißt es, dass FGFR3 nun, zusammen mit SV2C, Teil eines größeren Rezeptorkomplexes für BoNT/A sei. Die Wechselwirkungen zwischen BoNT/A und FGFR3 bzw. SV2C wurden mit Hilfe der SPR (*surface plasmon resonance*) charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Affinität zwischen BoNT/A und FGFR3 (25 nM) etwa zehn Mal größer ist als zwischen BoNT/A und SV2C (250 nM). Weiterhin kompetiert der natürliche Ligand des FGFR3, FGF-1 (*fibroblast growth factor 1*), mit BoNT/A um die Bindung an Neuro-2A-Zellen, so dass sich durch Zugabe von FGF-1 die

---

<sup>8</sup> <http://www.toxins2005.org>

<sup>9</sup> <http://www.toxins2008.org>

---

Toxizität von BoNT/A blockieren lässt. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde daher in dieser Arbeit versucht, die Toxizität von BoNT/A im MPN-Toxizitätsassay durch Vorinkubation der Zwerchfellpräparationen mit FGF-1 zu blockieren. Im ersten Experiment wurde BoNT/A alleine in einer Konzentration von 0,22 nM eingesetzt. Dies führte zu einer paralytischen Halbwertszeit von  $50 \pm 6$  Minuten. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Zwerchfellpräparationen in Gegenwart von 25 nM FGF-1 blieb die paralytische Halbwertszeit mit  $51 \pm 1$  Minuten unverändert. Auch die Erhöhung der Konzentration von FGF-1 auf 250 nM verlängerte die paralytische Halbwertszeit im Vergleich zum unbehandelten Zwerchfell nicht signifikant ( $53 \pm 2$  Minuten). Diese Ergebnisse deuten deshalb möglicherweise darauf hin, dass die Wechselwirkung zwischen BoNT/A und FGFR3 an der neuromuskulären Endplatte keine physiologische Bedeutung besitzt. Da die Aufnahme von BoNT/A aktivitätsabhängig erfolgt (Hughes & Whaler, 1962; Dong *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2004) scheint weiterhin gesichert, dass der Proteinrezeptor für BoNT/A integraler Bestandteil synaptischer Vesikel sein muss, was zwar für SV2, nicht aber für FGFR3 zutrifft.

## **4.2 Proteinrezeptoren als integraler Bestandteil der Membran synaptischer Vesikel**

Synaptotagmin I und II (Syt I und II) wurden zuerst als Proteinrezeptoren für BoNT/B identifiziert (Kap. 1.2.2.3). Dabei wurde zunächst eine spezifische Interaktion zwischen Syt I bzw. II und BoNT/B nachgewiesen (Nishiki *et al.*, 1994). Neun Jahre später wurde die physiologische Relevanz dieser Wechselwirkungen demonstriert (Dong *et al.*, 2003). Ein weiteres Jahr später wurde gezeigt, dass Syt I und II auch mit BoNT/G interagieren und dass diese Wechselwirkung essentiell für den Intoxikationsprozess von BoNT/G ist (Rummel *et al.*, 2004, Dong *et al.*, 2007). Syt I und II sind integrale Proteine der Membran synaptischer Vesikel (Abbildung 18), wo sie als Calciumsensoren bei der regulierten Exozytose fungieren (Chapman, 2008). Sie besitzen eine Transmembrandomäne und einen etwa 60 Aminosäuren langen N-terminalen Abschnitt, der in das Lumen des Vesikels hineinragt. Dieser luminale Abschnitt vermittelt die spezifische Interaktion mit BoNT/B bzw. G. Die Interaktion ist allerdings nur deshalb möglich, weil die zunächst im Lumen verborgenen Proteinabschnitte nach der Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran auf der Zelloberfläche exponiert und frei zugänglich sind. Nur in diesem Zustand können luminale Abschnitte von Transmembranproteinen aus synaptischen Vesikeln als Proteinrezeptoren für Pathogene



fungieren. Am häufigsten tritt dieser Zustand an der präsynaptischen Membran aktiver Neurone auf. Neben einer verstärkten Exozytoseaktivität zeigen aktive Neurone auch eine erhöhte Endozytoserate von Bereichen der präsynaptischen Membran, was schließlich zu einer verstärkten Aufnahme der BoNT in die Zelle führt. In Übereinstimmung mit diesen Vorgängen an der präsynaptischen Membran konnte bei einigen BoNT eine aktivitätsabhängige Aufnahme in neuronale Zellen beobachtet werden (Hughes & Whaler, 1962; Black & Dolly, 1986; Dong *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2004). Der Gedanke liegt nahe, dass die Proteinrezeptoren zumindest der CNT, deren Aufnahme von der Aktivität des Neurons abhängig ist, in der Membran synaptischer Vesikel zu finden sind. Aufgrund dieser Überlegungen wurden in dieser Arbeit ganz gezielt bestimmte Proteine aus der Membran synaptischer Vesikel als mögliche Proteinrezeptoren für die BoNT in Betracht gezogen.

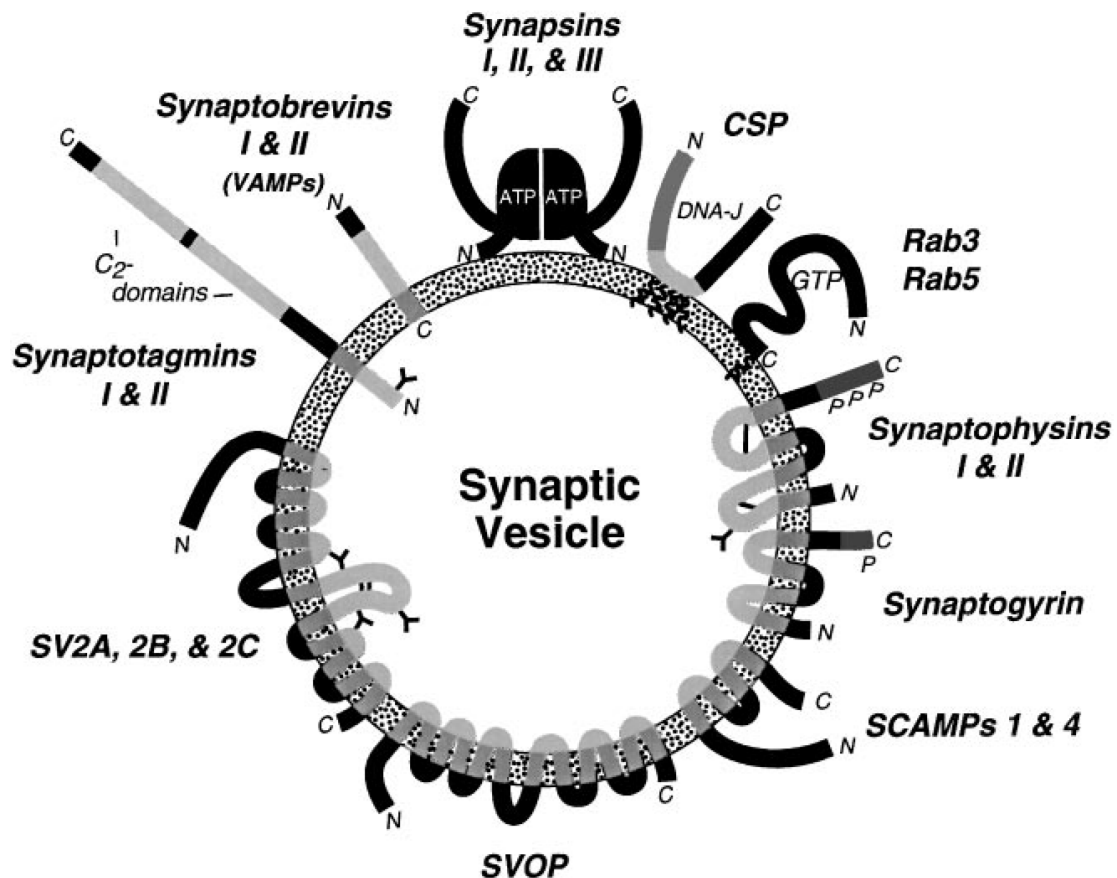


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines synaptischen Vesikels. Eingezeichnet sind Proteine, die am Transport synaptischer Vesikel innerhalb der Zelle (engl. *synaptic vesicle trafficking*) beteiligt sind. Die meisten Proteine kommen in mehreren Isoformen vor, von denen einige ausschließlich neuronal (z.B. Synaptogyrin I), andere ubiquitär (z.B. Cellugyrin/ Synaptogyrin II) vorkommen. Potentielle Rezeptorproteine nach der hier entwickelten Arbeitshypothese sind Synaptophysin I und II, Synaptogyrin I und 3 und die drei Isoformen von SV2. Zytosolisch oder luminal assoziierte Proteine (z.B. Rab3/5), oder Transmembranproteine ohne luminalen Abschnitt (z.B. Synaptobrevin oder SVOP) werden nicht als potentielle Proteinrezeptoren der BoNT in Betracht gezogen. Abbildung aus Fernandez-Chacon & Sudhof, 1999.

Synaptische Vesikel (SV) sind verhältnismäßig kleine Organellen mit einem Durchmesser von nur etwa 50 nm (Abbildung 18). Eine Modellrechnung, die die Größe der SV und deren Zusammensetzung aus Phospholipiden, Cholesterol und Proteinen berücksichtigt, kommt zu dem Ergebnis, dass ein SV etwa 200 Proteinmoleküle enthält. Da es wahrscheinlich ist, dass einige Proteine in mehrfacher Kopie vorliegen oder in mehreren Isoformen vorkommen, schätzt man die Zahl verschiedener Proteine in SV auf 20-40 (Fernandez-Chacon & Sudhof, 1999; Takamori *et al.*, 2006). Um als Proteinrezeptor für die BoNT in Fragen zu kommen, muss ein Protein mindestens einmal die Vesikelmembran durchspannen und einen ausreichend großen luminalen Abschnitt besitzen, um mit einem Toxinmolekül in Wechselwirkung treten zu können. Der luminal Abschnitt von Syt I und II ist etwa 60

Aminosäuren groß. Für die Interaktion mit BoNT/B bzw. G sind allerdings nur die etwa 20 in N-terminaler Richtung an die Vesikelmembran angrenzenden Aminosäuren von besonderer Bedeutung (Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden daher solche Proteine als potentielle Rezeptoren in Betracht gezogen, die in der Membran synaptischer Vesikel zu finden sind und einen luminalen Proteinabschnitt von mindestens 20 Aminosäuren besitzen.

Die drei Isoformen des synaptischen Vesikelproteins 2 (SV2) durchspannen die Vesikelmembran zwölf Mal. Ihr N- und C-Terminus liegt im Zytosol der Zelle. Zwischen der siebten und achten Transmembrandomäne besitzen die SV2 einen etwa 125 Aminosäuren langen schleifenförmigen Abschnitt, der in das Lumen des Vesikels hineinragt. Nach der für diese Arbeit geltende Arbeitshypothese machen diese Eigenschaften SV2 zu einem idealen Proteinrezeptor für die CNT und durch die Identifizierung von SV2 als Proteinrezeptor für BoNT/A wurde diese Arbeitshypothese in vollem Umfang bestätigt. Wie alle leichten Ketten der CNT, die eine Spezifität für Proteine aus der SNARE-Familie besitzen, haben möglicherweise alle H<sub>C</sub>-Fragmente eine Affinität für integrale Membranproteine synaptischer Vesikel entwickelt. Dabei fällt weiter auf, dass bisher alle Proteine, die am Intoxikationsmechanismus der CNT beteiligt sind, entweder aktiv die Exozytose antreiben (SNAREs) oder an ihrer Regulation beteiligt sind (Synaptotagmin, SV2; Chapman, 2008). Sonderbarerweise blockieren die CNT mit der neuronalen Exozytose den zellulären Vorgang, der für ihre eigene Aufnahme essentiell ist. Der evolutionäre Nutzen dieser Eigenschaft könnte darin bestehen, dass auf diese Weise nur so viel Neurotoxin in eine Synapse aufgenommen wird, wie zu ihrer Inaktivierung erforderlich ist. Toxinmoleküle, die nicht aufgenommen wurden, stehen so für die Intoxikation weiterer Synapsen zur Verfügung. Damit wäre schließlich sichergestellt, dass eine ausreichend große Anzahl von Synapsen inaktiviert wird, um eine Lähmung der entsprechenden Muskulatur hervorzurufen.

Die Identifizierung weiterer Proteinrezeptoren in der Zukunft wird zeigen, ob sich dieses Prinzip auf die verbleibenden CNT verallgemeinern lässt. Einige Wissenschaftler favorisieren für manche der verbleibenden CNT bereits heute andere Mechanismen der Rezeptorbindung und Aufnahme (Kap. 4.3).

---

### 4.3 Die Identifizierung von SV2 als Proteinrezeptor für BoNT/A bestätigt das Zwei-Rezeptor-Modell

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die clostridiellen Neurotoxine (CNT) mit Polysialylgangliosiden, die sich im äußeren Blatt der Plasmamembran neuronaler Zellen, befinden, interagieren. Dieser Schritt im Wirkungsmechanismus führt zu einer Erhöhung der lokalen Konzentration der CNT in der Ebene der Plasmamembran, was die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens eines Toxinmoleküls mit seinem spezifischen Proteinrezeptor deutlich erhöht. Gangliosidbindungsstellen konnten in verschiedenen CNT identifiziert werden (Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000; Eswaramoorthy *et al.*, 2001; Rummel *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004; Rummel *et al.*, 2007; Tsukamoto *et al.*, 2008). Die charakteristische Aminosäuresequenz H...SxWY...G, die die Interaktion mit Gangliosiden vermittelt, ist in allen CNT außer BoNT/D konserviert (Kap. 1.2.2.3). Die Identifikation einer zweiten Bindungsaktivität, die sich durch eine andere Affinität und durch Proteasesensitivität von der Gangliosidbindungsstelle unterscheidet (Pierce *et al.*, 1986; Lazarovici & Yavin, 1986), führte in den 1980er Jahren zur Postulierung eines zusätzlichen Proteinrezeptors und zur Formulierung eines Zwei-Rezeptor-Modells für die Bindung und Aufnahme der CNT (Montecucco, 1986). Nach diesem Modell werden die CNT durch Interaktion mit Gangliosiden auf der präsynaptischen Membran angereichert, bevor sie mit ihrem spezifischen Proteinrezeptor in Wechselwirkung treten und schließlich durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden.

Schon die Identifikation von Synaptotagmin als Proteinrezeptor für BoNT/B und G (Nishiki *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2003; Rummel *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2007) lieferte eine Bestätigung für die Gültigkeit des Zwei-Rezeptor-Modells. Co-Kristallisationen lieferten inzwischen Einblicke in die Wechselwirkung zwischen BoNT/B und Synaptotagmin auf atomarer Ebene (Jin *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2006) und ermöglichten ein erstes Verständnis dafür, wie das Zwei-Rezeptor-Konzept *in vivo* verwirklicht ist. Die Identifikation von SV2 als spezifischen Proteinrezeptor von BoNT/A lieferte abermals eine Bestätigung des Zwei-Rezeptor-Modells. Und obwohl damit Bindung und Aufnahme von drei der acht CNT diesem Modell entsprechen, gibt es Hinweise und Meinungen, dass das Zwei-Rezeptor-Modell möglicherweise keine Allgemeingültigkeit für die CNT besitzt.

---

Die japanische Arbeitsgruppe von S. Kozaki zeigte zum Beispiel, dass radioaktiv markiertes BoNT/C H<sub>C</sub> auch dann noch an Synaptosomen binden kann, wenn diese mit Protease K behandelt wurden. Behandlung der Synaptosomen mit Neuraminidase führt allerdings dazu, dass BoNT/C H<sub>C</sub> nicht mehr binden kann. Tsukamoto *et al.*, 2005 schlossen daraus, dass die Bindung von BoNT/C H<sub>C</sub> unabhängig von Proteinrezeptoren erfolgt und ausschließlich durch Ganglioside vermittelt ist. Im Gegensatz dazu ist BoNT/D H<sub>C</sub> in der Lage, Synaptosomen zu binden, die entweder mit Protease K oder mit Neuraminidase behandelt wurden. Dieselben Autoren schlossen aus diesem Ergebnis, dass weder Proteinrezeptoren noch Ganglioside für die Bindung von BoNT/D H<sub>C</sub> an neuronale Membranen erforderlich sind. Stattdessen demonstrierten sie, dass BoNT/D H<sub>C</sub> Phosphatidylethanolamin (PE) binden kann (Tsukamoto *et al.*, 2005; Tsukamoto *et al.*, 2008). PE ist ein Phospholipid, dessen Anteil an der Lipidzusammensetzung des inneren Blatts der Plasmamembran bei den meisten Zellen größer ist als im äußeren Blatt (Devaux, 1991). Besonders bei neuronalen Zellen scheint der Anteil von PE im äußeren Blatt vergleichsweise klein zu sein (Devaux, 1991). Es ist daher nur schwer vorstellbar, dass ein hochwirksames und neurospezifisches Proteintoxin wie BoNT/D ein derart verbreitetes Molekül wie PE als Rezeptor verwendet. Mäuse, die keine komplexen Ganglioside synthetisieren können (Kawai *et al.*, 2001), zeigen außerdem eine geringere Suszeptibilität gegenüber BoNT/D als Wildtypmäuse (persönliche Mitteilung, Dr. Andreas Rummel), was eine Beteiligung von Gangliosiden an der Bindung von BoNT/D klar beweist.

Einige Wissenschaftler sind inzwischen der Ansicht, dass nicht ein einzelnes Protein für die Bindung und Aufnahme der CNT verantwortlich ist, sondern mehrere. Dabei soll die Wechselwirkung eines CNT mit einem solchen „Rezeptorarray“ entweder tatsächlich durch gleichzeitige Interaktion mit mehreren Proteinrezeptoren zustande kommen (Montecucco *et al.*, 2004), oder aber die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten eines Rezeptorarrays verleihen einem spezifischen Proteinrezeptor erst die volle Affinität für die CNT (Baldwin & Barbieri, 2007). Beide Hypothesen erklären möglicherweise nicht nur, warum die Proteinrezeptoren der verbleibenden CNT scheinbar so schwer zu identifizieren sind, sondern auch die in dieser Arbeit bei der Untersuchung des vesikulären Acetylcholin-Transporters (VACHT) als potentiellen Proteinrezeptor für BoNT/C (Kap. 3.5) gewonnenen Ergebnisse.

Denn einiges spricht für die Spezifität des durchgeführten GST-Pulldown-Experimentes (Abbildung 17). Besonders die Tatsache, dass die Proteinrezeptoren für BoNT/C, E und F bisher unbekannt sind und dass BoNT/A, B oder G, deren Proteinrezeptoren bekannt sind,

nicht mit VAcHT interagieren, ist ein Hinweis auf die Spezifität der detektierten Wechselwirkung. Es gibt weiterhin Berichte, nach denen BoNT/C, E und F gegenseitig um Bindung kompetieren (persönliche Mitteilung, Dr. Andreas Rummel), was ein Hinweis auf einen gemeinsamen Proteinrezeptor ist. VAcHT ist außerdem ein spezifischer Marker cholinergischer Synapsen, wie den neuromuskulären Endplatten, und seine Membrantopologie macht es zu einem ausgezeichneten Rezeptorkandidaten für die CNT. Allein die Tatsache, dass Zelllinien, in denen die Expression von VAcHT durch RNAi stark reduziert ist, eine unveränderte Suszeptibilität gegenüber BoNT/C besitzen, beweist, dass VAcHT nicht den spezifischen Proteinrezeptor für BoNT/C darstellt (Abbildung 17C). Möglicherweise wurde VAcHT im GST-Pulldown-Experiment aber spezifisch als Teil eines Rezeptorarrays, das den spezifischen aber unbekanntem Proteinrezeptor für BoNT/C als zusätzliche Proteinkomponente enthält, isoliert. Das Fehlen von VAcHT in den etablierten Zelllinien führte deshalb nur zu einer nicht detektierbaren oder zu keiner Abnahme der Suszeptibilität der Zellen gegenüber BoNT/C. Bedauerlicherweise enthält die aktuelle Literatur keine Hinweise auf geeignete Membranproteine synaptischer Vesikel, die Wechselwirkungen mit VAcHT eingehen und somit einen potentiellen Proteinrezeptor für die CNT darstellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wechselwirkungen der verbleibenden CNT BoNT/C, D, E, F und TeNT mit neuronalen Membranen möglicherweise deutlich komplexer sind, als die bisher aufgeklärten Interaktionen von BoNT/A, B und G mit ihren spezifischen Proteinrezeptoren SV2 bzw. Synaptotagmin I und II. Die Zukunft wird zeigen, ob es noch einmal gelingt, einen einzelnen spezifischen Proteinrezeptor für eines der CNT zu identifizieren.

## 5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte der Proteinrezeptor für BoNT/A identifiziert werden. Alle drei Isoformen des synaptischen Vesikelproteins 2 (SV2) vermitteln Bindung und Aufnahme dieses Neurotoxins in neuronale Zellen. Der Mechanismus dieser Wechselwirkung auf molekularer und atomarer Ebene wurde bisher allerdings nicht aufgeklärt. Gegenwärtig wird deshalb versucht, durch zielgerichtete Mutagenese sowohl des Neurotoxins als auch der Rezeptoren die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren. Zukünftige Arbeiten sollen außerdem klären, welche Unterschiede zwischen den SV2-Isoformen in Bezug auf die Interaktion mit BoNT/A bestehen.

Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT) konnte nicht als spezifischer Proteinrezeptor, möglicherweise aber als Teil eines Rezeptorarrays für BoNT/C identifiziert werden. Mit Hilfe von Ko-Immunpräzipitationen sollen Proteine isoliert werden, die in der Membran synaptischer Vesikel mit VACHT in Wechselwirkung stehen und als spezifische Proteinrezeptoren für BoNT/C in Frage kommen.

Der spezifische Proteinrezeptor von drei der acht CNT konnte identifiziert werden. Durch Verbesserung der Spezifität der GST-Pulldown-Experimente aus nativem Material aber auch durch *screening*-Verfahren auf cDNA-Ebene oder *cross linking* Ansätze soll weiterhin versucht werden, die verbleibenden Proteinrezeptoren zu identifizieren. Dabei wird sich auch herausstellen, ob etablierte Hypothesen, wie das Zwei-Rezeptor-Modell, für die Familie der CNT allgemeine Gültigkeit besitzen.

Es besteht schließlich die berechtigte Hoffnung, dass die Ergebnisse dieser und vieler anderer Arbeiten auf dem Gebiet der Proteintoxine Mediziner und Wissenschaftler in die Lage versetzen werden, modifizierte CNT zur Therapie weiterer Krankheiten einsetzen zu können. Dabei steht die Veränderung der Zielzellspezifität oder die Verbesserung der Wirksamkeit der CNT ganz besonders im Interesse der Wissenschaft.

---

## 6 Literatur

1. Südhof, T. C. Neurotransmitter release (2008), *Handbook of experimental pharmacology* (184), 1-21
2. Galazka, A., and Gasse, F. The present status of tetanus and tetanus vaccination (1995), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **195**, 31-53
3. Aureli, P., Fenicia, L., Pasolini, B., Gianfranceschi, M., McCroskey, L. M., and Hatheway, C. L. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy (1986), *J. Infect. Dis.* **154**(2), 207-211
4. Hall, J. D., McCroskey, L. M., Pincomb, B. J., and Hatheway, C. L. Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism (1985), *J. Clin. Microbiol.* **21**(4), 654-655
5. Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis (2000), *Physiol. Rev.* **80**(2), 717-766
6. Kubota, T., Yonekura, N., Hariya, Y., Isogai, E., Isogai, H., Amano, K., and Fujii, N. Gene arrangement in the upstream region of *Clostridium botulinum* type E and *Clostridium butyricum* BL6340 progenitor toxin genes is different from that of other types (1998), *FEMS Microbiol. Lett.* **158**(2), 215-221
7. Mutoh, S., Kouguchi, H., Sagane, Y., Suzuki, T., Hasegawa, K., Watanabe, T., and Ohyama, T. Complete subunit structure of the *Clostridium botulinum* type D toxin complex via intermediate assembly with nontoxic components (2003), *Biochemistry (Mosc.)* **42**(37), 10991-10997
8. Schiavo, G., Papini, E., Genna, G., and Montecucco, C. An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin (1990), *Infect. Immun.* **58**(12), 4136-4141
9. Schiavo, G., Rossetto, O., Santucci, A., DasGupta, B. R., and Montecucco, C. Botulinum neurotoxins are zinc proteins (1992), *J. Biol. Chem.* **267**(33), 23479-23483
10. Jongeneel, C. V., Bouvier, J., and Bairoch, A. A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases (1989), *FEBS Lett.* **242**(2), 211-214
11. Schiavo, G., Poulain, B., Rossetto, O., Benfenati, F., Tauc, L., and Montecucco, C. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc (1992), *EMBO J.* **11**(10), 3577-3583



12. Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R., and Stevens, R. C. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity (1998), *Nat. Struct. Biol.* **5**(10), 898-902
13. Swaminathan, S., and Eswaramoorthy, S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B (2000), *Nat. Struct. Biol.* **7**(8), 693-699
14. Umland, T. C., Wingert, L. M., Swaminathan, S., Furey, W. F., Schmidt, J. J., and Sax, M. Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin (1997), *Nat. Struct. Biol.* **4**(10), 788-792
15. Sikorra, S., Henke, T., Swaminathan, S., Galli, T., and Binz, T. Identification of the amino acid residues rendering TI-VAMP insensitive toward botulinum neurotoxin B (2006), *J. Mol. Biol.* **357**(2), 574-582
16. Breidenbach, M. A., and Brunger, A. T. Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A (2004), *Nature* **432**(7019), 925-929
17. Niemann, H., Blasi, J., and Jahn, R. Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis (1994), *Trends Cell Biol.* **4**(5), 179-185
18. Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P., and Stroud, R. M. Crystal structure of colicin Ia (1997), *Nature* **385**(6615), 461-464
19. Brunger, A. T., Breidenbach, M. A., Jin, R., Fischer, A., Santos, J. S., and Montal, M. Botulinum neurotoxin heavy chain belt as an intramolecular chaperone for the light chain (2007), *PLoS pathogens* **3**(9), 1191-1194
20. Turton, K., Chaddock, J. A., and Acharya, K. R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility (2002), *Trends Biochem. Sci.* **27**(11), 552-558
21. Ginalski, K., Venclovas, C., Lesyng, B., and Fidelis, K. Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides residue level information about the putative ganglioside binding site (2000), *FEBS Lett.* **482**(1-2), 119-124
22. Fotinou, C., Emsley, P., Black, I., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., Sinha, K. A., Fairweather, N. F., and Isaacs, N. W. The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin (2001), *J. Biol. Chem.* **276**(34), 32274-32281

- 
23. Rummel, A., Bade, S., Alves, J., Bigalke, H., and Binz, T. Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity (2003), *J. Mol. Biol.* **326**(3), 835-847
  24. Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., and Binz, T. The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction (2004), *Mol. Microbiol.* **51**(3), 631-643
  25. Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., Sandhoff, K., Proia, R. L., Acharya, K. R., Bigalke, H., and Binz, T. Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(1), 359-364
  26. Simpson, L. L. Identification of the major steps in botulinum toxin action (2004), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 167-193
  27. Jahn, R., and Scheller, R. H. SNAREs--engines for membrane fusion (2006), *Nature reviews* **7**(9), 631-643
  28. Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution (1998), *Nature* **395**(6700), 347-353
  29. Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H., and Rothman, J. E. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion (1998), *Cell* **92**(6), 759-772
  30. Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Sudhof, T. C., and Niemann, H. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly (1994), *EMBO J.* **13**(21), 5051-5061
  31. Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. C. Membrane fusion (2003), *Cell* **112**(4), 519-533
  32. Montecucco, C., Schiavo, G., and Dasgupta, B. R. Effect of pH on the interaction of botulinum neurotoxins A, B and E with liposomes (1989), *Biochem. J.* **259**(1), 47-53
  33. Koriazova, L. K., and Montal, M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel (2003), *Nat. Struct. Biol.* **10**(1), 13-18
  34. Neale, E. A. Moving across membranes (2003), *Nat. Struct. Biol.* **10**(1), 2-3
  35. Li, L., and Singh, B. R. Spectroscopic analysis of pH-induced changes in the molecular features of type A botulinum neurotoxin light chain (2000), *Biochemistry (Mosc.)* **39**(21), 6466-6474

- 
36. Lalli, G., Herreros, J., Osborne, S. L., Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains (1999), *J. Cell Sci.* **112 ( Pt 16)**, 2715-2724
  37. Halpern, J. L., and Loftus, A. Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin (1993), *J. Biol. Chem.* **268(15)**, 11188-11192
  38. Montecucco, C. How do tetanus and botulinum toxins bind neuronal membranes? (1986), *Trends Biochem. Sci.* **11**, 314-317
  39. Kitamura, M., Takamiya, K., Aizawa, S., Furukawa, K., and Furukawa, K. Gangliosides are the binding substances in neural cells for tetanus and botulinum toxins in mice (1999), *Biochim. Biophys. Acta* **1441(1)**, 1-3
  40. Bullens, R. W., O'Hanlon, G. M., Wagner, E., Molenaar, P. C., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, J. J., and Willison, H. J. Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function (2002), *J. Neurosci.* **22(16)**, 6876-6884
  41. Dong, M., Tepp, W. H., Liu, H., Johnson, E. A., and Chapman, E. R. Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons (2007), *J. Cell Biol.* **179(7)**, 1511-1522
  42. Halpern, J. L., and Neale, E. A. Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport (1995), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **195**, 221-241
  43. Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E., and Isaacs, N. W. The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding (2000), *J. Biol. Chem.* **275(12)**, 8889-8894
  44. Louch, H. A., Buczko, E. S., Woody, M. A., Venable, R. M., and Vann, W. F. Identification of a binding site for ganglioside on the receptor binding domain of tetanus toxin (2002), *Biochemistry (Mosc).* **41(46)**, 13644-13652
  45. Pierce, E. J., Davison, M. D., Parton, R. G., Habig, W. H., and Critchley, D. R. Characterization of tetanus toxin binding to rat brain membranes. Evidence for a high-affinity proteinase-sensitive receptor (1986), *Biochem. J.* **236(3)**, 845-852
  46. Herreros, J., Ng, T., and Schiavo, G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons (2001), *Mol. Biol. Cell* **12(10)**, 2947-2960

- 
47. Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C., and Schiavo, G. Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons (2000), *J. Neurochem.* **74**(5), 1941-1950
  48. Herreros, J., Lalli, G., and Schiavo, G. C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor (2000), *Biochem. J.* **347 Pt 1**, 199-204
  49. Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S. Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes (1994), *J. Biol. Chem.* **269**(14), 10498-10503
  50. Dong, M., Richards, D. A., Goodnough, M. C., Tepp, W. H., Johnson, E. A., and Chapman, E. R. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells (2003), *J. Cell Biol.* **162**(7), 1293-1303
  51. Li, L., and Singh, B. R. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay (1998), *J. Nat. Toxins* **7**(3), 215-226
  52. Hughes, R., and Whaler, B. C. Influence of nerve-ending activity and of drugs on the rate of paralysis of rat diaphragm preparations by Cl. botulinum type A toxin (1962), *The Journal of physiology* **160**, 221-233
  53. Black, J. D., and Dolly, J. O. Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis (1986), *J. Cell Biol.* **103**(2), 535-544
  54. Keller, J. E., Cai, F., and Neale, E. A. Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons (2004), *Biochemistry (Mosc.)* **43**(2), 526-532
  55. Fishman, P. S., and Carrigan, D. R. Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin (1987), *Brain Res.* **406**(1-2), 275-279
  56. Sinha, K., Box, M., Lalli, G., Schiavo, G., Schneider, H., Groves, M., Siligardi, G., and Fairweather, N. Analysis of mutants of tetanus toxin Hc fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties (2000), *Mol. Microbiol.* **37**(5), 1041-1051
  57. Lalli, G., and Schiavo, G. Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR (2002), *J. Cell Biol.* **156**(2), 233-239

- 
58. Rummel, A., Meder, M., Binz, T., and Bigalke, H. Binding and axonal transport of recombinant tetanus toxin and fragments in nerve cell culture. (2001), *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol Supplement* **363**, R21
  59. Lalli, G., Gschmeissner, S., and Schiavo, G. Myosin Va and microtubule-based motors are required for fast axonal retrograde transport of tetanus toxin in motor neurons (2003), *J. Cell Sci.* **116**(Pt 22), 4639-4650
  60. Sollner, T., and Rothman, J. E. Neurotransmission: harnessing fusion machinery at the synapse (1994), *Trends Neurosci.* **17**(8), 344-348
  61. Davletov, B., Bajohrs, M., and Binz, T. Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins (2005), *Trends Neurosci.* **28**(8), 446-452
  62. Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Swerdlow, D. L., and Tonat, K. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management (2001), *JAMA* **285**(8), 1059-1070
  63. Bigalke, H., and Rummel, A. Medical aspects of toxin weapons (2005), *Toxicology* **214**(3), 210-220
  64. Dagert, M., and Ehrlich, S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. (1979), *Gene* **6**, 23-28
  65. Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G (2004), *J. Biol. Chem.* **279**(29), 30865-30870
  66. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**(12), 5463-5467
  67. Hell, J. W., Maycox, P. R., Stadler, H., and Jahn, R. Uptake of GABA by rat brain synaptic vesicles isolated by a new procedure (1988), *EMBO J.* **7**(10), 3023-3029
  68. Greene, L. A., and Tischler, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**(7), 2424-2428
  69. Klebe, R. J., and Ruddle, R. H. Neuroblastoma - Cell Culture Analysis of a Differentiating Stem Cell System (1969), *J. Cell Biol.* **43**(2P2), A69-&
  70. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells (2001), *Nature* **411**(6836), 494-498
-

- 
71. Meister, G., and Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA (2004), *Nature* **431**(7006), 343-349
  72. Fernandez-Chacon, R., and Sudhof, T. C. Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle (1999), *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 753-776
  73. Erickson, J. D., Varoqui, H., Schafer, M. K., Modi, W., Diebler, M. F., Weihe, E., Rand, J., Eiden, L. E., Bonner, T. I., and Usdin, T. B. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus (1994), *J. Biol. Chem.* **269**(35), 21929-21932
  74. Janz, R., and Sudhof, T. C. SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family (1999), *Neuroscience* **94**(4), 1279-1290
  75. Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R., and Chapman, E. R. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A (2006), *Science* **312**(5773), 592-596
  76. Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves (2006), *FEBS Lett.* **580**(8), 2011-2014
  77. Couesnon, A., Pereira, Y., and Popoff, M. R. Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers (2008), *Cellular microbiology* **10**(2), 375-387
  78. Yowler, B. C., Kensinger, R. D., and Schengrund, C. L. Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I (2002), *J. Biol. Chem.* **277**(36), 32815-32819
  79. Bennett, M. K., Calakos, N., Kreiner, T., and Scheller, R. H. Synaptic vesicle membrane proteins interact to form a multimeric complex (1992), *J. Cell Biol.* **116**(3), 761-775
  80. Schivell, A. E., Mochida, S., Kensel-Hammes, P., Custer, K. L., and Bajjalieh, S. M. SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site (2005), *Mol. Cell. Neurosci.* **29**(1), 56-64
  81. Custer, K. L., Austin, N. S., Sullivan, J. M., and Bajjalieh, S. M. Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses (2006), *J. Neurosci.* **26**(4), 1303-1313
-

- 
82. Fernández-Salas, E., Garay, P. E., Iverson, G., Malik, S. Z., Steward, L. E., and Aoki, R. Identification of FGFR3 as a Putative Receptor for Botulinum Neurotoxin Type A Uptake in Neuronal Cells. (2005), *Neurotoxicity Research* **9**(2-3), 241
  83. Chapman, E. R. How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? (2008), *Annu. Rev. Biochem.*
  84. Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S. A., Rammner, B., Grater, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmuller, H., Heuser, J., Wieland, F., and Jahn, R. Molecular anatomy of a trafficking organelle (2006), *Cell* **127**(4), 831-846
  85. Jin, R., Rummel, A., Binz, T., and Brunger, A. T. Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity (2006), *Nature* **444**(7122), 1092-1095
  86. Chai, Q., Arndt, J. W., Dong, M., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Chapman, E. R., and Stevens, R. C. Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B (2006), *Nature* **444**(7122), 1096-1100
  87. Eswaramoorthy, S., Kumaran, D., and Swaminathan, S. Crystallographic evidence for doxorubicin binding to the receptor-binding site in Clostridium botulinum neurotoxin B (2001), *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **57**(Pt 11), 1743-1746
  88. Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T., and Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D (2008), *Microb. Pathog.*
  89. Lazarovici, P., and Yavin, E. Affinity-purified tetanus neurotoxin interaction with synaptic membranes: properties of a protease-sensitive receptor component (1986), *Biochemistry (Mosc)*. **25**(22), 7047-7054
  90. Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M., and Kozaki, S. Binding of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipid. Novel insights into the receptor for clostridial neurotoxins (2005), *J. Biol. Chem.* **280**(42), 35164-35171
  91. Devaux, P. F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes (1991), *Biochemistry (Mosc)*. **30**(5), 1163-1173
  92. Kawai, H., Allende, M. L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crawley, J. N., Werth, N., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R. L. Mice

- expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures (2001), *J. Biol. Chem.* **276**(10), 6885-6888
93. Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins (2004), *Trends Microbiol.* **12**(10), 442-446
94. Baldwin, M. R., and Barbieri, J. T. Association of botulinum neurotoxin serotypes a and B with synaptic vesicle protein complexes (2007), *Biochemistry (Mosc)*. **46**(11), 3200-3210



## 7 Anhang

### 7.1 Publikationen

#### 7.1.1 Publikationen in Zeitschriften

Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., **Mahrhold, S.**, Sandhoff, K., Proia, R. L., Acharya, K. R., Bigalke, H., and Binz, T. Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept (2007), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**(1), 359-364

**Mahrhold, S.**, Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves (2006), FEBS Lett. **580**(8), 2011-2014

Rummel, A., **Mahrhold, S.**, Bigalke, H., and Binz, T. The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction (2004), Mol. Microbiol. **51**(3), 631-643

#### 7.1.2 Buchartikel

Binz, T., Rummel, A., Karnath, T., **Mahrhold, S.**, and Bigalke, H. (2007) Cell entry strategy of botulinum neurotoxins. In: Goudey-Perrière, F., Benoit, E., Marchot, P., and Popoff, M. R. (eds). Toxines émergentes : nouveaux risques

#### 7.1.3 Poster

**Stefan Mahrhold**, Tino Karnath, Andreas Rummel, Hans Bigalke, Bazbek Davletov, and Thomas Binz. Identification of the Protein Receptor of Botulinum Neurotoxin Type A and Characterization of its Binding Site. 5th International Meeting on the Molecular Biology and Pathogenesis of Clostridia – Clostpath 2006. 21. Juni – 25. Juni 2006, Nottingham, UK.

## 7.2 Oligonukleotide

Tabelle 7: Tabellarische Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit Angabe des Namens, der Sequenz in 5' → 3' Notation und der Erkennungssequenz (ES) der enthaltenen Restriktionsschnittstelle. Kursiv gesetzte Bereiche sind nicht komplementär zum jeweiligen Template. Fettgedruckte Bereiche kennzeichnen die Erkennungssequenz. Bereiche in roter Schrift kennzeichnen Stopcodons.

Name	Sequenz (5' → 3')	ES
5Syp-TGEL	<i>CTCTGGATCC</i> ACCGGGGAGCTTCGGCTG	<i>Bam</i> HI
3Syp-LQNK	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> CTTGTCTGCAGGAAGATGTAG	<i>Sma</i> I
5Syp-AGGL	<i>CTCTGGATCC</i> GCCGGAGGCCTGTCCGATGTG	<i>Bam</i> HI
3Syp-VFKE	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> CTCCTTGAACACGAACCATAAG	<i>Sma</i> I
5SyoSGGL	<i>CTCTGGATCCT</i> CAGGAGGCCTGCGGCTG	<i>Bam</i> HI
3SyoYIFF	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GAAGAAAATGTACACGACCGT	<i>Sma</i> I
5SyoKGLS	<i>CTCTGGATCCA</i> AAGGACTGTCTGATGTCAAAG	<i>Bam</i> HI
3SyoWFVF	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GAAAACAAACCAAATGTTCCAG	<i>Sma</i> I
5Syg-NEGY	<i>CTCTGGATCCA</i> ACGAGGGCTACCTCAACAAC	<i>Bam</i> HI
3Syg-ISSV	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GACACTGCTGATCTGCGGG	<i>Sma</i> I
5Syg-ANQW	<i>CTCTGGATCC</i> GCCAACCAGTGGCAAGTCTC	<i>Bam</i> HI
3Syg-VLAF	<i>CTCTGATATCA</i> GAAGGCTAGCACAGCCTGG	<i>EcoR</i> V
5Syg3EGYV	<i>CTCTGGATCC</i> GAGGGCTACGTGAACTCC	<i>Bam</i> HI
3Syg3FLLL	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> CAGCAGCAAGAAGGCCAC	<i>Sma</i> I
5Syg3NQWQ	<i>CTCTGGATCCA</i> ATCAGTGGCAACGAAC	<i>Bam</i> HI
3Syg3VKAL	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> CAGGGCCTTCACGGTGAG	<i>Sma</i> I
5SV2aFPDM	<i>CTCTGGATCCT</i> TTCCCGACATGATCCGCCA	<i>Bam</i> HI
3SV2aSALL	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GAGCAGAGCAGACACAATGTT	<i>Sma</i> I
3SV2aGEGA	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GGCACCTTCGCCCGTCC	<i>Sma</i> I
5SV2aMEEG	<i>CTCTCTCGAG</i> ATGGAAGAAGGCTTTCGAGAC	<i>Xho</i> I
3SV2aQVLG	<i>CTCTTCTAGATCA</i> CTGCAGCACCTGTCCC	<i>Xba</i> I
5SV2bDMIR	<i>CTCTGGATCC</i> GACATGATCCGCTATTTCC	<i>Bam</i> HI
3SV2bALLM	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> CATGAGCAGGGCAGAAATTATG	<i>Sma</i> I
3SV2bEDND	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> ATCATTGTCTCTTCAAAGTCC	<i>Sma</i> I
5SV2bMDDY	<i>CTCTCTGTCGAC</i> ATGGATGACTACAGGTATC	<i>Sal</i> I
3SV2bQVLM	<i>CTCTTCTAGATCA</i> CATCAGGACCTGTCTC	<i>Xba</i> I
5SV2cFPDV	<i>CTCTGGATCCT</i> TCCAGATGTCATTAAACAC	<i>Bam</i> HI
3SV2cSALL	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> CAGGAGAGCAGACACGAT	<i>Sma</i> I
3SV2cDYSA	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GGCACTGTAGTCGTGTCAAA	<i>Sma</i> I
3SV2cYKFI	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> TATGAATTTATAGGGCTCAAATC	<i>Sma</i> I
3SV2cVTSV	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GACTGAGGTCACATCGTCAA	<i>Sma</i> I
3SV2cGRFL	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GAGGAACCTGCCATTGTCATA	<i>Sma</i> I
3SV2cKFIN	<i>CTCTCTGCCGG</i> CTGTTTATGAATTTATAGGGCTCAAATC	<i>Nae</i> I
5SV2cMEDS	<i>CTCTCTCGAG</i> ATGGAAGACTCCTACAAGGAT	<i>Xho</i> I
3SV2cQVLM	<i>CTCTTCTAGATCA</i> CATCAGAACCTGGGTTT	<i>Xba</i> I
5mVACHTPDYI	<i>CTCTGGATCCCC</i> GACTATATCGCTCACATGCGC	<i>Bam</i> HI
3rVACHTGPFI	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> AATGAAAGGCCCGCTTAAGGG	<i>Sma</i> I
3mVACHTEDVK	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> CTCACATCTTCACTTTCTGTG	<i>Sma</i> I
3mVACHTEDVK-NS	<i>CTCTCCCGGG</i> CTTACATCTTCACTTTCTGTG	<i>Sma</i> I
5rVACHTEPTI	<i>CTTACCGGT</i> GAGCCCACCATAGCCACG	<i>Age</i> I
3rVACHTYLTV	<i>CTCTGAATTCTCA</i> CACGGTGAGGTAGACGCC	<i>Eco</i> RI
3rVACHTSEWE	<i>CTCTGAATTCTCA</i> CTCCCACTCGGATGCGGC	<i>Eco</i> RI
5mVIAATGKIL	<i>CTCTGGATCC</i> GGCAAGATCCTCATCGCG	<i>Bam</i> HI
3mVIAATVVSG	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GCCGCTCACCACGACGTAC	<i>Sma</i> I
3mVIAATVNVA	<i>CTCTCCCGGGTCA</i> GCCACATTGACCACGCGG	<i>Sma</i> I
5mVIAATAAVE	<i>CTCTGGATCC</i> GCGGCCGTCGAAGTGCTG	<i>Bam</i> HI

Name	Sequenz (5' → 3')	ES
3mVIAATHFAL	CTCTCCC <b>GGGTC</b> ACAGCGCGAAGTGTGGCAGC	Sma I
3mVIAATELTL	CTCTCCC <b>GGGTC</b> ACAGCGTCAGCTCCAGGAC	Sma I
5mVATPaseA1IYND	CTCT <b>GGATC</b> CCATCTACAATGACTGCTTTCC	Bam HI
3mVATPase_A1FNHI	CTCTCCC <b>GGGTC</b> AGATATGGTTGAAAAGGCTCAG	Sma I
3mVATPaseA1FKMK	CTCTCCC <b>GGGTC</b> ACTTCATCTTGAAGGAGTTGAGG	Sma I
5mVATPaseA1YDAH	CTCT <b>GGATC</b> CCTACGATGCCCACTCGTC	Bam HI
3mVATPase_A1MLLF	CTCTCCC <b>GGGTC</b> AAAACAGAAGCATCCAAGGGAC	Sma I
3mVATPaseA1QKGI	CTCTCCC <b>GGGTC</b> AAATTCCTTTCTGTCCAGAGTAC	Sma I
5mVATPase_A1LAGG	CTCT <b>GGATC</b> CCTTGGCCGGGGGTCTAGGG	Bam HI
3mVATPaseA1KFDE	CTCTCCC <b>GGGTC</b> ACTCATCAAACCTCCCTTCC	Sma I
5mVATPaseA1LHWV	CTCT <b>GGATC</b> CCTTACTGCGGTGGAGTTCCAG	Bam HI

**Tabelle 8:** Tabellarische Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten siRNAs. Angegeben ist der Name, die Sequenz in 5' → 3' Notation, die Spezifität und Bemerkungen.

Name	Sequenz (5' → 3')	Spezifität	Bemerkungen
ratSV2A_A2	GCCUCCUUUCUGGGGUUGGTT	SV2A der Ratte	2 Fehlpaarungen zu SV2A der Maus
NM_057210si.1	CCACAGGUAUGGAGUUAUATT	SV2A der Ratte	Komplementär zu SV2A der Maus
mouseSV2C_C1	UCAAAUCGGUAACCUUCAATT	SV2C der Maus	Dong <i>et al.</i> , 2006
mouseSV2C_C2	GACAGGAUCGGGCGUUUAATT	SV2C der Maus	Dong <i>et al.</i> , 2006
mouseSV2C_C3	UCAGUUGGCUCUGCAUGUUTT	SV2C der Maus	Dong <i>et al.</i> , 2006
mouseSV2C_C3	GCGAAUCCAUGAUGAUAGGTT	SV2C der Maus	Dong <i>et al.</i> , 2006

**Tabelle 9:** Tabellarische Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten pre-miRNAs (Kap. 2.1.9). Pre-miRNAs werden wie angegeben in den Vektor pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen) legiert. Die entstehenden Plasmide erlauben die *in situ* Expression entsprechender miRNAs. Angegeben ist der Name und die Sequenz in 5' → 3' Notation. Die Zielsequenz der pre-miRNA ist rot, die Schleife schwarz und die inverse Zielsequenz grün gekennzeichnet.

Name	Sequenz (5' → 3')
NM_057210_2449_top	TGCTG <b>AAACATGGGACAAAGGGACCC</b> GTTTTGGCCACTGACTGACGG GTCCCTGTCCCATGTTT
NM_057210_2449_bottom	CCTGAAACATGGGACAGGGACCCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGGGTCC CTTTGTCCCATGTTT
NM_057210_2754_top	TGCTG <b>CACACTTGTAGCCTGAATTG</b> ATTTTTGGCCACTGACTGACTCA ATCACTACAAGTGTG
NM_057210_2754_bottom	CCTGCACACTTGTAGTGAATTGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCAATTC AGGCTACAAGTGTG
NM_021712_538_top	TGCTG <b>TAAACAGTGCAACGCACACGAT</b> GTTTTGGCCACTGACTGACAT CGTGTGTTGCACTGTTA
NM_021712_538_bottom	CCTGTAACAGTGCAACACACGATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATCGTG TGCGTTGCACTGTTAC
NM_021712_1144_top	TGCTG <b>TAGAAAGGGTACACGCTTGCC</b> GTTTTGGCCACTGACTGACGG CAAGCGTACCCTTTCTA
NM_021712_1144_bottom	CCTGTAGAAAGGGTACGCTTGCCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGGCAAG CGTGTACCCTTTCTAC
NM_021712_1691_top	TGCTG <b>AATAGGAGATGTCAGCTATGG</b> GTTTTGGCCACTGACTGACCC ATAGCTCATCTCCTATT
NM_021712_1691_bottom	CCTGAATAGGAGATGAGCTATGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCATAG CTGACATCTCCTATT

### 7.3 Abkürzungen

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der in dieser Dissertation verwendeten Abkürzungen und ihre Bedeutungen.

<b>Abkürzung</b>	<b>Langform</b>
<b>AA</b>	Acrylamid
<b>Å</b>	Ångström $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ATCC</b>	<i>american type culture collection</i>
<b>BoNT/A-G</b>	Botulinus Neurotoxin A-G
<b>bp</b>	<i>base pairs</i> , Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CCD</b>	<i>charge coupled device</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>CNT</b>	clostridielle Neurotoxine
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>ddNTP</b>	3',5'-Dideoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DEPC-Wasser</b>	DEPC-behandeltes Wasser
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotid
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreit
<b><i>E. coli</i></b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>FDA</b>	<i>USA federal drug administration</i>
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>h</b>	Stunde
<b>HC</b>	<i>heavy chain</i> , schwere Kette
<b>H<sub>C</sub></b>	C-terminale Hälfte der HC
<b>H<sub>CC</sub></b>	C-terminale Hälfte der H <sub>C</sub>
<b>H<sub>CN</sub></b>	N-terminale Hälfte der H <sub>C</sub>
<b>H<sub>N</sub></b>	N-terminale Hälfte der HC
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i>
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>ICD-10</b>	<i>International Classification of Diseases, Revision 10</i>
<b>IPTG</b>	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissoziationskonstante [M]
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KRP</b>	Krebs-Ringer-Puffer
<b>LC</b>	<i>light chain</i> , leichte Kette
<b>LD<sub>50</sub></b>	letale Dosis in 50% der Fälle
<b>min</b>	Minute
<b>MPN</b>	<i>mouse phrenic nerve</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
<b>NaOAc</b>	Natriumacetat

<b>Abkürzung</b>	<b>Langform</b>
<b>NGF</b>	<i>nerve growth factor</i> , Nervenwachstumsfaktor
<b>NSF</b>	N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>p. a.</b>	zur Analyse
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNAi</b>	RNA Interferenz
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RNasin</b>	RNase-Inhibitor
<b>rNTP</b>	Ribonukleosidtriphosphat
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<b>SAP</b>	<i>shrimp alkaline phosphatase</i> , Phosphatase aus Shrimp
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>miRNA</b>	<i>MicroRNA</i>
<b>shRNA</b>	<i>short hairpin RNA</i>
<b>siRNA</b>	<i>short interfering RNA</i>
<b>SNAP-25</b>	<i>synaptosome associated protein of 25 kDa</i>
<b>SNARE</b>	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
<b>SP6</b>	Bakteriophage SP6
<b>SV2</b>	<i>synaptic vesicle protein 2</i>
<b>Syg</b>	Synaptogyrin
<b>Syo</b>	Synaptoporin (Synaptophysin 2)
<b>Syp</b>	Synaptophysin
<b>Syt</b>	Synaptotagmin
<b>TAE-Laufpuffer</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TBS</b>	<i>tris buffered saline</i>
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<b>TeNT</b>	Tetanus Neurotoxin
<b>TIFF</b>	<i>Tagged Image File Format</i>
<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
<b>tRNA</b>	Transfer RNA
<b>T4</b>	Bakteriophage T4
<b>T7</b>	Bakteriophage T7
<b>UV</b>	ultra violett
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>VACht</b>	vesikulärer Acetylcholin-Transporter
<b>VAMP</b>	<i>vesicle associated membrane protein</i>
<b>VATPase</b>	vesikuläre ATPase
<b>VGAT</b>	vesikulärer GABA-Transporter
<b>VIAAT</b>	<i>vesicular inhibitory amino acid transporter</i>
<b>WHO</b>	<i>world health organization</i>
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen

## 7.4 Chemikalien

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der verwendeten Chemikalien und der jeweiligen Hersteller.

Name	Hersteller
2-[4'-Hydroxy-benzenazo]-benzoesäure (HABA)	Sigma
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Roth
2-Mercaptoethanol, zur Synthese	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid 4K Lösung 29:1 Mix	Applichem
Agar	ICN
Agarose	Roth
Aminosäuremix ohne Methionin	Promega
Ampicillin	Roth
Benzamidin	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva
Calciumchlorid, getrocknet ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck
Coomassie Brilliant Blue R 250, für die Elektrophorese	Merck
D-Desthiobiotin	IBA
Dephosphorylierungspuffer 10x	Boehringer
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p. a. ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	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	Calbiochem
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma
Glycerin, doppelt destilliert, p. a.	Serva
Glycin, p. a.	Roth
Hefeextrakt	Roth
HPLC- $\text{H}_2\text{O}$	J.T.Baker
Isopropanol, reinst	J.T.Baker
Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Merck
Kaliumchlorid, p. a. (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, p. a. ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Kanamycin	Sigma
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Magermilchpulver	Applichem

Name	Hersteller
Methanol, p. a.	Roth
<sup>35</sup> 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 <sub>3</sub> )	Riedel DeHaën
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel DeHaën
Nervenwachstumsfaktor (NGF)	Alomone Labs
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 4000 (PEG)	MBI Fermentas
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	Amersham
pre-Mix für Sequenzierung	ABI
<i>Pwo</i> -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
RNasin®, RNase-Inhibitor	Promega
Salzsäure (HCl) 37%, p. a.	Merck
<i>Strep</i> -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

## 7.5 Bakterienstämme

### 7.5.1 *E. coli* TG1

Dieser Bakterienstamm wird zur Transformation von Plasmid-DNA verwendet. *E. coli* TG1 trägt das *lac*<sup>q</sup>-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<sup>-</sup> Abkömmling vom JM101-Stamm, der transformierte DNA weder modifiziert noch schneidet.

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

### 7.5.2 *E. coli* M15[pREP4] (Qiagen)

*E. coli* M15[pREP4] (Qiagen) wird für die rekombinante Expression der BoNT und BoNT<sub>H<sub>C</sub></sub>-Fragmente 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<sup>S</sup> str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup>

### 7.5.3 *E. coli* BL21 (Stratagene)

BL21 ist ein proteasedefizienter *E. coli* Stamm, der sich besonders zur Expression von GST-Fusionsproteinen eignet. *E. coli* BL21 synthetisiert keine OmpT und Lon Proteasen, die die Bildung von intakten rekombinanten Proteinen verhindern können.

Genotyp: B F- *dcm ompT hsdS*(<sub>FB-</sub> <sub>MB-</sub>) *gal*

## 7.6 Plasmide

### 7.6.1 pGEX-4T3 (GE Healthcare Life Sciences)

Der pGEX-4T3-Vektor ist ein prokaryontisches Expressionsplasmid zur rekombinanten Expression von Fusionsproteinen mit C-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli*. Der Vektor enthält das Gen für GST unter Kontrolle eines *tac*-Promotors, dessen Expression durch IPTG induziert werden kann. Zur Klonierung und Selektion in *E. coli* enthält das Plasmid ein Ampicillinresistenzgen.



### 7.6.2 pCMV5

Der pCMV5-Vektor ist ein eukaryontisches Expressionsplasmid. Gene, die in den Polylinker dieses Vektors kloniert werden stehen unter der Kontrolle des Cytomegalievirus *immediate early* Promotors, was zu einer starken Überexpression in nahezu allen Zelllinien führt. Zur Klonierung und Selektion in *E. coli* enthält das Plasmid ein Ampicillinresistenzgen.

### 7.6.3 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen)

Der pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor von Invitrogen ist ein Plasmid mit Cytomegalievirus *immediate early* Promotor, das die konstitutive Expression von miRNAs (MicroRNAs) in eukaryontischen Zellen erlaubt. Das Plasmid ermöglicht außerdem die kocistronische Expression von EmGFP (*Emerald Green Fluorescent Protein*), was die Selektion positiv transfizierter Zellen erleichtert. Zur Klonierung in *E. coli* enthält das Plasmid ein Spektinomycinresistenzgen. Positiv transfizierte eukaryontische lassen sich durch Blasticidin selektieren.

---

**Lebenslauf**

Vorname: Stefan

Nachname: Mahrhold

Geburtstag: 13. April 1976

Geburtsort: Hildesheim

Familienstand: Verheiratet mit Julia Mahrhold, geb. Herwig

Kinder: Greta Marie Mahrhold, geboren am 27.02.2007

Eltern: Roswitha Mahrhold, geb. Koch  
Walter Mahrhold

Geschwister: Jens Mahrhold, geb. 07.10.1974

Schullaufbahn: 1982 – 1987 Grundschule Langenholzen  
1987 – 1989 Orientierungsstufe Alfeld  
1989 – 1996 Gymnasium Alfeld

Schulabschluss: Juni 1996 Abitur

Wehrdienst: September 1996 – Juni 1997 Grundwehrdienst in Stadtoldendorf

Studium: WS 1997/1998 bis WS 2003/2004 Studium der Biochemie (Diplom)  
an der Universität Hannover

Abschluss: Juli 2003 Diplomprüfungen

1. Fach: Biochemie

2. Fach: Biophysikalische Chemie

3. Fach: Immunologie

Juli 2003 – Februar 2004 Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie im Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

Doktorarbeit: April 2004 – Juli 2008 im Institut für Physiologische Chemie im Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 18. Juli 2008