

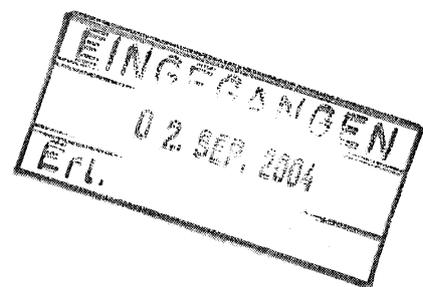
**Entwicklung einer *in-vitro*-Methode
zur Detektion von residualer Toxizität
in Tetanusimpfstoffen**

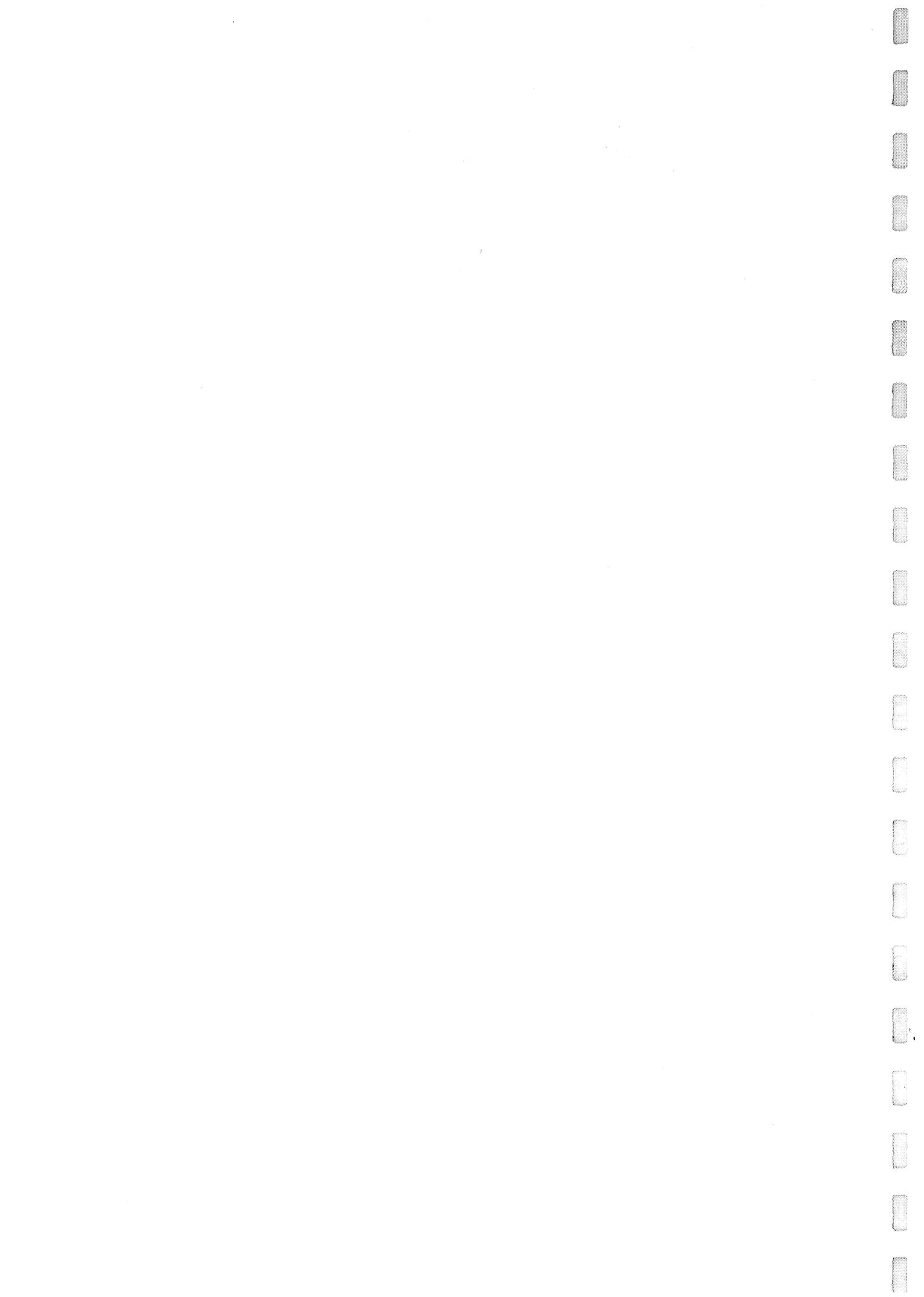
Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Katja Silberbach
aus Münster

Frankfurt (2004)





Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 BAKTERIELLE EXOTOXINE: STRUKTUR UND WIRKUNG IM ÜBERBLICK	3
2.1.1 CLOSTRIDIEN ALS TOXINBILDNER	4
2.2 MOLEKULARE MECHANISMEN DER VERGIFTUNG MIT CLOSTRIDIEN-NEUROTOXINEN	6
2.2.1 STRUKTUR DER NEUROTOXINE	6
2.2.2 KINETISCHE EIGENSCHAFTEN DER NEUROTOXINE: DER WEG ZUM WIRKORT	7
2.2.3 ENZYMATISCHE EIGENSCHAFTEN DER NEUROTOXINE: HEMMUNG DER EXOCYTOSE	11
2.3 TETANUS ALS KRANKHEIT	18
2.3.1 KRANKHEITSVERLAUF	18
2.3.2 VORKOMMEN UND HÄUFIGKEIT	19
2.3.3 IMPFUNG	19
2.4 TETANUSIMPFSTOFFE	19
2.4.1 HERSTELLUNG	20
2.4.2 PRÜFUNG VON TETANUSIMPFSTOFFEN: AKTUELLER STAND	20
2.5 ERSATZ- UND ERGÄNZUNGSMETHODEN ZUM TIERVERSUCH	21
3 PROBLEMSTELLUNG	23
3.1 ANFORDERUNGEN AN EINE <i>IN-VITRO</i> -METHODE ZUR SICHERHEITSPRÜFUNG VON TETANUSIMPFSTOFFEN	23
3.2 METHODEN ZUR DETEKTION VON TETANUSTOXIN ODER BOTULINUMTOXIN/B	24
3.3 AUFBAU DES TENT-ENDOPEPTIDASE-ASSAYS	27

4	MATERIAL UND METHODEN	33
<hr/>		
4.1	MEDIEN UND LÖSUNGEN	33
4.1.1	MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE VERSUCHE	33
4.1.2	MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR MIKROBIOLOGISCHE VERSUCHE	34
4.1.3	MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE PROTEINAUFREINIGUNG	34
4.1.4	LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR DIE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	36
4.1.5	LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR IMMUNOBLOTS	38
4.1.6	LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR ELISA	39
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
4.2.1	PCR ZUR AMPLIFIZIERUNG DER rSYB2-DNA	41
4.2.2	LIGATION DER DNA IN BAKTERIENPLASMID	44
4.2.3	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> ONESHOT®TOP10 CHEMICALLY COMPETENT CELLS	46
4.2.4	ANALYSE DER TRANSFORMIERTEN <i>E. COLI</i> -KLONE MITTELS KOLONIE-PCR	47
4.2.5	ANALYSE DER TRANSFORMIERTEN <i>E. COLI</i> -KLONE MITTELS RESTRIKTIONSVERDAU	48
4.2.6	SEQUENZIERUNG DER PLASMID-DNA	49
4.2.7	HERSTELLUNG VON <i>E. COLI</i> -KRYOKULTUREN	49
4.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	49
4.3.1	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> -EXPRESSIONSSTÄMMEN	49
4.3.2	EXPRESSION IM 500ML-MAßSTAB	51
4.3.3	EXPRESSION IM 10L-FERMENTER	51
4.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	52
4.4.1	SDS-PAGE ZUR AUFTRENNUNG VON PROTEINGEMISCHEN	52
4.4.2	AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEM SYNAPTOBREVIN-2	53
4.4.3	OPTIMIERUNG DER BEDINGUNGEN ZUR PROTEINFALTUNG	55
4.4.4	DIALYSE DES AUFGEREINIGTEN rSYB2S	56
4.4.5	BESTIMMUNG DER rSYB2-KONZENTRATION	56
4.4.6	LYOPHILISATION VON rSYB2	57
4.5	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	57
4.5.1	VERWENDETE ANTIKÖRPER	57
4.5.2	SPALTUNG VON REKOMBINANTEM SYNAPTOBREVIN-2 MIT TETANUSTOXIN	60
4.5.3	IMMUNOBLOTS ZUM NACHWEIS DER SPALTUNG VON rSYB2 DURCH TETANUSTOXIN	61
4.5.4	ELISA ZUM NACHWEIS DER SPALTUNG VON GEBUNDENEM rSYB2	61

5	ERGEBNISSE	65
<hr/>		
5.1	KLONIERUNG VON <i>E. COLI</i>-STÄMMEN ZUR EXPRESSION VON RSYB2	65
5.1.1	PCR ZUR HERSTELLUNG VON SYNAPTOBREVIN-2-DNA-FRAGMENTEN	65
5.1.2	LIGATION DER PCR-PRODUKTE IN EXPRESSIONSVEKTOREN	66
5.2	EXPRESSION DER RSYB2-FRAGMENTE	69
5.2.1	VERGLEICH VON DREI <i>E. COLI</i> -STÄMMEN ZUR HERSTELLUNG VON RSYB2(N;1-97)	70
5.2.2	SCALE-UP DER EXPRESSION VON 500ML AUF 10L	72
5.2.3	AUFREINIGUNG DES EXPRIMIERTEN RSYB2S AUS <i>E. COLI</i>	72
5.3	HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN RSYB2-SPALTPRODUKTE	77
5.4	SPALTUNG DER REKOMBINANTEN SYNAPTOBREVIN-2-FRAGMENTE DURCH TETANUSTOXIN	79
5.5	ELISA ZUM NACHWEIS DER SPALTUNG VON RSYB2	82
5.5.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR REIHENFOLGE VON SPALTUNG UND IMMOBILISIERUNG VON RSYB2	82
5.5.2	VERGLEICH DER DREI RSYB2-FRAGMENTE	85
5.5.3	OPTIMIERUNG DES ASSAYS	91
5.5.4	SENSITIVITÄT DES ASSAYS	99
6	DISKUSSION	103
<hr/>		
6.1	ZUSAMMENSTELLUNG DER KOMPONENTEN FÜR DEN ELISA	103
6.1.1	HERSTELLUNG DER RSYB2-FRAGMENTE	103
6.1.2	ANTI-KÖRPER GEGEN SYNAPTOBREVIN-2 UND GEGEN DIE TeNT-SPALTFRAGMENTE	108
6.2	AUFBAU DES ELISA	110
6.2.1	REIHENFOLGE VON SPALTUNG UND IMMOBILISIERUNG DES RSYB2S	110
6.2.2	AUSWAHL DES RSYB2-FRAGMENTS	112
6.2.3	OPTIMIERUNG DES ELISA	114
6.2.4	SENSITIVITÄT DES ELISA	116
6.3	KONSEQUENZEN DER UNTERSUCHUNGEN	117
7	ZUSAMMENFASSUNG	121
<hr/>		
8	LITERATUR	123
<hr/>		

9 ANHANG	131
9.1 VEKTORKARTEN	131
9.2 AUSWERTUNG DER MESSDATEN	135
9.2.1 REGRESSIONSANALYSEN	135
9.2.2 BERECHNUNG VON NACHWEIS- UND ERFASSUNGSGRENZE	135
9.3 GERÄTELISTE	141
9.4 LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN	141
9.5 LISTE DER VERBRAUCHSMATERIALIEN	143
9.6 INTERNETADRESSEN DER HERSTELLERFIRMEN	144

Abkürzungsverzeichnis

ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno- <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
TeNT	<u>T</u> etanus- <u>N</u> euro <u>T</u> oxin
BoNT/A bis /G	<u>B</u> otulinum- <u>N</u> euro <u>T</u> oxin <u>A</u> bis <u>G</u>
kDa	<u>K</u> ilodalton
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization
Gly	<u>G</u> lycin
K _M	Michaelis-Konstante
Cys	<u>C</u> ystein
PC-12-Zellen	<u>P</u> haeochromocytoma-12-Zellen
SNARE	<u>S</u> oluble <u>N</u> -ethylmaleimide-sensitive Fusion- <u>A</u> ttachment <u>R</u> eceptors
Syb2	<u>S</u> ynaptobrevin- <u>2</u>
rSyb2	rekombinantes <u>S</u> ynaptobrevin- <u>2</u>
ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
H-Kette	Schwere (von engl.: <u>h</u> heavy) Kette; große Untereinheit der Clostridien-Neurotoxine
L-Kette	Leichte (von engl.: <u>l</u> ight) Kette; kleine Untereinheit der Clostridien-Neurotoxine
H _C -Domäne	C-terminaler Bereich der großen Untereinheit der Clostridien-Neurotoxine
H _C C-Subdomäne	C-terminaler Bereich der H _C -Domäne der Clostridien-Neurotoxine
H _C N-Subdomäne	N-terminaler Bereich der H _C -Domäne der Clostridien-Neurotoxine
H _N -Domäne	N-terminaler Bereich der großen Untereinheit der Clostridien-Neurotoxine
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
NSF	<u>N</u> -Ethylmaleimid- <u>s</u> ensitiver <u>F</u> aktor
α-SNAP	<u>S</u> oluble <u>N</u> SF <u>A</u> ttachment <u>P</u> rotein
LD (z. B. LD ₅₀)	<u>L</u> etale <u>D</u> osis (LD ₅₀ : Dosis; bei der <u>50%</u> der Versuchstiere versterben)
Zn ²⁺	Zinkionen
Ca ²⁺	Calciumionen
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MLD	<u>M</u> inimale <u>L</u> etale <u>D</u> osis
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
SDS-PAGE	<u>S</u> odiumdodecylsulfat- <u>P</u> olyacrylamidgelelektrophorese
IMAC	<u>I</u> mmobilisierte <u>M</u> etall- <u>A</u> ffinitäts- <u>C</u> hromatographie
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
pET	<u>P</u> rotein <u>E</u> xpression using <u>T</u> 7
EDTA	<u>E</u> thylenediaminetetraacetic <u>A</u> cid
TMB	3,3',5,5'- <u>T</u> etramethylbenzidin
OD (z. B. OD ₆₀₀)	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte (bei einer Wellenlänge von <u>600nm</u>)

BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
IPTG	<u>I</u> sopropyl <u>t</u> hiogalactosid
NiNTA	<u>N</u> ickel- <u>N</u> itro <u>t</u> riacetic <u>A</u> cid
KLH	<u>K</u> eyhole- <u>L</u> impet- <u>H</u> ämocyanin
TCA	<u>T</u> richloric <u>A</u> cid
VAMP2	<u>V</u> esicle- <u>A</u> ssociated <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein 2 (Synonym f. Synaptobrevin-2)
Pox	<u>P</u> eroxidase
mAK	<u>m</u> onoklonaler <u>A</u> ntikörper
pAK	<u>p</u> olyklonaler <u>A</u> ntikörper
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
bp	<u>B</u> asenpaare
Aq. dest	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
dNTP	<u>2'</u> - <u>D</u> eoxynukleotid- <u>5'</u> - <u>t</u> riphosphat
His ₆ -tag	<u>H</u> istidin ₆ - <u>t</u> ag
HCl	Salzsäure
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. tetani</i>	<i>Clostridium tetani</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
TBS, TBS-Puffer	<u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
APS	Ammoniumpersulfat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ CO ₃	Dinatriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
CaCl ₂	Calciumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
KCl	Kaliumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
EGTA	<u>E</u> thylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <u>N,N,N',N'</u> - <u>t</u> etraacetic <u>A</u> cid

1 Einleitung

Die Zahl der jährlich auftretenden Tetanusfälle konnte in den vergangenen Jahrzehnten durch eine systematische Impfung der Bevölkerung kontinuierlich reduziert werden. In industrialisierten Ländern ist das Krankheitsbild aufgrund des seltenen Auftretens heute praktisch unbekannt. Zu diesem Erfolg hat die außerordentliche Akzeptanz der Tetanusimpfstoffe maßgeblich beigetragen. Sie ist mitbedingt durch die hohe Verträglichkeit der Impfstoffe, welche von den Herstellern und zuständigen Behörden durch eine umfassende Prüfung gesichert wird.

Ein entscheidender Schritt beim Herstellungsprozess des Impfstoffes ist die sichere Inaktivierung des Tetanustoxins, ohne dessen Immunogenität zu beeinträchtigen. Dieser Schritt ist bei jeder produzierten Charge sorgfältig zu kontrollieren. Dabei ist insbesondere zu gewährleisten, dass keinerlei Spuren des aktiven Toxins im Produkt enthalten sind. Das Tetanustoxin, das die Erregungsweiterleitung an Neuronen blockiert, gehört bekanntermaßen zu den giftigsten natürlichen Substanzen. Spuren von aktivem Toxin in Impfstoffen hätten verheerende Wirkungen.

Die Sicherheitsprüfung der produzierten Chargen hinsichtlich spezifischer Toxizität muss auch heute noch im Tierversuch erfolgen. Der weltweit enorme Impfstoffbedarf ist daher auch mit einer beträchtlichen Zahl durchzuführender Tierversuche verbunden. Es sind ethische und ökonomische Gründe, die sowohl Prüfbehörden als auch Impfstoffproduzenten veranlassen, nach einer Alternative für diesen Tierversuch zu suchen. Die vorliegende Arbeit stellt sich daher das Ziel, einen solchen *in-vitro*-Nachweis für aktives Tetanustoxin zu entwickeln.

Die biologische Aktivität des Tetanustoxins wird durch seine enzymatische Aktivität bestimmt. Als Substrat wurde das Membranprotein Synaptobrevin-2 identifiziert, das in der Synapse an der Exocytose von Neurotransmittern beteiligt ist. Aktives Tetanustoxin spaltet das Synaptobrevin-2 in zwei Fragmente und unterbindet dadurch nahezu irreversibel die Reizweiterleitung.

Diese enzymatische Aktivität des Tetanustoxins bildet die Grundlage für einen *in-vitro*-Test, der die enzymatische Spaltung von rekombinantem Synaptobrevin-2 erfasst, indem die Spaltprodukte immunologisch detektiert werden. Dazu ist es erforderlich, dass mindestens eines der beiden Synaptobrevin-2-Spaltfragmente durch geeignete Antikörper spezifisch detektiert wird.

Die Sensitivität des Tests muss der Nachweisgrenze des Tierversuches mindestens entsprechen, außerdem müssen die Mindestanforderungen an eine Standardisierung für die Anwendung in der Impfstoffprüfung erfüllt sein.

Für die Entwicklung des *in-vitro*-Tests wurden drei verschiedene rekombinante Synaptobrevin-2-Polypeptide mit molekularbiologischen Methoden hergestellt und deren Expression und Aufreinigung aus *E. coli* optimiert.

Zur Detektion der Spaltprodukte kamen neben kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen Synaptobrevin-2 auch zwei in „Eigenarbeit“ hergestellte, polyklonale Kaninchenserum zur Anwendung. Diese sollen das N- bzw. das C-terminale Synaptobrevin-2-Spaltfragment, nicht jedoch un-

gespaltenes Synaptobrevin-2 detektieren. Die zur Verfügung stehenden Komponenten für den Aufbau des Assays müssen vergleichend ausgetestet und optimiert werden. Schließlich ist die praktische Eignung zur Prüfung von Tetanusimpfstoffen zu untersuchen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Bakterielle Exotoxine: Struktur und Wirkung im Überblick

Das Tetanustoxin gehört zur Gruppe der bakteriellen Exotoxine. Diese Giftstoffe werden meist sezerniert oder gelangen - wie das Tetanustoxin - durch Autolyse in das umgebende Medium. Viele Exotoxine modulieren den Stoffwechsel eines Wirtes, indem sie spezifisch in grundlegende physiologische Prozesse wie die Proteinbiosynthese oder die Funktion des Nervensystems eingreifen. Man unterteilt die bakteriellen Exotoxine in drei Gruppen (s. Abbildung 2.1). Toxine der Gruppen (i) und (ii) wirken von der Zelloberfläche aus, Toxine der Gruppe (iii) müssen zunächst in das Cytosol der Wirtszelle gelangen.

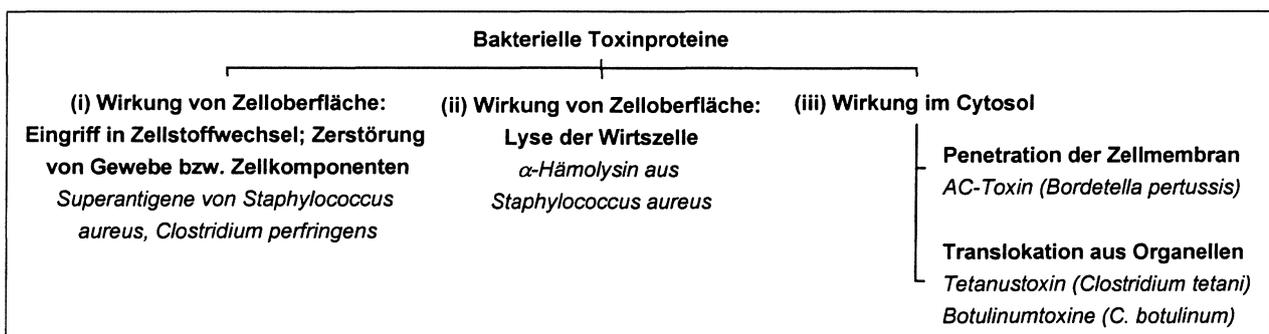


Abbildung 2.1: Einteilung der bakteriellen Toxinproteine (nach Olsnes (2000) [1], Rossetto (2000) [2]). Beispiele für die einzelnen Toxingruppen sind kursiv gedruckt.

Das Tetanustoxin gehört wie die meisten bakteriellen Toxine zur dritten Gruppe (iii). Mit Ausnahme des Toxins aus *Bordetella pertussis*, das direkt die Zellmembran penetriert, gelangen alle Toxine dieser Gruppe über einen vierstufigen Mechanismus in das Cytosol. Dieser besteht aus der Bindung an die Zelle, der Internalisierung durch Endocytose, der Translokation aus Organellen ins Cytosol und der Entfaltung der enzymatischen Wirkung [3].

Die im Cytosol wirkenden Toxine weisen eine ähnliche Grundstruktur auf (s. Abbildung 2.2). Man bezeichnet sie als AB-Toxine, da sie aus einer enzymatisch aktiven Untereinheit (A-Untereinheit) und einer oder mehrerer B-Untereinheiten bestehen, welche für die Bindung an die Zelle und teilweise auch für die Translokation ins Cytosol verantwortlich sind. Ein AB-Toxin wird in der Regel als einkettiges Polypeptid synthetisiert und muss zur Aktivierung von bakteriellen oder wirtseigenen Proteasen zwischen A- und B-Untereinheit gespalten werden. Die Untereinheiten bleiben - oft über Disulfidbrücken - miteinander verbunden, bis die A-Untereinheit das Cytosol erreicht.

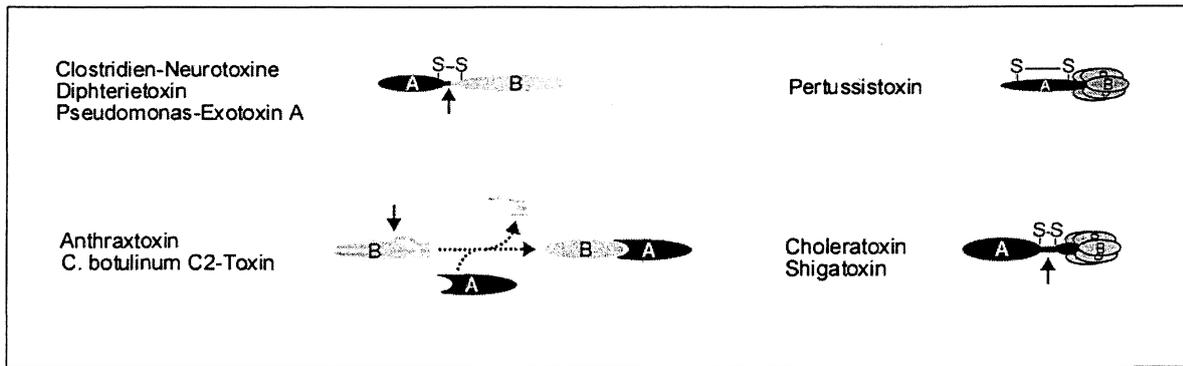


Abbildung 2.2: Struktur einiger AB-Toxine (nach Falnes (2000) [4]). Gekennzeichnet sind die A- und die B-Untereinheit, die durch Proteolyse (Pfeil) aktiviert werden. Die Disulfidbrücken werden durch wirts-eigene Reduktasen oder durch reduzierende Bedingungen in den Organellen gespalten. Die Untereinheiten der Anthraxtoxine und einiger Clostridientoxine (z. B. C2-Toxin aus *C. botulinum*) werden als getrennte Polypeptide synthetisiert, prozessiert und binden dann aneinander.

Durch die Bindung an verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche werden die Toxine in unterschiedliche Zellorganellen aufgenommen [1,5]. Einige Toxine, z. B. Pseudomonas-Exotoxin A, Cholera- und Shigatoxin, werden von Endosomen durch das Trans-Golgi-Netzwerk ins Endoplasmatische Reticulum (ER) transportiert. Die Translokation ins Cytosol funktioniert oft durch die Nutzung des zelleigenen Sec61b-Translocons, durch den die Zelle falsch gefaltete Proteine zur Degradierung aus dem ER ins Cytosol transportiert. Toxine wie die Tetanus-, Botulinum-, Diphtherie- und Anthraxtoxine translozieren aus einem Endosom ins Cytosol. In Tabelle 2.1 ist für einige AB-Toxine jeweils der Enzymtyp und die Wirkung aufgelistet. Alle Toxine greifen in essentielle Funktionen der Zelle ein.

Toxin	Typ des Enzyms	Wirkung
Shigatoxin	N-Glycosylase	Inhibierung der Proteinbiosynthese
Diphtherietoxin, Pseudomonas Exotoxin A	ADP-Ribosyltransferase	Inhibierung der Proteinbiosynthese
Botulinum C2-Toxin	ADP-Ribosyltransferase	Inhibierung der Actinpolymerisation
Cholera- und Pertussistoxin	ADP-Ribosyltransferase	Modulation der Signaltransduktion
Anthrax Letales Toxin	Zink-Endopeptidase	Modulation der Signaltransduktion
Clostridien-Neurotoxine (Tetanus-, Botulinumneurotoxine)	Zink-Endopeptidasen	Inhibierung der neuronalen Signalweiterleitung

Tabelle 2.1: Liste einiger Toxinproteine: Typ des Enzyms und die Wirkung auf die Zielzelle

Die Gattung Clostridium enthält zahlreiche toxinbildende Arten. Daher wird sie im nachfolgenden Abschnitt genauer beschrieben.

2.1.1 Clostridien als Toxinbildner

Die Gattung Clostridium ist mit über 150 Arten eine der größten Bakteriengattungen [6]. Vergleiche der 16S rRNA-Sequenzen bestätigten die schon lange beobachtete Diversität in der Gattung [6].

Clostridien sind ca. $0,5 \times 2,5 \mu\text{m}$ große, peritrich begeißelte Stäbchen. Diese eigentlich gram-positiven Bakterien können in älteren Kulturen auch gram-negativ auftreten. Sie bilden ovale bis runde Endosporen, die gegenüber Hitze und zahlreichen Lösungsmitteln äußerst beständig und im Dunkeln praktisch unbegrenzt haltbar sind. Clostridien wachsen unter anaeroben Bedingungen. Bis auf wenige thermophile Arten wachsen sie im mesophilen Temperaturbereich und nur im neutralen bis alkalischen pH-Bereich [7].

Die Clostridienarten unterscheiden sich stark in ihrem Nährstoffspektrum, die meisten zählen zu den saccharolytischen oder den peptolytischen Clostridien. Erstere vermögen z. B. Stärke oder Cellulose zu verwerten, letztere bauen Proteine und Aminosäuren ab [7]. Clostridien zeichnen sich durch einen ausgeprägten Gärungsstoffwechsel aus. Außerdem können sie neben kurzkettigen Fettsäuren auch eine Reihe von Alkoholen bilden, dabei entsteht in vielen Fällen eine große Menge Gas (H_2 , CO_2).

C. perfringens ist die in Patienten mit klinischen Symptomen am häufigsten isolierte Clostridienart, *C. histolyticum*; *C. septicum* und *C. novyi* lösen die gleichen Symptome aus [6]. Die produzierten Toxine zersetzen nach einer Wundinfektion das umliegende Muskelgewebe, und die dabei gebildeten Gärprodukte und Gase verursachen Wundbrand (Gasgangrän).

Clostridium tetani ist die einzige Art, die Tetanustoxin (TeNT, für Tetanus-Neurotoxin) zu produzieren vermag [8]. Die genetische Information für das Tetanustoxin ist plasmidcodiert [9], deshalb kann *C. tetani* die Pathogenität verlieren [8]. *C. tetani* findet sich ubiquitär in Boden und im Magen-Darm-Trakt von Pferden, seltener in Rindern oder anderen Tieren [10]. Gelangen die Sporen in eine Wunde, keimen sie aus, wenn die Wunde vom Luftsauerstoff abgeschlossen ist oder sie mit aeroben, den Sauerstoff verbrauchenden Bakterien infiziert ist. Häufig erfolgt eine Infektion durch Fremdkörper wie Holzsplitter oder Dornen. In der Regel verbleiben die Clostridien in der Wunde, aber manchmal gelangen sie über zerstörtes Gewebe, z. B. verletzte Darmschleimhaut, in Lymph- oder Blutbahnen. Sie können dann in innere Organe oder an Orten mit mangelhafter Sauerstoffversorgung, z. B. gequetschtem Gewebe, auskeimen [11].

Ein weiterer humanpathogener Vertreter der Gattung *Clostridium* ist *C. botulinum*, deren Sporen in nicht ausreichend sterilisierten Wurstwaren (lat.: *botulus*= Wurst) und Konserven keimen. Die Bakterien bilden dort die Botulinumtoxine als Bestandteil eines gegenüber der Verdauung resistenten Komplexes, der über den Darm resorbiert wird. Neben *C. botulinum* synthetisieren auch andere Clostridienarten wie *C. butyricum* und *C. barati* die Botulinumtoxine [8]. Sieben verschiedene Serotypen des Botulinumtoxins (BoNT/A bis G, für Botulinum-Neurotoxin A bis G) sind bekannt, wobei nur BoNT/A, /B, /C und /E für den Menschen relevant sind [6,8]. Botulinumtoxin A ist das stärkste natürliche Gift [7].

Tetanus- und Botulinumtoxin wirken im Nervensystem von Vertebraten und werden deshalb als Clostridien-Neurotoxine zusammengefasst. Sie stammen wahrscheinlich von einem gemeinsamen Vorläufer ab [12,13].

2.2 Molekulare Mechanismen der Vergiftung mit Clostridien-Neurotoxinen

Die Clostridien-Neurotoxine sind sich funktional und strukturell ausgesprochen ähnlich [8,9,13,14]. Tetanus und Botulismus sind aber durch gegenläufige Symptome charakterisiert, die auf den unterschiedlichen Wirkorten der Toxine beruhen (genauere Erläuterungen in Abschnitt 2.2.2). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit werden die Wirkungsweise des Tetanustoxins und der Botulinumtoxine im Folgenden gemeinsam dargestellt.

2.2.1 Struktur der Neurotoxine

Die Clostridien-Neurotoxine werden ohne Leadersequenz als eine lange Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 150kDa exprimiert. Je nach Toxin variiert die Länge zwischen 1251 (BoNT/E) und 1315 Aminosäuren (TeNT). Die Toxine stimmen in 30-40% der Aminosäuresequenz überein [8,15].

Die Clostridien-Neurotoxine werden mit der Zell-Lyse freigesetzt [16]. Dort werden sie unspezifisch in einem als „nicking site“ bezeichneten Bereich gespalten (s. Abbildung 2.3) [8]. Diese Prozessierung erfolgt durch Clostridien- oder Wirtsproteasen wie Trypsin [17,18].

Die Struktur der Clostridien-Neurotoxine entspricht dem allgemeinen Aufbau der AB-Toxine. Die B-Untereinheit hat ein Molekulargewicht von etwa 100kDa und wird als H-Kette (von engl.: havy) bezeichnet. Die A-Untereinheit wird L-Kette (von engl.: light) genannt und hat ein Molekulargewicht von etwa 50kDa. Beide Ketten sind durch eine Disulfidbrücke verbunden (s. Abbildung 2.3).

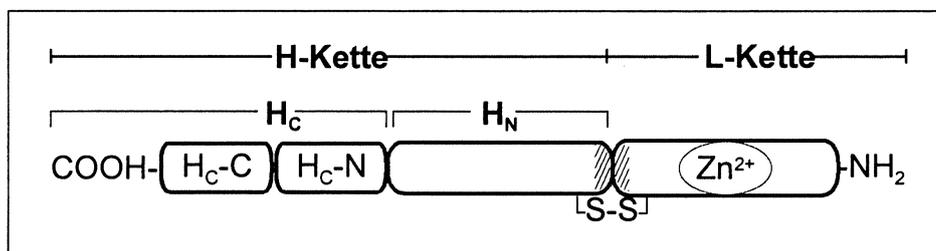


Abbildung 2.3: Struktur der Neurotoxine aus Clostridien. Die H-Kette ist unterteilt in H_C- und H_N-Domäne, erstere besteht aus H_C-C- und H_C-N-Subdomäne. Nach der Prozessierung in der „nicking site“ (schraffiert) sind H- und L-Kette über eine Disulfidbrücke verbunden.

Die Aminosäuresequenz der H_C-C-Subdomäne ist unter den Clostridien-Neurotoxinen kaum konserviert [13,16]. In der Varianz dieser Subdomäne wird der Schlüssel für den Transport der Clostridien-Neurotoxine zu unterschiedlichen Wirkorten vermutet. In allen Toxinen ist aber ein Motiv enthalten, das von verschiedenen Proteinen mit Erkennungs- und Bindungsfunktionen bekannt ist [19]. Die H_C-N-Subdomäne enthält stark konservierte Aminosäuresequenzen, und die Sekun-

därstruktur ist bei allen Clostridien-Neurotoxinen sehr ähnlich [16,19]. Einige Lectine und andere gangliosidbindende Proteine weisen eine vergleichbare Struktur auf [15,20].

Die H_N-Domänen sind in Sequenz und Struktur stark homolog [15]. Sie weisen große Ähnlichkeit zu einigen viralen Proteinen auf, die durch eine säureabhängige Konformationsänderung Membranen penetrieren [8,13]. Eine Schleife der H_N-Domäne umgibt die L-Kette wie ein Gürtel - dies ist vermutlich der Grund für die proteolytische Inaktivität des nicht-reduzierten Toxins [8,9,16].

Die L-Ketten sind Zink-abhängige Metalloproteasen. Metallchelatoren entfernen das Zinkion und hinterlassen ein strukturell unverändertes, inaktives Apotoxin [21,22]. Die Gesamtstruktur der L-Ketten zeigt keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteasen [15]. Die aktiven Zentren von Tetanus- und Botulinumtoxinen enthalten ein für Zink-abhängige Metalloproteasen typisches Zink-Bindungsmotiv, die Aminosäuresequenz HEXXH (s. Abbildung 2.4.) [21-23], wobei „X“ eine beliebige Aminosäure sein kann (bei den Clostridien-Neurotoxinen handelt es sich immer um Leucin).

BoNT/A	PAVTLAHELIHAG	FEEL	RKTYLNF
BoNT/B	PALILMHELIHVL	AEEL	RASYFSD
BoNT/C	PILILMHELNHAM	YAEI	RKIYLSN
BoNT/D	PVIALMHELTHSL	FEEL	RTHYFSR
BoNT/E	PALTLMHELIHSL	IEEF	RQTYIGV
BoNT/F	PAISLAHELIHAL	LEEF	RNTYFIK
BoNT/G	PALTEMHELIHVL	AEEL	RYSYFSE
TeNT	PALLMHELIHVL	AEEL	RLSYFSM
	227	239	269 272 372 378

Abbildung 2.4: Vergleich der Aminosäuresequenz in den L-Ketten der Clostridien-Neurotoxine (nach Rossetto (2002) [14]). Die Nummerierung bezieht sich nur auf das TeNT und unterscheidet sich bei den BoNTs. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

Neben dem HEXXH-Bindungsmotiv sind noch andere Aminosäurereste für Struktur und Funktion des aktiven Zentrums verantwortlich. Ein Glutamatrest (E₂₇₁ im TeNT) bindet ein für die hydrolytische Reaktion wichtiges Wassermolekül [24]. Der Phenolring eines Tyrosinrests (Y₃₇₅ im TeNT) ragt in das aktive Zentrum und stellt vermutlich ein für die Stabilität der Spaltprodukte entscheidendes Proton zur Verfügung [24]. Auch ein Argininrest (R₃₇₂ im TeNT) ist für die Funktion der Enzyme wichtig, aber die genaue Rolle ist nicht geklärt.

Der Aufbau des aktiven Zentrums ähnelt Thermolysin [14,15,24], die anderen an der Bindung beteiligten Aminosäurereste deuten aber eher darauf hin, dass es sich bei den Clostridien-Neurotoxinen um eine ganz eigene Klasse von Metalloproteasen handelt (Familie M27 in der MEROPS-Datenbank [25]) [13,26].

2.2.2 Kinetische Eigenschaften der Neurotoxine: der Weg zum Wirkort

Nach der Freisetzung diffundieren die Clostridien-Neurotoxine kaum durch das Gewebe, sondern werden an der präsynaptischen Membran durch Endocytose in α -Motoneurone aufgenommen [13].

Das Tetanustoxin wird innerhalb der endocytotischen Vesikel des α -Motoneurons mittels retrogradem Transport in das ventrale Horn der grauen Substanz des Rückenmarks transportiert (s. Abbildung 2.5) [13]. An der postsynaptischen Membran des α -Motoneurons wird es in den synaptischen Spalt sezerniert und in Vesikel eines inhibitorischen Neurons internalisiert; dieser Vorgang heißt Transcytose. Im Gegensatz dazu verbleiben die Botulinumtoxin enthaltenden Vesikel in der Synapse des α -Motoneurons und unterliegen keinem retrograden Transport.

Alle Clostridien-Neurotoxine durchdringen die Vesikelmembran in der Synapse ihres Zielneurons (Membrantranslokation) und entfalten im Cytosol ihre Wirkung.

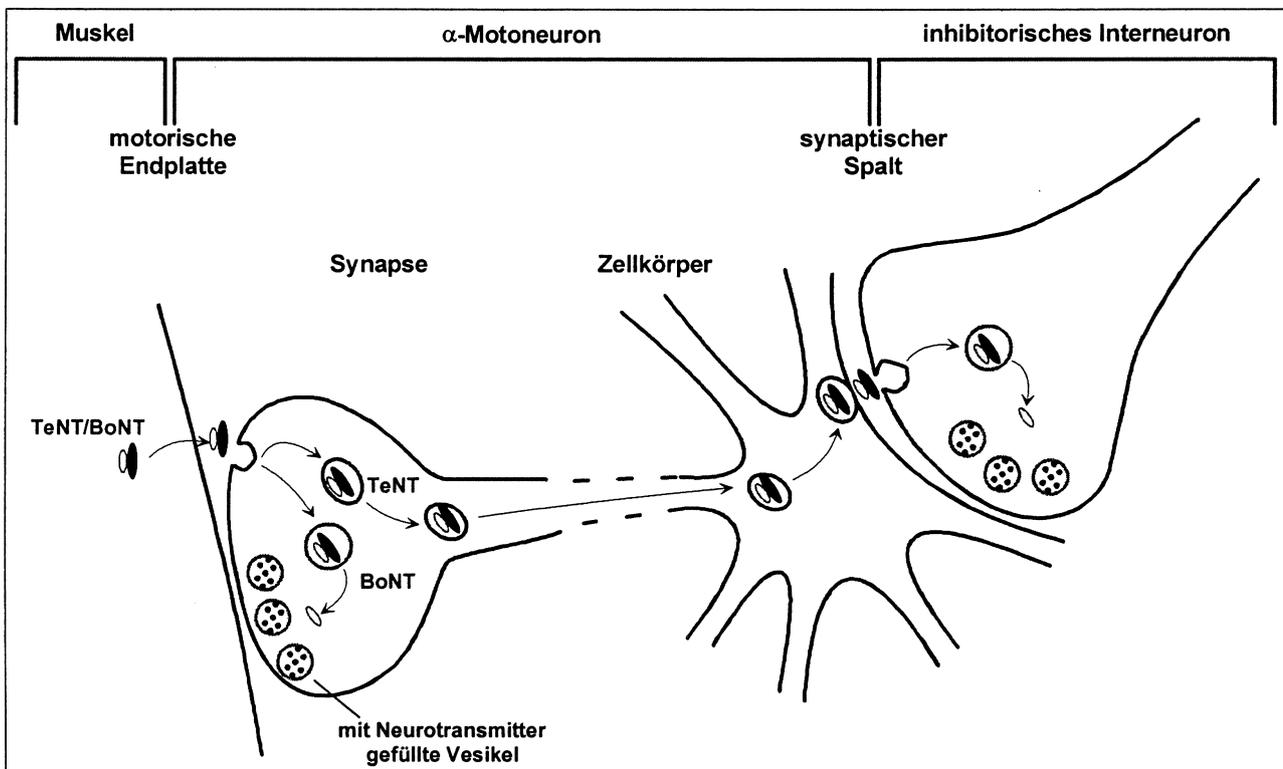


Abbildung 2.5: Darstellung der kinetischen Unterschiede zwischen TeNT und BoNT. Nach der Endocytose an der motorischen Endplatte unterliegt das TeNT dem retrograden Transport, BoNT dagegen nicht. Die Membrantranslokation, durch den die L-Kette in der Zielzelle aus dem Vesikel in das Cytosol passagiert, funktioniert gleich. Die H-Kette verbleibt wahrscheinlich in der Vesikelmembran.

Die Information zum Transport ins zentrale Nervensystem muss sich in der Struktur oder der Funktion verantwortlicher Regionen des Tetanustoxins reflektieren und ist in Botulinumtoxin nicht enthalten. Es gilt als sehr wahrscheinlich, dass die Toxine an unterschiedliche Rezeptoren binden und dadurch in unterschiedliche Vesikel aufgenommen werden [13].

2.2.2.1 Neurospezifische Bindung und Internalisierung

Der erste Schritt der Intoxikation ist die Bindung von Tetanus- oder Botulinumtoxin an α -Motoneurone und die Aufnahme in Vesikel.

Die Toxine binden an Ganglioside in der neuronalen Membran [27-33]. Diese bilden eine Klasse der Glycosphingolipide und kommen besonders häufig in den Membranen neuronaler Zellen vor [34]. Ihr Grundgerüst bildet ein mit einer Fettsäure acyliertes Sphingosinmolekül, an dessen primärer Hydroxylgruppe eine verzweigte Kette aus Zuckermolekülen gebunden ist. Je nachdem, ob das Gangliosid eine oder mehrere N-Acetylneuraminsäuren (=Sialinsäuren) enthält, zählt man es zu den Mono- (z. B. G_{M1}) bzw. den Polysialogangliosiden (z. B. G_{D1b} , G_{T1b}). Die Toxine zeigen bei der Bindung an Ganglioside keine ausgeprägte Spezifität [29], jedoch ist die Affinität zu Polysialogangliosiden bedeutend höher als zu Monosialogangliosiden [27,35].

Für die Gangliosidbindung ist im wesentlichen die H_C -Domäne erforderlich [35-38]. Wird die H_C -Domäne des Tetanustoxins intramuskulär injiziert, sammelt sie sich *in vivo* im zentralen Nervensystem an [13,38]. Wahrscheinlich sind aber auch andere Bereiche des Moleküls involviert, da die Internalisierung des Holotoxins effektiver funktioniert als die der isolierten H_C -Domäne [13].

Obwohl die lectinähnliche Struktur der H_C N-Subdomäne auf die Fähigkeit zur Gangliosidbindung hindeutet, ist an der motorischen Endplatte die H_C C-Subdomäne für diese Bindung verantwortlich [36,39]. Die 34 C-terminalen Aminosäuren scheinen zur Bindung der Toxinmoleküle an Ganglioside entscheidend beizutragen [28,30,32]. Emsley et al. [27] identifizierten im Tetanustoxin vier mögliche Regionen zur Bindung von Carbohydraten. Möglicherweise bindet es multivalent an Membranen [28,31].

Die geringe Spezifität der Toxine für Ganglioside steht im Kontrast zu ihrer spezifischen Bindung an bestimmte Neurone und zu ihrer differierenden Wirksamkeit auf verschiedene Spezies. Außerdem konnte in mehreren Untersuchungen die Bindung der Clostridien-Neurotoxine durch eine Behandlung mit Proteasen unterbunden werden (zusammengefasst in [37]). Die Internalisierung der Clostridien-Neurotoxine beruht daher wahrscheinlich auf der gemeinsamen Bindung an Ganglioside und an einen Proteinrezeptor.

In neueren Studien wird die Bindung von Tetanustoxin in „Lipid Rafts“ untersucht. Dies sind Membranstrukturen, in denen Sphingolipide und Cholesterol dicht gepackt auftreten und funktionelle Domänen bilden. In ihnen sind besonders häufig Polysialoganglioside und an Glycosylphosphatidylinositol (GPI) gebundene Proteine zu finden [40], die als Rezeptoren fungieren. „Lipid Rafts“ spielen eine große Rolle im intrazellulären Transport und in der biochemischen Signalweiterleitung [34,41,42]. So liegt es nahe, dass viele Toxine, aber auch einige Viren und Bakterien durch die Bindung an diese Strukturen in Zellen gelangen [37,41-43]. Mehrere Untersuchungen zeigen, dass Tetanustoxin in „Lipid Rafts“ der α -Motoneurone an ein oder mehrere GPI-verankerte Rezeptorproteine bindet [36,43-45]. Diese Rezeptoren sind aber bis dato nicht identifiziert.

Nach einem Modell von Herreros et al. [43], könnte die geringaffine Bindung an Ganglioside in „Lipid Rafts“ zu einer lokalen Konzentration der Toxine führen. Die zusätzliche hochaffine Bindung an Proteinrezeptoren ermöglicht die effektive Nutzung der zellulären Transportmechanismen.

Die Proteinrezeptoren für BoNT/A, /B und /E sind Synaptotagmine [46,47].

2.2.2.2 Retrograder Transport und Transcytose des Tetanustoxins

Es ist unklar, welche Zellstrukturen das Tetanustoxin für den retrograden Transport benutzt [13,48]. In α -Motoneuronen wurde die TeNT-H_C-Domäne in morphologisch verschiedenen und teilweise bis dato unbekanntes vesikulären Strukturen gefunden [38]. Im Gegensatz zu Endosomen und Lysosomen werden diese Vesikel nicht angesäuert [38], das Tetanustoxin scheint das lysosomale System also zu umgehen. Dieses Ergebnis erklärt die lange Halbwertszeit des Tetanustoxins in Neuronen von bis zu 5 Tagen [8,13,37]. Erst seit kurzem sind zelluläre endocytotische Transportwege bekannt, mit denen das endosomal-lysosomale System von *E. coli* in Mastzellen oder von Simian Virus 40 in Fibroblasten umgangen wird [37].

Die Tetanustoxin enthaltenden Vesikel werden durch Exocytose in den synaptischen Spalt zwischen α -Motoneuron und inhibitorischem Neuron ausgeschüttet. Wie das TeNT dann in das inhibitorische Neuron gelangt, ist unklar. Die Bindung an Ganglioside könnte hier wieder eine Rolle spielen, vielleicht bindet das Toxin auch an einen Proteinrezeptor. Der Mechanismus unterscheidet sich aber wahrscheinlich von der Internalisierung in α -Motoneurone [38,48]. Dafür spricht, dass das Tetanustoxin nun in Vesikel aufgenommen wird, die in der Synapse verbleiben. Möglicherweise liegt hier der gleiche Mechanismus zugrunde wie bei Botulinumtoxin [13,48].

2.2.2.3 Membrantranslokation

Da sowohl Tetanus- als auch Botulinumtoxin im Cytosol der Synapse wirken, müssen sie durch die Lipiddoppelschicht des Vesikels gelangen, in das sie internalisiert wurden. Die genaue Funktionsweise dieser Membrantranslokation ist nicht geklärt. Offenbar ist die H_CN-Subdomäne dafür verantwortlich [13-15,49,50]. Der Mechanismus könnte für Tetanus- und Botulinumtoxine in den jeweils erreichten Neuronen auf die gleiche Art und Weise funktionieren, die H_CN-Subdomänen weisen jedenfalls außerordentlich starke Homologien auf [16]. Ihre Strukturen zeigen dabei weniger Ähnlichkeit zu porenbildenden Toxinen [14,20] als zu einigen viralen Proteinen [13-15].

Die Membrantranslokation der Clostridien-Neurotoxine erfordert einen pH-Wert im sauren Bereich (zusammengefasst in [13]) - ein Schritt, in dem sich die Clostridien-Neurotoxine und andere bakterielle Toxinproteine gleichen [3]. Wird die Ansäuerung des Vesikellumens durch die Hemmung einer Protonenpumpe (ATPase) in der Vesikelmembran unterbunden, hat dies eine Inhibierung der Toxinaktivität zur Folge [8,48,51]. Die Toxine unterliegen durch den niedrigen pH-Wert einer Konformationsänderung, die zur Exposition von hydrophoben Molekülregionen führt [13,14]. Deshalb können die Toxinmoleküle nun in die Lipiddoppelschicht eindringen. Es wird vermutet, dass die H-Kette einen hydrophilen Spalt bildet, durch den die L-Kette in die Lipiddoppelschicht gelenkt wird [3]. Auf ähnliche Weise funktioniert der Transport von Proteinen durch die Membran des Endoplasmatischen Reticulums [52].

Für die Entfaltung der Aktivität in der Synapse muss die Disulfidbrücke zwischen H- und L-Kette reduziert werden. Da weder die H- noch die L-Kette reduzierende Eigenschaften besitzen, muss ein neuronales Enzym für diesen Schritt genutzt werden. Bigalke et al. [8] schlagen dafür den aus Neuronen isolierten Thioredoxin-Reduktase-Komplex vor.

Sobald die L-Kette in das Cytosol gelangt, faltet sie sich wieder in eine wasserlösliche Konformation und besitzt nun ihre proteolytische Wirksamkeit.

2.2.3 Enzymatische Eigenschaften der Neurotoxine: Hemmung der Exocytose

Die L-Ketten der Clostridien-Neurotoxine greifen in die Erregungsweiterleitung der Neurone ein, indem sie spezifisch die Proteine spalten, die in der Synapse für die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt verantwortlich sind. Abschnitt 2.2.3.1 beschreibt allgemein die Funktionsweise des synaptischen Exocytoseapparates, bevor in Abschnitt 2.2.3.2 auf die molekulare Wirkung der Clostridien-Neurotoxine eingegangen wird.

2.2.3.1 Aufbau und Funktion des Exocytoseapparates

Neurone erzeugen und leiten Informationen in Form von elektrischen Signalen (Aktionspotentialen) an ihren Membranen. Über Synapsen leitet ein Neuron ein Signal an eine benachbarte Zelle weiter. Chemische Synapsen wandeln die elektrische Potentialänderung in einen Sekretionsprozess um. Dabei ist die Modulation des Signals möglich, so dass variabel auf Reize reagiert werden kann.

Im Bereich der chemischen Synapsen befinden sich viele spannungsabhängige Calciumkanäle. Erreicht ein Aktionspotential die Synapse, steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration von $< 0,1\mu\text{M}$ auf $1-100\mu\text{M}$ [34]. Das Calcium reagiert mit einem bisher nicht identifizierten Ca^{2+} -Sensor. In den Synapsen befinden sich in hoher Dichte $40-50\text{nm}$ große, mit Neurotransmittern gefüllte Vesikel. Ein Teil der Vesikel ist an die Membran assoziiert, der Rest bildet eine Reserve. Das Calciumsignal bewirkt die Fusion dieser Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Neuronen können bis zu 50 Aktionspotentiale pro Minute weiterleiten, weil jeweils nur etwa 10% der assoziierten Vesikel mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und weil der Wiederaufbau der Vesikel sehr schnell stattfindet [34].

Die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran wird durch einen Komplex aus Proteinen bewirkt, die jeweils in der Vesikel- oder in der Plasmamembran verankert sind (s. Abbildung 2.7). Dies sind die SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion-attachment receptors), die man traditionell je nach ihrer Lokalisierung in v(esikuläre)- und in t(arget)-SNARE-Proteine unterteilt. Das Funktionsprinzip der SNARE-Proteine gilt allgemein für die Fusion von Vesikeln mit Zielmembranen, also nicht nur bei der Exocytose von Neurotransmittern, sondern generell beim Transport von Substanzen durch Zellen [34,53]. Diese grundlegende Funktion der SNARE-Proteine erklärt ihre starke Konservierung von Hefen bis zu Säugetieren [34]. In unterschiedlichen

Zellstrukturen kommen unterschiedliche Isotypen der SNARE-Proteine zum Einsatz [54]. Für den gezielten Transport an einen Bestimmungsort sind aber nicht allein die unterschiedlichen SNARE-Isotypen verantwortlich, die Grundlagen dafür sind noch nicht vollständig geklärt [53,55-57].

Grundsätzlich besteht ein SNARE-Komplex aus vier sich zusammenlagernden Polypeptidketten. Im neuronalen SNARE-Komplex sind dies das v-SNARE Synaptobrevin-2 und die t-SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP-25; von letzterem gehen sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich in den Komplex ein.

- Synaptobrevin-2 (auch VAMP-2, vesicle-associated membrane protein, isoform 2, genannt) enthält 117 Aminosäuren und ist 13kDa groß (s. Abbildung 2.6). Die N-terminale, Prolin-reiche Region könnte für die spezifische Interaktion des Proteins mit Effektoren verantwortlich sein [13,58]. Die zentrale Aminosäuresequenz ist zwischen Synaptobrevin-Isotypen stark konserviert [13]. Die darauf folgende Region enthält ein Bindungsmotiv für Calmodulin, kann aber auch mit Phospholipiden interagieren [59]. Der gesamte cytoplasmatische Teil des Synaptobrevins wird in den SNARE-Komplex eingebracht [60]. Mit den 20 C-terminalen Aminosäuren ist Synaptobrevin-2 in der Vesikelmembran verankert.

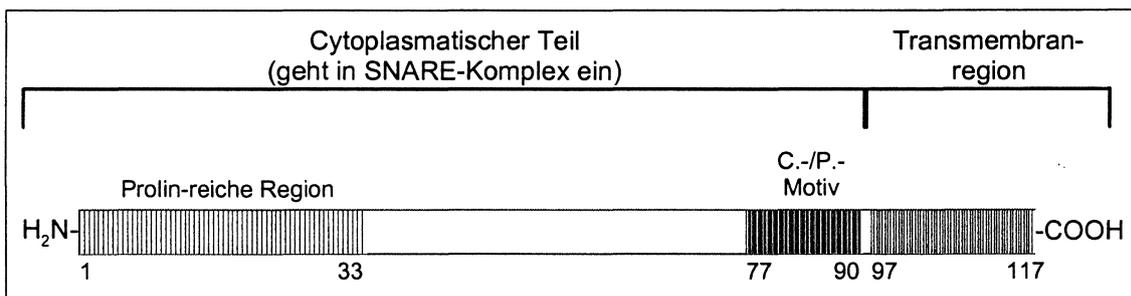


Abbildung 2.6: Struktur von Synaptobrevin-2 (C./P.-Motiv: Calmodulin-/Phospholipid-Motiv).

- Syntaxin ist ein 35kDa großes, integrales Transmembranprotein, das mit verschiedenen Ca²⁺-Kanälen interagiert [13]. Nur die zentrale Region des Syntaxins geht in den SNARE-Komplex ein [61]. Der N-Terminus interagiert mit Effektoren [53,62,63], im neuronalen SNARE-Komplex ist dies Munc18-1 [59,64].
- SNAP-25 ist 25kDa groß. Es wird durch die Palmitoylierung von vier Cysteinresten im zentralen Bereich der Polypeptidkette an die Plasmamembran gebunden [65]. Sowohl die N- als auch die C-terminale Region von SNAP-25 gehen in die Ausbildung des SNARE-Komplexes ein [61].

Solange die SNARE-Proteine frei in das Cytoplasma ragen, zeigen sie keine definierte Struktur [66-68]. Erst im SNARE-Komplex bilden sie α -Helices aus [66-68]. Die vier Polypeptidketten der SNARE-Proteine schrauben sich in parallelen α -Helices umeinander, die C-Termini aller SNARE-Proteine sowie der Fettsäureanker des SNAP-25 liegen dabei an einer Seite des Bündels (s. Abbildung 2.7) [61,68].

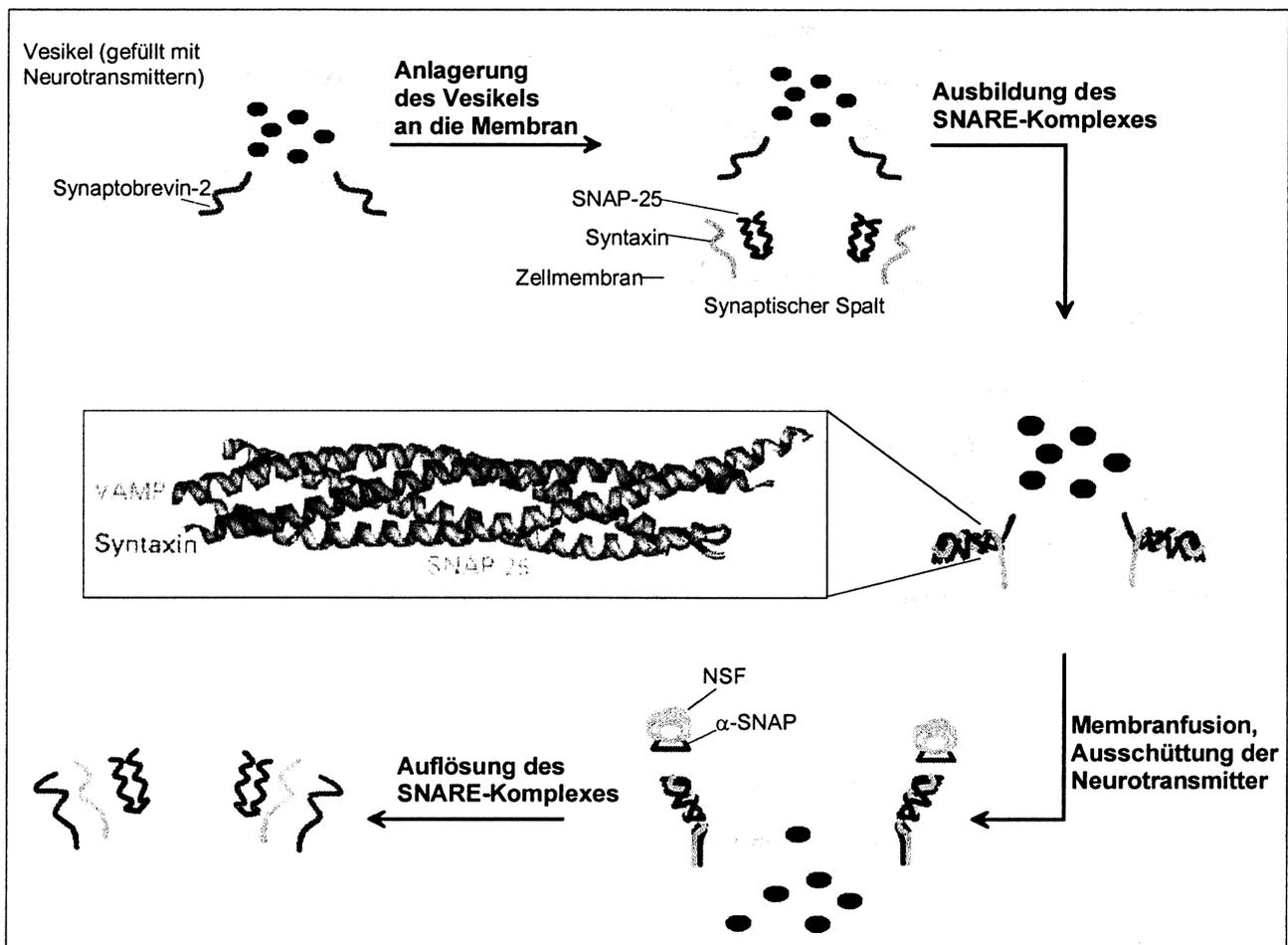


Abbildung 2.7: Ablauf der Neuroexocytose. In der Mitte ist die Struktur der SNARE-Proteine im SNARE-Komplex dargestellt: sie bilden α -Helices aus, die sich umeinander schrauben. Die Rolle von Effektoren sowie der zeitliche Ablauf in Bezug auf den Ca^{2+} -Einstrom in das Neuron sind noch ungeklärt und deshalb nicht dargestellt (nach [34]).

Durch welche Effektoren und in welchem Ablauf die SNARE-Proteine bei der Ausbildung des SNARE-Komplexes reguliert werden, ist noch ungeklärt. Möglicherweise komplexieren sie zum Teil schon vor der Ankunft eines Aktionspotentials. Erst durch die in die Synapse strömenden Calciumionen würde der Komplex vollständig ausgebildet [62,63,69-71]. Diese „Vorbereitung“ des SNARE-Komplexes für die Fusion könnte die Signalweiterleitung beschleunigen [69,70].

Bei der Ausbildung eines SNARE-Komplexes interagieren zunächst die N-terminalen Bereiche der beteiligten Polypeptidketten. Der Komplex zieht sich dann wie ein Reißverschluss in Richtung der C-Termini zusammen [53,61,64,69,70]. Die Transmembranregionen an den C-Termini werden zueinander gezogen und die Vesikel- und die Plasmamembran liegen als Folge dicht aneinander [55]. Wie die Membranen dann zur Fusion gebracht werden, ist noch nicht geklärt. Ein passiver Vorgang wie die bloße Aneinanderlagerung der Membranen führt aber nicht zu deren Fusion [56]. Möglich wäre ein aktiver Prozess, bei dem die SNARE-Proteine Kraft auf die Membranen ausüben und diese so zur Fusion bringen [56,72].

Nach der Fusion der Membranen und der Exocytose der Neurotransmitter befinden sich die SNARE-Komplexe in der Plasmamembran (s. Abbildung 2.7). Sie sind ungewöhnlich stabil [73-75], ihre Dissoziation erfordert Energie [34,73,74]. Diese wird durch die Hydrolyse von ATP durch die ATPase NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) bereitgestellt. NSF bindet in Gegenwart von α -SNAP (soluble NSF attachment protein; die Namensähnlichkeit von α -SNAP und SNAP-25 ist zufällig) an den SNARE-Komplex und dissoziiert ihn [34,73,74]. Die vesikulären Proteine, z. B. Synaptobrevin-2, werden in weniger als 1 Sekunde nach der Exocytose durch Endocytose in Clathrin-umhüllte Vesikel aufgenommen [13].

Die Neurotransmitter diffundieren nach der Exocytose durch den synaptischen Spalt und übertragen das neuronale Signal durch die Bindung an Rezeptoren in der Membran des benachbarten Neurons. Die Transmittermoleküle werden nach der Signalweiterleitung in die Synapse zurück transportiert oder im Cytoplasma neu synthetisiert. In ein Vesikel gelangen sie durch spezifische Membrankanäle. Das Vesikel kann sich wieder an die präsynaptische Membran anlagern und steht für ein neues Fusionsereignis zur Verfügung.

2.2.3.2 Proteolytische Wirkung der Neurotoxine

Die Clostridien-Neurotoxine hemmen die Exocytose von Neurotransmittern, indem sie die SNARE-Proteine selektiv und spezifisch hydrolysieren: TeNT und BoNT/B, /D, /F, und /G spalten Synaptobrevin-2 [22,76-81], BoNT/A und /E spalten SNAP-25 [82,83]. Nur BoNT/C spaltet sowohl Syntaxin als auch SNAP-25 [80,82-86]. Die Toxine spalten jeweils nur eine bestimmte Peptidbindung ihres Substrats (s. Abbildung 2.8). Diese hohe Spezifität ist unter den Zink-Metalloproteasen einzigartig (zusammengefasst in [87]). Nur TeNT und BoNT/B spalten dieselbe Bindung in Synaptobrevin-2 (Q₇₆-F₇₇) [76,78], alle anderen Botulinumtoxine spalten ihre Substrate an jeweils unterschiedlichen Stellen (s. Abbildung 2.8).

Ein Teil des Synaptobrevin-2 ist gegen die Spaltung durch Tetanustoxin resistent [88]. Dieser Teil ist in Vesikeln enthalten, die bereits mit der präsynaptischen Membran assoziiert sind. Sobald das Synaptobrevin-2 mit SNAP-25 und Syntaxin komplexiert, ist es durch Tetanustoxin nicht mehr hydrolysierbar [60].

Synaptobrevin-2 ist für den Menschen das einzige physiologisch relevante Substrat des TeNT und der genannten BoNTs. In Neuronen gibt es neben Synaptobrevin-2 auch die Isoform Synaptobrevin-1, in allen untersuchten nicht-neuronalen Zellen findet man die Isoform Cellubrevin [76]. Synaptobrevin-2 und Cellubrevin werden *in vitro* gleich gut gespalten; da die Toxine aber fast nur in neuronale Zellen gelangen, hat dies keine physiologische Bedeutung. Synaptobrevin-1 aus einigen Spezies, z. B. Ratten, weist gegenüber Synaptobrevin-2 u. a. einen Tausch des Aminosäurerests in Position 76 auf, der mit dem Aminosäurerest in Position 77 die von TeNT und BoNT/B zu spaltende Peptidbindung bildet. Synaptobrevin-1 aus Ratten wird deshalb nur sehr schlecht gespalten

[76,78]. Die großen Unterschiede in der N-terminalen Region und in der Transmembranregion zwischen den drei Isoformen sind für die Hydrolyse durch die Toxine irrelevant [76,78].

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Clostridien-Neurotoxine nicht in der Lage sind, kurze Peptide zu spalten, die ihre jeweilige Spaltstelle enthalten [3,12,76,78,82]. Die Aminosäuren beiderseits der Spaltstelle sind also nicht die einzigen Determinanten für die Hydrolyse des Substrats. So benötigt das Tetanustoxin für die vollständige Aktivität ein Polypeptid, das mindestens die Aminosäuren 27-93 aus Synaptobrevin-2 enthält [87].

Rossetto et al [12] postulierten, dass die Sequenzen der SNARE-Proteine untereinander konservierte Regionen für die Bindung der Clostridien-Neurotoxine enthalten, weil die Substraterkennung durch die Toxine von untereinander stark konservierten Bereichen gewährleistet wird. Tatsächlich fand die Arbeitsgruppe das sogenannte SNARE-Motiv. Das Motiv ist in den SNARE-Proteinen in unterschiedlicher Kopienzahl vorhanden (s. Abbildung 2.8). Synaptobrevin-2 enthält zwei Kopien des SNARE-Motivs, eine zwischen den Aminosäuren 38 und 47 (V1), die andere zwischen den Aminosäuren 62 und 71 (V2) [12].

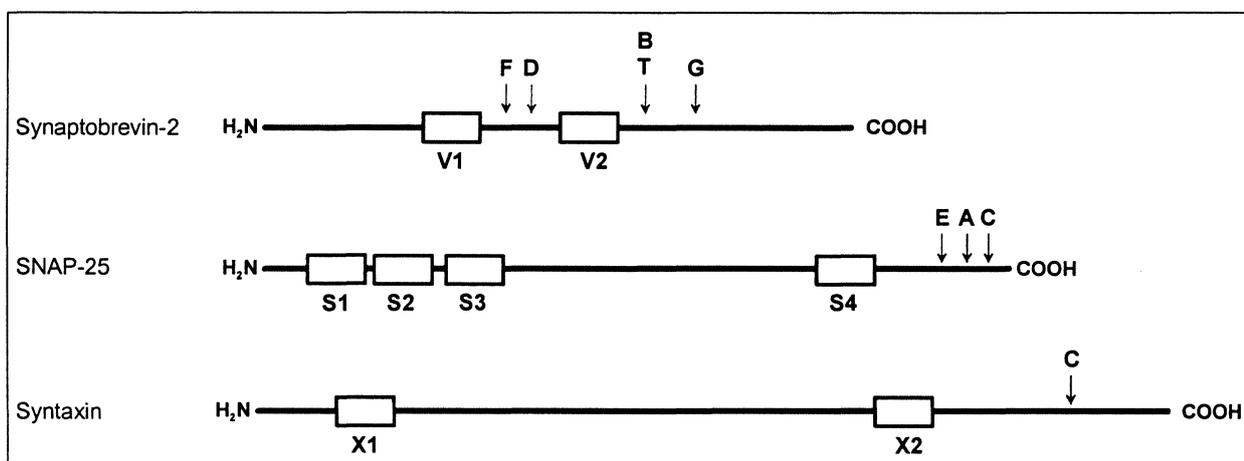


Abbildung 2.8: Spaltung der SNARE-Proteine durch Clostridien-Neurotoxine (A-G: BoNT/A bis /G; T: TeNT). TeNT und BoNT/B spalten dieselbe Peptidbindung in Synaptobrevin-2. Die Lage der SNARE-Motive ist jeweils durch Rechtecke angedeutet (nach Rossetto (1994) [12]).

Dass das SNARE-Motiv eine Erkennungssequenz für die Clostridien-Neurotoxine ist, konnte in mehreren Versuchen gezeigt werden [12,89]. Antikörper gegen das SNARE-Motiv eines SNARE-Proteins kreuzreagieren mit anderen SNARE-Proteinen, und durch die Bindung inhibieren sie die Hydrolyse durch die Toxine. Auch Peptide, die eins der SNARE-Motive darstellen, können die Clostridien-Neurotoxine inhibieren.

In der Synaptobrevin-2-Erkennung wird ein fundamentaler Unterschied zwischen TeNT und BoNT/B deutlich. Mutationen in der C-terminalen Kopie des SNARE-Motivs (V2) senken die proteolytische Aktivität von BoNT/B, das Tetanustoxin bleibt davon unbeeinflusst. Mutationen in der N-terminalen Kopie (V1) bewirken den gegenteiligen Effekt. Weil die für die Bindung wichtige Kopie des SNARE-Motivs für BoNT/B näher an der Spaltstelle liegt als die Kopie für Tetanustoxin, kann

BoNT/B kürzere Peptide spalten als das Tetanustoxin (Aminosäuren 44-93 vs. 27-93) [13,90]. Die große strukturelle Ähnlichkeit der beiden Toxine lässt vermuten, dass beide Kopien in der Tertiärstruktur des Synaptobrevins in der gleichen Orientierung und im gleichen räumlichen Verhältnis zur Spaltstelle liegen [16,89].

Für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes aus Tetanustoxin und Synaptobrevin-2 wurde ein allosterischer Mechanismus vorgeschlagen, der für keine andere Protease außer Thrombin beschrieben ist [87]. Das Tetanustoxin bindet das Synaptobrevin-2 demnach zunächst im Bereich der Aminosäuren 82-93, ändert dadurch seine Konformation und besitzt eine gestiegene Affinität zum Bereich der Aminosäuren 27-55, welcher das SNARE-Motiv V1 enthält. Erst dann geht das Toxin in eine proteolytisch aktive Form über und spaltet Synaptobrevin-2 zwischen den beiden Erkennungssequenzen.

Die gespaltenen SNARE-Proteine sind noch in der Lage zu komplexieren, der SNARE-Komplex ist aber nicht stabil genug, um die Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran zu ermöglichen [13,60,91]. In die Synapse gelangende neuronale Signale können nicht weitergeleitet werden. Da das Tetanustoxin in inhibitorischen Neuronen wirkt, werden inhibitorische Signale zur Entspannung von Muskeln nicht weitergesandt - das führt zur Hyperaktivität von α -Motoneuronen. Muskeln verkrampfen und der Patient entwickelt die klassischen Symptome von Tetanus (s. Abschnitt 2.3.1). Die Botulinumtoxine wirken in exzitatorischen Fasern an der motorischen Endplatte. Wenn hier die neuronale Signalweiterleitung unterbrochen wird, fehlen Signale zur Muskelkontraktion. Der Patient entwickelt Lähmungserscheinungen, die für Botulismus typisch sind.

2.2.3.3 Toxizität des Tetanustoxins

Das Tetanustoxin ist hinter BoNT/A das zweitstärkste natürliche Gift, die Angaben zur Toxizität schwanken allerdings recht stark. Um die Giftigkeit für den Menschen zu ermitteln, muss man die Ergebnisse aus Tierversuchen extrapolieren. Die Ergebnisse verschiedener Tierversuche variieren jedoch beträchtlich zwischen Tierspezies und der Applikationsart (s. Tabelle 2.2). Im Vergleich zu Mäusen gelten Menschen und Pferde als mindestens gleich empfindlich [13,92], eine Quelle gibt sogar eine zwölfmal höhere Sensibilität an [11]. Meerschweinchen sind etwa vier- bis achtmal so empfindlich wie Mäuse ([11,13,92]). Ratten, Vögel, Schlangen und Amphibien reagieren kaum auf Tetanustoxin, Schildkröten sind völlig unempfindlich [13,92].

Parameter	Toxizität	Spezies	Applikation	Quelle	Kommentar
MLD nach 48h	0,1ng/ Tier	Maus	k. A.	[93]	
MLD nach 4-6 Tagen	1ng/ Tier	Maus	k. A.	[11]	Annahme: Ø 15g/ Tier
MLD	<1ng/kg	Maus	intraperitoneal	[22]	
LD ₅₀	0,1-1ng/kg	Maus	n.n.	[13]	
MLD	1ng/ kg	Maus	intracranial	[92]	
MLD	0,3ng/ kg	Meerschwein	intracranial	[92]	Annahme: Ø 250g/ Tier
MLD	0,5-5ng/ kg	Kaninchen	intracranial	[92]	Annahme: Ø 3kg/ Tier
Letale Dosis	<2,5ng/ kg	Mensch	?	[92]	Extrapolation aus Tierdaten
Letale Dosis	100-1000ng	Mensch	?	[8]	Extrapolation; Daten aus Unfall mit kontaminiertem Blut
Letale Dosis	1ng/kg	Mensch	?	[94]	Angabe aus nicht benannter Quelle
LD ₅₀	0,1-1ng/ kg	Mensch	?	[19]	Angabe stammt aus zweiter Quelle

Tabelle 2.2: Toxizität von Tetanustoxin. Die Angaben stammen aus unterschiedlichen Quellen (MLD=Minimale Letale Dosis)

Für einen Infektionsweg über die motorische Endplatte (d. h. wenn das Toxin nicht direkt in das Zentrale Nervensystem injiziert wird) liegt die tödliche Dosis für Mäuse und Meerschweinchen wahrscheinlich im Bereich von 0,1-1ng pro Tier.

2.2.3.4 Nutzung der Clostridien-Neurotoxine für Forschungs- und Therapiezwecke

In der Erforschung der zellulären Mechanismen zur Exocytose spielen die Clostridien-Neurotoxine eine wichtige Rolle. Der Transportweg des Tetanustoxins ist von besonderer Bedeutung, da offenbar noch unbekannte Strukturen oder Mechanismen genutzt werden [38]. Mit den L-Ketten der Clostridien-Neurotoxine kann gezielt in den Zellstoffwechsel eingegriffen werden, z. B. um die Vorgänge bei der Ausbildung des SNARE-Komplexes weiter aufzuklären. Durch Transfektion, Mikroinjektion oder Membranpermeabilisation können die L-Ketten auch in nicht-neuronale Zellen eingebracht werden [13,16].

Die hohe Spezifität (Bezeichnung als „biochemical scalpels“ [16]) ist eine gute Voraussetzung für den Einsatz der Clostridien-Neurotoxine als nebenwirkungsarme Therapeutika [8,13]. Der Einsatz von Tetanustoxin in der Therapie ist noch beschränkt; in der Zukunft könnte es aber eine bedeutende Rolle im gezielten Transport von Wirkstoffen ins zentrale Nervensystem spielen. Interessant wäre z. B. die Kopplung von Arzneimitteln wie Analgetika oder Psychopharmaka an die H-Kette oder an proteolytisch inaktives Tetanustoxin [8,13,16,95]. Aufgrund der hohen Durchimpfungsrate der Bevölkerung gegen Tetanus (s. Abschnitt 2.3.3) muss bei einer Anwendung die Immunabwehr umgangen werden.

Botulinumtoxine können prinzipiell gegen Hyperfunktionen von peripheren cholinergen Nervenendigungen eingesetzt werden, um Muskelkrämpfen oder Drüsenüberfunktionen entgegen zu wirken [96]. Auch in der Schmerztherapie wurden sie bereits erfolgreich getestet [8,96]. Ein kosmetisches Einsatzgebiet für Botulinumtoxin ist die Glättung von Hautfalten.

2.3 Tetanus als Krankheit

Der Name „Tetanus“ stammt aus dem Griechischen (griech.: tetanos= Krampf, Spannung) und beschreibt ebenso wie der deutsche Name „Wundstarrkrampf“ die typische, von Muskelkrämpfen geprägte Symptomatik dieser Infektion. Tetanus war schon im alten Ägypten bekannt, die erste ausführliche Beschreibung stammt von Hippokrates (380 v. Chr.) [8]. 1884 wurde *Clostridium tetani* von Arthur Nicolaier als Verursacher der Infektion identifiziert und 1897 von Kitasato Shibasaburo isoliert und gezüchtet. Erst fast 100 Jahre später, im Jahre 1986, wurden die Aminosäuresequenz [97] und die Nucleotidsequenz [98] des TeNT veröffentlicht. Die Aufklärung der molekularen Wirkung des Toxins auf die Exocytose von Neurotransmittern begann in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts [73,74,78] und dauert bis heute an. Das komplette Genom von *Clostridium tetani* wurde 2003 veröffentlicht [94].

2.3.1 Krankheitsverlauf

Die Inkubationszeit zwischen der Infektion mit *Clostridium tetani* und dem Auftreten erster Symptome liegt in der Regel bei 3-21 Tagen. Zunächst kommt es mit Kopfschmerzen, Muskelschmerzen und Schlaflosigkeit zu uncharakteristischen Symptomen. Die charakteristischen Symptome treten häufig zuerst im Kopfbereich auf. Verkrampfungen der Kiefermuskulatur verhindern das vollständige Öffnen des Mundes (Trismus oder Kieferklemme) und führen oft zur Verzerrung des Gesichtsausdruckes (Risus sardonicus). Vom Kopf ist eine über den Rücken bis in die Extremitäten hinabsteigende Muskelstarre (Rigor) zu beobachten. Diese kann mit weitreichenden Folgen verbunden sein: in der Rückenmuskulatur können Krämpfe zu Wirbelkörperfrakturen führen, in Kehlkopf- und Rippenmuskulatur haben sie häufig Atemstörungen zur Folge, die im Zusammenhang mit der Lähmung der Zwerchfellmuskulatur zum Ersticken führen können. Die rhythmischen, 1 bis 2 Minuten andauernden Krämpfe werden durch geringste optische, akustische oder taktile Reize ausgelöst und sind äußerst schmerzhaft. Die gesamte Zeit ist der Patient bei vollem Bewusstsein.

Eine Tetanusinfektion ist nicht therapierbar, weil das Toxin im Nervensystem unerreichbar ist. Nur eine Linderung der Symptome ist möglich. Eine dunkle und ruhige Unterbringung senkt die Zahl der eingehenden Reize und damit die Häufigkeit schmerzhafter Muskelkrämpfe. Muskelentspannende Medikamente lösen die Krämpfe. Wenn nötig, wird der Patient künstlich beatmet. Der Infektionsort wird, falls bekannt, gesäubert, eventuell wird umliegendes Gewebe chirurgisch entfernt.

Die Clostridieninfektion wird mit Antibiotika behandelt. Durch passive Immunisierung wird neugebildetes Tetanustoxin inaktiviert, bevor es in das Nervensystem eintritt.

2.3.2 Vorkommen und Häufigkeit

Vorkommen und Häufigkeit von Tetanuserkrankungen unterscheiden sich weltweit beträchtlich. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) rechnet mit jährlich knapp 300.000 Todesfällen weltweit durch Tetanus, allerdings werden nur etwa 2-8% der Fälle gemeldet, so dass eine genaue Angabe nicht möglich ist [99]. In Industrieländern ist das Auftreten von Tetanus selten, dem Robert-Koch-Institut werden für Deutschland etwa 10-15 Fälle jährlich gemeldet. Betroffen sind meist Menschen ab 60 Jahren, deren Impfschutz nachgelassen hat [6,10]. Etwa ein Drittel der Betroffenen versterben. In den USA wurde in den letzten Jahren eine zunehmende Zahl von an Tetanus erkrankten Drogensüchtigen verzeichnet, die sich durch eine Injektion infiziert hatten [6].

Die mit Abstand meisten Erkrankungen treten in Entwicklungsländern auf. Dort versterben 70-90% der Erkrankten [100]. Besonders dramatisch ist die hohe Zahl der Fälle von Neugeborenen, die aufgrund von unhygienischen Bedingungen während oder nach der Geburt über die Nabelschnur infiziert werden (neonataler Tetanus). Laut Berechnungen der WHO für das Jahr 2000 sind 14% (das entspricht 238.000) der weltweiten neonatalen Todesfälle auf Tetanus zurückzuführen.

2.3.3 Impfung

In den Industrienationen werden die meisten Menschen bereits während des ersten Lebensjahres gegen Tetanus geimpft [101]. Das entspricht den Impfeempfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch-Instituts [102].

Für die Entwicklungsländer will die WHO [100] die Rate des neonatalen Tetanus bis 2005 auf unter 1 Fall pro 1000 Geburten senken. In einigen Ländern, z. B. in Algerien und Südafrika, ist dies seit 1990 bereits gelungen.

2.4 Tetanusimpfstoffe

Am 4. Dezember 1890 veröffentlichten Emil von Behring und Kitasato Shibasaburo in der "Deutschen Medizinischen Wochenschrift" ihre Arbeiten "Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren". Beide arbeiteten zusammen bei Robert Koch im „Institut für Infektionskrankheiten“ in Berlin. In dem Beitrag zeigten sie die Rolle der Antitoxine im Blutserum, die Tetanus- und Diphtherietoxin neutralisieren. Von Behring erhielt 1901 den ersten Medizinnobelpreis für diese Arbeiten. Ab 1891 gelang ihm zusammen mit Paul Ehrlich die Herstellung von reinem, hochkonzentriertem Serum.

Diese passive Immunisierung bietet jedoch nur einen kurzfristigen Schutz vor Tetanus. 1923 entwarf der Chemiker Ramon ein Protokoll zur Inaktivierung von Tetanustoxin mit Formaldehyd. Mit dem Produkt konnten Menschen aktiv immunisiert werden.

2.4.1 Herstellung

Die Inaktivierung des Tetanustoxins durch Formaldehyd ist auch heute noch der wesentliche Schritt in der Produktion der Tetanusimpfstoffe. Das Formaldehyd bewirkt die Quervernetzung der Proteine. Dieses inaktivierte, aber immunogene Produkt bezeichnet man als Toxoid.

Die Herstellung der Impfstoffe kann grob in drei Phasen unterteilt werden:

- Herstellung von krudem Tetanustoxin
- Detoxifikation (Herstellung und Aufreinigung von konzentriertem Rohtoxoid)
- Herstellung des Endprodukts

Die genauen Protokolle zur Produktion der Impfstoffe unterscheiden sich bei den einzelnen Herstellern, das Prinzip ist jedoch immer gleich:

Für die Herstellung des kruden Tetanustoxins wird *Clostridium tetani* fermentiert. Die Bakterien autolysieren am Ende des Prozesses und setzen Tetanustoxin in das Medium frei. Dieses wird durch Filtration, Zentrifugation bzw. Fällung des Fermentationsmediums grob aufgereinigt. Anschließend wird das krude Tetanustoxin für 20-30 Tage bei 37°C mit Formaldehyd (in einer Endkonzentration von 0,4-0,6 Volumenprozent) detoxifiziert. Die Aufreinigung des entstandenen Rohtoxoids umfasst je nach Hersteller unterschiedliche Fällungs- und Filtrationsschritte (Ammoniumsulfatfällung, Ultra- und Sterilfiltration). Teilweise wird Konservierungsmittel zugesetzt.

In der letzten Produktionsphase wird das aufgereinigte Rohtoxoid an ein Adjuvans adsorbiert. Adjuvantien sind in Impfstoffen enthaltene Bestandteile, die die immunogene Wirkung des Antigens verstärken. Tetanustoxoid wird dabei in der Regel an Aluminiumhydroxid oder -phosphat adsorbiert. Es kann als singulärer Tetanusimpfstoff verdünnt und abgefüllt werden. Für die Grundimmunisierung von Kleinkindern haben sich Kombinationspräparate aus einer Vielzahl von Antigenen (z. B. aus Tetanus-, Diphtherie- und Pertussisantigenen) durchgesetzt.

2.4.2 Prüfung von Tetanusimpfstoffen: aktueller Stand

Das Europäische Arzneibuch sieht die Überprüfung von Wirksamkeit und Sicherheit von Tetanusimpfstoffen vor. Für die Wirksamkeitsprüfung wird die Induktion der Antikörperbildung in Tieren überprüft oder es werden sogenannte Challenge-Tests durchgeführt. Darin wird ermittelt, wie gut ein Tetanusvakzin Meerschweinchen oder Mäuse vor der Intoxikation mit Tetanustoxin schützt.

Der Test zur Überprüfung der Sicherheit beinhaltet zwei Prüfkriterien: die „Abwesenheit des Toxins“ (es darf kein aktives Tetanustoxin in der Lösung enthalten sein) und die „Irreversibilität des Toxoids“ (das Toxin muss irreversibel inaktiviert sein). Dazu wird das aufgereinigte Toxoid an

10 Meerschweinchen getestet. Zusätzlich dazu müssen die fertigen Tetanusimpfstoffe für die veterinärmedizinische Anwendung an 5 Meerschweinchen auf „Toxizität“ geprüft werden.

In allen Tests wird die Prüfsubstanz subkutan verabreicht. Stirbt ein Tier innerhalb der folgenden 3 Wochen (bei Kombinationspräparaten: 6 Wochen) an typischen Tetanussymptomen, gilt der Test als nicht bestanden. Stirbt mehr als ein Tier aus nicht-spezifischen Gründen, darf der Test einmal wiederholt werden.

2.5 Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

In Deutschland regelt das Tierschutzgesetz (TSchG) die Durchführung von Tierversuchen. Es erlaubt Tierversuche nur zum Zwecke der Grundlagenforschung, des Vorbeugens, Erkennens sowie Behandelns von Krankheiten oder wenn sie gesetzlich vorgeschrieben sind (§7 TSchG). Gesetzlich vorgeschrieben sind Tierversuche im allgemeinen, wenn die Unbedenklichkeit von Stoffen oder Produkten, z. B. Arzneimitteln, für Mensch, Tier oder Umwelt nachgewiesen werden muss. Darüber hinaus gilt die EU-Richtlinie 86/609/EWG, nach der ein Tierversuch nicht vorgenommen werden darf, „wenn zur Erreichung des Ergebnisses eine wissenschaftlich zufrieden stellende, vertretbare und praktikable Alternative zur Verfügung steht, bei der kein Tier verwendet werden muss“. Wird eine tierversuchsfreie Methode wissenschaftlich erforscht, entwickelt und behördlich akzeptiert, darf ein Tierversuch mit dem gleichen Versuchsziel nicht mehr durchgeführt werden. Die zur Prüfung von Arzneimitteln durchzuführenden Methoden inklusive der Tierversuche sind im Europäischen Arzneibuch (European Pharmacopoeia) festgehalten.

Bei der Validierung und Anerkennung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch hat die EU die führende Rolle übernommen [103]. So wurden die ersten Ersatzmethoden erst in der EU, und dann weltweit von der OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) akzeptiert. Die Regierung der Bundesrepublik Deutschland unterstützt Forschungsvorhaben mit dem Ziel der Reduktion von Tierversuchen seit 1980 durch den Förderschwerpunkt „Ersatzmethoden zum Tierversuch“.

Grundsätzlich sind Ersatz- und Ergänzungsmethoden den Tierversuchen schon aus ethischen Gründen vorzuziehen, in der Regel sind sie aber auch kostengünstiger, weil sie schneller und unkomplizierter durchführbar sind. Häufig sind sie sogar deutlich empfindlicher als ein Tierversuch.

Zur Prüfung eines Stoffes oder eines Produktes reicht oft die Überprüfung eines bestimmten Effekts, die Wirkung auf einen ganzen Organismus muss nicht überprüft werden. Deshalb ist der Ersatz der entsprechenden Tierversuche leichter möglich als in der Grundlagenforschung, in der die Versuchstiere selbst Gegenstand der Forschung sind.

Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch werden entsprechend des „Prinzip der 3R“ eingeteilt [104] (s. Tabelle 2.3). „3R“ steht für „Reduction“ (engl.: Reduzierung), „Refinement“

(engl.: Verfeinerung, Verbesserung) und „Replacement“ (engl.: Ersatz). Der Ersatz von Tierversuchen durch Tests ohne Tierverbrauch („Replacement“) ist die beste Lösung zum Schutz der Tiere.

	Ziel	Mittel
Reduction	Verringerung der Zahl der nötigen Tests	Internationale Harmonisierung, Streichung unnötiger Vorschriften
Refinement	Verminderung des Leidens der Versuchstiere, Gewinn von mehr Information aus einem Test	Weiterentwicklung der Versuche
Replacement	Ersatz von Tierversuchen	Entwicklung neuer Methoden

Tabelle 2.3: Das „Prinzip der 3R“ von Russel und Burch [104] (Tabelle nach [105])

Durch die konsequente Umsetzung des „Prinzips der 3R“ konnte die Zahl der für Sicherheitsprüfungen von Arzneimitteln benötigten Tiere im Jahr 2001 um 13,4% auf 190.000 gesenkt werden [103].

Der erste Schritt im Ersatz von Tierversuchen sind die wissenschaftliche Erforschung, Entwicklung und Optimierung einer alternativen Methode. Diese muss der herkömmlichen Prüfmethode gleichwertig sein.

3 Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer *in-vitro*-Methode zur Detektion von Tetanustoxin. Sie soll als Alternative zum Tierversuch dienen, um aktives Toxin in Tetanustoxoiden bzw. den fertigen Impfstoffen zu detektieren.

Zunächst werden die Anforderungen an eine *in-vitro*-Methode zur Detektion von Tetanustoxin definiert (s. Abschnitt 3.1). In Abschnitt 3.2 folgt ein Abgleich von bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zur Detektion von Tetanustoxin und Botulinumtoxin/B mit den definierten Anforderungen. Abschnitt 3.3 befasst sich mit dem Aufbau der *in-vitro*-Methode zur Detektion von Tetanustoxin.

3.1 Anforderungen an eine *in-vitro*-Methode zur Sicherheitsprüfung von Tetanusimpfstoffen

An eine *in-vitro*-Methode zur Prüfung von Tetanusimpfstoffen werden die folgenden Anforderungen gestellt:

- **Sensitivität:** die zu überprüfenden Parameter (hier: Toxizität des Tetanustoxins) müssen mindestens mit gleicher Empfindlichkeit getestet werden können wie im Tierversuch. Die letale Dosis für Meerschweinchen beträgt etwa 0,1-1ng Tetanustoxin pro Tier (s. Abschnitt 2.2.3.3), bei einem im Tierversuch applizierten Volumen von 1ml beträgt die letale Konzentration demnach 0,1-1ng/ml. Die Konzentration, bei der Meerschweinchen erste Anzeichen von Tetanus entwickeln, ist geringer, aber mangels Daten nicht bezifferbar. Die letale Dosis muss deshalb als erster Anhaltspunkt für die nötige Sensitivität des *in-vitro*-Systems dienen, welche dann im direkten Vergleich zum Tierversuch überprüft werden muss.
- **Spezifität:** es muss gewährleistet sein, dass genau die gewünschten Parameter getestet und dass die gleichen Informationen erhalten werden wie durch den Tierversuch. Für die Prüfung von Tetanustoxoiden oder -impfstoffen heißt das, dass aktives Tetanustoxin detektiert und der Einfluss anderer Toxoidkomponenten ausgeschlossen werden kann.
- **Anwendbarkeit für Routineuntersuchungen:** eine alternative Methode zu Tierversuchen sollte auf einem standardmäßig in vielen Labors durchgeführten Verfahren beruhen und ohne erheblichen technischen, personellen und finanziellen Mehraufwand funktionieren.

Neben diesen drei Anforderungen ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse entscheidend. Sie wird in Validierungsstudien untersucht, die sich der Erforschung einer *in-vitro*-Methode anschließen. Eine Validierungsstudie ist nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

3.2 Methoden zur Detektion von Tetanustoxin oder Botulinumtoxin/B

Die Sicherheitsprüfung von Tetanustoxoiden beruht auf dem Nachweis der Inaktivierung des Toxins (s. Abschnitt 2.4.2). Inaktiviertes, d. h. durch Formaldehyd quervernetztes Tetanustoxin besitzt keine neurotoxische Wirkung mehr, es kann aber aufgrund seiner Immunogenität als Impfstoff eingesetzt werden. Ein Tetanustoxoid bzw. ein –impfstoff ist aber nicht sicher, wenn er funktionell aktives Tetanustoxin enthält.

In der Literatur sind sehr sensitive Methoden zum Nachweis von Clostridien-Neurotoxinen beschrieben [106,107], diese Methoden sind jedoch für die Sicherheitsprüfung von Tetanustoxoiden ungeeignet, weil sie auf dem immunologischen Nachweis der Toxine selbst beruhen. Da die Tetanustoxoide das quervernetzte Toxin enthalten, führt der Nachweis in jedem Fall zu einem positiven Ergebnis, denn die verwendeten Antikörper detektieren Toxinmoleküle unabhängig davon, ob diese funktionell aktiv sind oder als Toxoid inaktiviert vorliegen. Bisher wurde kein Antikörper beschrieben, der zwischen Toxin und Toxoid differenzieren kann.

Für die Sicherheitsprüfung von Tetanustoxoiden wird deshalb ein Funktionsnachweis benötigt, mit dem die Inaktivierung des Tetanustoxins überprüft werden kann. Ein solcher Funktionsnachweis könnte auf der Inhibierung der Neurotransmitterfreisetzung oder der enzymatischen Spaltung von Synaptobrevin-2 beruhen (s. Abschnitt 2.2.3.2).

In der Literatur ist bereits eine Vielzahl von Testsystemen für den funktionellen Nachweis von Tetanustoxin oder Botulinumtoxin/B beschrieben (Methoden für die anderen BoNTs werden hier nicht diskutiert, weil sie andere Substrate erfordern (s. Abschnitt 2.2.3.2)). Ziel der Testsysteme ist meist die Erforschung der toxischen Wirkung, im Fall von BoNT auch die Lebensmittelkontrolle, die Diagnose oder das Auffinden geeigneter Inhibitoren zur Therapie einer BoNT-Vergiftung. Bei Lebensmittelkontrollen und zur Diagnose sind mittlerweile Nachweise der Clostridien mittels PCR etabliert.

Im Folgenden werden bisher veröffentlichte Methoden zur Detektion von TeNT oder BoNT/B mit der minimal verwendeten Toxinkonzentration aufgelistet, zudem wird ihre Brauchbarkeit zur Sicherheitsprüfung von Tetanustoxoiden bewertet.

In Tabelle 3.1 sind Methoden aufgelistet, in denen mit neuronalen Zellen die Funktion von TeNT oder BoNT/B nachgewiesen wurde. Ein Vorteil eines Testsystems mit neuronalen Zellen liegt darin, dass sowohl die Funktion der H- als auch die der L-Kette des Tetanustoxins nachgewiesen wird, weil das gesamte Toxin zunächst in die Zellen internalisiert werden muss, bevor es seine enzymatische Wirkung entfalten kann (s. Abschnitt 2.2). Mit neuronalen Zellen können die Vorgänge im Zentralen Nervensystem also gut simuliert werden.

Messparameter	Art der verwendeten Zellen	Geringste Toxinkonzentration im Test	Quelle
Hemmung der Acetylcholin-freisetzung	Präparierte Neuronen des Bukkalganglions der Meeresschnecke <i>Aplysia californica</i> <i>in-vitro</i> , TeNT wurde injiziert	> 1,2µg/ml TeNT bzw. TeNT-L-Kette	[22,78]
Hemmung der Glutamat-freisetzung	Präparierte Nervenendigungen (Synaptosomen) aus Rattenhirn <i>in vitro</i>	7,5µg/ml TeNT	[76]
Hemmung der Freisetzung von radioaktiv markiertem Glycin	Präparierte Rückenmarksneuronen (Maus)	0,9ng/ml TeNT	[51,108]
Synaptobrevinspaltung (Analyse per SDS-PAGE, Immunoblot)	Präparierte synaptischen Vesikel aus Rattenhirn	> 2,25µg/ml TeNT; 3,3µg/ml BoNT	[22,78]
Synaptobrevinspaltung (Analyse per Immunoblot, Immuncytochemie)	Präparierte Rückenmarksneuronen (Maus)	15ng/ml TeNT	[35]
Synaptobrevinspaltung (Analyse per Immuncytochemie)	Präparierte Hippocampusneuronen (Ratte)	1,5µg/ml TeNT	[48]
	Präparierte Rückenmarksneuronen (Maus)	10ng/ml TeNT	[108]
Hemmung der Neuroexocytose	PC-12-Zellen, TeNT wurde injiziert	3µg/ml	[109]
Hemmung der Acetylcholin-freisetzung ($[^3\text{H}]$ Acetylcholin)	PC-12-Zellen	0,6-1,5µg/ml TeNT	[110]
Hemmung der hGH-Freisetzung	PC-12-Zellen	45µg/ml TeNT	[111]
Synaptobrevinspaltung (Analyse per Immunoblot)	PC-12-Zellen (künstlich permeabilisiert)	>1µg/ml TeNT	[112]

Tabelle 3.1: In der Literatur beschriebene Methoden, mit denen die TeNT- bzw. die BoNT/B-Funktion mit neuronalen Zellen detektiert werden kann (hGH: human Growth Hormone, humaner Wachstumsfaktor)

Einzelne Methoden, die auf der Verwendung von Primärzellen beruhen, weisen die Aktivität von TeNT sehr sensitiv nach (s. Tabelle 3.1). Ein Beispiel ist die Detektion der Freisetzung von radioaktiv markiertem Glycin [51,108] - eine auf Radioaktivität beruhende Meßmethode ist allerdings für Routineuntersuchungen ungeeignet. Per Immunoblot oder Immuncytochemie kann die Synaptobrevin-Spaltung bereits mit TeNT-Konzentrationen von 10-15ng/ml nachgewiesen werden. Insgesamt steht die Verwendung von Primärzellen jedoch im Gegensatz zum Ziel der *in-vitro*-Methode, mit der ja Tierversuchen ersetzt werden sollen. Das entscheidende Argument gegen die Verwendung von Primärzellen ist der erforderliche „Tierverbrauch“. Die Präparation von Neuronen, z. B. aus der Meeresschnecke *Aplysia* bzw. Nervenendigungen oder synaptischen Vesikeln aus Rattenhirn, ist zudem für Routineuntersuchungen zu aufwändig.

Als Alternative bieten sich Kulturen neuronaler Zellen an. PC-12- (Phaeochromocytoma-) Zellen bilden in Kultur auf ein chemisches Signal hin neuronale Fortsätze, die Strukturen und Mechanismen zur Exocytose von Neurotransmittern aufweisen. Mit PC-12-Zellen wurden schon zahlreiche Untersuchungen zur Wirkung der Clostridien-Neurotoxine durchgeführt [44,59,109-111]. Allerdings wurden bei diesen Arbeiten immer TeNT-Konzentrationen von mehr als 0,5µg/ml eingesetzt

(s. Tabelle 3.1). Schon 1992 konstatierten Schiavo et al. [22], dass das Fehlen einer für Tetanustoxin hochsensitiven Zelllinie ein großes Hindernis bei der Demonstration der proteolytischen Aktivität des Tetanustoxins ist. An dieser Situation hat sich bis heute nichts geändert.

Eine Alternative zur Detektion mittels neuronaler Zellen bildet der direkte Nachweis der spezifischen Enzymaktivität des TeNT.

Durch die Verwendung künstlicher Substrate für die Clostridien-Neurotoxine können der Tierbedarf und die aufwändigen Präparationsschritte umgangen werden. In Tabelle 3.2 sind Methoden aufgelistet, in denen die Funktion von TeNT oder BoNT/B mit künstlichem Synaptobrevin-2 nachgewiesen wurde.

Messmethode	Verwendetes Synaptobrevin	Geringste Toxinkonzentration im Test	Quelle
Autoradiographie	<i>in-vitro</i> -translatiertes, radioaktiv markiertes Syb2	22,5ng/ml TeNT	[76,77]
SDS-PAGE	rekombinantes Syb2	5-30µg/ml TeNT, 130µg/ml BoNT/B	[26,89,113]
Auftrennung der Spaltprodukte per HPLC, Analyse der Chromatogramme	Synthetische Peptide: Syb 1-93, Syb 33-94	2,5-7,5µg/ml TeNT	[90,114]
Auftrennung der Spaltprodukte per HPLC, Analyse per Fluoreszenz	Synthetische Peptide, (beinhalten Fluorophore): Syb 39-88 [Pya88], Abz-Syb 73-82-EDDnp Syb 60-94 [Pya ⁷⁴ , Nop ⁷⁷]	1µg/ml TeNT bzw. TeNT-L-Kette 3,5pg/ml BoNT/B	[87,115-117] [105,115]
BoNT/B-Endopeptidase-Assay	Synthetisches Peptid: Syb 60-94-Cys	0,6-4,5ng/ml BoNT/B 5pg/ml BoNT/B	[118] [119]

Tabelle 3.2: In der Literatur beschriebene Methoden, in denen die TeNT- oder BoNT/B-Aktivität anhand der Spaltung von künstlichem Synaptobrevin detektiert werden kann (Abkürzungen: Pya (Pyrenylalanin), Nop (p-Nitrophenylalanin, Abz (o-Aminobenzol), EDDnp (Ethylendiamin-Dinitrophenol))

Wieder ist eine auf der Messung radioaktiv markierter Substanzen (hier: Synaptobrevin-2) beruhende Methode zwar sehr sensitiv [76,77], für Routineuntersuchungen jedoch ungeeignet. Rekombinante Fusionsproteine wie Syb (44-94)-Thioredoxin [113], Syb (1-117)-Glutathion-S-Transferase (GST) [89], und Syb (1-96)-GST [26] werden durch TeNT offenbar sehr gut gespalten, die Sensitivität der Detektionsmethoden liegt allerdings nur im Mikrogramm-Bereich. Sie kann mit fluoreszierenden Synaptobrevinfragmenten für BoNT/B fast um den Faktor 10⁶ erhöht werden [115], für TeNT aber nicht [87,116,117]. Besonders erwähnenswert ist hier die von Perpetuo et al. [105,117] vorgestellte Methode die auf der Spaltung eines Syb 73-82-Derivats beruht. Dass ein derart kurzes Synaptobrevinfragment von TeNT gespalten wird, widerspricht sämtlichen Untersuchungen zur Mindestlänge des Substrats für dieses Enzym sowie der Rolle der SNARE-Motive (s. Abschnitt 2.2.3.3). Die Autoren mutmaßen, dass durch die Addition der Fluorophore ein für TeNT spaltbares Substrat entsteht, ein Nachweis dieser Theorie steht noch aus.

Die Detektion per SDS-PAGE ist für die Überprüfung von Tetanustoxoiden zu ungenau, weil die spezifische Spaltung des Synaptobrevins durch Tetanustoxin nicht von einer unspezifischen Hydrolyse durch Fremdstoffe im Toxoid zu unterscheiden ist, wenn dabei ähnlich große Spaltfragmente entstehen wie durch das Tetanustoxin. Die chromatographische Auftrennung eines Spaltansatzes mit Tetanustoxoid blockiert wahrscheinlich die Säule – in Vorversuchen ergab die Auftragung von Toxoid auf ein Polyacrylamidgel jedenfalls aufgrund der Quervernetzung der Proteine einen verschmierten Streifen ohne klar definierte Banden.

Der BoNT/B-Endopeptidase-Assay ist die einzige Methode, die wichtigen Anforderungen an eine Ersatzmethode zum Tierversuch standhält: sie weist - zumindest für BoNT/B - eine ausreichende Sensitivität auf und ist für die Routineanwendung geeignet. Nur die Spezifität der Methode wurde bislang nicht überprüft. Für diesen Assay wird das synthetische Peptid Syb 60-94-Cys an Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach der Spaltung durch BoNT/B wird das C-terminale Spaltprodukt mit einem gegen die ersten 7 Aminosäuren hinter der Spaltstelle gerichteten Antikörper nachgewiesen [118]. Die Sensitivität des Assays kann um das 1000fache gesteigert werden, wenn BoNT/B zunächst zur Aufreinigung an eine Immunoaffinitätssäule gebunden wird [119]. Das Synaptobrevinfragment läuft dann über die Säule und die Spaltprodukte sammeln sich im Säulendurchfluss. Das C-terminale Spaltprodukt wird an einer Mikrotiterplatte immobilisiert nachgewiesen [119]. Mit dem Assay können 0,5 Maus-LD₅₀ detektiert werden, er ist somit sensitiver als alle bis dahin veröffentlichten Methoden.

3.3 Aufbau des TeNT-Endopeptidase-Assays

Der Endopeptidase-Assay für BoNT/B dient als Grundlage für die Entwicklung eines *in-vitro*-Tests zur Bestimmung von Tetanustoxizität. Der Test beruht auf einem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): An eine Festphase immobilisiertes Antigen (Syb2-Spaltprodukt) wird immunologisch, d. h. durch die Bindung von Antikörpern, nachgewiesen. Das gemessene Syb2-Spaltprodukt dient als indirektes Maß für die Aktivität der Endopeptidase. Abbildung 3.1 zeigt schematisch, wie der ELISA aufgebaut sein könnte. In dieser Variante wird die Zunahme eines Spaltprodukts detektiert. Daneben ist auch denkbar, die Abnahme des ungespaltenen Synaptobrevin-2 zu detektieren.

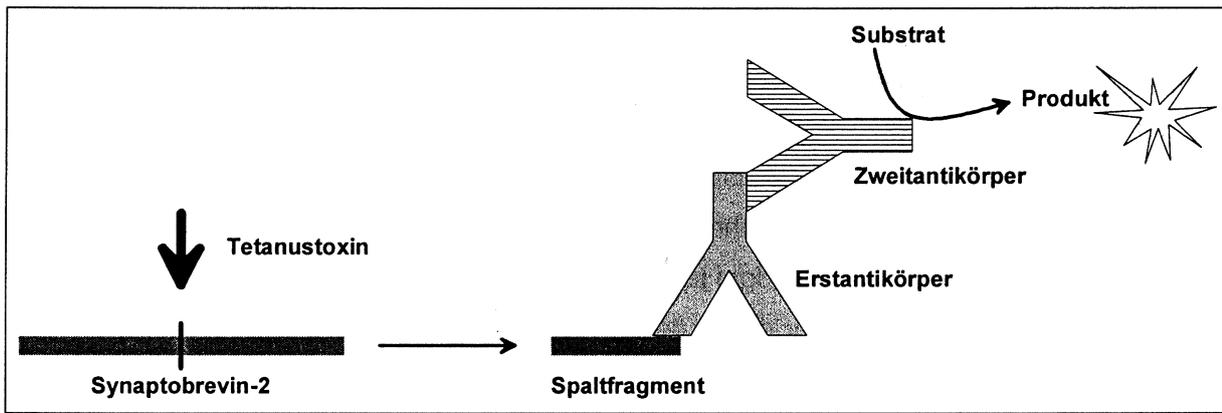


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des möglichen ELISA-Aufbaus. Rekombinantes Synaptobrevin-2 wird durch Tetanustoxin gespalten, ein Spaltfragment wird anschließend mit polyklonalem Kaninchenserum (Erstantikörper) und gegen Kaninchen-Immunglobulin gerichteten Antikörpern (Zweitantikörper, mit Meerrettichperoxidase markiert) inkubiert. Diese Komplexbildung wird anhand des Substratumsatzes der Meerrettichperoxidase gemessen, der mit der Bildung eines farbigen Produkts einhergeht. Die Darstellung zeigt weder, wie Synaptobrevin-2 immobilisiert wird noch welches der Spaltfragmente detektiert wird. Die Untersuchung und Optimierung dieser Parameter ist ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

Zunächst werden nun die Komponenten beschrieben, die für die Entwicklung eines Endopeptidase-Assays für TeNT entscheidend sind: ein für Tetanustoxin spaltbares Substrat und ein Antikörper, der zwischen gespaltenem und ungespaltenem Substrat differenziert. Dem folgen Überlegungen zum Gesamtaufbau des Assays.

Im Gegensatz zum Testsystem für BoNT/B wird entsprechend der zahlreichen Untersuchungen zur Mindestlänge des Synaptobrevins ein deutlich längeres Fragment benötigt (s. Abschnitt 2.2.3.2). Die Synthese dieses Peptids würde die Kosten für den Endopeptidase-Assay rapide in die Höhe treiben, stattdessen könnte aber rekombinantes Substrat verwendet werden. Mehrere rekombinante Synaptobrevin-2- (rSyb2-) Fragmente sind in der Literatur beschrieben worden (s. Abschnitt 3.2). Um die Proteingewinnung zu vereinfachen, soll das Synaptobrevin-2 keine Transmembranregion enthalten und als Fusionsprotein exprimiert werden.

Ein bakterieller Expressionsvektor, der für ein Synaptobrevin-2-Fragment mit derartigen Eigenschaften codiert, wurde freundlicherweise von Dr. Th. Binz (Institut für Biochemie/ Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Das Synaptobrevin-2-Fragment wird rSyb2(N;1-97) genannt und enthält die Aminosäuren 1-97 aus Synaptobrevin-2 und am N-Terminus einen Histidin₆-tag (s. Abbildung 3.2). Der Histidin₆-tag dient der Aufreinigung mittels immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC).

Für den Aufbau des TeNT-Endopeptidase-Assays ist eine Vielzahl von Varianten denkbar (nähere Erläuterungen s. unten). Um möglichst viele dieser Varianten miteinander vergleichen zu können, wird die DNA des Synaptobrevin-Fragments rSyb2(N;1-97) als Vorlage (Template) zur Herstellung von zwei weiteren Fragmenten mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) verwendet.

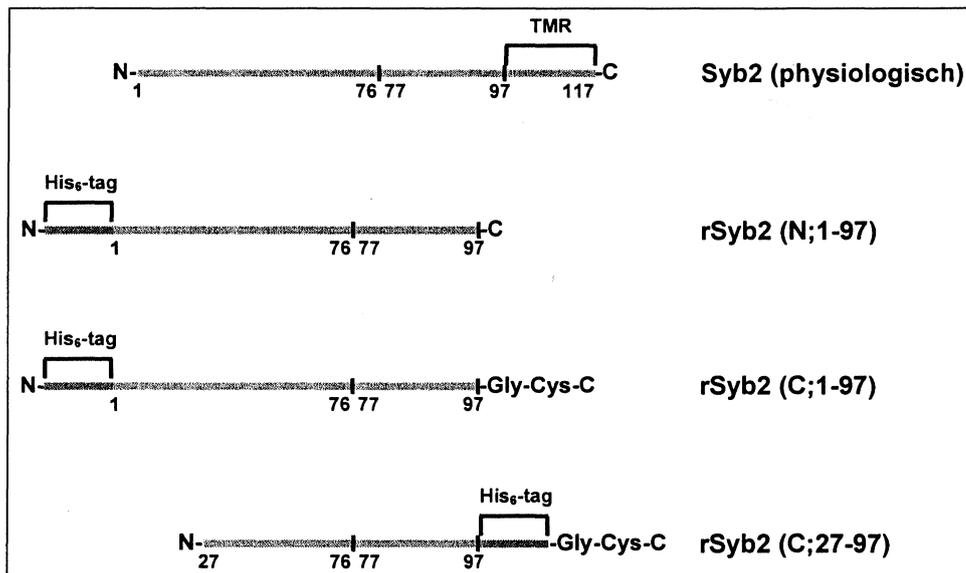


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des physiologischen Synaptobrevin-2 (Ratte) und der drei rekombinanten Synaptobrevin-2-Fragmente (rSyb2). Die Spaltstelle des Tetanustoxins zwischen den Aminosäuren 76 und 77 ist eingezeichnet (TMR: Transmembranregion).

Das Fragment rSyb2(C;1-97) trägt im Vergleich zu rSyb2(N;1-97) zusätzlich die Aminosäuren Glycin und Cystein am C-Terminus. Das Fragment rSyb2(C;27-97) enthält die Aminosäuren 27-97 aus Synaptobrevin-2, denn das Tetanustoxin benötigt die ersten 26 Aminosäuren für die Spaltung des Synaptobrevins nicht (s. Abschnitt 2.2.3.2). Weil die Aufreinigung mancher Proteine mittels IMAC besser funktioniert, wenn sie über ihren C-Terminus immobilisiert sind, wird dem neuen Fragment ein Histidin₆-tag an den C-Terminus kloniert. Dieser folgt direkt auf den Aminosäurerest an Position 97. Außerdem befinden sich wie beim Fragment rSyb2(C;1-97) zusätzlich die Aminosäuren Glycin und Cystein am C-Terminus.

Die DNA der rSyb2-Fragmente rSyb2(C;1-97) und rSyb2(C;27-97) soll per PCR amplifiziert werden und anschließend in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden. Die Wahl fällt auf Vektoren mit den gleichen Eigenschaften wie der pET-Vektor, in dem das Fragment rSyb2(N;1-97) enthalten ist. So können alle Fragmente mit dem gleichen Expressionssystem produziert werden. Zur Expression der rSyb2-Fragmente werden drei verschiedene *E. coli*-Stämme verglichen, um den Stamm mit der höchsten rSyb2-Ausbeute zu ermitteln.

Für die robuste und reproduzierbare Funktion des TeNT-Endopeptidase-Assay muss ein Aufreinigungsprotokoll entwickelt werden, das die Verfügbarkeit von rSyb2 gewährleistet. Von den drei ausgewählten *E. coli*-Stämmen ist bekannt, dass die Expression eines nicht nativen Polypeptids in hohen Konzentrationen zu dessen Aggregation und Akkumulation in sogenannten Inclusion Bodies führt. Dies ist ein bei der Herstellung rekombinanter Proteine häufig zu beobachtendes Phänomen [120], auf das das Protein selbst, der Organismus oder die gewählten Bedingungen keinen Einfluss haben [120].

Die Bildung der Inclusion Bodies hat für die Proteinaufreinigung große Vorteile, denn sie können leicht aus den Zellen isoliert werden und enthalten im wesentlichen das exprimierte Protein, welches in den unlöslichen Aggregaten „gefangen“ und vor Proteolyse weitgehend geschützt ist [121,122]. Die Herausforderung liegt in der Umwandlung der Inclusion Bodies in ein natives und biologisch aktives Produkt [120,121]. Zur rSyb2-Aufreinigung werden die Inclusion Bodies in Puffer mit hoher Chaotrop-Konzentration solubilisiert, Fremdprotein wird mittels IMAC entfernt. Die Renaturierung des rekombinanten Synaptobrevins kann ein sehr kritischer Schritt sein, weil die Bedingungen zur Renaturierung eines Proteins nicht kalkulierbar sind und jeweils empirisch ermittelt werden müssen. Wenn sich ein Protein bei der Renaturierung nicht korrekt faltet, bildet es Aggregate. Kinetisch konkurrieren Proteinfaltung und Aggregation [120-122], unter optimalen Bedingungen findet ausschließlich die korrekte Faltung statt. Neben pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke haben viele niedermolekulare Substanzen ihre stabilisierende Funktion bewiesen. Die Wirkung dieser Additive auf die Proteinfaltung ist weitgehend unklar, zumal sie bei unterschiedlichen Proteinen durchaus gegenläufig sein kann und die Proteinaggregation dann fördert.

Sobald ein Aufreinigungsprotokoll entwickelt ist und die rSyb2-Fragmente vorliegen, sollen sie in Hinblick auf ihrer Spaltbarkeit durch Tetanustoxin untersucht und verglichen werden.

Der für den BoNT/B- Assay beschriebene Antikörper [118] müsste das durch Tetanustoxin generierte C-terminale Synaptobrevin-2-Spaltprodukt ebenso gut detektieren, da beide Toxine identische Spaltprodukte generieren. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde bisher nicht untersucht. Diese Information ist aber wichtig, weil von ihr die Spezifität des Tests für Tetanustoxin abhängt. Entsprechende Versuche sind deshalb Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Mit der Herstellung eines Antikörpers gegen das N-terminale Spaltprodukt wird die Zahl der Möglichkeiten für den Aufbau des Assays deutlich vergrößert. Es ist beispielsweise denkbar, dass sich die rSyb2-Spaltfragmente unterschiedlich gut an eine Festphase immobilisieren lassen und in einem solchen Fall muss die Detektion des leichter zu bindenden Fragments gewährleistet sein.

Beide Antikörper werden hergestellt, indem Kaninchen ein Peptid injiziert wird, das die Synaptobrevin-2-Sequenz auf jeweils einer Seite der Spaltstelle darstellt. Der Herstellung des Antikörpers gegen das N-terminale Spaltprodukt wird als Auftragsarbeit vergeben und beinhaltet die Affinitätsreinigung. Der Antikörper gegen das C-terminale Spaltprodukt wird in Eigenarbeit hergestellt und zunächst als nicht aufgereinigtes Serum verwendet. Die Antikörper werden nicht direkt enzymmarkiert, sondern mit einem spezie-spezifischen, Peroxidase-gekoppelten IgG-Antikörper nachgewiesen. Auf diese Weise wird die Flexibilität für ein alternatives Detektionssystem gewahrt, sollte dies z. B. zur Steigerung der Sensitivität erforderlich sein.

Neben den beiden Antikörpern gegen die rSyb2-Spaltprodukte sind kommerzielle Antikörper gegen Synaptobrevin-2 erhältlich, deren Eignung für den Einsatz im TeNT-Endopeptidase-Assay eben-

falls untersucht werden soll. Die Epitope dieser Antikörper liegen aber nicht in der Nähe der TeNT-Spaltstelle.

Der TeNT-Endopeptidase-Assay muss die Spaltung des rekombinanten Synaptobrevins, die Immobilisierung des Spaltprodukts an eine Festphase und seine Detektion umfassen. Dabei ist die Reihenfolge von Spaltung und Immobilisierung nicht festgelegt: man könnte gelöstes rSyb2 mit TeNT inkubieren und die Spaltprodukte immobilisieren, und die Spaltung des zuvor gebundenen rSyb2 ist ebenso denkbar.

Die Spaltung von gelöstem rSyb2 könnte deutlich besser funktionieren, weil dem TeNT eine höhere Substratkonzentration angeboten werden kann. Eine genaue Einschätzung der benötigten Substratkonzentration könnten Untersuchungen zur Kinetik des Tetanustoxins ermöglichen. Aufgrund der hohen Spezifität und Selektivität des Tetanustoxins müsste ein K_M -Wert (Michaelis-Konstante) zwischen 0,1-10 μ M betragen, dies entspricht dem unteren Ende des Bereichs von 10^{-1} -10 $^5\mu$ M, in dem K_M -Werte für gewöhnlich liegen [123]. Diese Vermutung wird von Literaturdaten nicht gestützt. Es sind mehrere K_M -Werte für TeNT beschrieben, die auf Arbeiten mit verschiedenen Substraten beruhen. Dabei wurden sehr unterschiedliche Bedingungen zur Bestimmung der Enzymkinetik gewählt und es wurden K_M -Werte von 3 [117], 192 [114], 527 [116] und 2400 μ M [90] erhalten. Diese großen Unterschiede lassen keine weiteren Schlüsse für den TeNT-Endopeptidase-Assay zu. Bei der Bestimmung des K_M -Wertes von 3 μ M bleibt die Versuchsdurchführung allerdings unklar, weil für die verwendete Substratkonzentration einerseits das zehnfache des K_M -Wertes, andererseits maximal 2,32 μ M Substrat angegeben wird [117]. Die drei hohen ermittelten K_M -Werte erscheinen den jeweiligen Autoren immer zu hoch für ein so selektives und spezifisches Enzym wie das Tetanustoxin. Eine überzeugende Erklärung für ihre Messwerte geben sie nicht, aber ein Grund könnte die in einer weiteren Studie festgestellte, geringere Sensitivität für gelöstes im Gegensatz zu gebundenem Substrat liegen [124]. Dieser Umstand würde bedeuten, dass der TeNT-Endopeptidase-Assay nicht unbedingt besser funktioniert, wenn das rSyb2 in Lösung gespalten wird. Beide Varianten der Reihenfolge von Spaltung und Immobilisierung sollen deshalb miteinander verglichen werden.

Für den Nachweis muss das Synaptobrevin-Spaltfragment an einer Festphase immobilisiert sein. Diese Immobilisierung kann ungerichtet, d. h. ohne eine gezielte Steuerung der Bindung erfolgen. Speziell beschichtete Matrices lassen aber auch eine gerichtete Bindung zu, die auf Affinität oder der Ausbildung kovalenter Bindungen beruht. Im Falle des Synaptobrevins könnte der Vorteil einer gerichteten Bindung sein, dass Bereiche des Proteins, die das Tetanustoxin zur Spaltung benötigt, frei zugänglich in die Lösung ragen. Gleiches gilt für die Bindung der Antikörper an frei zugängliche Epitope.

Gerichtete und ungerichtete Bindung der drei rSyb2-Fragmente sollen verglichen werden. Die gerichtete Bindung der rSyb2-Fragmente kann über ihren Histidin₆-tag erfolgen, wenn eine entspre-

chend beschichtete Festphase verwendet wird. Die Fragmente rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) wären dann über ihren N-Terminus, rSyb2(C;27-97) über den C-Terminus gebunden (s. Abbildung 3.2). Die beiden Fragmente rSyb2(C;1-97) und rSyb2(C;27-97) können außerdem über eine kovalente Bindung zwischen dem C-terminalen Cysteinrest und einer geeigneten Festphase immobilisiert werden. Der Vorteil ist die deutlich stabilere Bindung, da die Immobilisierung über den Histidin₆-tag auf Affinität beruht.

Je nachdem, in welcher Ausrichtung ein rSyb2-Fragment gebunden wird, bleibt nach der Spaltung durch TeNT das N- oder das C-terminale Spaltfragment gebunden, während das jeweils andere Fragment im nächsten Waschschrift entfernt wird. Das gebundene Spaltfragment soll dann mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden.

Insgesamt sollen also verschiedene Festphasen, die drei rSyb2-Fragmente und die Antikörper miteinander werden. Wenn dieser grundsätzliche Aufbau des TeNT-Endopeptidase-Assays feststeht, soll er in Bezug auf andere Parameter, z. B. Puffer und Inkubationszeiten optimiert werden.

Grundsätzlich wäre auch denkbar, den ELISA als Sandwich-ELISA aufzubauen. Dafür müsste ein Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden werden, der rSyb2 bindet, welches dann gespalten und von einem weiteren Antikörper detektiert würde. Der Aufbau entspricht im Prinzip einer gerichteten Bindung. In Vorversuchen erwies sich zur Immobilisierung von rSyb2 von den zur Verfügung stehenden Antikörpern nur ein kommerziell erwerblicher Antikörper aus Kaninchen als geeignet. Allerdings ist der Bedarf an Antikörperlösung zur Absättigung einer Mikrotiterplatte so hoch, dass die Kosten für den Assay rapide in die Höhe schnellen würden. Deshalb und weil die Vorversuche zum Sandwich-ELISA insgesamt keine vielversprechenden Resultate erzielten, wurde dieser Aufbau nicht weiter verfolgt.

4 Material und Methoden

4.1 Medien und Lösungen

4.1.1 Medien und Lösungen für molekularbiologische Versuche

6x Slotmarker

	<i>Konzentration</i>
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Sucrose	40% (w/v)
EDTA (0,5M, pH 8,0)	5mM

Die Komponenten werden mit Aq. dest. vermischt, in Aliquots à 1ml abgefüllt und bei 4°C gelagert.

1x TBE(E)-Puffer

Der TBE-Puffer wird 10-fach konzentriert hergestellt:

	<i>Konzentration</i>
Tris	89mM
Borsäure	89mM
EDTA	20mM

Alle Komponenten werden in Aq. dest. gelöst, auf 1000ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Zur Herstellung von 1x TBEE-Puffer wird der 10-fache TBE-Puffer verdünnt und in einer 1-Liter-Flasche mit 1ml Ethidiumbromid (500µg/ml) versetzt. Der fertige Puffer wird bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

Größenmarker-Gebrauchslösung (für 100bp- und 500bp-Ladder)

	<i>Konzentration/ Volumen</i>
Tris (pH 8,0)	20mM
EDTA	10mM
NaCl	20mM
6x Slotmarker	40µl
Aq. dest.	70µl
Größenmarker	10µl

Die Lösung wird bei 4°C gelagert und kann direkt auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

4.1.2 Medien und Lösungen für mikrobiologische Versuche

Antibiotika-Stammlösungen

Zur Herstellung der Ampicillin- bzw. Carbenicillin-Stammlösung werden 200mg des Antibiotikums pro Milliliter Aq. dest. gelöst, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Ampicillin wird in Agar, Carbenicillin in Flüssigmedium mit jeweils $200\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt.

Die Chloramphenicol-Stammlösung besteht aus 35mg Chloramphenicol pro Milliliter Ethanol. Sie wird aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Chloramphenicol wird mit $35\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt.

IPTG-Stammlösung (1M)

4,76g IPTG werden in 20ml Aq. dest. gelöst und in Aliquots bei -20°C eingefroren. IPTG wird in einer Konzentration von 1mM im Medium eingesetzt.

LB-Medium, LB-Agar

	<i>Konzentration</i>
Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	171mM

Die Komponenten werden gelöst und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. LB-Agar enthält zusätzlich 15g Agar. Die Lösung wird auf 1000ml aufgefüllt und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. LB-Agar wird nach dem Abkühlen auf unter 50°C je nach Bedarf mit Antibiotika versetzt und vor dem Erstarren in sterile Petrischalen gegossen. LB-Medium und LB-Agar werden bei 4°C gelagert.

SOC-Medium

	<i>Konzentration</i>
Trypton	2% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	8,55mM
KCl	2,5mM

Alle Komponenten werden in Aq. dest. gelöst, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, auf 980ml aufgefüllt und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden 20ml einer 1-molaren, steril filtrierten Glucoselösung zugegeben.

4.1.3 Medien und Lösungen für die Proteinaufreinigung

Proteaseinhibitoren

Die Proteaseinhibitoren werden gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

	<i>Konzentration</i>
PMSF (in Ethanol)	0,2M
Benzamidin (in Aq. dest.)	1,0M
Pepstatin A (in Isopropanol)	0,73mM

Lysepuffer zum Zellaufschluß

	<i>Konzentration</i>
Tris	50mM
EDTA (0,5M)	5mM
Sucrose	25% (w/v)

Tris, Sucrose und EDTA werden in Aq. dest. gelöst, und anschließend auf 100ml aufgefüllt.

Zu den resuspendierten Zellen werden folgende Lösungen pipettiert:

	<i>Konzentration</i>
Lysozym	0,5mg/ml
RNAseA	250µg/ml
DNAseI	10U/ml
MgCl ₂	2,5mM
PMSF	0,3mM
Benzamidin	10mM
Pepstatin A	20µg/ml

Harnstoff-Puffer zur Synaptobrevin-2- Aufreinigung

Zunächst wird ein 10-fach konzentrierter Tris-Phosphat-Puffer hergestellt. Dafür werden Tris und NaH₂PO₄ in Aq. dest. gelöst, auf 1000ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

	<i>Konzentration</i>
Tris	0,1M
NaH ₂ PO ₄	1,0M

Der Harnstoff-Puffer enthält die folgenden Bestandteile:

	<i>Konzentration</i>
Urea	8M
10x Tris-Phosphatpuffer	10% (v/v)

Der Harnstoff wird in Tris-Phosphatpuffer und Aq. dest. unter Rühren und Erwärmen auf maximal 30°C gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der pH-Wert mit HCl oder NaOH auf den gewünschten Wert eingestellt und auf 100ml aufgefüllt.

Der Puffer wird frühestens einen Tag vor dem Gebrauch hergestellt, und kurz vorher wird der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls nachjustiert. Der Grund ist der Zerfall des gelösten Harnstoffs zu Ammoniumcyanat. Bei Temperaturen über 37°C und mit der Zeit verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des Ammoniumcyanats. Als Isocyanat carbamylt dieses sehr schnell die N-Termini von Proteinen sowie die Seitenketten von Lysin und Arginin.

Dialysepuffer (NaCl/Tris- und Natriumacetat-Puffer; aus 10x Stammlösungen)

10x NaCl/Tris-Puffer (pH 7,4):

	<i>Konzentration</i>
Natriumchlorid	1M
Tris	10mM

Natriumchlorid und Tris werden in Aq. dest. gelöst, der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wird auf 1000ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

10x Natriumacetat-Puffer (pH 5,0):

	<i>Konzentration</i>
Natriumacetat	200mM

Das Natriumacetat wird in Aq. dest. gelöst und der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 5,0 eingestellt. Der Puffer wird auf 1000ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Dialysepuffer werden die Puffer 1:10 verdünnt und mit Triton-X-100 (10% v/v) auf eine Endkonzentration von 0,05 Volumenprozent versetzt.

4.1.4 Lösungen und Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngele 15% (2 Stück)

	<i>Konzentration</i>
Acrylamid/Bis (30%)	15%
Tris (1,5M, pH 8,8)	0,375M
SDS	3,5mM
TEMED	0,07% (v/v)
APS	0,06% (w/v)

Alle Bestandteile werden mit 3,5ml Aq. dest. erst kurz vor dem Gießen der Gele gemischt.

Sammelgele

Zunächst wird eine 4%-ige Acrylamid-Stammlösung mit den folgenden Bestandteilen hergestellt:

	<i>Konzentration</i>
Acrylamid/Bis (30%)	4%
Tris (0,5M, pH 6,8)	0,125M
SDS (10% w/v)	3,5mM

Die Bestandteile werden in 273ml Aq. dest. gelöst und dunkel bei 4°C gelagert. Die Sammelgele werden vor dem Gießen der Gele aus 5ml der 4%-igen Acrylamid-Stammlösung mit 10µl TEMED und 30µl APS (10% w/v) hergestellt.

Elektrophorese-Puffer (10x)

	<i>Konzentration</i>
Tris	0,25M
Glycin	2M
SDS	35mM

Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert. Der 1-fache Elektrophorese-Puffer wird durch Verdünnung mit Aq. dest. hergestellt.

3x Probenpuffer

	<i>Konzentration</i>
Tris (0,5M, pH 6,8)	0,1875M
SDS	0,312M
Bromphenolblau	0,0075% (w/v)
Glycerol	30% (v/v)
β -Mercapto-Ethanol	6,25% (v/v)

Die Komponenten werden in Aq. dest. gelöst, auf ein Volumen von 8ml aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Coomassie-Färbelösung

	<i>Konzentration</i>
Coomassie brilliant blue R 250	0,125% (w/v)
Methanol	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Das Coomassie brilliant blue wird in Methanol gelöst, mit Essigsäure versetzt, mit Aq. dest. aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

50% Entfärbelösung

	<i>Konzentration</i>
Essigsäure	10% (v/v)
Methanol	50%(v/v)

10% Entfärbelösung

	<i>Konzentration</i>
Essigsäure	10%(v/v)
Methanol	10%(v/v)

4.1.5 Lösungen und Puffer für Immunoblots

TBS-Puffer (pH 7,4)

	<i>Konzentration</i>
Tris	50mM
NaCl	146mM
HCl (37%)	ca. 0,325% (v/v)

Alle Komponenten werden in Aq. dest. gelöst und bei 4°C gelagert.

5x Transferpuffer

	<i>Konzentration</i>
Tris	625mM
Glycin	4,8M
EDTA	25mM
SDS	43,35mM
Methanol	20% (v/v)

Nach dem Lösen aller Komponenten stellt sich automatisch ein pH-Wert von 8,3 ein. Der 1x Transferpuffer besteht aus 200ml 5x Transferpuffer, 160ml Methanol und 640ml Aq. dest.

Waschpuffer

TBS-Puffer (pH 7,4) wird mit Tween-20® (1% v/v) versetzt: Waschpuffer 1 enthält 0,05% (v/v) Tween-20®, Waschpuffer 2 0,1% (v/v). Pro Waschschrift werden 25ml Waschpuffer benötigt.

Verdünnung der Antikörper

α -VAMP2 (mAK) wird 1:3000, α -VAMP2 (pAK) wird 1:600 und α -Histidin₆-tag wird 1:1500 in TBS-Puffer (pH 7,4) verdünnt. Dieses enthält:

	<i>Konzentration</i>
BSA	1%
Natriumazid	0,02%

α -N-Terminus- und α -C-Terminus-Antikörper werden 1:500, die Zweitantikörper (α -Kaninchen- und α -Maus-IgG) werden 1:3000 verdünnt. Die Lösungen werden vor jedem Gebrauch frisch hergestellt und enthalten kein Natriumazid.

Entwicklerlösung für 4 Blots

Der Entwickler wird direkt vor Gebrauch angesetzt.

TBS-Puffer (pH 7,4)	50ml
H ₂ O ₂ (30%)	30 μ l
Methanol (-20°C)	10ml
4-Chloro-1-Naphtol (4CN)	30mg

H₂O₂ wird zu TBS pipettiert und 4-Chloro-1-Naphtol in eiskaltem Methanol aufgenommen, dann werden beide Lösungen vermischt. Ein Western Blot wird mit 15ml der Lösung inkubiert. Bei der Umsetzung von H₂O₂ zu H₂O durch die am Zweitantikörper gebundene Peroxidase entsteht aus 4-Chloro-1-Naphtol ein unlösliches, braunschwarzes Produkt, das sich auf der Membran niederschlägt.

4.1.6 Lösungen und Puffer für ELISA

Beschichtungspuffer

Die Komponenten werden jeweils gelöst, der pH-Wert eingestellt und die Lösung wird auf 1000ml aufgefüllt. Wenn nicht anders angegeben, werden die Puffer bei Raumtemperatur gelagert.

PBS (pH 7,4):

	<i>Konzentration</i>
Na ₂ HPO ₄	6,46mM
KH ₂ PO ₄	1,47mM
KCl	2,68mM
NaCl	136,89mM

Die Komponenten werden in Aq. dest. gelöst.

Carbonat-Puffer (pH 9,6)

	<i>Konzentration</i>
Na ₂ CO ₃	40mM
NaHCO ₃	60mM

Die Komponenten werden in Aq. dest. gelöst.

Citratphosphatpuffer (pH 6,0)

Zwei Stammlösungen werden hergestellt: 0,1M Citronensäure (21,01g/l Citronensäure-Monohydrat in Aq. dest.) und 0,2M Dinatriumhydrogenphosphat (28,4g/l Na₂HPO₄ in Aq. dest.).

Zur Herstellung des Puffers werden 37,9ml Citronensäure-Lösung mit 62,1ml Natriumhydrogenphosphat-Lösung vermischt. Der pH-Wert wird gemessen und wenn nötig korrigiert.

Beschichtungspuffer für Maleimid-Platten (pH 6,5)

	Konzentration
EDTA	1mM
DTT	0,1µM

Die Komponenten werden in PBS gelöst.

Waschpuffer (PBST)

Für den Waschpuffer wird PBS mit Tween-20® versetzt. In der Optimierungsphase werden Tween-20®-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,1% (v/v) getestet.

Blockierungspuffer

	Konzentration
BSA	0,2% (w/v)
Sucrose	2% (w/v)

Die Komponenten werden in PBS gelöst.

Verdünnungspuffer für Antikörper

Die Antikörper werden je nach Versuch in PBS oder in PBS mit 0,2% BSA verdünnt.

Entwicklerlösung (TMB-Lösung)

Zuerst werden Natriumacetat-Puffer und eine 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Stammlösung hergestellt.

90,2g wasserfreies Natriumacetat werden in 900ml Aq. dest. gelöst und auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor mit HCl ein pH-Wert von 5,5 eingestellt wird. Der Puffer wird auf 1000ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Die TMB-Stammlösung (6mg TMB pro Milliliter Ethanol) kann für 14 Tage bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

Die Entwicklerlösung wird jeweils vor Gebrauch frisch hergestellt.

Aq. dest.	9ml
Natriumacetat-Puffer	1ml
TMB-Stammlösung	167µl
H ₂ O ₂ (30%)	2µl

4.2 Molekularbiologische Methoden

Zunächst werden drei Synaptobrevin-2-Fragmente hergestellt, die dem Tetanustoxin als Substrat dienen werden. Die DNA des Fragments rSyb2(N;1-97) wurde freundlicherweise von Dr. Th. Binz (Institut für Biochemie/ Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt und wurde als Vorlage (Template) zur Herstellung von zwei neuen Synaptobrevin-2-Fragmenten verwendet.

Sowohl der N- als auch der C-Terminus variieren bei den rekombinanten Synaptobrevin-2-Fragmenten. Die Unterschiede (s. Tabelle 5.1, Seite 69) beziehen sich auf die Lage des Histidin₆-tags, des Vorhandenseins eines Cysteinrests sowie die Länge des Gesamtfragments. Die Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 5.4 auf Seite 69 abgebildet.

4.2.1 PCR zur Amplifizierung der rSyb2-DNA

4.2.1.1 Design von Primern für die Polymerase Chain Reaction (PCR)

Primer für rSyb2(C;1-97): Die rSyb2-DNA wird über die Restriktionsenzymypaare NdeI/ BamHI bzw. NcoI/ BamHI in den Vektor pET15b kloniert. Die N-Termini der Fragmente rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) sind identisch, daher stimmen die Primer für den Bereich der NdeI- bzw. der NcoI-Schnittstelle (Primer „C97nco“, „C97nde“) mit der Vorlage pET15b_rSyb2(N;1-97) überein.

pET15b_rSyb2(N;1-97) codiert nicht für einen C-terminalen Cysteinrest und enthält keine BamHI-Schnittstelle. Diese Eigenschaften werden durch den Primer „C97bam“ in die rSyb2-DNA angefügt. Die Primer haben folgende Sequenzen:

Primer „C97nco“ (24 Basen):

5'-AGGAGATATACCATGGGCAGCAGC-3'

Primer „C97nde“ (25 Basen):

5'-GCCGACATATGGCTGCCGCG CGGCA-3'

Primer „C97bam“ (48 Basen):

5'-GCGTAGCGAC GGATCCTTAG CATCCGATCA TCATCTTGAG GTTTTTCC-3'

Primer für rSyb2(C;27-97): Die rSyb2-DNA wird über das Restriktionsenzymypaar NdeI/ BamHI in den Vektor pET11a kloniert. Der C-terminale Glycin-Cysteinrest wird durch den Vektor codiert.

Primer „C70nde“ enthält die NdeI-Schnittstelle und eine zur Vorlage komplementäre Sequenz, die für die Aminosäuren ab Position 27 des Synaptobrevin-2 codiert. Primer „C70bam“ codiert neben einer 22 Basen langen, der Vorlage bis Position Aminosäure 97 homologen Sequenz das Histidin₆-tag und eine BamHI-Schnittstelle.

Die Primer haben folgende Sequenzen:

Primer „C70nde“ (39 Basen):

5'-GACGGAGACA CACATATGAC CAGTAACAGG AGACTGCAG -3'

Primer „C70bam“ (48 Basen):

5'-TCGGATCCGT GATGATGATG GTGGTGGATC ATCATCTTGA GGTTTTTC -3'

4.2.1.2 Durchführung der PCR

Die PCR wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Vor Gebrauch werden die Primer mit Aq. dest. auf eine Konzentration von 100pmol/μl verdünnt. Die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) werden äquimolar gemischt. Der PCR Puffer (Puffer I) wird 10-fach konzentriert mit der Taq Gold DNA-Polymerase ausgeliefert und enthält 100mM Tris-HCl (pH 8,3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂ und 0,01% (w/v) Gelatine. Puffer I, dNTP-Mix, Primer und Aq. dest. werden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für einen PCR-Mastermix werden die in Tabelle 4.1 angegebenen Volumina mit der Anzahl der PCR-Ansätze multipliziert.

	Konzentration der Stammlösung	Volumen [μl]	Endkonzentration
Puffer I	10x	5,0	1x
dNTP-Mix	2,5mM je dNTP	4,0	200μM je dNTP
Primer I	100pmol/μl	0,5	50pmol= 1μM
Primer II	100pmol/μl	0,5	50pmol= 1μM
Aq. dest.		34,5	
DNA-Polymerase	5U/μl	0,5	2,5U
Template-DNA oder Aq. dest.	10ng/μl	5,0	50ng
Summe		50,0	

Tabelle 4.1: Zusammensetzung eines PCR-Mastermixes für die Herstellung von rSyb2-Fragmenten

Puffer, dNTPs, Primer, Aqua dest und DNA-Polymerase werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Je 45μl des Mastermixes werden in 0,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und mit je 50μl Silikonöl überschichtet. Kurz vor Beginn der PCR werden die Ansätze nochmals kurz abzentrifugiert, dann werden 5μl Template-DNA bzw. Aq. dest. in die untere Phase der Lösung pipettiert. Das folgende Temperaturprofil wird im PCR-Cycler eingestellt (Tabelle 4.2):

	Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Hot Start	11 min.	95°C	1x
Denaturierung	1 min.	95°C	-----
Annealing	0,5 min.	variiert	40x
Elongation	0,5 min.	72°C	-----
End-Elongation	15 min.	72°C	1x
	∞	4°C	

Tabelle 4.2: Temperaturprofil eines PCR-Laufs

Die Annealingtemperaturen variieren je nach herzustellendem PCR-Produkt. Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die optimalen Annealingtemperaturen. Sie wurden mit dem „TM calculator“, einem Bestandteil der Freeware „pDraw“ (www.acaclone.com), errechnet.

	Länge des PCR-Produkts	GC-Gehalt	Annealingtemperatur
rSyb2(C;1-97)			
hergestellt mit „C97nde“/ „C97bam“	333bp	60,7%	66°C
hergestellt mit „C97nco“/ „C97bam“	388bp	59,8%	61°C
rSyb2(C;27-97)			
hergestellt mit „C70nde“/ „C70bam“	272bp	53,7%	62°C

Tabelle 4.3: Optimale Annealingtemperaturen für die Herstellung der einzelnen PCR-Produkte

4.2.1.3 Agarosegelelektrophorese zur Analyse der PCR-Produkte

Zur Analyse der PCR werden 5µl jedes Ansatzes mit 1µl Slotmarker versehen und kurz abzentrifugiert. Bis zur Auftragung auf ein Agarosegel werden sie bei 4°C gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe beruht auf der negativen Ladung dieser Moleküle, die mit einem angelegten Strom durch eine Gelmatrix zur Anode wandern. Es werden Agarosematrices verwendet, da diese bei hoher Stabilität eine ausreichende Porengröße vorweisen. Diese kann über die Agarosekonzentration gesteuert werden.

Für die unter 1000 Basenpaare großen PCR-Produkte wird ein vierprozentiges Gel mit einer speziell für diese Zwecke geeigneten Agarose (NuSieve 3:1 Agarose) gegossen. Dafür werden 1,4g Agarose mit TBEE-Puffer auf 35g aufgefüllt. Die Agarose wird in einer Mikrowelle für 90 Sekunden bei 375 Watt geschmolzen. Sie muss vor dem Gießen des Gels auf unter 60°C abkühlen, weil durch die Hitze die mit einem Teflonkamm versehene Gießapparatur beschädigt werden kann. Beim Gießen entstandene Luftblasen werden mit einer Kanüle zerstoßen. Nach dem Erstarren wird die Gießapparatur in die mit TBEE-Puffer gefüllte Laufkammer eingespannt. Die Proben sowie ein DNA-Marker (100bp Ladder) werden nun aufgetragen.

Das Gel läuft für 90-120 Minuten bei 100 Volt. Die DNA-Banden werden mit einer UV-Lampe visualisiert, das Gel wird mit einer Polaroidkamera photographiert.

4.2.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

PCR-Ansätze, die ein Fragment mit der erwarteten Größe enthalten, werden mit dem „PCR Purification Kit“ (Fa. QIAGEN) aufgereinigt. Im Gegensatz zu Proteinen bindet die DNA in Gegenwart eines hochkonzentrierten, chaotropen Salzes bei einem pH-Wert von unter 7,5 an eine Silikamembran. Die DNA wird mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen und mit Aq. dest. eluiert.

Zur Konzentrationsbestimmung wird die DNA in Aq. dest. verdünnt. Aus der Absorption der Lösung bei 260nm kann die DNA-Konzentration folgendermaßen berechnet werden [125]:

(Formel 1)

$$c = OD_{260} \times 50 \times F$$

c: Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]

OD₂₆₀: gemessene Absorption bei 260 nm

F: Verdünnungsfaktor

Verunreinigungen durch Proteine können bei 280nm erfasst werden. Ist der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ größer als 1,5, gilt die DNA als sauber.

Bis zur weiteren Verwendung wird die DNA bei -20°C gelagert.

4.2.2 Ligation der DNA in Bakterienplasmid

Die Ligationen werden nach dem Protokoll in Tabelle 4.4 durchgeführt.

Die Vektor-DNA wird nach dem Verdau am 5'-Ende mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Religation der entfernten DNA-Sequenz in den Vektor zu verhindern. Im letzten Schritt verknüpft eine T4 DNA-Ligase den dephosphorylierten Vektor mit dem verdauten PCR-Produkt.

Schritt 1a: Verdau des PCR-Produkts	150ng PCR-Produkt je 10 Units Restriktionsendonukleasen 100µg/ml BSA 10% v/v Puffer (10x), jeweils optimal für Restriktionsendonukleasen
Schritt 1b: Verdau des Vektors (7,0µl)	50ng Vektor-DNA je 10 Units Restriktionsendonukleasen 100µg/ml BSA 10% v/v Puffer (10x) Die Komponenten werden vorsichtig gemischt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Restriktionsenzyme inaktiviert (BamHI, NcoI: 15 Minuten bei 65°C, NdeI: 20 Minuten bei 80°C).
Schritt 2: Dephosphorylierung	7µl Vektor-DNA aus Schritt 1b 0,9µl Dephosphorylierungspuffer 1,0µl alkalische Phosphatase Der Puffer und die alkalische Phosphatase werden direkt zur verdauten Vektor-DNA pipettiert. Der Ansatz wird für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, dann wird die Phosphatase für 15 Minuten bei 65°C inaktiviert.
Schritt 2: Ligation	9,0µl Dephosphorylierungsansatz aus Schritt 2 2,0µl Ligasepuffer (10x) 150ng verdautes PCR-Produkt aus Schritt 1a 1,0µl T4 DNA-Ligase Aq. dest. (ad 20µl) Alle Komponenten werden vorsichtig gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz kann bei -20°C gelagert oder sofort zur Transformation von Bakterien verwendet werden.

Tabelle 4.4: Durchführung eines Ligationsansatzes

Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2 zeigen die Multiple Cloning Sites der Vektoren pET15b und pET11a, in welche die amplifizierten DNA-Fragmente ligiert werden. Aus der pET15b wird mit den Restriktionsenzymen BamHI und NcoI die DNA entfernt, die auch das Histidin₆-tag codiert. Dieses musste deshalb in der per PCR amplifizierten rSyb2(C;1-97)-Sequenz enthalten sein. Der Vektor codiert im Bereich der BamHI-Schnittstelle nicht für ein Stop-Codon, welches auch diesem Grund ebenfalls in der rSyb2-DNA enthalten ist.

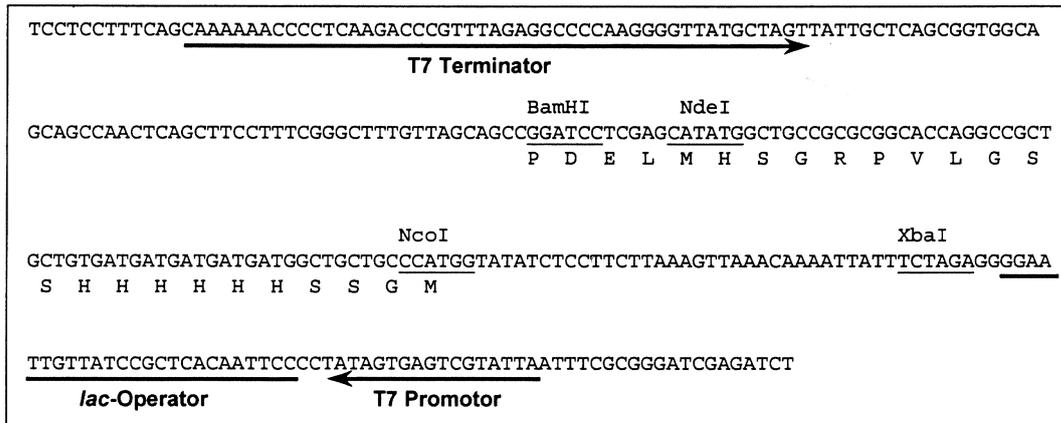


Abbildung 4.1: Multiple Cloning Site des Vektors pET15b. Gezeigt ist die DNA-Sequenz zwischen T7-Terminator und –Promotor. Zwischen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und NcoI wird die rSyb2(C;1-97)-DNA inseriert.

Aus pET11a wird mit den Restriktionsenzymen BamHI und NdeI ein Bereich entfernt, der für die rSyb2-Herstellung ohne Belang ist. Der Vektor codiert nicht für ein Histidin6-tag, das aber in der rSyb2(C;27-97)-DNA enthalten ist. Der C-terminale Cysteinrest sowie ein Stop-Codon werden im Vektor pET11a im Bereich direkt hinter der BamHI-Schnittstelle codiert.

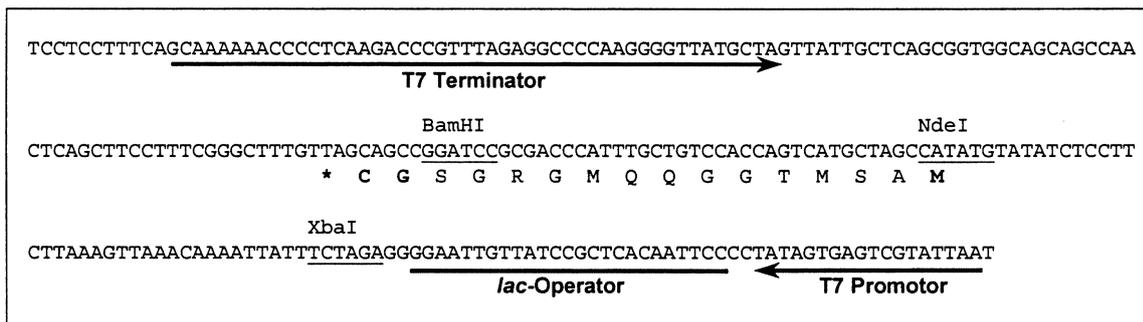


Abbildung 4.2: Multiple Cloning Site des Vektors pET11a. Gezeigt ist die DNA-Sequenz zwischen T7-Terminator und –Promotor. Zwischen die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und NdeI wird die rSyb2(C;27-97)-DNA inseriert.

4.2.3 Transformation von *E. coli* OneShot®TOP10 Chemically Competent Cells

Zur Überprüfung der Ligation sowie zur Plasmidvermehrung werden *E. coli* OneShot®TOP10 Chemically Competent Cells (Fa. Invitrogen) mit den ligierten Vektoren transformiert. Die Bakterien werden als kompetente Zellen erworben und lagern bei –80°C. Zur Transformation werden sie auf Eis aufgetaut. 5µl eines Ligationsansatzes werden hinzupipettiert und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Der Ansatz wird 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ein anschließender Hitzeschock für 30 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad bewirkt die Aufnahme der Vektor-DNA in die Zellen. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium wird der Ansatz 1 Stunde lang bei 37°C und 225 rpm geschüttelt.

Je 100µl eines Transformationsansatzes werden dann auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Gewachsene Bakterienklone enthalten den pET-Vektor, der ihnen Ampicillinresistenz verleiht. Die Agarplatten können mit Parafilm umwickelt für 4-6 Wochen bei 4°C gelagert werden.

4.2.4 Analyse der transformierten *E. coli*-Klone mittels Kolonie-PCR

Ob die transformierten Bakterien den Vektor mit oder ohne rSyb2-DNA-Insert enthalten, wird in einer Kolonie-PCR untersucht.

Die Kolonien werden mit einer sterilen Pipettenspitze in 5µl Aq. dest. überführt, abzentrifugiert und für 10 Minuten gekocht. Durch anschließendes Zentrifugieren pelletieren die Zellwandbausteine, die DNA befindet sich im Überstand. Damit die Kolonien auf den Agarplatten wieder nachwachsen, werden diese für einige Stunden bei 37°C inkubiert.

Dem PCR-Mastermix liegen die in Tabelle 4.5 für einen 1-fachen Ansatz aufgelisteten Volumina für alle Komponenten zugrunde. Das Temperaturprofil entspricht dem in Tabelle 4.2 beschriebenen Verlauf, die Annealingtemperatur beträgt 53°C. Die Analyse der PCR erfolgt wie in Abschnitt 4.2.1.3 beschrieben auf einem 4% NuSieve-Agarosegel.

	Konzentration der Stammlösung	Volumen [µl]	Endkonzentration
Puffer I	10x	2,5	1x
dNTP-Mix	2,5mM je dNTP	2,0	200µM je dNTP
Primer I	5pmol/µl	0,5	2,5pmol= 0,1µM
Primer II	5pmol/µl	0,5	2,5pmol= 0,1µM
Aq. dest.		16,75	
DNA-Polymerase	5U/µl	0,25	1,25U
Template-DNA	Kontrollvektor (10ng/µl) oder Bakterienlysat	2,5	
Aq. dest.			
Summe		25,0	

Tabelle 4.5: Zusammensetzung eines PCR-Mastermixes zur Kontrolle transformierter Bakterien

Die verwendeten Primer sollten mit dem Vektor, nicht jedoch mit der Insert-DNA hybridisieren: Im Ligationsansatz wird die verdaute Insert-DNA im Überschuß zugegeben, gelangt beim Ausplattieren des Transformationsansatzes erst auf die Agarplatte und dann mit den Bakterienlysaten in den PCR-Ansatz. Durch Primer, die mit der Insert-DNA hybridisieren, kommt es zu einer Vervielfältigung des nicht ligierten Inserts und somit zu falsch-positiven Ergebnissen [126]. Um diese falsch-positiven Ergebnisse zu vermeiden, werden in der Kolonie-PCR der T7 Promotor- sowie der T7 Terminator-Primer verwendet.

Als Negativkontrolle der PCR dienen Aq. dest. sowie das LB-Medium, in dem die Kolonien inkubiert werden. Als Positivkontrollen werden pET15b-DNA ohne rSyb2-Insert und das Plasmid pET15b_rSyb2(N;1-97) verwendet.

4.2.5 Analyse der transformierten *E. coli*-Klone mittels Restriktionsverdau

Zur Analyse der Transformanden werden *E. coli*-Klone mit sterilen Pipettenspitzen von der Agarplatte in 3ml LB-Medium mit Carbenicillin überführt. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen werden 200µl der Kultur abgenommen und bei -20°C eingefroren. Diese Proben sind noch einige Tage verwendbar.

Die restlichen 2,8ml werden für 10 Minuten bei 5100xg abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Im Plasmid Miniprep Kit wird das Pellet in RNaseA-haltigem Puffer resuspendiert und die Zellen in einem alkalischen, SDS-haltigen Puffer aufgeschlossen. Mit einer Kaliumacetatlösung fällt man das SDS als Kalium-SDS aus der Lösung und zentrifugiert es für 10 Minuten bei 8050xg ab. Der klare Überstand wird auf einer Silikamembran gebunden, mit Ethanol-haltigem Puffer gewaschen und anschließend mit Aq. dest. eluiert. Die Konzentration der Lösung kann wie in Abschnitt 4.2.1.3 beschrieben berechnet werden. Die DNA wird bei -20°C gelagert.

Per Restriktionsverdau lässt sich mit dem Enzym PfiFI verifizieren, ob rSyb2-DNA in den Vektor ligiert wurde: Beide Vektoren, pET15b und pET11a, enthalten die Schnittsequenz je zweimal, wenn rSyb2-DNA in den Vektor ligiert wurde, aber nur einmal, wenn die Ligation nicht funktioniert hat. PfiFI erkennt die gleiche Basensequenz wie das in den Vektorkarten im Anhang eingezeichnete Restriktionsenzym Tth1111 (s. Abbildung 9.1, Abbildung 9.2, Abbildung 9.3).

Für einen Restriktionsverdau werden die in Tabelle 4.6 aufgelisteten Komponenten zusammenpipettiert und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrollansatz dient immer ein parallel durchgeführter Restriktionsverdau mit dem jeweiligen Vektor ohne das rSyb2-Insert.

	Konzentration der Stammlösung	Volumen	Endkonzentration
Aq. dest.			
BSA	100mg/ml, 1:10 verdünnen	10% v/v	1mg/ml
PfiFI	10Units/µl	0,5µl	5Units
Puffer #4 (Fa. NEB)	10x	10% v/v	1x
Plasmid-DNA	variiert	variiert	300ng

Tabelle 4.6: Komponenten eines Restriktionsverdaus

Zur Analyse werden die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt. Die Herstellung des Gels entspricht dem in Abschnitt 4.2.1.3 beschriebenen Protokoll, allerdings werden die Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, und es wird ein anderer Marker (500bp-Ladder) verwendet.

4.2.6 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Plasmide, die die rSyb2-DNA enthalten, werden von der Firma GENterprise GmbH sequenziert, um eventuelle Mutationen in den DNA-Sequenzen zu erkennen. Als Primer dient der T7-Primer, von dessen Sequenz aus die 700 folgenden Basen ermittelt werden.

4.2.7 Herstellung von *E. coli*-Kryokulturen

Aus Klonen, die Vektoren mit korrekten rSyb2-Inserts enthalten, werden zur längerfristigen Aufbewahrung Kryokulturen angelegt. Dazu werden 5ml LB-Medium mit 200µg/ml Carbenicillin versetzt und von einer Agarplatte oder einer eingefrorenen Kultur beimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen werden 20ml frisches LB-Carbenicillin-Medium mit 40µl der über-Nacht-Kultur beimpft. Die Kultur wird bei 37°C und 225rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Je 200µl Glycerol (45% v/v) werden in Kryoröhrchen mit 400µl der Bakterienlösung versetzt und sofort bei -80°C eingefroren.

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Transformation von *E. coli*-Expressionsstämmen

In der Expression der rSyb2-Fragmente kommen die *E. coli*-Expressionsstämme *E. coli* BLR(DE3), *E. coli* Tuner(DE3) und *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP zum Einsatz.

4.3.1.1 Eigenschaften der verwendeten Expressionsstämme

Alle Stämme sind speziell für die Expression von Proteinen mit dem pET-Expressionssystem (pET: "protein expression using T7") ausgelegt (s. Abbildung 4.3). Ein in einen pET-Vektor kloniertes Gen unterliegt der Kontrolle des Promotors aus dem Bakteriophagen T7, dieser wird durch den *lac*-Repressor reprimiert. *E. coli*-RNA-Polymerasen erkennen den T7-Promotor nicht, dafür bedarf es der hochspezifischen T7-RNA-Polymerase. Deren Gen („T7-Gen“ in Abbildung 4.3) ist in geeigneten Bakterienstämmen, sogenannten λDE3 Lysogenen, in das Genom kloniert. Das Gen unterliegt der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors, der ebenfalls durch den *lac*-Repressor reprimierbar ist.

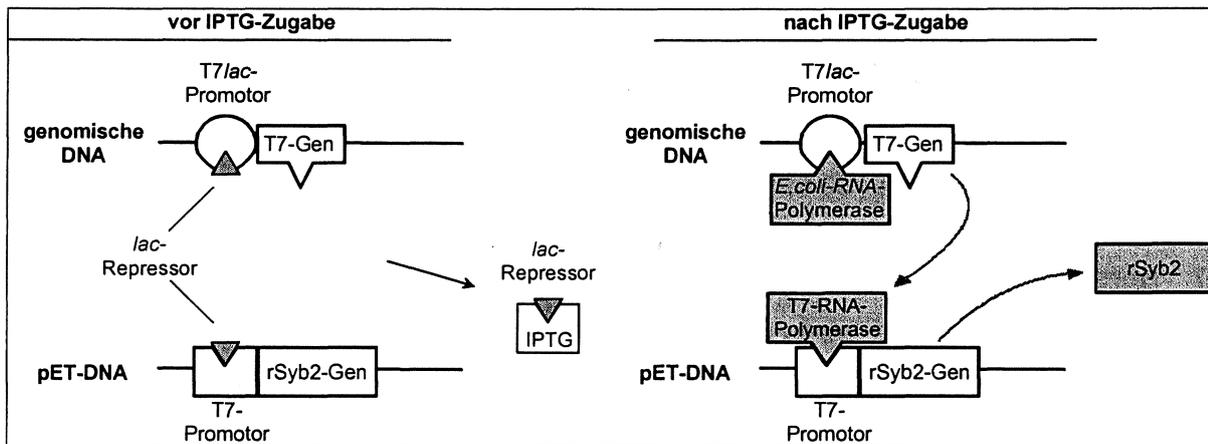


Abbildung 4.3: Funktionsweise des pET-Expressionssystems.

Der *lac*-Repressor kann durch die Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) inaktiviert werden - die Bakterien exprimieren dann zunächst die T7-RNA-Polymerase, welche mit der Transkription des Zielproteins beginnt (s. Abbildung 4.3 rechts, von oben nach unten).

In Tabelle 4.7 werden die Genotypen der drei Stämme verglichen. Sie sind alle λ DE3 Lysogene. Als Abkömmlinge des Stammes *E. coli* BL21 fehlen ihnen die Proteasen *lon* und *ompT*, wodurch exprimierte Proteine besser vor der Degradierung geschützt sind.

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> BLR (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>recA</i> λ (DE3)
<i>E. coli</i> Tuner (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lacY1</i> λ (DE3)
<i>E. coli</i> BL21 CodonPlus(DE3)-RP	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>Tet^r</i> λ (DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU</i> <i>proL</i> <i>Cam^r</i>]

Tabelle 4.7: Genotypen der drei verwendeten *E. coli*-Expressionsstämme

Der Stamm *E. coli* BLR(DE3) ist *recA*-defizient, dadurch werden Plasmide stabilisiert. In *E. coli* Tuner(DE3) sind die Gene *lacZY* deletiert. Durch das Fehlen der durch *lacY* codierten *lac*-Permease kann IPTG in die Zellen diffundieren, die Induktion soll dadurch besser funktionieren.

E. coli BL21 CodonPlus(DE3)-RP enthält ein pACYC-basiertes Plasmid. Dieses beinhaltet die Gene *argU* und *proL*, die tRNAs für Arginin und Prolin codieren.

Das Gen *Cam^r* in *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP codiert für die Chloramphenicol-Acetyltransferase und verleiht den Bakterien eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol. Weitere Eigenschaften dieses Stammes sind der *Hte*-Phänotyp, durch den die Transformationseffizienz gesteigert werden soll, sowie die Inaktivierung des Gens *endA*, durch dessen Produkt Endonuklease I Plasmid-DNA sehr schnell degradiert würde.

4.3.1.2 Durchführung der Transformation

E. coli BL21 CodonPlus(DE3)-RP werden als kompetente Zellen erworben, *E. coli* BLR(DE3) und *E. coli* Tuner(DE3) müssen zunächst kompetent gemacht werden. Dazu wird eine über-Nacht-Kultur der Bakterien in LB-Medium angelegt. 200 μ l dieser Kultur werden am nächsten Morgen in

20ml frisches LB-Medium überführt und bei 37°C und 225rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Die Bakterien werden in einem 50ml-Röhrchen für 10 Minuten bei 4°C und 1275xg abzentrifugiert. Das Pellet wird in 20ml eiskalter, 0,1-molarer Calciumchloridlösung resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis gestellt. Anschließend werden die Bakterien für 20 Minuten bei 4°C und 200xg abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1ml der Calciumchloridlösung resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Zellen werden sofort transformiert.

Die kompetenten Zellen von *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP werden zunächst auf Eis aufgetaut, dann werden 2µl der beiliegenden, 1:10-verdünnten β-Mercaptoethanolösung zugegeben.

Die weitere Verlauf der Transformation ist für alle drei *E. coli*-Stämme gleich. Zu 50µl der kompetenten Zellen werden 10µl Ligationsansatz gegeben. Die Bakterien werden für 30 Minuten auf Eis gekühlt, dann für 20 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und wieder auf Eis gestellt. Zur Regeneration werden 250µl SOC-Medium, das auf 42°C erwärmt wurde, zugegeben, und der Ansatz wird für 1 Stunde bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Je 100µl werden auf eine LB-Agarplatte ausplattiert. Agarplatten für *E. coli* BLR(DE3) und *E. coli* Tuner(DE3) enthalten Ampicillin, Agarplatten für *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP enthalten Ampicillin und Chloramphenicol. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Bewachsene Platten werden am nächsten Tag mit Parafilm umwickelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Von den Transformanden werden, wie in Abschnitt 4.2.7 beschrieben, Kryokulturen angelegt.

4.3.2 Expression im 500ml-Maßstab

Zur Expression von rSyb2 in *E. coli* wird eine über-Nacht-Kultur der Bakterien in 20ml LB-Carbenicillin-Medium angelegt. Das Medium für *E. coli* CodonPlus (DE3)-RP enthält zusätzlich Chloramphenicol. Die Kulturen werden bei 37°C und 225rpm geschüttelt.

Am nächsten Morgen werden 10ml der über-Nacht-Kultur in 500ml frisches LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika überführt und weiterhin bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ (Optische Dichte, Wellenlänge: 600 nm) von 1,0 erreicht hat, wird die rSyb2-Expression mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Die Dauer der Expression beträgt 5 Stunden. Die Zellen werden dann für 20 Minuten bei 4°C und 3850xg abzentrifugiert. Vom Überstand wird eine Probe entnommen, anschließend wird er verworfen. Nach einer Nassgewichtsbestimmung des Pellets kann dieses bei -20°C aufbewahrt werden.

4.3.3 Expression im 10l-Fermenter

Zunächst wird der Fermenter zur Expression vorbereitet. Dafür wird die pH-Elektrode kalibriert. Der Rührer, die Antischaum- und Temperatursonden, die Zuläufe für Säure, Base und Antischaummittel, ein Ernterohr sowie ein Abluft- und ein Zuluftschlauch und werden in den Deckel montiert. Da der Fermenter aus technischen Gründen nicht mit Sauerstoff, sondern nur mit steriler Raumluft

begast werden kann, wird der Sauerstoffpartialdruck während der Expression nicht gemessen. Eine pO_2 -Elektrode wird deshalb nicht angeschlossen.

Der Fermenter wird mit etwa 5 Liter Aq. dest. befüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wird das Aq. dest. über das Ernterohr aus dem Fermenter gepumpt, im Gegenzug werden 7,84 Liter steriles, Antibiotika enthaltendes LB-Medium hineingepumpt. Alle Elektroden und Schläuche werden angeschlossen, das Medium wird auf 37°C vortemperiert.

Zur Expression von rSyb2 werden über-Nacht-Kulturen der Bakterien in 2x 80ml LB-Medium mit Antibiotika angelegt. Die Kulturen werden bei 37°C und 225 rpm geschüttelt.

Am nächsten Morgen wird der Fermenter mit den Vorkulturen beimpft. Das Medium wird konstant bei 37°C mit 400rpm gerührt und mit 3l/h Raumluft begast. Regelmäßig wird eine Probe entnommen, um die OD_{600} der Kultur zu bestimmen. Sobald diese einen Wert von 1,0 erreicht hat, erfolgt die Zugabe von IPTG. 5 Stunden später wird die Expression abgebrochen, die Zellen werden für 20 Minuten bei 4°C und 3850xg abzentrifugiert. Das Nassgewicht des Pellets wird bestimmt, anschließend wird es bei -20°C eingefroren.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteingemischen

In einer SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Lämmli [127] werden Proteine in einem Polyacrylamidgel mit dem elektrischen Strom nach ihrer Größe aufgetrennt. Ihre Ladung spielt keine Rolle, weil sie zuvor in einem SDS-haltigen Puffer denaturiert werden. Das Verhältnis von Ladung zu Masse der Proteine ist dann konstant und proportional zum Molekulargewicht.

Die Gelmatrix besteht aus Polyacrylamidketten, die durch Quervernetzung mit Bis-Acrylamid eine siebartige Struktur bilden. Die Konzentrationen des Monomers Acrylamid und des Vernetzers Bis-Acrylamid bedingen die Porengröße und somit die Trenneigenschaften eines Gels.

Für die Polyacrylamidgele werden Vorder- und Rückscheiben, Spacer und Teflonkämme mit Ethanol gesäubert und in die Gießapparatur montiert. Diese wird bis 2cm unter die Oberkante der Glasscheiben mit der Acrylamidlösung für Trenngele befüllt. Sie wird mit Isopropanol überschichtet und polymerisiert in etwa 20 Minuten aus. Anschließend wird das Isopropanol entfernt, dann kann das Sammelgel gegossen und ein Teflonkamm in die Apparatur gesteckt werden. Die fertig auspolymerisierten Gele werden in den Glasscheiben aus der Gießapparatur genommen und in die Laufkammer montiert. Innen- und Außenkammer werden mit Elektrophorese-Puffer befüllt, der Teflonkamm wird aus der Apparatur gezogen.

Zur Vorbereitung von Proben mit hoher Proteinkonzentration, z. B. aus der rSyb2-Aufreinigung, werden 10µl Probe mit 5µl des dreifach konzentrierten Probenpuffers versehen. Die Proben werden für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert und bis zum Gebrauch bei 4°C gekühlt.

Größervolumige Proben und Proben mit geringer Proteinkonzentration werden zuvor einer TCA-Fällung unterzogen. Dazu wird die Proteinlösung mit PBS auf 1ml aufgefüllt, ihr werden 250µl Trichloressigsäure (TCA, 50%) sowie 10µl Deoxycholat (DOC, 0,15%) zugegeben, sie wird gevortext und entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 Stunde auf Eis gekühlt. Die gefällten Proteine werden für 1 Stunde bei 4°C und 8000xg zentrifugiert, das Pellet wird in 1ml einer eiskalten Aceton:HCl-Mischung (200:1) resuspendiert und nochmals für 1 Stunde bei 8000xg und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 15µl des einfach konzentrierten Probenpuffers resuspendiert. Die Proben werden für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert und bis zum Gebrauch bei 4°C gekühlt.

In jede Tasche des Gels werden 10µl Probe, 1-facher Probenpuffer oder 4µl Prestained Broad Range Marker pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt für 45 Minuten bei 25mA pro Gel. Anschließend werden die Gele entweder einem Western Blot unterzogen (s. Abschnitt 4.5.3) oder in Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln für 45 Minuten gefärbt. Durch die je 45 Minuten dauernde Inkubation in 50% und in 10% Entfärbelösung löst sich die blaue Farbe aus der Polyacrylamidmatrix, an den Proteinen wird sie dabei fixiert.

4.4.2 Aufreinigung von rekombinantem Synaptobrevin-2

Zur Aufreinigung des rekombinanten Synaptobrevins werden drei verschiedene Protokolle verglichen. Das rSyb2 wird mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) von *E. coli*-Proteinen getrennt. Die IMAC beruht auf der hohen Affinität der Histidinreste für zweiwertige Kationen, insbesondere Nickel. Ein Protein mit einem Histidin-tag bindet deshalb an einer Matrix, an der Nickel immobilisiert wurde. Die Aufreinigung wird durch Auftragen der Proben aus Expression und Aufreinigung mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 4.4.1) auf einem 15%igen Polyacrylamidgel kontrolliert.

4.4.2.1 Renaturierende Aufreinigung des rSyb2s

Die Resuspension des Bakterienpellets erfolgt auf Eis in achtmolarem Harnstoff-Puffer bei pH 8,0. Pro Gramm Pellet (Nassgewicht) werden 5ml Puffer zugegeben. Zum mechanischen Zellaufschluss werden die Zellen zweimal für je 10 Minuten auf Eis mit Ultraschall (50 Watt; 50%; 1 Minute Pause) behandelt und danach für 1 Stunde bei Raumtemperatur taumelnd inkubiert. Die Suspension wird 20 Minuten bei 4°C und 30.000xg zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wird in 50 ml Falconröhrchen zu NiNTA-Agarosebeads (engl.: Nickel-nitrilotriacetic acid; Nickel-Nitriлотriessigsäure) gegeben (0,25ml pro ml verwendetem Puffer) und bei Raumtemperatur 2 Stunden taumelnd inkubiert.

Die Suspension wird auf eine NiNTA-Agarosesäule gegeben, der Durchfluß wird gesammelt. Die NiNTA-Agarosebeads werden zunächst mit achtmolarem Harnstoff-Puffer bei pH 7,4 gewaschen. Die Harnstoffkonzentration wird mit den folgenden Waschschritten schrittweise auf 0M gesenkt (s. Tabelle 4.8). Dadurch sollen bakterielle Proteine zunächst von der Matrix abgewaschen werden und das rSyb2 soll an der Säule renaturieren.

Waschschritt	Volumen	Anmerkungen
8M Urea; pH 8,0	100%	
8M Urea; pH 7,4	100%	
6M Urea; pH 7,4	50%	
4M Urea; pH 7,4	50%	
2M Urea; pH 7,4	50%	
0M Urea; pH 7,4	25%	2 Waschschrritte
0M Urea; pH 5,0	10%	4 Elutionsschrritte

Tabelle 4.8: Schema der rSyb2-Aufreinigung auf NiNTA-Agarosesäulen (renaturierende Aufreinigung)

Die Elution des rSyb2s erfolgt in harnstofffreiem Puffer bei pH 5,0. Der Durchfluß eines jeden Wasch- und Elutionsschritts wird separat gesammelt und bis zur Dialyse bei 4°C gelagert.

4.4.2.2 Denaturierende Aufreinigung des rSyb2s

Der Zellaufschluß und die Bindung des denaturierten rSyb2s an NiNTA-Agarosebeads erfolgt wie im vorhergehenden Abschnitt „Renaturierende Aufreinigung des rSyb2“ beschrieben wurde. Die Suspension wird dann ebenfalls auf eine NiNTA-Agarosesäule gegeben.

Die NiNTA-Agarosebeads werden schrittweise mit achtmolaren Harnstoff-Puffern mit sinkenden pH-Werten gewaschen (s. Tabelle 4.9). Das rSyb2 eluiert bei pH 5,0.

Waschschritt	Volumen	Anmerkungen
pH 8,0	100%	
pH 7,4	50%	
pH 6,5	25%	2 Waschschrritte
pH 5,0	10%	3-4 Elutionsschrritte

Tabelle 4.9: Schema der rSyb2-Aufreinigung auf NiNTA-Agarosesäulen (denaturierende Aufreinigung)

Der Durchfluss jedes Wasch- und Elutionsschritts wird gesammelt und bei 4°C gelagert.

4.4.2.3 Präparation der Inclusion Bodies und denaturierende Aufreinigung des rSyb2s

Die Resuspension des Bakterienpellets erfolgt in Lysepuffer bei pH 8,0. Pro Gramm Pellet (Nassgewicht) werden 5ml Puffer zugegeben. Das EDTA im Puffer komplexiert divalente Kationen, die zur Vernetzung der Lipopolysaccharide in der äußeren Bakterienzellwand beitragen. Sie werden durch die monovalenten Trismoleküle aus dem Puffer ersetzt, dadurch kommt es zu einer Destabilisierung der Zellwand. Die Zellmembran wird dann enzymatisch durch Lysozym und nach

60 Minuten Inkubation bei 37°C mechanisch durch Ultraschall (2x 10 Minuten, 50 Watt; 50%) zerstört. RNase A und DNase I im Puffer verringern die Viskosität der Suspension. An die Ultraschallbehandlung schließt sich eine 60minütige Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln an.

Anschließend werden nicht gelöste Inclusion Bodies abzentrifugiert. Die Inclusion Bodies werden noch dreimal mit PBS + Triton-X-100 gewaschen. Dabei wird die Triton-X-100-Konzentration von 1% im ersten auf 0,5% im zweiten auf 0% im dritten Waschgang reduziert. Durch das Triton-X-100 werden adsorbierte Zellbestandteile von den Inclusion Bodies gewaschen. Die Inclusion Bodies können zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden. Zum Solubilisieren werden sie in achtmolarem Harnstoff-Puffer aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden nicht gelöste Bestandteile der Lösung durch einen weiteren Zentrifugationsschritt entfernt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen für 45 Minuten bei 4°C und 30.000xg.

Der Überstand wird zu NiNTA-Agarosebeads gegeben (0,25ml pro verwendetem Lysepuffer) und bei Raumtemperatur 2 Stunden taumelnd inkubiert. Die weiteren Schritte entsprechen dem für die denaturierende Aufreinigung beschriebenen Protokoll (s. Abschnitt 4.4.2.2).

4.4.3 Optimierung der Bedingungen zur Proteinfaltung

Das rSyb2 liegt bei der denaturierenden Aufreinigung nach der Elution von den NiNTA-Agarosebeads in achtmolarem Harnstoff-Puffer vor. Es muss nun in einen Puffer überführt werden, der die korrekte Proteinfaltung gewährleistet. Weil die Auswahl an Puffern und Pufferzusätzen extrem groß ist, wird eine Methode zum schnellen und effizienten Screening möglichst vieler Bedingungen angewandt [128]: Das denaturierte rSyb2 wird zunächst 1:10 in Renaturierungspuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei gebildete Proteinaggregate werden über eine 30kDa-Membran abzentrifugiert und befinden sich dann im Retentat, gelöstes Protein ist im Filtrat. Durch die Analyse der Retentate und der Filtrate per SDS-PAGE (s. Abschnitt 4.4.1) können Puffer ermittelt werden, unter denen das gesamte rSyb2 in Lösung bleibt. Gegen diese Puffer soll das rSyb2 dialysiert werden.

In Tabelle 4.10 sind sämtliche getesteten Renaturierungspuffer aufgelistet. Für die Zusätze und Detergenzien ist jeweils die Endkonzentration im Puffer angegeben.

Puffer	Zusatz (getestete Konzentrationen)	Detergenz
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)		Triton-X-100 (0,05%/ 0,10%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	MgSO ₄ (0,2M/ 0,4M)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	NaCl (0,5M/ 1M)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	CaCl ₂ (0,1M/ 0,2M)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	Urea (0,8/ 1,6M)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	Glycin (1%/ 2%)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	Sucrose (0,5M/ 1M)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	Glycerol (20%/ 40%)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)	KCl (0,5M/ 1M)	Triton-X-100 (0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)		Tween-20® (0,01%/ 0,05%)
0,1M NaCl, 0,01M Tris (pH 7,4)		Tween-80 (0,1%/ 0,2%)
20mM Natriumacetat (pH 4,5)		Triton-X-100 (0,05%/ 0,10%)
20mM Natriumacetat (pH 4,75)		Triton-X-100 (0,05%)
20mM Natriumacetat (pH 5,0)		Triton-X-100 (0,05%)
20mM Natriumacetat (pH 4,5)		Tween-20® (0,01%/ 0,05%)
20mM Natriumacetat (pH 5,0)		Tween-20® (0,01%/ 0,05%)

Tabelle 4.10: Liste der zur Synaptobrevin-2-Aufreinigung getesteten Renaturierungspuffer

4.4.4 Dialyse des aufgereinigten rSyb2s

Die SDS-PAGE der Proben aus der Aufreinigung zeigt, welche der Eluate viel reines rSyb2 enthalten. Diese Eluate werden vereinigt. Proben mit bis zu 9ml werden in Dialyskassetten überführt, und in drei Schritten jeweils gegen 2l dialysiert, höhervolumige Eluate werden in Dialyseschlauch jeweils gegen 10l dialysiert. Der Dialysepuffer ist entweder NaCl/Tris- oder Natriumacetat-Puffer.

Schritt	Dauer	Temperatur
Nr. 1	2h	4°C
Nr. 2	über Nacht	4°C
Nr. 3	2h	4°C

Tabelle 4.11: Schema zur Dialyse von rSyb2-Lösungen.

Nach dem letzten Dialyseschritt wird die rSyb2-Lösung in Glasgefäße überführt. Sollte die Lösung Proteinaggregate enthalten, so müssen diese für 30 Minuten bei 4°C und 3850xg abzentrifugiert werden. Der Überstand wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Außerdem wird vom Dialysepuffer eine Probe eingefroren, sie dient als Blindwert in der anschließenden Proteinbestimmung.

4.4.5 Bestimmung der rSyb2-Konzentration

Die Proteinkonzentration des Dialysats wird mit dem DC-Assay von der Firma BIO-RAD bestimmt. Dieser detergenzkompatible, kolorimetrische Test beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry [129]: Im ersten Schritt reagieren die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Cystein und

Histidin mit Kupfertartrat. Durch den Verlust von Sauerstoffatomen reduziert das kupferbehandelte Protein im zweiten Schritt Folin, wodurch eine charakteristische Blaufärbung der Lösung entsteht, die bei 700nm gemessen wird. Der gesamte Test wird in Mikrotiterplatten durchgeführt, so dass pro Messwert nur 5µl Probenlösung gebraucht werden.

Als Standardprotein dient Bovines Serumalbumin (BSA), von dem mit Dialysepuffer eine Verdünnungsreihe mit 0-1,4mg/ml hergestellt wird. Aus der Steigung der Geraden, die aus den zugehörigen Messwerten resultiert, wird die Konzentration der Synaptobrevin-2-Lösung ermittelt.

4.4.6 Lyophilisation von rSyb2

Durch Lyophilisation (Gefriertrocknung) können empfindliche biologische Materialien schonend konserviert werden. Die Methode beruht auf der Trocknung des gefrorenen Produkts, bei der Wassermoleküle aus der Eisphase des Produkts unter Vakuum sublimieren.

Je 500µl der dialysierten rSyb2-Lösung werden in sterile Glasfläschchen aliquotiert, mit einem Gummistopfen versehen und bei -80°C auf der temperierbaren Edelstahlstellplatte eingefroren. Die Glasfläschchen dürfen nicht dicht verschlossen sein. Die Stellplatte mit den eingefrorenen Proben wird in die Vakuumkammer der Gefriertrocknungsanlage gestellt. Eine Vakuumpumpe sorgt innerhalb von 24 Stunden für die Sublimation des Wassers. Nach Beendigung des Trocknungsprozesses wird die Trocknungskammer mit Inertgas (Stickstoff) auf Normaldruck gebracht. Durch Herunterdrehen der Druckplatte werden die Gummistopfen fest auf die Probengefäße gedrückt. Diese werden zusätzlich mit Bördelkappen verschlossen. Das lyophilisierte rSyb2 wird bei -80°C gelagert.

4.5 Immunologische Methoden

4.5.1 Verwendete Antikörper

Insgesamt kommen fünf verschiedene Peptidantikörper zum Einsatz, von denen drei kommerziell erhältlich sind (s. Tabelle 4.12). Zwei Antikörper werden speziell für den Endopeptidase-Assay hergestellt.

Name	Epitop in natürlichem Syb2	Epitop in rekombinantem Syb2	Spezies
α-VAMP2 (pAK)	Aminosäuren Nr. 36-56	Aminosäuren Nr. 56-76	Kaninchen
α-VAMP2 (mAK)	Aminosäuren Nr. 1-20	Aminosäuren Nr. 21-40	Maus
α-Histidin ₆ -tag (monoklonal)	/.	Aminosäuren Nr. 5-10	Maus

Tabelle 4.12: Kommerziell erhältliche Antikörper gegen (rekombinantes) Synaptobrevin-2.

Laut Herstellerangaben wird für die Herstellung des polyklonalen α-VAMP2-Antikörpers ein an KLH (Keyhole-Limpet-Hämocyanin) gekoppeltes Peptid aus den Aminosäuren verwendet, die das Epitop des Antikörpers darstellen.

4.5.1.1 Herstellung von Antikörpern gegen rSyb2-Spaltfragmente

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper werden *in vitro* synthetisierte Peptide in Kaninchen injiziert. Die Peptide entsprechen in ihrer Sequenz den Aminosäuren an der rSyb2-Spaltstelle (s. Abbildung 4.4). Der Antikörper gegen das N-terminale Spaltfragment wird mit „ α -N-Terminus“ bezeichnet, der gegen das C-terminale Spaltfragment mit „ α -C-Terminus“.

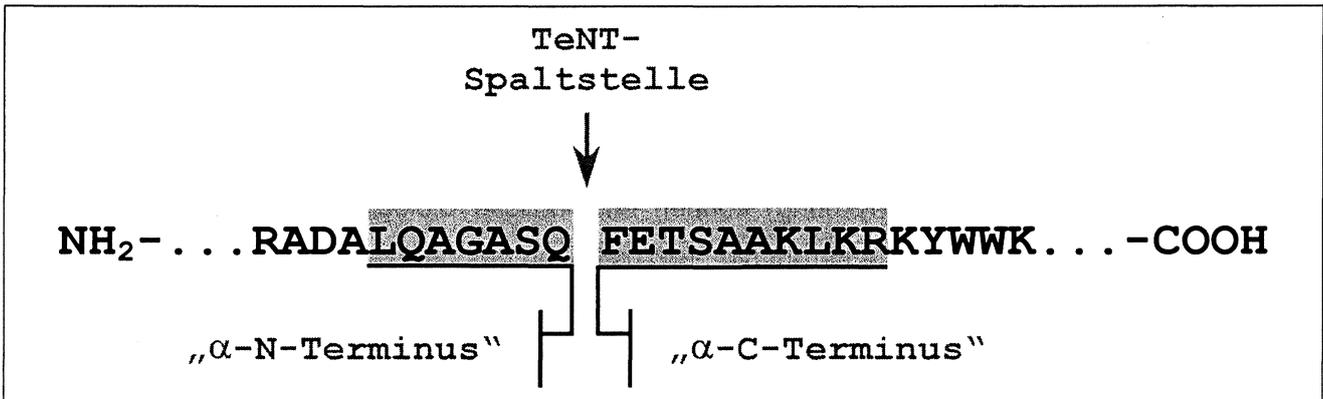


Abbildung 4.4: Aminosäuresequenz an der TeNT-Spaltstelle in Synaptobrevin-2. Die Peptidsequenzen, gegen die die Antikörper „ α -N-Terminus“ und „ α -C-Terminus“ hergestellt werden sind grau unterlegt.

Mit der Herstellung und der Aufreinigung des α -N-Terminus-Antikörpers wird die Firma BIOTREND Chemikalien GmbH beauftragt, der α -C-Terminus-Antikörper wird in Eigenarbeit im Paul-Ehrlich-Institut hergestellt [112].

Da Peptide mit weniger als 5kDa aufgrund ihrer geringen Größe in der Regel nicht immunogen sind, werden sie an einen größeren Träger gekoppelt [130]. Im vorliegenden Fall werden die Peptide zur kovalenten Bindung mit einem endständigen Cystein versehen; CLQAGASQ wird dann an KLH gekoppelt; FETSAAKLKRRC an die nichttoxische β -Untereinheit von Cholera toxin. Beide Antigene werden in einem Adjuvans verdünnt und subkutan an die Kaninchen verabreicht. Adjuvantien wirken als Depot für die Antigene, so dass die immunisierten Tiere dem Antigen über einen längeren Zeitraum kontinuierlich ausgesetzt sind [130]. Adjuvantierte Antigen besitzen eine erhöhte Immunogenität [130].

Nach der Erstimmunisierung erfolgt die erste Auffrischinjektion nach 2 Wochen. Die Tiere werden drei weitere Male im Abstand von jeweils 4 Wochen immunisiert, 3 Wochen nach der letzten Auffrischinjektion erfolgt die Endblutentnahme.

Name	α -N-Terminus	α -C-Terminus
Zielpeptid	CLQAGASQ	FETSAAKLKRC
Aminosäuren in Syb2	Nr. 70-76	Nr. 77-86
Aminosäuren in rSyb2	Nr. 90-96	Nr. 97-106
Träger	KLH	Choleratoxin (β -Untereinheit)
Adjuvans	Lipopolysaccharid	Specol
Peptidkonzentration	nicht bekannt	300 μ g/ml
Verabreichtes Volumen	1ml	1ml
Kaninchen-Stamm	ZIKA Rabbits	New Zealand White Rabbits

Tabelle 4.13: Antikörper gegen rSyb2-Spaltfragmente

Der α -N-Terminus-Antikörper wird nach der Endblutentnahme affinitätsgereinigt. Dazu wird das Kaninchenserum auf eine Säule gegeben, die mit dem Antigen-Peptid beladen wurde. Nur die gegen dieses Peptid gebildeten Antikörper binden, alle anderen werden abgetrennt.

4.5.1.2 Test der Spezifität der hergestellten Antikörper

Die Spezifität des α -N- bzw. des α -C-Terminus-Antikörpers wird im ELISA getestet, indem ihre Bindung an rSyb2-Spaltprodukt kompetitiv durch die Vorinkubation mit unterschiedlichen synthetischen Peptiden (hergestellt von der Affina Immuntechnik GmbH) gehemmt wird. Je stärker die Hemmung eines Antikörpers durch ein Peptid, desto höher seine Spezifität für diese Aminosäuresequenz. Ein Antikörper lässt sich auf diese Weise näher charakterisieren. Das wesentliche Kriterium im Falle der hergestellten Antikörper ist die Genauigkeit, mit der die TeNT-Spaltstelle im Synaptobrevin-2 detektiert wird. Diese wird mit Peptiden ermittelt, bei deren Aminosäuresequenz die N- oder die C-terminale Seite der Spaltstelle um eine oder mehrere Aminosäuren verkürzt oder verlängert wird (s. Abbildung 4.5).

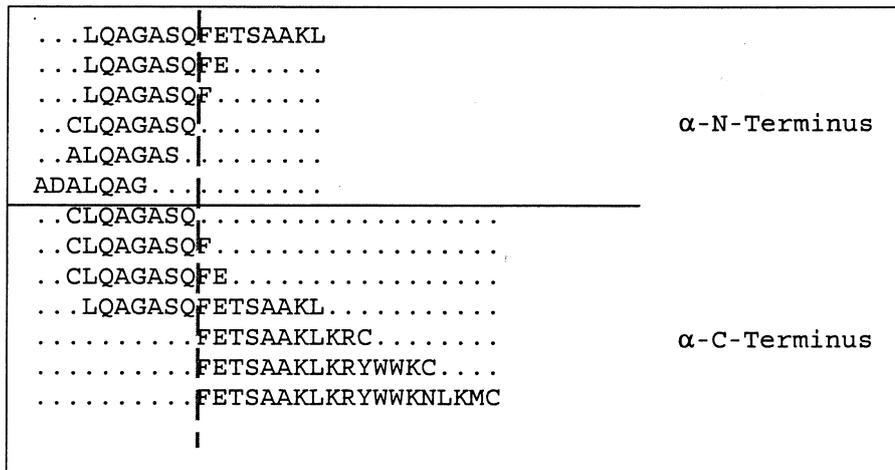


Abbildung 4.5: Peptide zur Untersuchung der Antikörperspezifität von α -N—bzw. α -C-Terminus-Antikörper. Die Peptide sind entsprechend ihrer Lage an der TeNT-Spaltstelle in Synaptobrevin-2 aufgelistet. Die TeNT-Spaltstelle ist durch die gestrichelte Linie markiert.

Der Aufbau des Tests entspricht im Prinzip dem in Abbildung 3.1 auf Seite 28 dargestellten Schema. Zunächst werden Mikrotiterplatten für 2 Stunden bei 37°C mit 1200nM rSyb2 beschichtet. Für den α -N-Terminus-Antikörper wird rSyb2(N;1-97), für den α -C-Terminus-Antikörper rSyb2(C;27-97) verwendet. Die Platten werden über Nacht bei 4°C mit 2% Sucrose und 0,2%BSA in PBS blockiert und anschließend viermal mit 250 μ l PBS mit 0,05% Tween®-20 pro Vertiefung gewaschen. Das rSyb2 wird mit 20ng/ml TeNT in PBS für 6 Stunden bei 37°C gespalten und die Platte anschließend wieder gewaschen. Der α -N-Terminus bzw. der α -C-Terminus-Antikörper werden in PBS mit 0,2% BSA verdünnt (1:2000 bzw. 1:10000), den Lösungen wird jeweils ein zu testendes Peptid in einer Endkonzentration von 165nM zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 4°C geschüttelt, gewaschen, für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit α -Kaninchen-IgG (Peroxidase-gekoppelt, 1:5000 in PBS verdünnt) inkubiert, wieder gewaschen und für 7 Minuten mit Entwicklerlösung inkubiert. Die Reaktion wird mit 2M H₂SO₄ abgestoppt und die Extinktion photometrisch bei 450nm (Referenz: 620nm) gemessen.

4.5.2 Spaltung von rekombinantem Synaptobrevin-2 mit Tetanustoxin

Das lyophilisierte Reinsttoxin (Fa. Calbiochem), das für die Entwicklung des ELISA als Standard dient, wird vor Gebrauch mit 0,5% BSA in Aq. dest. rekonstituiert (25 μ g TeNT in 100 μ l) und bei 4°C gelagert.

In Abschnitt 2.2.2.3 auf Seite 10 wurde die Notwendigkeit beschrieben, die Disulfidbindung zwischen H- und L-Kette des Tetanustoxins zu reduzieren, damit die L-Kette in das Cytosol des Neurons eindringen und dort ihre enzymatische Wirkung entfalten kann. Diese Aktivierung der L-Kette muss im ELISA *in vitro* erfolgen. Dazu wird die benötigte Menge Toxin zunächst in einem Volumen von 20 μ l in PBS mit 0,01M DTT für 30 Minuten bei 37°C reduziert. Anschließend wird das Toxin

mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und mit rSyb2 versetzt. Wird das Tetanustoxin im ELISA eingesetzt, enthält das PBS zusätzlich 2µg/ml BSA.

4.5.3 Immunoblots zum Nachweis der Spaltung von rSyb2 durch Tetanustoxin

Beim Immunoblotting werden Proteine auf einer Membranoberfläche immobilisiert und sind dann für großmolekulare Liganden wie Antikörper zugänglich.

Das nach der Beschreibung in Abschnitt 4.5.2 reduzierte Tetanustoxin wird mit 1,5µg rSyb2 versetzt, mit PBS auf 50µl aufgefüllt und über Nacht bei 37°C leicht geschüttelt. Anschließend wird die Probe einer TCA-Fällung unterzogen (s. Abschnitte 4.4.1).

Die Proteingemische werden per SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (s. Abschnitt 4.4.1). Die Gele werden kurz in Transferpuffer inkubiert. Filterpapier und Nitrocellulosemembran werden auf die Größe des Gels geschnitten und ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Drei Lagen Filterpapier, die Blotmembran, das Gel und drei abschließende Lagen Filterpapier werden luftblasenfrei auf die Anode gestapelt und die Apparatur wird verschlossen. Die Proteine wandern bei 65mA pro Blot für 55 Minuten aus dem Gel in Richtung der Anode und werden auf der Blotmembran immobilisiert.

Die Membran wird in 5% Magermilchpulver in TBS-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu unterdrücken. Die Inkubation mit Erstantikörper erfolgt über Nacht bei 4°C. Die Membran wird dann für 10 Minuten in TBS-Puffer und zweimal für 10 Minuten in Waschpuffer 1 gewaschen. Anschließend erfolgt die 60minütige Inkubation mit Zweitantikörper bei Raumtemperatur. Der Zweitantikörper ist entweder ein Maus- oder ein Kaninchenspezifisches IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat, das 1:3000 in TBS-Puffer verdünnt wird. Die Membran wird dann für 10 Minuten in TBS-Puffer, zweimal für 10 Minuten in Waschpuffer 2 und zweimal 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wird die Blotmembran mit 15ml Entwicklerlösung inkubiert, bis die Proteinbanden angefärbt sind. Die Entwicklung wird durch Schwenken der Membran in Aq. dest. gestoppt. Der Blot wird photographiert und im Dunkeln auf Papiertüchern getrocknet.

4.5.4 ELISA zum Nachweis der Spaltung von gebundenem rSyb2

Der ELISA beruht auf einer Reaktion zwischen dem immobilisierten Antigen und einem Antikörper. Der hier zu entwickelnde TeNT-Endopeptidase-Assay wird durch die enzymatische Umsetzung von rSyb2 zu rSyb2-Spaltprodukt ergänzt (s. Abbildung 3.1 auf Seite 28).

Es werden verschiedene Varianten für den Aufbau des TeNT-Endopeptidase-Assays miteinander verglichen. Diese beinhalten die Reihenfolge Spaltung und Immobilisierung die Ermittlung des am besten geeigneten rSyb2-Fragments, unterschiedliche Methoden zur Immobilisierung des rSyb2, und die Wahl des Antikörpers zur Detektion der Spaltung durch TeNT.

4.5.4.1 Immobilisierung von gespaltenem rSyb2

Gelöstes rSyb2 wird mit Tetanustoxin inkubiert, die Proteine werden anschließend verdünnt und an Mikrotiterplatten gebunden. Entweder wird die Abnahme des ungespaltenen rSyb2 mit α -VAMP2 (mAK) oder die Zunahme der Spaltfragmente mit α -N-Terminus-Antikörper detektiert.

Spaltung von rSyb2 mit Tetanustoxin

Das Tetanustoxin wird in einem Ansatz von 20 μ l reduziert (s. Abschnitt 4.5.2). Eine 7,5 μ M rSyb2-Lösung (entspricht 95,25 μ g/ml) in PBS wird mit der gewünschten Menge TeNT-Lösung versetzt und für 8 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Beschichtung von Mikrotiterplatten

Der Spaltansatz wird auf eine rSyb2-Konzentration von 2 μ g/ml verdünnt. Je 200 μ l des Ansatzes werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (MaxiSorp oder NiNTA-Platte) pipettiert, die Platte wird über Nacht bei 4°C inkubiert.

Blocken der Mikrotiterplatten

Die freien Bindungsstellen an der Mikrotiterplatte werden mit je 250 μ l PBS mit 1% BSA blockiert. Die Platten werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Detektion der Spaltung

Von den Antikörperlösungen und der TMB-Lösung werden jeweils 200 μ l in jede Vertiefung pipettiert. α -N-Terminus-Antikörper wird 1:1000, α -VAMP2 (mAK) wird 1:10000 in PBS verdünnt. Die mit Meerrettichperoxidase konjugierten Zweitantikörper α -Kaninchen-Pox und α -Maus-Pox werden 1:5000 in PBS verdünnt. Während der Inkubation mit TMB-Lösung setzt die Meerrettichperoxidase ihr Substrat H₂O₂ unter Bildung von tiefblau gefärbten 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkationen zu H₂O um. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 50 μ l Schwefelsäure gestoppt, im stark sauren pH-Bereich findet außerdem ein sofortiger Farbumschlag von blau nach gelb statt. Die Intensität der Gelbfärbung wird bei 450nm photometrisch gemessen.

4.5.4.2 Spaltung von immobilisiertem rSyb2

Das rSyb2 wird erst an eine Mikrotiterplatte gebunden und dann zur Spaltung mit Tetanustoxin inkubiert. Entweder wird dann die Abnahme des ungespaltenen rSyb2 mit α -VAMP2 (mAK) oder die Zunahme der Spaltfragmente mit α -N-Terminus- bzw. α -C-Terminus-Antikörper detektiert.

Die Mikrotiterplatten werden nach dem Block- und dem Spaltschritt sowie nach der Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper in einem ELISA-Platten-Washer je vier mal mit je 250 μ l Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Maleimid-Platten werden zusätzlich nach dem Beschichten je vier mal mit je 200 μ l PBS (ohne Tween-20®) pro Vertiefung gewaschen.

Nach dem Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure wird die Absorption der Lösung in den Vertiefungen in einem ELISA-Reader bei 450nm mit einer Referenz bei 620nm gemessen.

Beschichtung von Mikrotiterplatten

Hierzu gehören die Wahl der am besten geeigneten Mikrotiterplatte, die optimale rSyb2-Konzentration sowie der optimale Beschichtungspuffer. Verschiedene unbeschichtete Mikrotiterplatten werden verglichen: MaxiSorp, MediSorp, MultiSorp und PolySorp-Platten.

Zur Auswahl eines Beschichtungspuffers wird rSyb2 in PBS (pH 7,4), Carbonat-Puffer (pH 9,6), HEPES (pH 7,4), Citrat-Puffer (pH 6,0) und Acetat-Puffer (pH 5,0) verdünnt. Für die gerichtete Bindung werden die Empfehlungen der Hersteller befolgt: rSyb2 wird in PBS (pH 7,4) an NiNTA-Platten und in PBS (pH 6,5) mit DTT und EDTA an Maleimid-Platten gebunden.

Für die Wahl der optimalen rSyb2-Konzentration werden die Platten mit 100µl einer 0-1200 nanomolaren rSyb2-Lösung beschichtet. Dazu werden die Platten entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei 37°C geschüttelt.

Blocken der Mikrotiterplatten

Die freien Bindungsstellen an der Mikrotiterplatte werden mit je 200µl Blockierungspuffer blockiert. Dieser besteht aus PBS, dem 0,2-1% BSA oder 0,2% BSA und 2% Sucrose zugesetzt ist. Die Platten werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geschüttelt.

Spaltung von rSyb2 mit Tetanustoxin

Das Tetanustoxin wird in einem Ansatz von 20µl reduziert (s. Abschnitt 4.5.2). Es wird anschließend in PBS ohne oder mit 2mg/l BSA (mit und ohne 20µM Zinkchlorid) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. 100µl der Toxinlösung werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wird unter Schütteln für 0-14 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zum Testen der Inhibitoren wird der Toxinlösung nach dem Verdünnen hochkonzentrierter Inhibitor zugesetzt. EDTA, EGTA und 1,10-Phenanthrolin liegen dann in einer Endkonzentration von 1mM, Phosphoramidon 0,5mM und die Aminosäuren L-Cystein, L-Glutamat, L-Histidin und L-Phenylalanin 11,1µM vor. Die Toxinlösung wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Mikrotiterplatte pipettiert.

Detektion der Spaltung

Von den Antikörperlösungen und der TMB-Lösung werden je 100µl in jede Vertiefung pipettiert.

α-N-Terminus-Antikörper wird in Verdünnungen von 1:250 bis 1:3000 eingesetzt, α-C-Terminus-Antikörper in Verdünnungen von 1:5000 und 1:10000. α-VAMP2 (mAK) wird immer 1:10000 verdünnt. Als Verdünnungspuffer dient PBS mit 0-1,0% BSA.

Die mit Meerrettichperoxidase konjugierten Zweitantikörper α -Kaninchen- und α -Maus-IgG werden 1:5000 in PBS oder in PBS mit 0,2% BSA verdünnt.

Die Reaktion mit TMB-Lösung wird durch Zugabe von 50 μ l Schwefelsäure gestoppt. Die Intensität der Gelbfärbung wird bei 450nm (Referenz: 620nm) photometrisch gemessen.

Ermittlung der Sensitivität

Zur Bewertung der Sensitivität des ELISA werden die Nachweis- und die Erfassungsgrenze ermittelt. Die Berechnung beruht auf den Vorgaben in der DIN 32645 „Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenze“, die auch zur Validierung von Prüfmethode zugrunde gelegt wird. Sie wird mit dem frei erhältlichen Programm DINtest durchgeführt (www.rzuser.uni-heidelberg.de)

5 Ergebnisse

5.1 Klonierung von *E. coli*-Stämmen zur Expression von rSyb2

Das Ziel der im Folgenden dargestellten Experimente ist die Herstellung von drei rekombinanten Synaptobrevin-2-Fragmenten, die als rSyb2(N;1-97), rSyb2(C;1-97) und rSyb2(C;27-97) bezeichnet werden. Aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften (Länge, Lage des Histidin₆-tags, Anwesenheit eines Cysteinrests am C-Terminus) ermöglichen die drei Fragmente viele Varianten zum Aufbau des ELISA. Das zur Detektion von Tetanustoxin am besten geeignete Fragment wird später im Vergleich identifiziert.

5.1.1 PCR zur Herstellung von Synaptobrevin-2-DNA-Fragmenten

Die PCR-Ansätze mit pET15b_rSyb2(N;1-97) als Template und den Primerpaaren „C70nde/ C70bam“ bzw. „C97nco/ C97bam“ werden zur Analyse der PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abbildung 5.1).

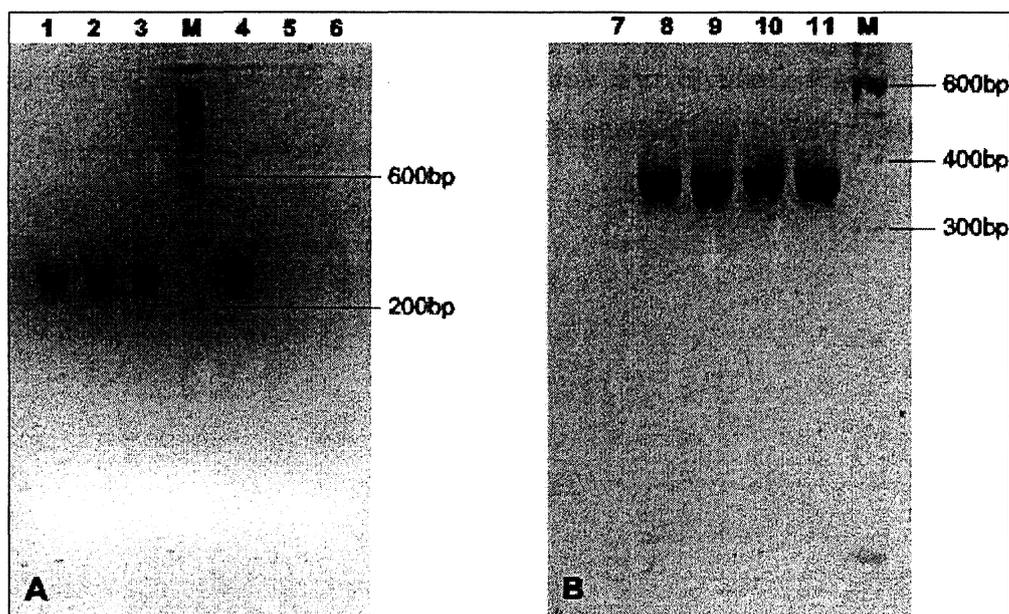


Abbildung 5.1: Analyse der PCR-Ansätze zur Amplifikation von rSyb2(C;27-97)-DNA (A) und rSyb2(C;1-97)-DNA (B) im Agarosegel. Aufgetragen sind: M: Marker, 100bp-Ladder; 1-4 und 8-11: Probe aus PCR-Ansatz; 5-6 und 7: Kontrollansatz ohne Template. Die DNA-Fragmente haben die erwartete Größe von 272bp (rSyb2(C;27-97)) und 388bp (rSyb2(C;1-97)).

Die PCR hat in beiden Ansätzen funktioniert: Die erwarteten PCR-Produkte von 272 Basenpaaren für rSyb2(C;27-97) und 388 Basenpaaren für rSyb2(C;1-97) sind amplifiziert worden. Auch mit dem Primerpaar „C97nde/ C97bam“ wird das erwartete PCR-Produkt von 333 Basenpaaren amplifiziert (Gel nicht abgebildet). Die Ansätze werden aufgereinigt und die DNA-Konzentration der Ansätze

wird bestimmt. Die aufgereinigten PCR-Produkte können nun in Expressionsvektoren ligiert werden.

5.1.2 Ligation der PCR-Produkte in Expressionsvektoren

Die PCR-Produkte werden in geeignete Expressionsvektoren ligiert. Die Ligation des mit dem Primerpaar „C97nde/ C97bam“ hergestellten PCR-Produkts rSyb2(C;1-97) gelingt in mehrmaligen Versuchen nicht. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich im Restriktionsverdau des Amplifikats mit der Restriktionsendonuklease NdeI: Laut Herstellerangaben ist dieses Enzym sehr sensitiv gegenüber Verunreinigungen und spaltet DNA nach Standardaufreinigungen nur mit geringer Rate. Durch die Verwendung des Primerpaars „C97nco/ C97bam“ kann der Vektor pET15b_rSyb2(C;1-97) aber wie geplant hergestellt werden.

Zur Kontrolle der Ligation werden kompetente *E. coli* TOP10-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Proben der gewachsenen Kolonien werden in einer Kolonie-PCR eingesetzt, der klonierte Vektor dient dabei als Template. Die verwendeten Primer sind komplementär zu Sequenzen aus dem T7-Promotor und dem T7-Terminator. Enthält der Vektor das PCR-Produkt, dann ist die DNA-Sequenz zwischen T7-Promotor und –Terminator deutlich länger als in einem Vektor ohne Insert (s. Abbildung 4.1, Seite 46, und Abbildung 4.2, Seite 46). Abbildung 5.2 zeigt die auf ein Agarosegel aufgetragenen Proben aus einer Kolonie-PCR.

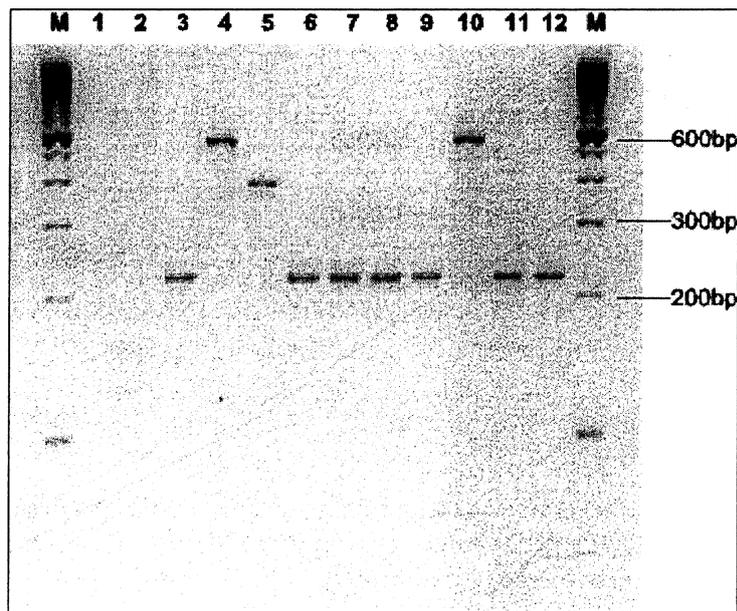


Abbildung 5.2: Kolonie-PCR zur Identifikation von Insert-tragenden Plasmiden (hier pET15b_rSyb2(C;1-97)). Aufgetragen sind (Größe der erwarteten PCR-Produkte in Klammern): M: Marker, 100bp-Ladder; 1-2: Kontrolle ohne Template (./.); 3: Kontrolle mit pET15b als Template (224bp); 4: Kontrolle mit pET15b_rSyb2(N;1-97) als Template (528bp); 5: Kontrolle mit pET11a_rSyb2(C;27-97) als Template (391bp); 6-12: Proben aus PCR-Ansatz (224bp ohne Insert, 516bp mit Insert).

Bahnen 1 und 2 des Agarosegels zeigen Kontrollen ohne Template- da keine DNA amplifiziert worden ist, kann die Kontamination des Mastermixes ausgeschlossen werden. In Bahn 3 ist das 224 Basenpaare lange PCR-Produkt aus dem Vektor pET15b ohne Insert als Kontrolle aufgetragen. Die Bahnen 6-9 und 11-12 enthalten ein ebenso langes PCR-Produkt - die Vektoren, die in diesen Proben als Templates dienten, enthalten das Insert nicht. Für den Kontrollansatz in Bahn 4 ist pET15b_rSyb2(N;1-97) als Template verwendet worden, die daraus amplifizierte DNA ist 528 Basenpaare lang. Mit dem Vektor pET15b_rSyb2(C;1-97) als Template sollte ein 516 Basenpaare großes DNA-Fragment amplifiziert werden- dieses im PCR-Ansatz in Bahn 10 der Fall. Der hier als Template verwendete Vektor enthält also das Insert.

Die Ligation des PCR-Produkts rSyb2(C;27-97) in pET11a hat ebenfalls funktioniert- in Bahn 5 des Agarosegels ist das 391 Basenpaare lange PCR-Produkt aus dem Ansatz mit pET11a_rSyb2(C;27-97) zu sehen (das Gel der zugehörigen Kolonie-PCR ist nicht abgebildet).

Als weitere Kontrolle werden die Insert-tragenden Vektoren einem Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease PflFI unterzogen. Sowohl die rSyb2-DNA-Fragmente als auch die Vektoren enthalten je eine PflFI-Schnittstelle, ein erfolgreich ligierter Expressionsvektor enthält deshalb in der Summe zwei Schnittstellen für dieses Restriktionsenzym. Die in Abbildung 5.3 gezeigten Agarosegele bestätigen, dass die rSyb2-DNA-Fragmente in die Vektoren ligiert sind.

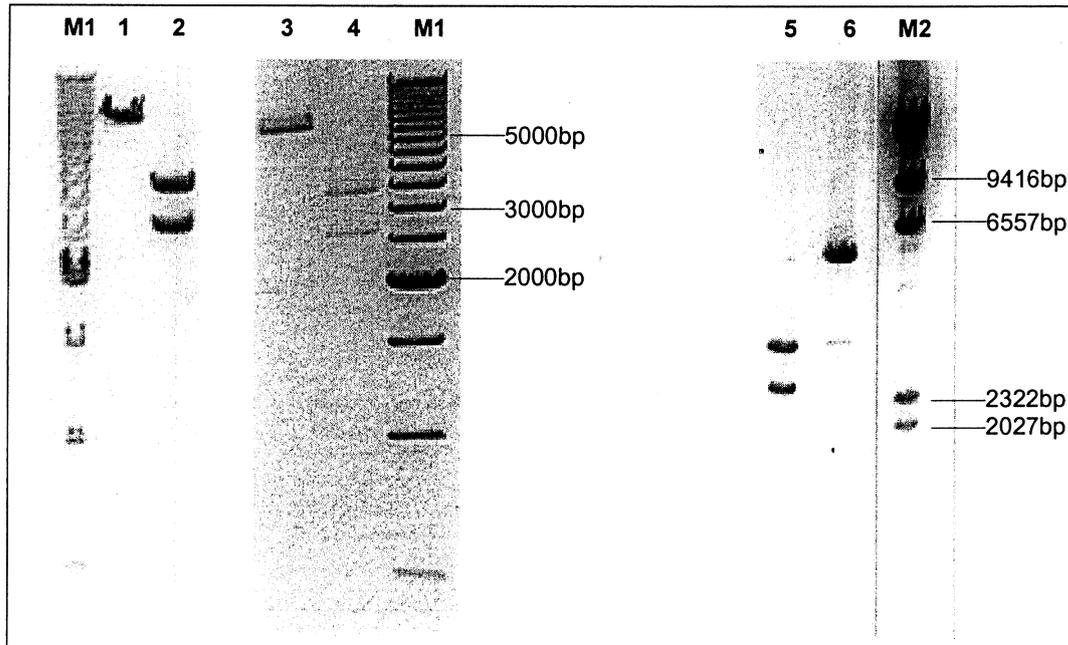


Abbildung 5.3: Überprüfung der rSyb2-DNA-tragenden Plasmide durch Restriktionsverdau mit der Endonuklease PflFI. Aufgetragen sind (Größe der erwarteten PCR-Produkte in Klammern): M1: Marker, 500bp-Ladder; 1 und 3: Kontrolle pET15b (5708bp); 2: pET15b_rSyb2(N;1-97) (2624bp, 3388bp); 4: pET15b_rSyb2(C;1-97) (2612bp, 3388bp); 5: pET11a_rSyb2(C;27-97) (2621bp, 3254bp); 6: pET11a (5677bp); M2: Marker, HindIII-verdaute λ -DNA

Die Sequenzierung der Vektoren zeigt, dass keine der rSyb2-Sequenzen eine Mutation enthält, die zu einem Aminosäuretausch führen würde. Abbildung 5.4 zeigt die Aminosäuresequenzen der drei rekombinanten rSyb2-Fragmente, die sich aus der Sequenzierung der DNA ergeben. Im Vergleich zu Synaptobrevin-2 aus der Ratte enthält keins der Fragmente die Transmembranregion. Das Fragment rSyb2(C;1-97) unterscheidet sich von der Vorlage rSyb2(N;1-97) nur durch die an den C-Terminus angehängten Aminosäuren Glycin und Cystein. Die am N-Terminus liegenden Histidin₆-tags beider Fragmente enthalten eine Thrombinschnittstelle mit der Aminosäuresequenz Leu-ValProArgGlySer. Das Histidin₆-tag und der Cysteinrest des kürzeren Fragments rSyb2(C;27-97) liegen am C-terminalen Ende der Peptidkette und folgen direkt dem Isoleucinrest an Position 97.

Syb2 (Ratte)	MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPPNLTSNR
rSyb2 (N;1-97)	MGSSHHHHHSSGLVPRGSH MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPPNLTSNR
rSyb2 (C;1-97)	MGSSHHHHHSSGLVPRGSH MSATAATVPPAAPAGEGGPPAPPPNLTSNR
rSyb2 (C;27-97)	MTSNR
Syb2 (Ratte)	RLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQKLELDDRADALQAGASQFETS
rSyb2 (N;1-97)	RLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQKLELDDRADALQAGASQFETS
rSyb2 (C;1-97)	RLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQKLELDDRADALQAGASQFETS
rSyb2 (C;27-97)	RLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQKLELDDRADALQAGASQFETS
Syb2 (Ratte)	AAKLKRKYWWKNLKMMIILGVICAILIIIIIVYFST
rSyb2 (N;1-97)	AAKLKRKYWWKNLKMMI
rSyb2 (C;1-97)	AAKLKRKYWWKNLKMIGC
rSyb2 (C;27-97)	AAKLKRKYWWKNLKMIIHHHHHGSGC

Abbildung 5.4: Aminosäuresequenzen der rSyb2-Fragmente im Vergleich zu Synaptobrevin-2 aus der Ratte (*Rattus norvegicus*). Unterschiede sind fett hervorgehoben.

In Tabelle 5.1 sind wichtige Eigenschaften der drei rekombinanten rSyb2-Fragmente im Vergleich zu Synaptobrevin-2 aus der Ratte zusammengefasst. Aufgrund der großen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der Fragmente rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) fallen auch die Unterschiede in der Größe der TeNT-Spaltfragmente sehr gering aus. Die Spaltfragmente von rSyb2(C;27-97) sind deutlich kleiner.

	rSyb2(N;1-97)	rSyb2(C;1-97)	rSyb2(C;27-97)	Syb2
Gesamtlänge [Anzahl Aminosäuren]	117	119	82	116
Aminosäurerest aus natürlichem Syb2	1-97	1-97	27-97	1-116
Lage des Histidin₆-tags	N-Terminus	N-Terminus	C-Terminus	./.
Lage des Cysteinrests	./.	C-Terminus	C-Terminus	./.
Größe [kDa]	12,79	12,96	9,57	12,69
Größe der TeNT-Spaltfragmente [kDa]	10,14; 2,67	10,14; 2,83	5,79; 3,80	7,98; 4,73
Isoelektrischer Punkt	9,16	8,89	8,89	7,84

Tabelle 5.1: Eigenschaften der rekombinanten Synaptobrevin-Fragmente im Vergleich zu natürlichem Synaptobrevin-2

5.2 Expression der rSyb2-Fragmente

Zur Expression der rSyb2-Fragmente werden *E. coli*-Expressionsstämme mit den hergestellten Plasmiden transformiert. Zunächst werden die Stämme *E. coli* BLR(DE3), *E. coli* Tuner(DE3) und *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP in Hinblick auf Wachstum und Expression von rSyb2(N;1-97) verglichen (s. Tabelle 5.2). Der Stamm mit der höchsten Proteinausbeute wird auch mit den beiden anderen Plasmiden transformiert.

Plasmide	Transformierte <i>E. coli</i> -Stämme
pET15b_rSyb2(N;1-97)	BLR(DE3), Tuner(DE3), BL21 CodonPlus(DE3)-RP
pET15b_rSyb2(C;1-97)	BL21 CodonPlus(DE3)-RP
pET11a_rSyb2(C;27-97)	BL21 CodonPlus(DE3)-RP

Tabelle 5.2: Liste der hergestellten Plasmide und der zur Transformation verwendeten Expressionsstämme

5.2.1 Vergleich von drei *E. coli*-Stämmen zur Herstellung von rSyb2(N;1-97)

Abbildung 5.5 zeigt die Wachstumskurven der drei mit pET15b_rSyb2(N;1-97) transformierten *E. coli*-Stämme. Der Stamm *E. coli* BLR(DE3) wächst nach einer Stunde bis zum Ende der Expression nahezu linear, er erreicht bis dahin eine Zelldichte von etwa 3 OD₆₀₀-Einheiten. Die Induktion mit IPTG erfolgt nach drei Stunden bei einer OD₆₀₀ von etwa 1,0. Die Anwuchsphase von *E. coli* Tuner(DE3) ist mit 3,25 Stunden deutlich verzögert, und der Stamm wächst bis zur Induktion nach 4,75 Stunden mit relativ geringer Geschwindigkeit. Nach 7 Stunden verzögert sich das Wachstum, und am Ende wird eine OD₆₀₀ von 2,5 Einheiten erreicht. Die Anwuchsphase von *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP dauert 1 Stunde, dann wachsen die Bakterien für 1-2 Stunden bis zur IPTG-Zugabe exponentiell weiter. Infolgedessen verdoppelt sich die OD₆₀₀ nur noch einmal, und nach 4 Stunden kommt das Wachstum zum Erliegen. Bis zum Ende der Expression bleibt die OD₆₀₀ fast konstant bei 2,0 Einheiten.

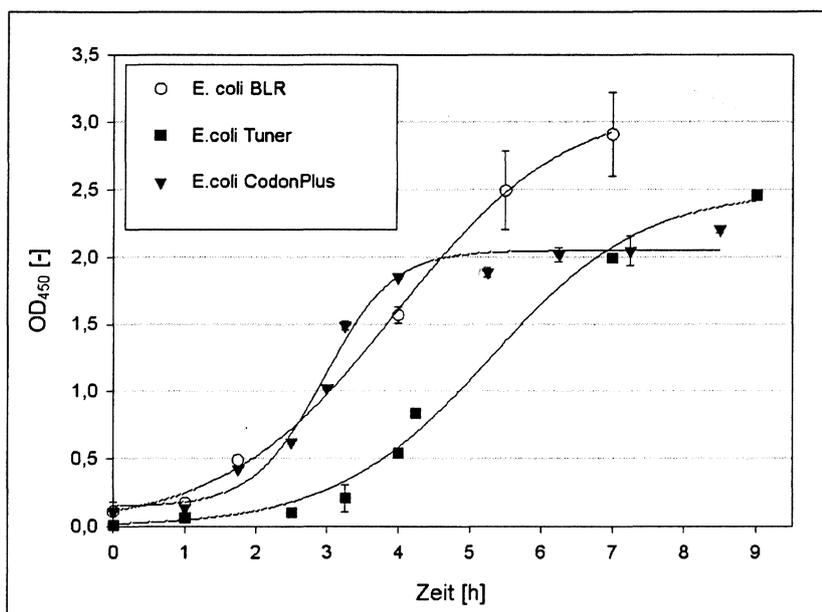


Abbildung 5.5: Vergleich des Wachstums der mit dem Plasmid pET15b_rSyb2(N;1-97) transformierten *E. coli*-Stämme BLR(DE3), Tuner(DE3) und BL21 CodonPlus(DE3)-RP. Zur Messung des Wachstums wird zum angegebenen Zeitpunkt die Optische Dichte der Kultur bei 600nm gemessen. Bei einer OD_{600} von ca. 1,0 werden die Kulturen zur Induktion der Proteinexpression mit IPTG versetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei (*E. coli* BLR(DE3) und Tuner(DE3)) bzw. vier (*E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP) Expressionen. Die Formeln zu den Regressionen der Kurven befinden sich im Anhang in Abschnitt 9.2.1.1.

Die Proteinausbeute ist mit *E. coli* BLR(DE3) mit Abstand am geringsten. *E. coli* Tuner(DE3) exprimiert etwa viermal soviel rSyb2(N;1-97), mit *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP verdoppelt sich die Ausbeute nochmals auf mehr als 9mg pro Liter Medium (s. Tabelle 5.3).

<i>E. coli</i> -Stamm	Proteinausbeute [mg/l Medium]	Anmerkung
BLR(DE3)	ca. 1,0	Abschätzung aus SDS-PAGE
Tuner(DE3)	ca. 4	Abschätzung aus SDS-PAGE
BL21 CodonPlus(DE3)-RP	9,23 +/-2,70	Messung der rSyb2-Konzentration nach Aufreinigung im DC-Assay (Fa Bio-RAD) (Mittelwert und Standardabweichung aus 10 Expressionen)

Tabelle 5.3: Proteinausbeute in Expressionen mit den drei *E. coli*-Stämmen. Für die Berechnung der Proteinausbeute wird die gebildete Masse rSyb2 auf das Volumen des Kulturmediums bezogen, der Proteinverlust während der Aufreinigung bleibt unberücksichtigt.

Alle folgenden Expressionen werden mit dem Stamm *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP durchgeführt. Auch die Vektoren pET15b_rSyb2(C;1-97) und pET11a_rSyb2(C;27-97) werden in diesen *E. coli*-Stamm transformiert.

5.2.2 Scale-Up der Expression von 500ml auf 10l

Zur Herstellung einer größeren Proteinmasse wird die Expression in einem 10l-Fermenter durchgeführt. Die Wachstumskurve verläuft im Fermenter ganz ähnlich zum Schüttelkolben, die Optische Dichte ist am Versuchsende etwas höher (s. Abbildung 5.6). Um den pH-Wert des Mediums konstant zu halten, muss in den ersten drei Stunden bis zur Induktion der Kultur NaOH zugeführt werden. Ab diesem Zeitpunkt muss der pH-Wert mit Salzsäure herunter titriert werden.

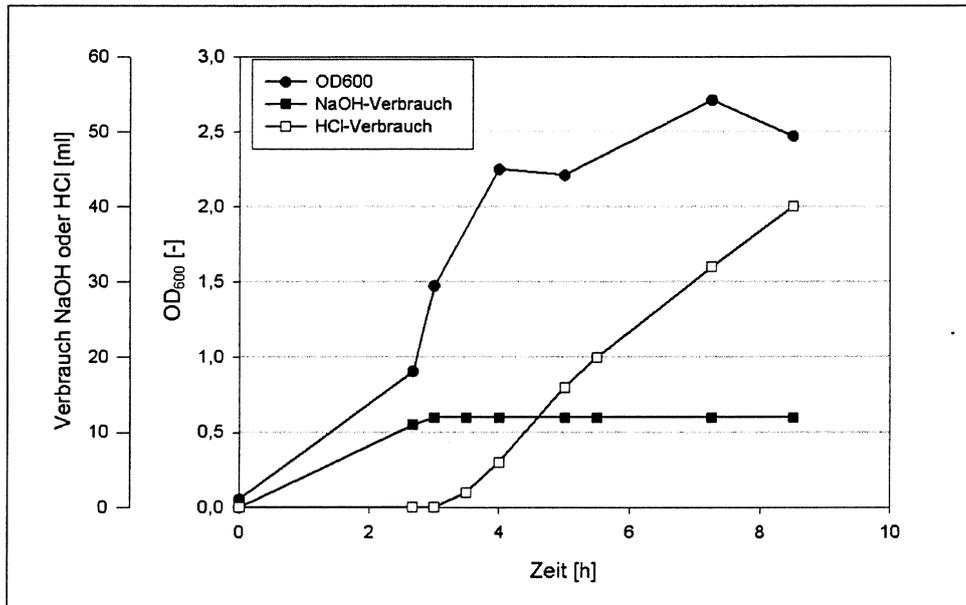


Abbildung 5.6: Beispiel des Fermentationsverlaufs mit *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP pET15b_rSyb2(N;1-97). Aufgetragen sind die OD₆₀₀, der NaOH- und der HCl-Verbrauch. Die OD₆₀₀ wird durch Messung einer Probe bestimmt, der NaOH- sowie der HCl-Verbrauch werden von der Steuereinheit des Fermenters erfasst. Die rSyb2-Expression wird nach 2,75h induziert.

In der Proteinausbeute (Masse pro Liter Medium) ist zwischen Fermenter und Schüttelkolben kein Unterschied feststellbar (Daten nicht abgebildet).

5.2.3 Aufreinigung des exprimierten rSyb2s aus *E. coli*

Es werden drei Protokolle verglichen, mit denen das exprimierte rSyb2 aus den *E. coli*-Zellen gewonnen und per Immobilisierter Metall-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden kann: die renaturierende und die denaturierende Aufreinigung sowie die Präparation der Inclusion Bodies mit sich anschließender denaturierende Aufreinigung (Protokolle in Abschnitt 4.4.2).

5.2.3.1 Vergleich von drei Protokollen zur rSyb2-Aufreinigung

In der renaturierenden Aufreinigung wird das rSyb2 bereits während der Chromatographie in einen physiologischen Puffer überführt, was einen abschließenden Dialyseschritt ersparen soll.

Abbildung 5.7 zeigt ein mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes Gel mit elektrophoretisch aufgetrennten Säulendurchflüssen aus der renaturierenden rSyb2-Aufreinigung. Im Laufe des Wasch-

vorgangs (im Gel von links nach rechts) nimmt die Konzentration des Gesamtproteins in den Säulendurchflüssen ab, mit zwei- und nullmolarem Harnstoff-Puffer wird keine detektierbare Proteinmenge mehr von der Säule gewaschen. Bei pH 5,0 eluiert rSyb2. Eine große Menge rSyb2 verbleibt aber auf den NiNTA-Beads (in Bahn 14 des Gels in Abbildung 5.7) und kann auch durch weitere Elutionsschritte nicht von der Säule eluiert werden (Gel nicht abgebildet).

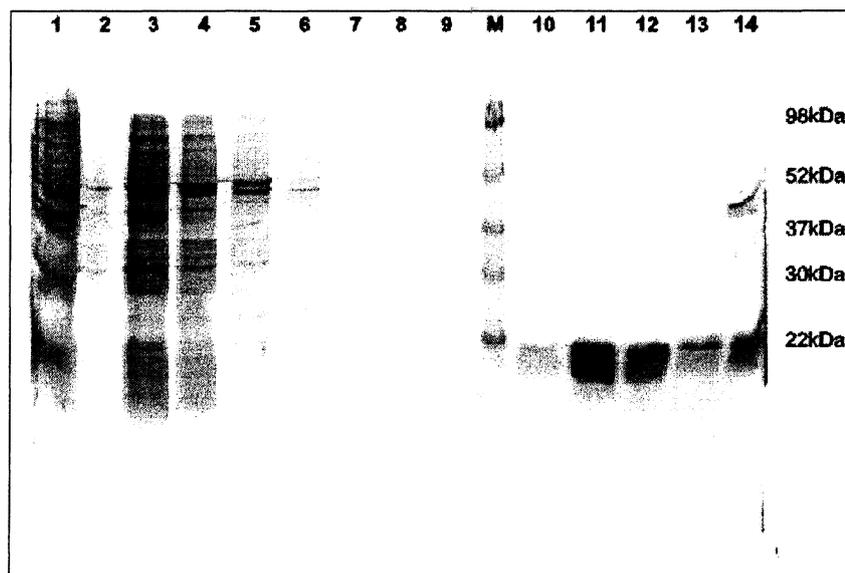


Abbildung 5.7: Analyse der renaturierenden Aufreinigung von rSyb2 im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen sind: 1: Zellbruchstücke nach Ultraschallbehandlung; 2: Probenpuffer; 3: Säulendurchfluß (SD) 8M Urea, pH 8,0; 4: SD 8M Urea, pH 7,4; 5: SD 6M Urea, pH 7,4; 6: SD 4M Urea, pH 7,4; 7: SD 2M Urea, pH 7,4; 8-9: SD 0M Urea, pH 7,4; 10-13: SD 0M Urea, pH 5,0; 14: NiNTA-Agarosebeads nach Aufreinigung; M: Prestained Broad Range Größenmarker.

In der denaturierenden Aufreinigung verbleibt das rSyb2 im achtmolaren Harnstoff, der nach der Chromatographie durch Dialyse entfernt werden muß.

Abbildung 5.8 zeigt ein mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes Gel mit elektrophoretisch aufgetrennten Proben aus der denaturierenden rSyb2-Aufreinigung. Im Laufe des Waschvorgangs nimmt die Proteinkonzentration in den Säulendurchflüssen deutlich ab, aber bis zur Elution von rSyb2 (Bahn 7) verbleibt ein Rest von bakteriellen Proteinen mit einer Größe von 40-45kDa auf den NiNTA-Beads und eluiert mit rSyb2. Das in Bahn 13 des Gels in Abbildung 5.8 aufgetragene rSyb2 aus einer vorangegangenen Expression enthält diese Proteine ebenfalls. Ein Teil dieser Proteine und ein geringer Rest des rSyb2s bleibt auf den NiNTA-Agarosebeads gebunden (s. Bahn 12 in Abbildung 5.8).

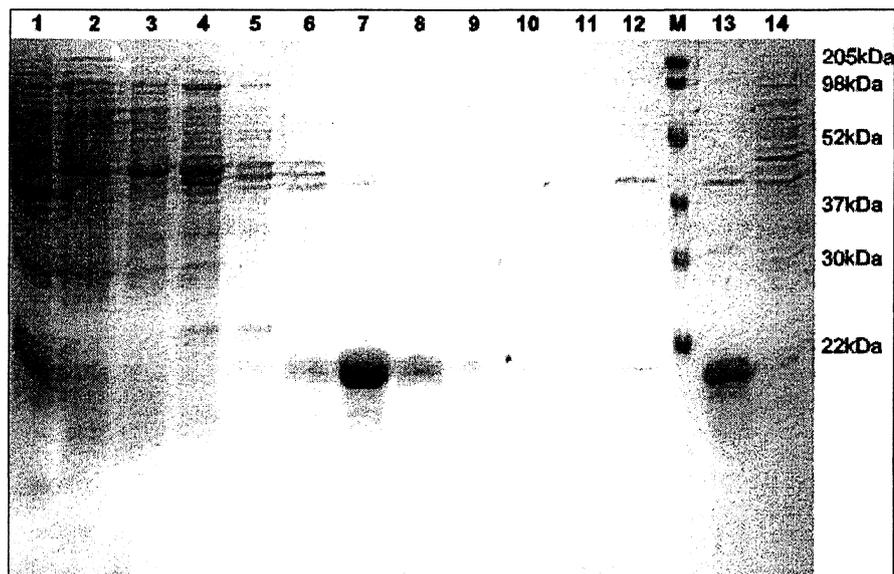


Abbildung 5.8: Analyse der denaturierenden Aufreinigung von rSyb2 im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen sind: 1: Zellbruchstücke nach der Ultraschallbehandlung; 2: Säulendurchfluß (SD) pH 8,0; 3: SD pH 7,4; 4-5: SD pH 6,5; 6-11: SD pH 5,0; 12: NiNTA-Agarosebeads nach Aufreinigung; 13: rSyb2 aus vorangegangener Expression; 14: Zellbruchstücke von nicht mit IPTG induzierten Zellen; M: Prestained Broad Range Größenmarker.

Im dritten getesteten Aufreinigungsprotokoll werden zunächst die Inclusion Bodies aus den Bakterienzellen präpariert, gelöste bakterielle Proteine werden entfernt.

Abbildung 5.9 zeigt ein Coomassie-gefärbtes Gel mit elektrophoretisch aufgetrennten Proben aus einer Inclusion Body-Präparation und anschließender rSyb2-Aufreinigung. Durch die Inclusion Body-Präparation kann bereits ein großer Teil der bakteriellen Proteine entfernt werden. In der SDS-PAGE ist auch deutlich erkennbar, dass das zum Zellaufschluß eingesetzte Lysozym (etwa 14kDa groß) durch die Waschschriffe von den Inclusion Bodies gewaschen wird. Durch die Behandlung des Zell-Lysats mit Nukleasen nimmt dessen Viskosität ab, und dadurch wird der Chromatographieschritt erheblich vereinfacht. Der Säulendurchlauf bei pH 8,0 enthält viel weniger bakterielles Protein, und das aufgereinigte rSyb2 erscheint deutlich weniger verunreinigt als dies nach der denaturierenden Aufreinigung der Fall ist.

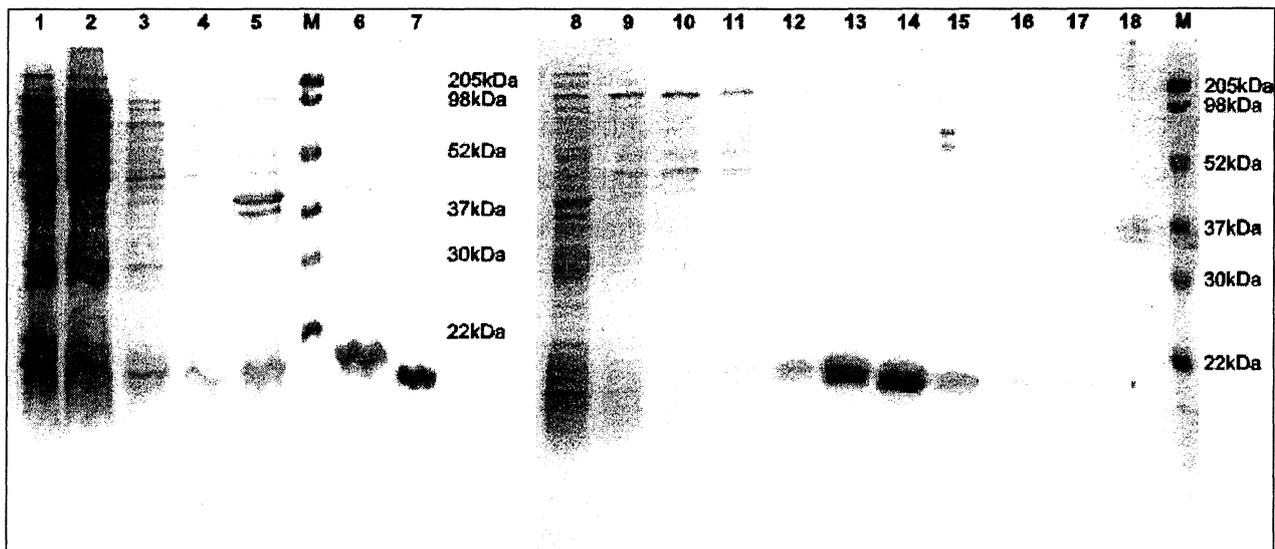


Abbildung 5.9: Analyse von Inclusion Body-Präparation und denaturierender Aufreinigung von rSyb2 im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen sind: 1: Zellbruchstücke nach der Ultraschallbehandlung; 2-4: Waschpuffer nach Zentrifugation der Inclusion Bodies; 5: Pellet nach Solubilisieren der Inclusion Bodies; 6: rSyb2 aus vorangegangener Expression; 7: Kontrolle (Lysozym); 8: Säulendurchfluß (SD) pH 8,0; 9: SD pH 7,4; 10-11: SD pH 6,5; 12-17: SD pH 5,0; 18: NiNTA-Agarosebeads nach Aufreinigung; M: Prestained Broad Range Größenmarker.

Zusammenfassend kann für die renaturierende Aufreinigung ein Proteinverlust durch unvollständige Elution des rSyb2s von den NiNTA-Beads festgehalten werden, bei der denaturierenden Aufreinigung ohne Präparation der Inclusion Bodies eluiert Fremdprotein mit dem rSyb2 von der Säule. Durch die Präparation der Inclusion Bodies wird die Verunreinigung durch Fremdprotein verhindert. Im achtmolaren Harnstoff-Puffer eluiert das rSyb2 bei pH 5,0 vollständig von den NiNTA-Beads.

5.2.3.2 Optimierung der Bedingungen zur Proteinfaltung während der Dialyse

Während der Dialyse wird das aufgereinigte rSyb2 vom achtmolaren Harnstoff- in einen physiologischen Puffer überführt. Erste Versuche zeigen, dass rSyb2 die Tendenz hat, bei der Dialyse zu aggregieren. Diese Proteinaggregate sind für weitere Versuche nicht verwendbar und bedeuten einen teils hohen Proteinverlust. Deshalb werden in einem Screeningverfahren (Beschreibung in Abschnitt 4.4.3) eine Reihe unterschiedlicher Puffer und Pufferzusätze auf ihre Fähigkeit hin verglichen, die Aggregation zu verhindern.

Abbildung 5.10 gibt einen Eindruck von der Kapazität einiger Puffer, rSyb2(N;1-97) in Lösung zu halten (die komplette Liste der getesteten Renaturierungspuffer befindet sich in Tabelle 4.10). Nach der Filtration der rSyb2-Lösung müsste vollständig gelöstes Protein im Filtrat detektierbar sein (jeweils Bahn F). Aggregiert das Protein, ist es im Retentat sichtbar (jeweils Bahn R).

In NaCl/Tris-Puffer mit 0,05% Triton-X-100 (Bahnen 1R und F) ist in Retentat und Filtrat in etwa gleich viel rSyb2 enthalten, ein Teil des Proteins ist also aggregiert. Enthält der Puffer zusätzlich

0,4M Magnesiumsulfat, ist das gesamte Protein aggregiert und im Retentat enthalten (Bahn 2R), das Filtrat (Bahn 2F) enthält kein rSyb2(N;1-97) mehr. In Natriumacetat-Puffer bleibt das meiste rSyb2(N;1-97) in Lösung und ist deshalb im Filtrat (Bahn 3F) zu sehen. Eine Verdopplung der Triton-X-100-Konzentration auf 0,1% (Bahnen 4R und F) scheint eher von Nachteil zu sein, weil mehr Protein im Retentat in Bahn 4R als in Bahn 4F enthalten ist.

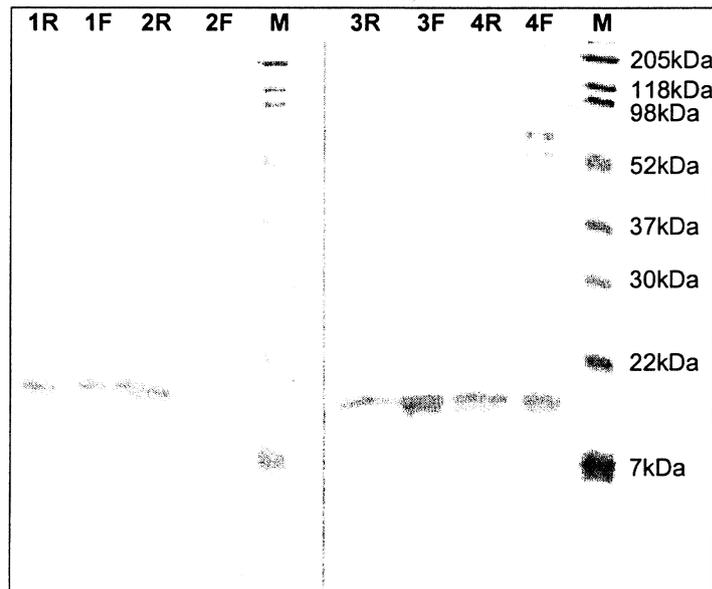


Abbildung 5.10: Screening nach einem geeigneten Dialysepuffer. Die Proben werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Färbelösung eingefärbt. Die erste von zwei aufgetragenen Proben ist jeweils das Retentat (R), die zweite das Filtrat (F). Nähere Erläuterungen zu den verwendeten Puffern befinden sich im Text (M: Prestained Broad Range Größenmarker).

Alle anderen getesteten Zusätze zu NaCl/Tris-Puffer haben denselben Effekt wie 0,4M Magnesiumsulfat, nämlich die vollständige Aggregation des rSyb2s (Gele nicht abgebildet). Eine Erhöhung des pH-Wertes des Natriumacetat-Puffers auf pH 4,75 oder pH 5,0 hat keinen Einfluss, die Verwendung von Tween-20® als Detergenz führt aber wie in NaCl/Tris-Puffer zur Aggregation des Proteins (Gele nicht abgebildet).

Zur Dialyse kommen von den getesteten Puffern also nur NaCl/Tris- oder Natriumacetat-Puffer, beide jeweils mit 0,05% Triton-X-100, in Frage. Zur endgültigen Entscheidung für einen der Puffer wird aufgereinigtes rSyb2 in mehreren Ansätzen gegen NaCl/Tris-Puffer mit 0,05% Triton-X-100 bzw. gegen Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) mit 0,05% Triton-X-100 über Nacht bei 4°C dialysiert.

Die Ergebnisse aus dem Screeningverfahren werden dadurch bestätigt. In NaCl/Tris-Puffer mit 0,05% Triton-X-100 zeigt das rSyb2 eine erhöhte Tendenz zur Aggregation, denn in einigen Ansätzen aggregiert das Protein, in anderen aber nicht. Bei der Dialyse in Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) mit 0,05% Triton-X-100 ist das rSyb2 in keinem der durchgeführten Versuche aggregiert.

5.3 Herstellung von Antikörpern gegen rSyb2-Spaltprodukte

Herstellung und Affinitätsreinigung des polyklonalen Kaninchenserums gegen das N-terminale rSyb2-Spaltprodukt (α -N-Terminus-Antikörper) werden bei der Firma BIOTREND Chemikalien GmbH in Auftrag gegeben (Protokoll in Abschnitt 4.5.1.1).

Die Spezifität des Antikörpers wird im ELISA untersucht: rSyb2(N;1-97) wird an einer Mikrotiterplatte immobilisiert und entsprechend der Darstellung in Abbildung 3.1 auf Seite 28 zunächst mit Tetanustoxin gespalten und dann mit α -N-Terminus-Antikörper und α -Kaninchen-IgG inkubiert. Die Erkennung des N-terminalen rSyb2(N;1-97)-Spaltprodukts wird dabei durch verschiedene synthetische Peptide kompetitiv gehemmt (Protokoll in Abschnitt 4.5.1.2). Je stärker die Hemmung, desto eher entspricht das verwendete Peptid dem Epitop des Antikörpers.

Abbildung 5.11 zeigt, dass der α -N-Terminus-Antikörper kaum an ungespaltenes rSyb2 bindet („Kontrolle“, weiße Balken). Die Inkubation des Antikörpers mit den verschiedenen Peptiden hat keinen Einfluss auf dieses Ergebnis. Der Antikörper bindet dagegen sehr stark an mit TeNT gespaltenes rSyb2 („ohne Peptid“). Diese Bindung wird mit dem Peptid CLQAGASQ sehr deutlich gehemmt. Gegen dieses Peptid, das die N-terminale TeNT-Spaltstelle im rSyb2-Molekül darstellt, wurde der Antikörper hergestellt. Die Addition oder die Subtraktion von nur einer Aminosäure am C-Terminus des Peptids hebt die inhibierende Wirkung auf. Eine leichte Hemmung ist durch das Peptid LQAGASQFE zu beobachten.

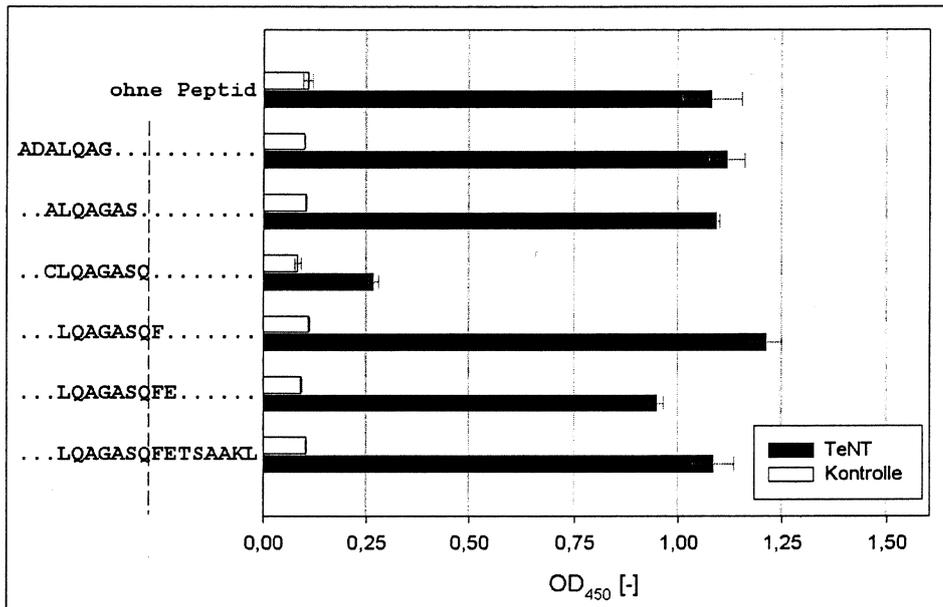


Abbildung 5.11: Untersuchung der Spezifität des α -N-Terminus-Antikörpers im ELISA. An einer Mikrotiterplatte immobilisiertes rSyb2(N;1-97) wird mit Tetanustoxin gespalten (Kontrollansätze enthalten kein Toxin). Anschließend wird mit α -N-Terminus-Antikörper inkubiert, die Erkennung des N-terminalen rSyb2(N;1-97)-Spaltprodukts wird dabei durch verschiedene synthetische Peptide kompetitiv gehemmt. Gebunder α -N-Terminus-Antikörper wird mit dem photometrisch detektierbaren Substratumsatz von an α -Kaninchen-IgG konjugierter Meerrettichperoxidase erfasst. Aufgetragen ist die Optische Dichte von Ansätzen mit (TeNT) und ohne TeNT (Kontrolle) in Abhängigkeit von der Zugabe des angegebenen Peptids zum α -N-Terminus-Antikörper. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen (Ansätze ohne Peptid), aus zwei Versuchen (Peptid CLAGASQ) bzw. aus einem Versuch (alle anderen Peptide), jeder Versuch wurde mit drei Parallelansätzen durchgeführt. Die gestrichelte Linie markiert die Spaltstelle des TeNT in Synaptobrevin-2.

Der α -C-Terminus-Antikörper wird in Eigenarbeit im Paul-Ehrlich-Institut hergestellt, das Kaninchenserum wird nicht affinitätsgereinigt. Der Antikörper wird untersucht wie der α -N-Terminus-Antikörper, allerdings werden rSyb2(C;27-97) als Substrat des TeNT und teilweise andere Peptide verwendet (s. Abbildung 5.12).

Der α -C-Terminus-Antikörper bindet ohne die Einwirkung eines Peptids stark an ungespaltenes rSyb2 („Kontrolle“, weißer Balken). Die Differenz zwischen dem Signal mit und ohne TeNT ist deshalb sehr viel geringer als mit dem α -N-Terminus-Antikörper.

Das Peptid CLQAGASQ, das die N-terminale Seite der TeNT-Spaltstelle darstellt, hemmt den α -C-Terminus-Antikörper erwartungsgemäß nicht. Das gilt auch für die um ein oder zwei Aminosäuren verlängerten Peptide LQAGASQF und LQAGASQFE.

Die anderen Peptide hemmen die Bindung des α -C-Terminus-Antikörpers auf unterschiedliche Art und Weise. Das Peptid LQAGASQFETSAAKL hemmt die Bindung an ungespaltenes rSyb2 um etwa 40%, während die Detektion des rSyb2-Spaltprodukts nur um 16% gehemmt wird. Dadurch wird die Differenz zwischen Spaltsignal („TeNT“) und Hintergrund („Kontrolle“) stark erhöht. Dage-

gen wird diese Differenz durch die Wirkung der drei Peptide FETSAAKLKRC, FETSAAKLKRYWWKC und FETSAAKLKRYWWKLNKMMC eliminiert, weil sie im Verhältnis stärker an das Spaltprodukt als an ungespaltenes rSyb2 binden. Dabei verhalten sich die letztgenannten drei Peptide nicht gleich. Die stärkste Hemmung wird durch das Peptid bewirkt, gegen das dieser Antikörper hergestellt wurde (Peptid FETSAAKLKRC). Wird es in Richtung des C-Terminus verlängert, fällt die Hemmung des Antikörpers geringer aus.

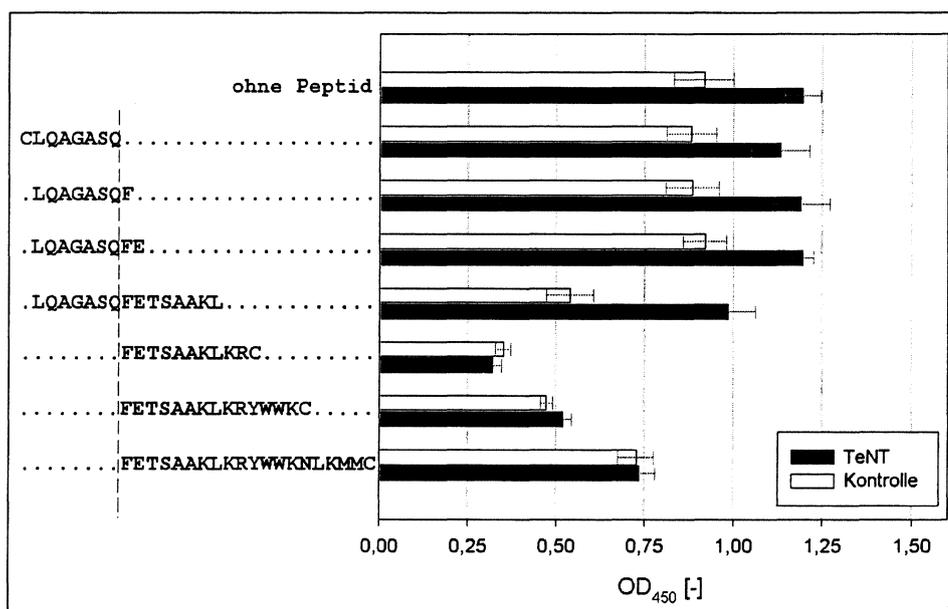


Abbildung 5.12: Untersuchung der Spezifität des α -C-Terminus-Antikörpers im ELISA. Die Versuchsdurchführung entspricht der für Abbildung 5.11 beschriebenen Anleitung, allerdings wird die Mikrotiterplatte mit rSyb2(C;27-97) beschichtet und zur kompetitiven Hemmung des α -C-Terminus-Antikörpers werden teils andere Peptide verwendet. Aufgetragen ist die Optische Dichte von Ansätzen mit und ohne TeNT (Kontrolle) in Abhängigkeit von der Zugabe des angegebenen Peptids zum α -C-Terminus-Antikörper. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch mit je sechs Parallelansätzen. Die gestrichelte Linie markiert die Spaltstelle des TeNT.

5.4 Spaltung der rekombinanten Synaptobrevin-2-Fragmente durch Tetanustoxin

Zunächst wird überprüft, ob sich die rekombinanten rSyb2-Fragmente in Lösung durch TeNT spalten lassen. Die Spaltansätze werden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine werden entweder in den Gelen mit Coomassie-Färbelösung angefärbt (s. Abbildung 5.13) oder aus den Gelen auf Nitrocellulose-Membranen geblottet und mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern inkubiert (s. Abbildung 5.15). Dadurch kann einerseits die Identität der Proteine überprüft werden, andererseits wird das Verhalten der Antikörper untersucht.

Im Coomassie-Gel in Abbildung 5.13 sind aus den ungespaltenen rSyb2-Fragmenten (in den Bahnen 1, 3, 5) durch die Inkubation mit TeNT kürzere Proteine entstanden (in den Bahnen 2, 4, 6). Die ungespaltenen Proteine rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) (Bahnen 1 und 3, 13kDa) sowie deren Spaltfragmente (Bahnen 2 und 4, jeweils 10 und 3kDa) erscheinen erwartungsgemäß gleich

groß. rSyb2(C;1-97) scheint allerdings nicht vollständig gespalten zu sein, da im Spaltansatz in Bahn 4 noch eine Bande bei 13kDa in der Höhe des ungespaltenen rSyb2s erkennbar ist. Das Gleiche gilt für rSyb2(C;27-97): Neben den Spaltfragmenten ist im Spaltansatz in Bahn 6 noch ein Rest ungespaltenes rSyb2 zu sehen, das auf der gleichen Höhe erscheint wie das ungespaltene Protein in Bahn 5. Das größere Spaltprodukt von rSyb2(C;27-97) läuft in Bahn 6 auf der Höhe der 7kDa-Bande des Markers, obwohl seine Größe nur 5,8kDa beträgt. Dies ist auf den Unterschied zwischen berechnetem und apparentem Molekulargewicht zurückzuführen.

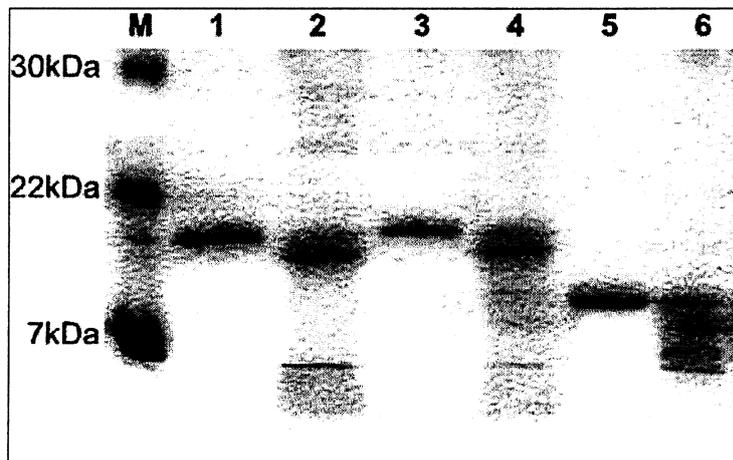


Abbildung 5.13: Überprüfung der Spaltung der rSyb2-Fragmente im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Aufgetragen sind (erwartete Größe der Banden in Klammern): M: Prestained Broad Range Größenmarker; 1: rSyb2(N;1-97) ohne TeNT (12,8kDa); 2: rSyb2(N;1-97) mit TeNT (10,1 und 2,7kDa); 3: rSyb2(C;1-97) ohne TeNT (13,0 kDa); 4: rSyb2(C;1-97) mit TeNT (10,1 und 2,8kDa); 5: rSyb2(C;27-97) ohne TeNT (9,6kDa); 6: rSyb2(C;27-97) mit TeNT (5,8 und 3,8kDa).

In Abbildung 5.14 sind die Epitope der verwendeten Antikörper in die Proteinsequenzen der rSyb2-Fragmente eingezeichnet. Die Sequenz von rSyb2(C;27-97) enthält das Epitop des monoklonalen α -VAMP2-Antikörpers nicht, alle anderen Antikörper sollten alle rSyb2-Fragmente erkennen.

rSyb2(C;1-97) sehr deutlich, das von rSyb2(C;27-97) nur als leichter Schatten erkennbar. Der α -N-Terminus-Antikörper differenziert also zwischen gespaltenem und ungespaltenem rSyb2.

Der gegen das C-terminale Spaltfragment gerichtete Antikörper α -C-Terminus (Abbildung 5.15 D) bindet erwartungsgemäß nicht an ungespaltenes rSyb2. Die kleineren rSyb2-Spaltfragmente von rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) sind aber ebenfalls nicht erkennbar. Nur das Spaltfragment von rSyb2(C;27-97) wird deutlich erkannt.

5.5 ELISA zum Nachweis der Spaltung von rSyb2

Der in der vorliegenden Arbeit zu entwickelnde TeNT-Endopeptidase-Assay ist ein ELISA, d. h. immobilisiertes Antigen wird mit einem Antikörper nachgewiesen. Für den Aufbau des Assays ergeben sich mehrere Möglichkeiten, von denen die zur Detektion von TeNT am besten geeignete im folgenden Abschnitt ermittelt werden soll.

Im ersten Schritt (s. Abschnitt 5.5.1) wird mit rSyb2(N;1-97) untersucht, in welcher Reihenfolge Spaltung und Immobilisierung stattfinden sollen.

Dann wird das am besten geeignete rSyb2-Fragment identifiziert (s. Abschnitt 5.5.2). Dieser Vergleich beinhaltet unterschiedliche Methoden zur Immobilisierung des rSyb2, außerdem werden die beiden Antikörper gegen rSyb2-Spaltprodukt (α -N-Terminus-, α -C-Terminus-Antikörper) getestet. Abschnitt 5.5.3 beschreibt die Optimierung des TeNT-Endopeptidase-Assays, der abschließend in Abschnitt 5.5.4 in Bezug auf seine Sensitivität bewertet wird.

5.5.1 Untersuchungen zur Reihenfolge von Spaltung und Immobilisierung von rSyb2

Die Funktion des TeNT wird in den hier gezeigten Versuchen im Vergleich als Abnahme des ungespaltenen rSyb2(N;1-97) mit α -VAMP2 (mAK) und als Zunahme des N-terminalen Spaltprodukts mit dem α -N-Terminus-Antikörper detektiert.

5.5.1.1 Spaltansatz in Lösung mit anschließendem Nachweis des immobilisierten rSyb2s

Wird rSyb2(N;1-97) mit TeNT inkubiert und anschließend auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert, kann die Abnahme des ungespaltenen rSyb2 mit α -VAMP2 (mAK) schon bei TeNT-Konzentration von 0,75 μ g/ml detektiert werden (s. Abbildung 5.16). Mit steigender TeNT-Konzentration sinkt das Signal weiter ab und erreicht bei 45,0 μ g/ml einen konstanten Wert von 0,75 OD₄₅₀-Einheiten. Die vollständige Abnahme des Signals wird nicht beobachtet.

Die Zunahme des Spaltsignals ist mit dem α -N-Terminus-Antikörper erst ab einer TeNT-Konzentration von 3 μ g/ml detektierbar. Dieses Signal erreicht mit 22,5 μ g/ml bei 1,29 OD₄₅₀-Einheiten bereits fast sein Maximum, und kann mit höheren TeNT-Konzentrationen nur noch gering auf 1,48 OD₄₅₀-Einheiten gesteigert werden.

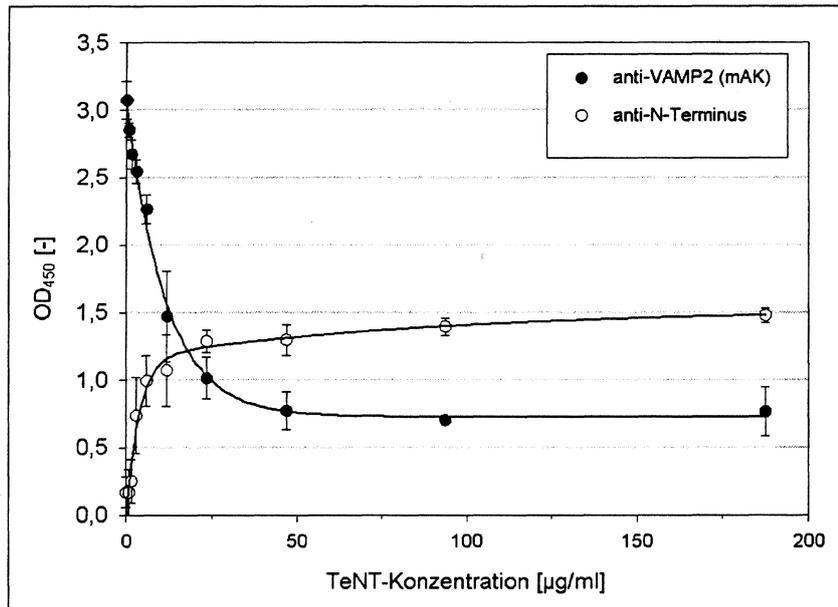


Abbildung 5.16: ELISA zum Nachweis des in Lösung gespaltenen rSyb2s. Aufgetragen ist die Optische Dichte in Abhängigkeit von der im Spaltansatz eingesetzten TeNT-Konzentration, die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit je drei Parallelansätzen.

In weiteren Versuchen mit TeNT-Konzentrationen unter $0,5\mu\text{g/ml}$ ist weder die Abnahme des ungespaltenen rSyb2s noch die Zunahme des N-terminalen Spaltprodukts detektierbar.

Deshalb wird getestet, das rSyb2-Spaltfragment aus dem Spaltansatz an mit NiNTA-beschichteten Mikrotiterplatten zu binden. Da das rSyb2 auf diesen Mikrotiterplatten über das Histidin₆-tag immobilisiert wird, sollten selektiv ungespaltenes rSyb2 und das N-terminale Spaltprodukt gebunden werden. Die Spaltstelle müsste so für den α -N-Terminus-Antikörper gut zugänglich sein. Abbildung 5.17 A zeigt einen solchen Versuch. Mit α -VAMP2 (mAK) wird die Abnahme des ungespaltenen rSyb2s detektiert, denn der Spaltansatz enthält dieses nicht mehr. Im Kontrollansatz ist mit dem α -N-Terminus-Antikörper erwartungsgemäß kein Spaltfragment messbar, aber auch im Ansatz mit TeNT ist dieses nur sehr schwach detektierbar.

Um die Frage zu klären, ob das Spaltprodukt überhaupt an die NiNTA-Platte bindet, werden die Überstände aus dem Bindungsschritt einer TCA-Fällung unterzogen, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet (s. Abbildung 5.17 B). Nicht gebundenes rSyb2 wird dadurch detektiert. Die Entwicklung des Blots mit α -VAMP2 (mAK) zeigt in den Überständen der Kontrollansätze (Bahnen 3 und 4) nur wenig ungespaltenes rSyb2 - das ungespaltene rSyb2 der Kontrollansätze ist an der Platte immobilisiert. Im Spaltansatz (Bahn 3) ist in Übereinstimmung zu den Ergebnissen im ELISA kein ungespaltenes rSyb2 mehr detektierbar. Das spricht für eine vollständige Spaltung von rSyb2. Der α -N-Terminus-Antikörper zeigt in den Überständen der Kontrollansätze (Bahn 4) erwartungsgemäß kein, in denen des Spaltansatzes (Bahn 5) dagegen viel N-terminales Spaltprodukt. Dieses ist demnach entgegen den Erwartungen nicht an die Platte gebunden.

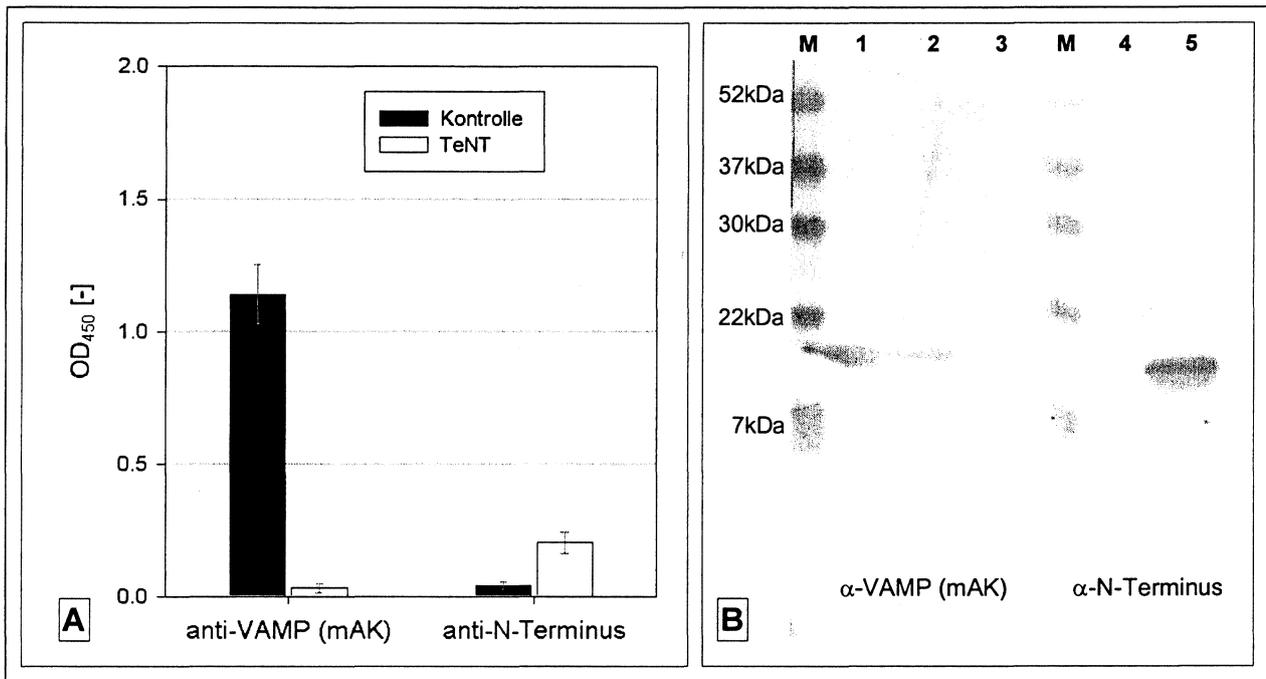


Abbildung 5.17: ELISA (A) und Immunoblot (B) zum Nachweis von Bindung und Spaltung von rSyb2 auf NiNTA-Platten. (A) Aufgetragen ist die Optische Dichte in den Versuchsansätzen (Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen mit je drei Parallelansätzen). Zur Spaltung wurden 125µg/ml TeNT eingesetzt. (B) Nach der Beschichtung einer NiNTA-Platte werden die Überstände per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und α-VAMP2 (mAK) oder mit α-N-Terminus-Antikörper analysiert (aufgetragen sind: M: Prestained Broad Range Größenmarker); 1, 2, 4: Überstand aus Kontrollansatz (rSyb2 ungespalten); 3, 5: Überstand aus Spaltansatz (rSyb2 gespalten).

Werden geringere TeNT-Konzentration (75µg/ml) eingesetzt, ist die Abnahme des ungespaltenen rSyb2 auch auf NiNTA-Platten nicht mehr detektierbar (Daten nicht abgebildet).

Wird rSyb2 also zuerst in Lösung gespalten und anschließend an eine Festphase immobilisiert, dann ist sowohl die Abnahme des ungespaltenen rSyb2s als auch die Zunahme des N-terminalen Spaltprodukts mit TeNT-Konzentrationen über 3µg/ml gut detektierbar. Mit Konzentrationen unter 0,5µg/ml wird kein Unterschied zu Ansätzen ohne Toxin festgestellt. Die Verwendung von NiNTA-beschichteten Mikrotiterplatten zur Immobilisierung des Spaltprodukts liefert schlechtere Ergebnisse, denn das N-terminale Spaltprodukt kann auch mit 125µg TeNT pro Milliliter nicht detektiert werden, die Abnahme des ungespaltenen rSyb2 ist mit 75µg/ml TeNT nicht mehr detektierbar.

5.5.1.2 Spaltung von immobilisiertem rSyb2

Die Mikrotiterplatte wird zunächst mit rSyb2(N;1-97) beschichtet und anschließend mit Tetanustoxin inkubiert. Auf diese Weise kann das Spaltprodukt mit α-N-Terminus-Antikörper bereits mit TeNT-Konzentrationen von 75ng/ml gut detektiert werden (s. Abbildung 5.18). Der monoklonale α-VAMP2-Antikörper detektiert die Spaltung nicht, das Signal nimmt in Abhängigkeit von der TeNT-Konzentration nicht ab.

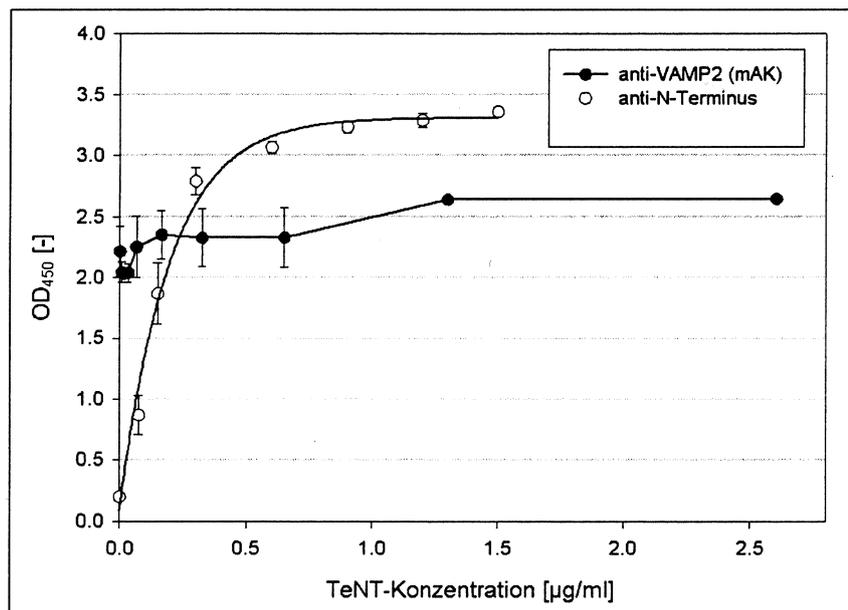


Abbildung 5.18: ELISA zum Nachweis von an der Mikrotiterplatte immobilisiertem und anschließend gespaltenem rSyb2. Aufgetragen ist die Optische Dichte in Abhängigkeit von der eingesetzten TeNT-Konzentration. Im Versuch werden 7,5 µM rSyb2 für 8h bei 37°C mit TeNT gespalten und anschließend nach Protokoll mit Antikörpern und Entwicklerlösung inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchsansätzen mit je drei Parallelen.

In Tabelle 5.4 sind die minimal nachweisbaren TeNT-Konzentrationen der Versuche aufgelistet.

Reihenfolge	Art der Immobilisierung	Antigen	Minimale TeNT-Konzentration
Erst Spaltung	ungerichtet	Ungespaltenes rSyb2	750ng/ml
Erst Spaltung	ungerichtet	N-terminales Spaltprodukt	3µg/ml
Erst Spaltung	Gerichtet (His ₆ -tag)	Ungespaltenes rSyb2	>75µg/ml
Erst Spaltung	Gerichtet (His ₆ -tag)	N-terminales Spaltprodukt	>150µg/ml
Erst Immobilisierung	ungerichtet	Ungespaltenes rSyb2	>2,5µg/ml
Erst Immobilisierung	ungerichtet	N-terminales Spaltprodukt	75ng/ml

Tabelle 5.4: Untersuchungen zur Reihenfolge von Spaltung und Immobilisierung von rSyb2(N;1-97). Aufgelistet ist die minimale TeNT-Konzentration, bei der in den Versuchen ein Signal detektiert werden konnte.

Die Spaltung von immobilisiertem rSyb2(N;1-97) ist also die sensitivste Variante des ELISA. Somit wird dieser Ansatz weiterverfolgt. Weitere Versuche, die Abnahme des ungespaltenen rSyb2 mit α -VAMP2 (mAK) zu detektieren, werden nicht durchgeführt.

5.5.2 Vergleich der drei rSyb2-Fragmente

Die drei hergestellten rSyb2-Fragmente können auf unterschiedliche Art und Weise an Mikrotiterplatten immobilisiert werden: ungerichtet, gerichtet über das Histidin₆-tag und gerichtet über den C-terminalen Cysteinrest. Die Ausrichtung könnte die Spaltbarkeit durch TeNT und die Detektion durch die Antikörper beeinflussen und somit für die Sensitivität des Assays entscheidend sein.

Deshalb werden im folgenden Abschnitt verschiedene Varianten zur Bindung der rSyb2-Fragmente und zur Detektion der Spaltung verglichen.

Das rSyb2-Fragment der Wahl soll gleichzeitig eine geringe unspezifische Bindung des Erstantikörpers (z. B. an die Mikrotiterplatte), eine ebenso geringe Bindung an ungespaltenes rSyb2 und eine hohe Steigung der Messgeraden bei geringeren TeNT-Konzentrationen aufweisen, so dass geringe TeNT-Konzentrationen bereits hohe Messwerte liefern.

5.5.2.1 Ungerichtete Bindung von rSyb2 an Mikrotiterplatten

Für die ungerichtete Bindung von rSyb2 werden zuerst Mikrotiterplatten, Beschichtungspuffer und rSyb2-Konzentration optimiert. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen sind in Abschnitt 5.5.3.1 zusammen mit allen anderen Versuchen zur Optimierung des Assays dargestellt.

Zunächst wird die Entstehung des N-terminalen Spaltprodukts mit dem α -N-Terminus-Antikörper gemessen (s. Abbildung 5.19). Mit allen rSyb2-Fragmenten ist eine in etwa lineare Abhängigkeit des Mess-Signals von der TeNT-Konzentration erkennbar. Die Erkennung des ungespaltenen rSyb2s im Ansatz ohne TeNT liegt bei allen Fragmenten im Bereich von 0,5 OD₄₅₀-Einheiten. Die Steigung der Geraden mit der TeNT-Konzentration ist mit dem Fragment rSyb2(N;1-97) aber am höchsten. So ist das Mess-Signal bei 32ng/ml mit rSyb2(N;1-97) mit 1,96 OD₄₅₀-Einheiten fast doppelt so hoch wie mit rSyb2(C;1-97) oder mit rSyb2(C;1-97).

Die direkte Bindung des Antikörpers an die Mikrotiterplatten trägt kaum zu den Hintergrundwerten bei, sie beträgt nur 0,145 OD₄₅₀-Einheiten (Daten nicht abgebildet).

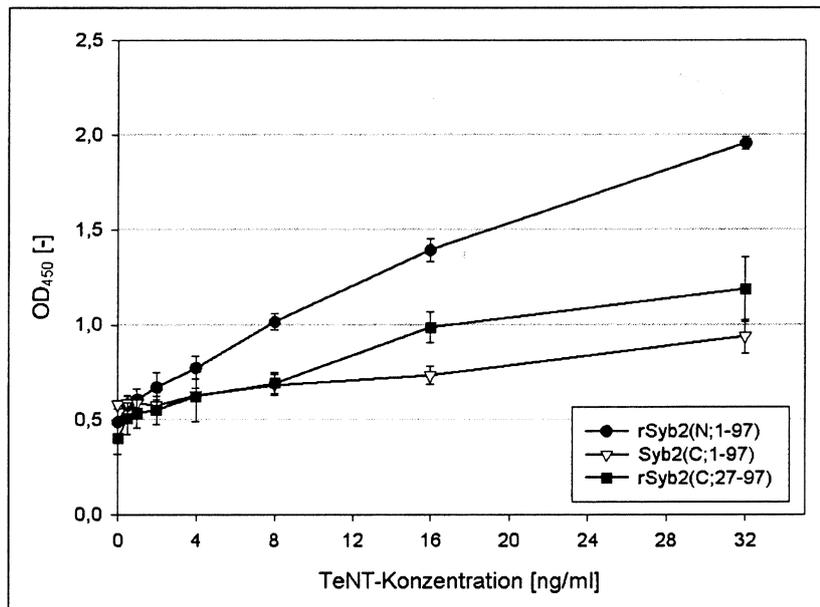


Abbildung 5.19: Vergleich der drei ungerichtet gebundenen rSyb2-Fragmente im ELISA. Aufgetragen ist die Optische Dichte in Abhängigkeit von der TeNT-Konzentration. Nach der Inkubation mit TeNT wurde die Entstehung des N-terminalen Spaltprodukts mit dem α -N-Terminus-Antikörper gemessen. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit je drei Parallelen.

Zur Detektion der Spaltung steht auch der α -C-Terminus-Antikörper zur Verfügung, mit dem die Entstehung des C-terminalen Spaltprodukts gemessen wird (s. Abbildung 5.20). Die rSyb2-Fragmente werden dazu wieder ungerichtet an eine MaxiSorp-Platte gebunden und mit TeNT inkubiert. Der Antikörper differenziert gut zwischen ungespaltenem und gespaltenem rSyb2(C;27-97). Das Signal ohne TeNT liegt bei 0,55 OD₄₅₀-Einheiten, und mit dem Anstieg der TeNT-Konzentration ist auch ein linearer Anstieg des Mess-Signals verbunden. Mit einer TeNT-Konzentration von 32ng/ml wird ein Mess-Signal von 1,31 OD₄₅₀-Einheiten erreicht.

Der α -C-Terminus-Antikörper differenziert nicht zwischen den gespaltenen und ungespaltenen rSyb2-Fragmenten rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97). Das gemessene Signal beträgt mit allen TeNT-Konzentrationen zwischen 1,35 und 1,50 OD₄₅₀-Einheiten.

In Kontrollansätzen mit unbeschichteten Mikrotiterplatten wird eine Bindung des α -C-Terminus-Antikörpers an die Festphase festgestellt, die sich in Extinktionen von 0,5 OD₄₅₀-Einheiten manifestiert. Das Signal mit rSyb2(C;27-97) ohne TeNT entsteht also durch an die Platte gebundenen Erstantikörper. Die Differenz zu den bei 0ng/ml TeNT gemessenen Werten von rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) beruht aber auf der Bindung des Antikörpers an die ungespaltenen Fragmente.

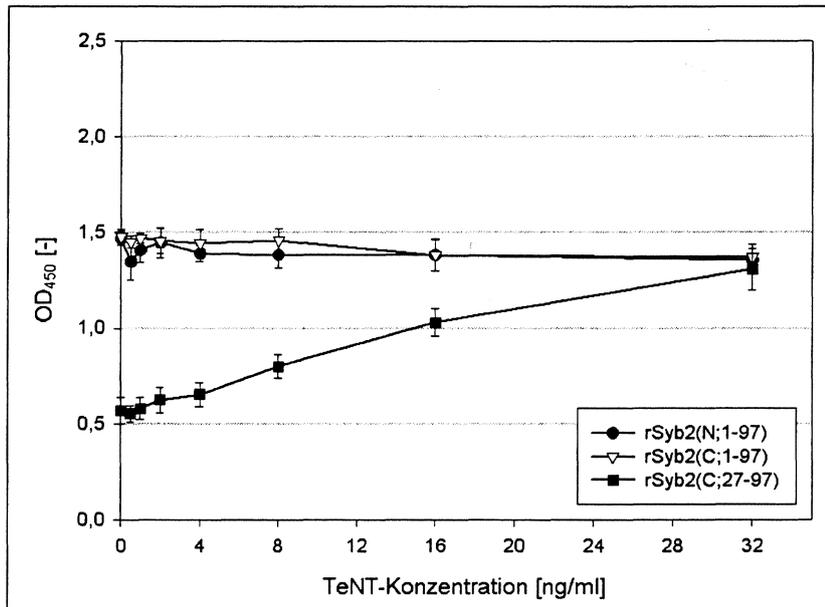


Abbildung 5.20: Vergleich der drei ungerichtet gebundenen rSyb2-Fragmente im ELISA. Aufgetragen ist die Optische Dichte in Abhängigkeit von der TeNT-Konzentration. Nach der Inkubation mit TeNT wurde die Entstehung des C-terminalen Spaltprodukts mit dem α -C-Terminus-Antikörper gemessen. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit je drei Parallelen.

Insgesamt sind also bei der ungerichteten Bindung von rSyb2 an Mikrotiterplatten deutliche Unterschiede zwischen den rSyb2-Fragmenten und zwischen den beiden Antikörpern feststellbar.

5.5.2.2 Gerichtete Bindung von rSyb2 an Mikrotiterplatten

Für die gerichtete Bindung werden NiNTA- und Maleimid-beschichtete Mikrotiterplatten (kurz: NiNTA- und Maleimid-Platten) verwendet. Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten werden die Empfehlungen der Hersteller befolgt, ansonsten werden die Versuche durchgeführt wie bei der ungerichteten Bindung von rSyb2.

Abbildung 5.21 zeigt die Spaltung der über das Histidin₆-tag an NiNTA-Platten gebundenen rSyb2-Fragmente. rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) sind über den N-Terminus an die Platten gebunden, deshalb wird die Entstehung des N-terminalen Spaltprodukts gemessen. Umgekehrt trägt rSyb2(C;27-97) das Histidin₆-tag am C-Terminus, deshalb bleibt nach der Spaltung das C-terminale Spaltprodukt an der Platte gebunden und sollte mit dem α -C-Terminus-Antikörper nachweisbar sein.

Im ELISA kann nicht zwischen ungespaltenem und gespaltenem rSyb2(C;27-97) unterschieden werden. Kontrollansätze ohne rSyb2 (Daten nicht abgebildet) zeigen, dass dafür eine starke Bindung des α -C-Terminus-Antikörpers an die NiNTA-Platte verantwortlich ist.

Der α -N-Terminus-Antikörper bindet im Gegensatz dazu nicht an die NiNTA-Platten (Daten nicht abgebildet). Trotzdem sind die Signale ohne Toxin im Vergleich zu den Versuchen mit ungerichtet gebundenem rSyb2 höher. Der α -N-Terminus-Antikörper bindet offenbar stärker an die gerichtet

gebundenen, ungespaltenen rSyb2-Fragmente. Die Spaltung beider Fragmente ist messbar, das N-terminale Spaltprodukt aus rSyb2(N;1-97) wird aber viel besser detektiert als das gleiche Fragment aus rSyb2(C;1-97).

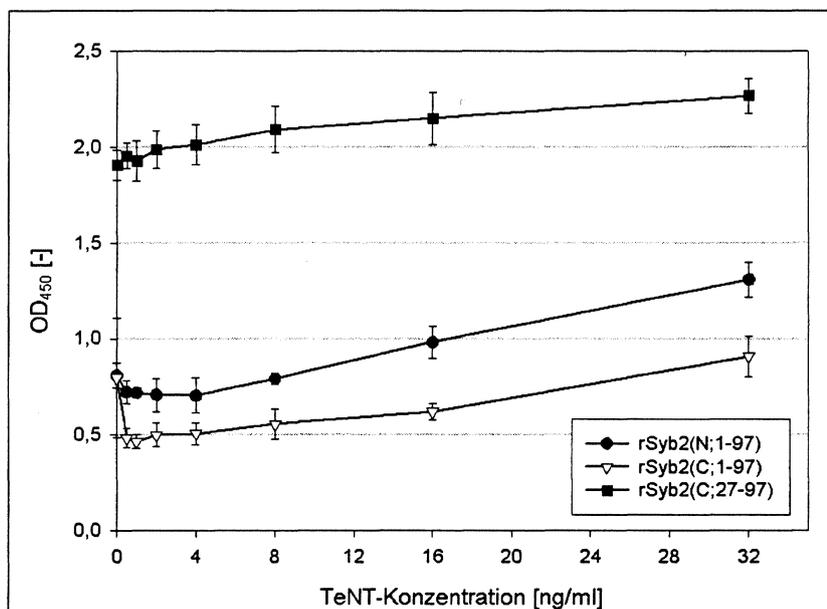


Abbildung 5.21: Vergleich der drei gerichtet über den Histidin₆-tag gebundenen rSyb2-Fragmente im ELISA. Aufgetragen ist die Optische Dichte in Abhängigkeit von der TeNT-Konzentration. Nach der Inkubation mit TeNT wurde die Entstehung des N-terminalen Spaltprodukts von rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) mit dem α -N-Terminus-Antikörper und die Entstehung des C-terminalen Spaltprodukts von rSyb2(C;27-97) mit dem α -C-Terminus-Antikörper gemessen. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit je drei Parallelen.

An die Maleimid-Platten werden nur rSyb2(C;1-97) und rSyb2(C;27-97) gebunden, weil nur sie einen Cysteinrest enthalten, der mit den Maleimidgruppen der Plattenoberfläche reagieren kann. Beide rSyb2-Fragmente enthalten nur einen Cysteinrest am C-Terminus, so dass nach der Spaltung mit TeNT das C-terminale Spaltprodukt detektiert werden kann.

Abbildung 5.22 zeigt, dass der α -C-Terminus-Antikörper stark an das längere der beiden Fragmente bindet. Er bindet leicht an die Mikrotiterplatte und bewirkt damit Extinktionen von 0,25 OD₄₅₀-Einheiten (Daten nicht abgebildet). Beide Kurven sind bis zu einer TeNT-Konzentration von 4-8ng/ml linear. Insgesamt verlaufen sie parallel, die Spaltung ist also ähnlich gut detektierbar. Besonders die Werte mit rSyb2(C;27-97) zeigen hohe Standardabweichungen und die Bindung an ungespaltenes rSyb2(C;27-97) ergibt ein Signal von 0,6 OD₄₅₀-Einheiten.

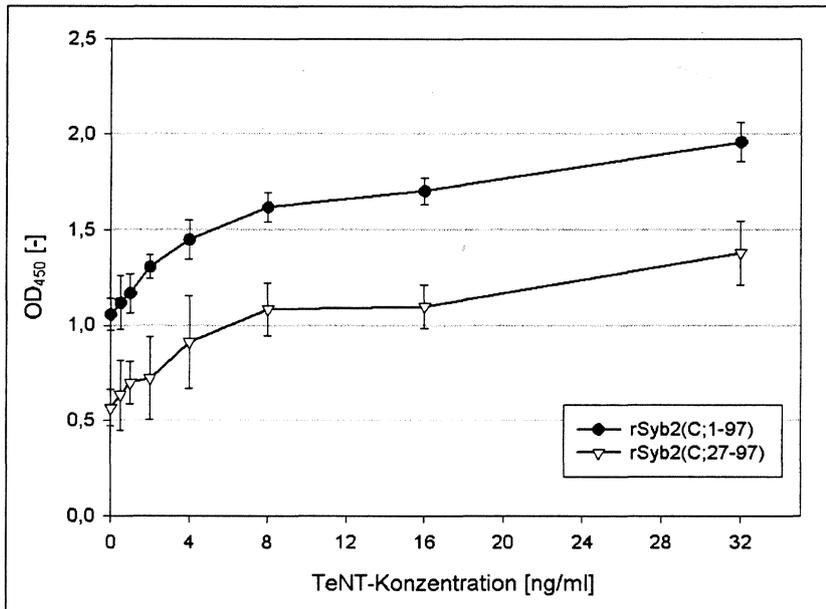


Abbildung 5.22: Vergleich der gerichtet über den C-terminalen Cysteinrest gebundenen rSyb2-Fragmente rSyb2(C;1-97) und rSyb2(C;27-97) im ELISA. Aufgetragen ist die Optische Dichte in Abhängigkeit von der TeNT-Konzentration. Nach der Inkubation mit TeNT wurde die Entstehung des C-terminalen Spaltprodukts mit dem α -C-Terminus-Antikörper gemessen. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit rSyb2(C;1-97) bzw. drei Versuchen mit rSyb2(C;27-97) mit je drei Parallelen.

Abbildung 5.19, Abbildung 5.20, Abbildung 5.21, und Abbildung 5.22 zeigen, dass die gemessenen Signale bis 8ng/ml TeNT weitgehend linear mit der TeNT-Konzentration ansteigen. Deshalb werden die Messgeraden in diesem Konzentrationsbereich einer Regressionsanalyse unterzogen. Die Kurven entsprechen der Formel

(Formel 2)
$$y = a * x + y_0$$

Je höher die Steigung a einer Geraden, desto höher ist die Sensitivität für Methode für TeNT, weil eine geringe Erhöhung der TeNT-Konzentration einen starken Anstieg des Mess-Signals bewirkt. Der Y-Achsenabschnitt y_0 gibt das Mess-Signal mit 0ng/ml TeNT an und ist deshalb ein Maß für die Genauigkeit des verwendeten Antikörpers: je höher y_0 , desto stärker bindet der Antikörper an ungespaltenes rSyb2.

Tabelle 5.5 enthält die errechneten Parameter a und y_0 sowie den ermittelten Regressionskoeffizienten R^2 für die Messgeraden.

Mikrotiterplatte	rSyb2-Fragment	Antikörper	a	y ₀	R ²
MaxiSorp	rSyb2(N;1-97)	α-N-Terminus	0,061	0,531	0,985
MaxiSorp	rSyb2(C;1-97)	α-N-Terminus	0,013	0,575	0,926
MaxiSorp	rSyb2(C;27-97)	α-N-Terminus	0,030	0,474	0,847
MaxiSorp	rSyb2(N;1-97)	α-C-Terminus	-0,005	1,418	0,102
MaxiSorp	rSyb2(C;1-97)	α-C-Terminus	-0,002	1,462	0,162
MaxiSorp	rSyb2(C;27-97)	α-C-Terminus	0,030	0,553	0,975
NiNTA*	rSyb2(N;1-97)	α-N-Terminus	0,020	0,67	0,980
NiNTA*	rSyb2(C;1-97)	α-N-Terminus	0,013	0,456	0,973
NiNTA	rSyb2(C;27-97)	α-C-Terminus	0,021	1,926	0,93
Maleimid	rSyb2(C;1-97)	α-C-Terminus	0,070	1,106	0,945
Maleimid	rSyb2(C;27-97)	α-C-Terminus	0,063	0,606	0,967

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Regressionsanalyse der Vergleiche zwischen Beschichtungsmethoden und rSyb2-Fragmenten (* für diese beiden Regressionsanalysen wurde auch der Messwert bei 0 ng/ml TeNT nicht berücksichtigt).

Die geringsten Bindungen an ungespaltenes rSyb2 gekoppelt mit einer hohen Steigung der Messgeraden zeigen folgende Methoden:

- Ungerichtete Bindung von rSyb2(N;1-97), Detektion mit α-N-Terminus
- Gerichtete Bindung von rSyb2(C;27-97) an Maleimid-Platten, Detektion mit α-C-Terminus

Für die Testdurchführung wird die erste Methode favorisiert. Mit gerichtet gebundenem rSyb2(C;27-97) fällt die Bindung des α-C-Terminus-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 (entspricht y₀) etwas höher aus, aber vor allem sind die Standardabweichungen zwischen den Versuchen beträchtlich.

5.5.3 Optimierung des Assays

Zunächst wird die ungerichtete Bindung von rSyb2(N;1-97) an Mikrotiterplatten optimiert. Neben der Wahl einer geeigneten Festphase werden dazu auch Beschichtungs-, Blockierungs- und Waschpuffer verglichen. Die verschiedenen Parameter werden immer im ELISA mit und ohne Tetanustoxin überprüft, damit die Bindung der Antikörper an ungespaltenes rSyb2 und der Einfluss der einzelnen Parameter auf die Mess-Signale beurteilt werden kann.

5.5.3.1 Bindung von rSyb2(N;1-97) an Mikrotiterplatten

Bei der Auswahl der Festphase ist entscheidend, dass das rSyb2 überhaupt immobilisiert werden kann. Zudem muss die TeNT-Spaltstelle für das Enzym und auch für den Erstantikörper gut zugänglich sein.

Das rSyb2 wird für diese Versuche in PBS verdünnt. Die in Abbildung 5.23 verglichenen Mikrotiterplatten bestehen alle aus Polystyren, weisen aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächen eine unterschiedliche Fähigkeit zur Molekülbindung auf.

Auf Maxi-, Medi- und PolySorp-Platten ist die Bindung des α -N-Terminus-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 recht gering. Die Detektion des Spaltprodukts liefert auf Maxi- und MediSorp-Platten dagegen Werte von über 3,5 OD₄₅₀-Einheiten, während das entsprechende Signal auf PolySorp-Platten nicht detektierbar ist. Mit MultiSorp-Platten wird sehr viel ungespaltenes rSyb2 gemessen. Die Spaltung ist zwar gut detektierbar, das Signal ist jedoch mit 2,75 OD₄₅₀-Einheiten deutlich geringer als mit Maxi- oder MediSorp-Platten.

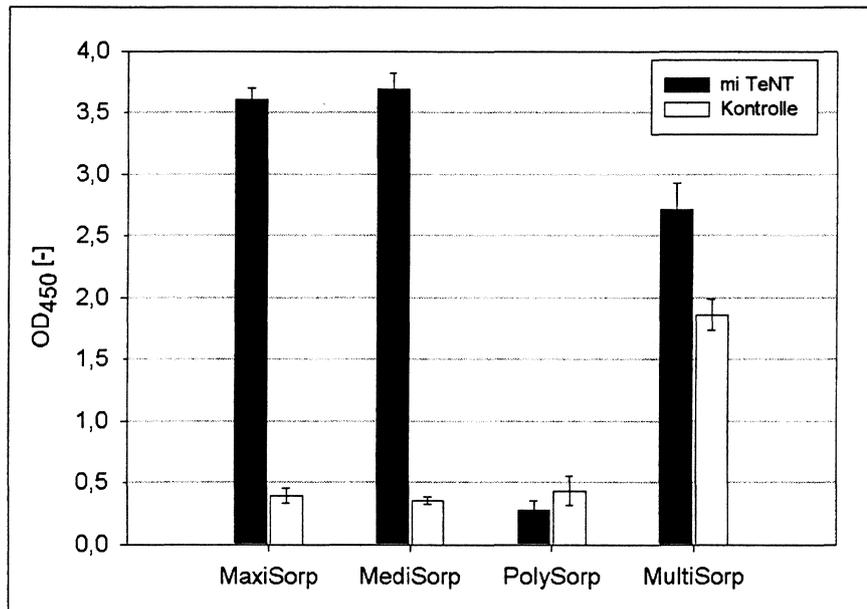


Abbildung 5.23: Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten zur Beschichtung mit rSyb2(N;1-97). Die TeNT-Konzentration im Spaltansatz betrug 100ng/ml. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit je vier Parallelansätzen.

Zusätzliche Kontrollen in den Versuchen (Daten nicht abgebildet) zeigen, dass die Antikörper selbst an keinen der untersuchten Plattentypen binden. Der hohe Kontrollwert auf MultiSorp-Platten ist allein durch die Bindung des Erstantikörpers an ungespaltenes rSyb2 bedingt. Die besten Resultate werden mit Maxi- und MediSorp-Platten erzielt. In den weiteren Versuchen werden MaxiSorp-Platten verwendet, da diese ein Standardprodukt in der Durchführung von ELISAs sind.

Für die Wahl des besten Beschichtungspuffers werden PBS (pH 7,4), Carbonat-Puffer (pH 9,6), 50mM HEPES (pH 7,4), Citrat-Puffer (pH 6,0) und 20mM Acetat-Puffer (pH 5,0) miteinander verglichen (s. Abbildung 5.24). PBS, Carbonat- und Citrat-Puffer sind in ELISAs häufig verwendete Beschichtungspuffer, durch die der für die jeweilige Immobilisierung optimale pH-Wert eingestellt werden kann. In einigen Literaturstellen wird die Spaltung von TeNT in 50mM HEPES beschrieben [90,114], und möglicherweise kommt dieser Puffer auch für die Spaltung auf ELISA-Platten zum Einsatz. Es könnte für die Stabilität des ELISA vorteilhaft sein, Beschichtung und Spaltung im glei-

chen Puffer durchzuführen. Acetat-Puffer wird getestet, weil das rSyb2 gegen Acetat-Puffer dialysiert wird. Für die Stabilität des rSyb2s könnte es vorteilhaft sein, die Mikrotiterplatten im gleichen Puffer zu beschichten. Die Spaltung wird in diesen Versuch immer in PBS durchgeführt, weil das pH-Optimum des TeNT im neutralen pH-Bereich liegt.

Abbildung 5.24 zeigt, dass die Bindung des α -N-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 (Datenreihe „Kontrolle“) mit allen Beschichtungspuffern ähnlich gering ausfällt. Das Spaltensignal ist jedoch sehr unterschiedlich: mit PBS wird die Spaltung am deutlichsten gemessen, auch die in HEPES beschichteten Platten liefern hohe Spaltensignale, aber mit Carbonat-, Citrat- und Acetat-Puffer fällt die Detektion der Spaltung deutlich geringer aus.

Offenbar ist PBS als Beschichtungspuffer für diesen ELISA am besten geeignet.

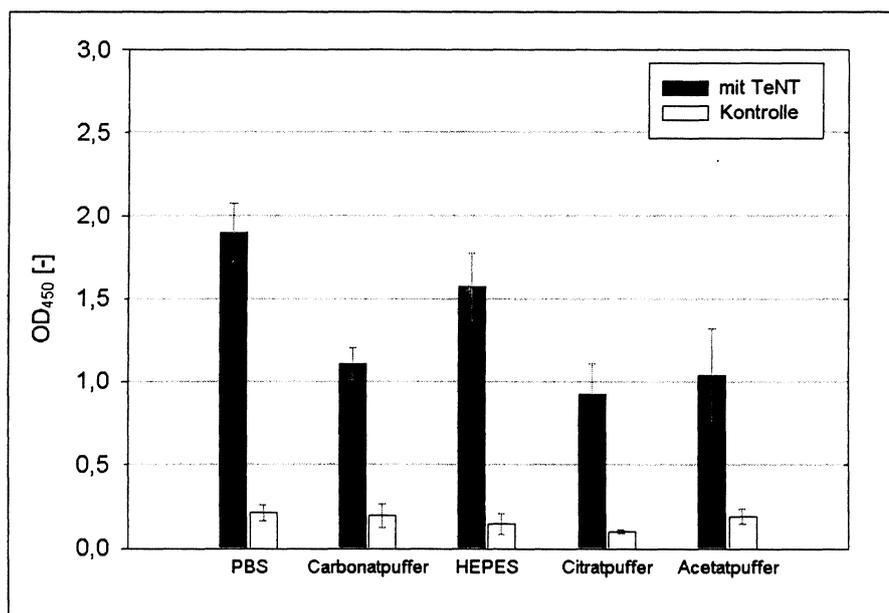


Abbildung 5.24: Auswahl des Beschichtungspuffers. rSyb2(N;1-97) wird in verschiedenen Puffern verdünnt und an eine MaxiSorp-Platte gebunden. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 11 Versuchen (PBS) bzw. 3 Versuchen (alle anderen Puffer); jede rSyb2-Präparation wird im jeweiligen Puffer in 3-5 Parallelansätzen getestet.

Der nächste getestete Parameter betrifft die rSyb2-Konzentration, mit der die Mikrotiterplatten beschichtet werden. Abbildung 5.25 A und B zeigen die Abhängigkeit der Mess-Signale von der rSyb2-Konzentration. Die Daten für Abbildung 5.25 A wurden mit rSyb2-Präparationen gewonnen, die ohne Inclusion-Body-Präparation denaturierend aufgereinigt und gegen NaCl/Tris-Puffer dialysiert wurden. Für die Gewinnung der Daten in Abbildung 5.25 B wurden die rSyb2-Präparationen mit Inclusion-Body-Präparation denaturierend aufgereinigt und gegen Acetat-Puffer dialysiert.

Abbildung 5.25 A zeigt mit 400nM rSyb2 eine starke Bindung an ungespaltenes rSyb2 mit einer sehr hohen Standardabweichung an, welche durch die großen Schwankungen zwischen den verschiedenen getesteten rSyb2-Präparationen bedingt wird. Mit 800nM sind sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung zwischen den rSyb2-Präparationen viel geringer, mit 1200nM ist die

Bindung an ungespaltenes rSyb2 auf ein einheitlich geringes Signal gesunken. Die Detektion des N-terminalen Spaltprodukts liefert ebenfalls mit 400nM rSyb2 höhere Werte, die mit steigender rSyb2-Konzentration etwas absinken. Die Differenz der Signale zwischen den rSyb2-Konzentrationen sowie die Standardabweichungen zwischen den rSyb2-Präparationen fällt aber wesentlich geringer aus als bei der Messung des ungespaltenen rSyb2.

An gegen Acetat-Puffer dialysiertem rSyb2 bindet der α -N-Terminus-Antikörper offensichtlich längst nicht so stark (s. Abbildung 5.25 B). Das Spaltsignal erreicht bei 400nM rSyb2 bereits eine Sättigung und bleibt unabhängig von der rSyb2-Konzentration konstant.

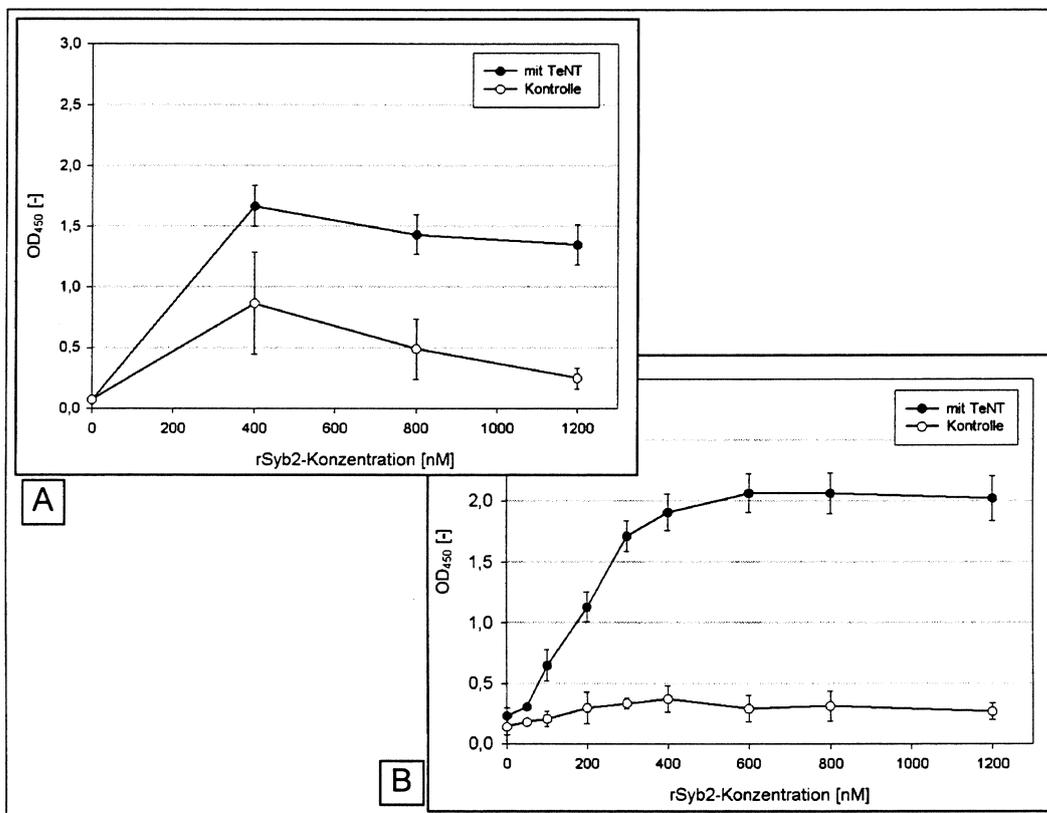


Abbildung 5.25: Titration von rSyb2(N;1-97) zur Beschichtung von Mikrotiterplatten. Aufgetragen ist die Optische Dichte in Abhängigkeit von der rSyb2-Konzentration, wobei die in (A) und (B) verwendeten rSyb2-Präparationen unterschiedlich aufgereinigt wurden (Erläuterungen im Text). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 Versuchen mit 7 rSyb2-Präparationen (A) bzw. 6 Versuchen mit 5 rSyb2-Präparationen (B). Es wurden immer 75ng/ml TeNT eingesetzt.

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten werden in den folgenden Versuchen 1200nM rSyb2 eingesetzt. Das nach diesen Versuchen verwendete rSyb2 ist zwar so aufgereinigt wie die rSyb2-Präparationen in Abbildung 5.25 B, so dass eine Konzentration von 400-600nM bereits ausreichen müsste. Um die Detektion des ungespaltenen rSyb2 durch den Erstantikörper aber definitiv ausschließen zu können, wird sicherheitshalber die hohe Substratkonzentration von 1200nM gewählt.

Für die Dauer der Beschichtung hat sich eine zweistündige Inkubation bei 37°C als optimal herausgestellt. Gegenüber der Beschichtung über Nacht liefert sie einen geringeren Hintergrund und ein höheres Spaltsignal (Daten nicht abgebildet).

5.5.3.2 Blockierungs- und Waschschrirte

Im Anschluss an den Beschichtungsschritt wird die rSyb2-Lösung abgenommen und in jede Vertiefung werden 200µl Blockierungspuffer pipettiert. Das Blockieren geschieht durch Protein im Puffer, das noch freie Bindungsstellen der Platte belegt, um die unspezifische Anlagerung der Antikörper zu minimieren. Für den hier beschriebenen ELISA erwies sich Bovines Serumalbumin (BSA) gegenüber Magermilchpulver und Casein als geeignetster Proteinzusatz (Daten nicht abgebildet). Als Blockierungspuffer sind PBS mit 2% Sucrose und 0,2% BSA oder PBS mit 1% BSA gleichermaßen gut geeignet. Es spielt keine Rolle, ob der Blockierungsschritt über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt wird.

Nach der Beschichtung mit rSyb2 werden die Mikrotiterplatten gewaschen. Für alle Waschschrirte hat sich ein Standardpuffer aus PBS mit 0,025-0,05 Volumenprozent des nichtionischen Detergenz Tween-20® als optimal erwiesen (Daten nicht abgebildet). Tween-20®-Konzentrationen von über 0,05% wirken sich negativ auf den ELISA aus, weil rSyb2 von der Mikrotiterplatte gewaschen und somit das Mess-Signal verringert wird. Der Zusatz von Protein (BSA) hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse und ist deshalb unnötig.

5.5.3.3 Optimierung der Bedingungen zur Spaltung von rSyb2(N;1-97) durch Tetanustoxin

Ein wichtiger Parameter zur Optimierung des ELISA ist die Dauer der Inkubation mit Tetanustoxin. Sie sollte maximiert werden, da sehr geringe Mengen dieses Enzyms nachgewiesen werden sollen. Gleichzeitig muss beachtet werden, dass der Assay durch eine zu lange Inkubationszeit bei 37°C an Sensitivität einbüßen könnte, z. B. könnte das Tetanustoxin einen Aktivitätsverlust erleiden oder sich das rSyb2 wieder von der Mikrotiterplatte lösen.

Abbildung 5.26 zeigt die Entwicklung der Toxinspaltung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Toxin und der Toxinkonzentration.

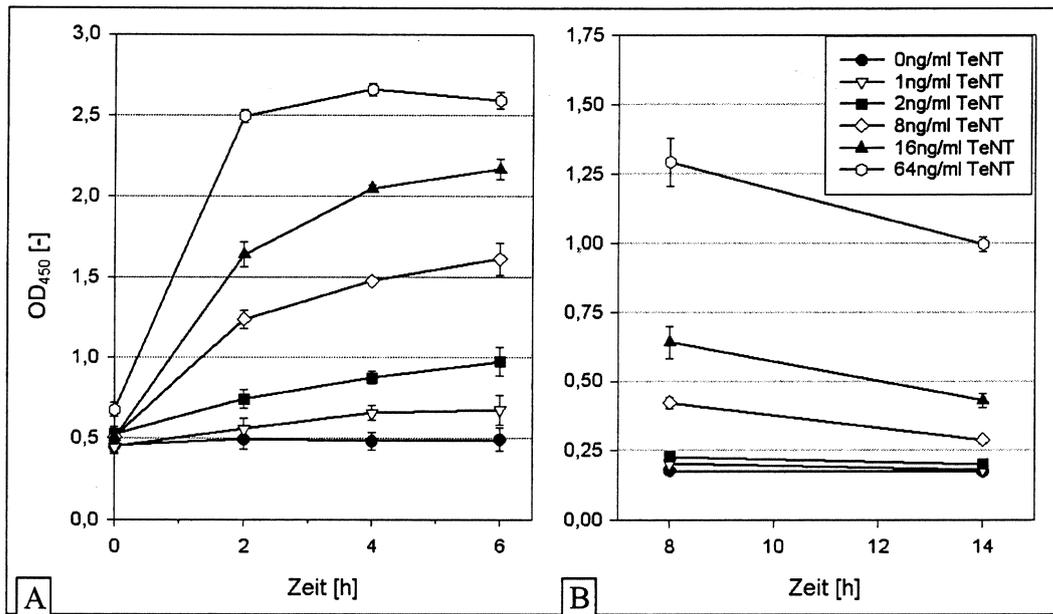


Abbildung 5.26: Abhängigkeit des Mess-Signals von der Inkubationsdauer der mit TeNT. In Versuch (A) beträgt sie zwischen 0 und 6 Stunden, in Versuch (B) 8 oder 14 Stunden. Jeder Datenpunkt beinhaltet Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Versuchsansätzen mit je drei Parallelen.

Mit der höchsten TeNT-Konzentration, 64ng/ml, ist nach 2-4 Stunden Inkubationszeit bereits das maximale Mess-Signal erreicht. Bei geringeren TeNT-Konzentrationen ist die Zunahme des Signals mit der Inkubationsdauer erkennbar. Bei allen Konzentrationen nimmt das Signal zwischen 8 und 14 Stunden wieder ab. Das bedeutet, dass eine Inkubation mit TeNT über Nacht nicht sinnvoll ist. Zwischen Inkubationszeiten von 6 und 7,5 Stunden, die in einem separaten Versuch getestet wurden, scheint kein nennenswerter Unterschied zu bestehen (Daten nicht abgebildet). Für alle folgenden Versuche wird deshalb eine Inkubationszeit von 6 Stunden festgelegt, denn eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 8 Stunden scheint keinen Vorteil zu bringen.

Tetanustoxin ist eine Zinkmetalloprotease, deshalb könnte die Zugabe von Zinkionen zum Toxin dessen Aktivität steigern. Abbildung 5.27 zeigt jedoch, dass das mit 20 μ M Zinkchlorid versetzte Tetanustoxin kein höheres Spaltsignal bewirkt als das Tetanustoxin ohne Zinkchlorid, die Mess-Signale nehmen sogar leicht ab.

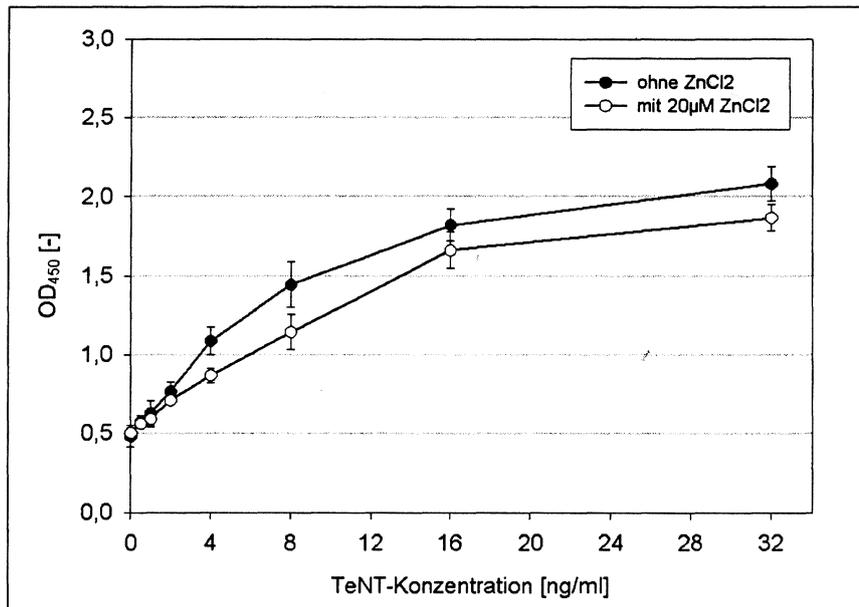


Abbildung 5.27: Abhängigkeit des Mess-Signals von der Zugabe von Zinkchlorid zum Tetanustoxin. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchsansätzen mit je drei Parallelen.

Das Tetanustoxin wird deshalb in den Folgeversuchen nicht in Zink-haltigem Puffer verdünnt.

Die Funktionsweise des Tetanustoxins wird überprüft, indem das Enzym vor der Applikation auf die Mikrotiterplatte mit den Metalloproteaseinhibitoren Phosphoramidon, EDTA, EGTA und 1,10-Phenanthrolin vorinkubiert wird. Abbildung 5.28 A zeigt, dass EDTA, EGTA und 1,10-Phenanthrolin das Tetanustoxin vollständig inhibieren, während Phosphoramidon keinen Effekt auf das Enzym hat.

Nach dem gleichen Versuchsprinzip wird der Effekt einiger Aminosäuren getestet (s. Abbildung 5.28 B). L-Cystein, L-Histidin und L-Phenylalanin hemmen das Tetanustoxin nur geringfügig, L-Glutamat hat dagegen einen viel deutlicheren Effekt: 5ng/ml TeNT werden vollständig, 50ng/ml zu etwa zwei Dritteln gehemmt. Die Aminosäuren liegen jeweils im 333fachen (5ng/ml TeNT) bzw. im 33fachen (50ng/ml TeNT) molaren Überschuss vor.

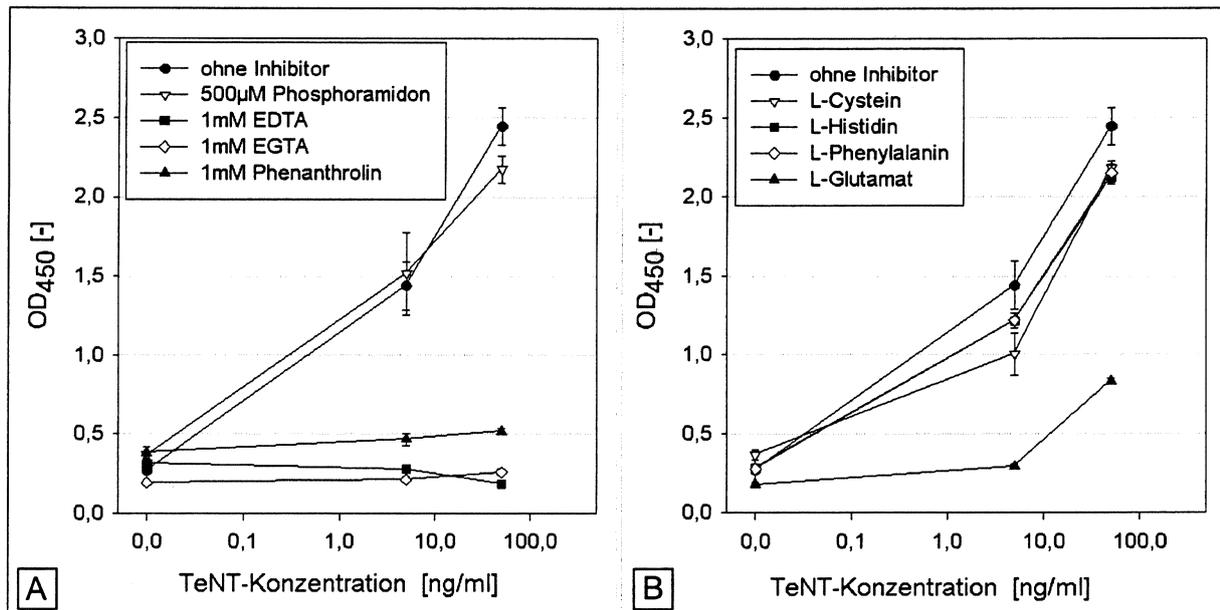


Abbildung 5.28: Hemmung des Tetanustoxins durch Proteaseinhibitoren (A) oder Aminosäuren (B). TeNT wird vor der Inkubation auf der Mikrotiterplatte mit dem jeweiligen Agens inkubiert (die Konzentration der Aminosäuren beträgt 11,1 μ M). Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier Versuchen (ohne Inhibitor) bzw. aus je einem Versuch (mit Inhibitor) mit je drei Parallelen.

Die Aktivität des TeNT ist also nicht durch Phosphoramidon und nur geringfügig durch L-Cystein, L-Histidin und L-Phenylalanin hemmbar.

5.5.3.4 Detektion der rSyb2-Spaltung

Die Antikörper werden titriert, um die optimale Konzentration zu ermitteln (Daten nicht abgebildet). Dabei muss ein molarer Überschuss der Antikörper gewährleistet sein, um alle zu detektierenden Partikel zu erfassen. Eine zu hohe Antikörperkonzentration erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Bindung, durch die dann hohe Hintergrundsignale erzeugt werden.

Für den α -N-Terminus-Antikörper erweist sich eine Verdünnung von 1:2000 als optimal, der Zweitantikörper (α -Kaninchen-IgG, Peroxidase-gekoppelt) wird 1:5000 verdünnt eingesetzt.

Die in den anfänglichen Versuchen teils hohe Bindung des α -N-Terminus-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 kann durch Zugabe von 0,2% BSA in den Inkubationspuffer auf Werte von 0,2 OD_{450} -Einheiten gesenkt werden.

5.5.3.5 Ergebnis der Optimierung

Aus der Optimierung ergibt sich das in Tabelle 5.6 dargestellte Protokoll zur Durchführung des E-LISA.

		Puffer	Dauer, Temperatur	Anmerkung
Beschichten	1200nM rSyb2(N;1-97)	PBS	2h, 37°C	
Blockieren		1% BSA in PBS	über Nacht, 4°C	Alternativ: 2% Sucrose + 0,2% BSA
Waschen		0,05% Tween-20® in PBS		4x
Spaltung	TeNT	2µg/ml BSA in PBS	6h, 37°C	
Waschen		0,05% Tween-20® in PBS		4x
Erstantikörper	α-N-Terminus (1:2000)	0,2% BSA in PBS	über Nacht, 4°C	
Waschen		0,05% Tween-20® in PBS		4x
Zweitantikörper	α-Kaninchen-IgG (1:5000)	0,2% BSA in PBS	45 min., 20-25°C	
Waschen		0,05% Tween-20® in PBS		4x
Entwicklung	TMB		20min., 20-25°C	
	Abstoppen mit 1M H ₂ SO ₄			

Tabelle 5.6: Protokoll für einen ELISA nach der Optimierung der Parameter.

5.5.4 Sensitivität des Assays

Zur Ermittlung der Sensitivität werden ELISAs nach dem Versuchsprotokoll in Tabelle 5.6 durchgeführt. Darin wird das TeNT in Konzentrationen zwischen 0 und 32ng/ml titriert. Die Ergebnisse werden in das Programm DINtest eingegeben, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden berechnet. Dafür wird eine Signifikanz von 99% vorgegeben.

Die DIN 32645 definiert die Nachweisgrenze als die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein eines Analyten. Bei Messwerten, die im Bereich der Nachweisgrenze liegen, kann mit einer vorgegebenen Sicherheit (Signifikanz), z. B. 99%, davon ausgegangen werden, dass der Bestandteil in der Testlösung enthalten ist, der Messfehler (α -Fehler oder Irrtumswahrscheinlichkeit) beträgt dann 1%.

Liegt der Bestandteil in einer Konzentration vor, die genau der Nachweisgrenze entspricht, dann ist der zugehörige Messwert statistisch in 50% der Messungen größer als die Nachweisgrenze (β -Fehler). Um den β -Fehler zu verringern, definiert die DIN 32645 die Erfassungsgrenze, bei der α - und β -Fehler gleich sind. Die Erfassungsgrenze entspricht deshalb in der Regel dem Doppelten der Nachweisgrenze. Zur Ermittlung dieser Grenzen testet das Programm DINtest die Linearität der eingegebenen Daten (Mandel-Test). Außerdem werden Ausreißer durch einen Ausreißer-F-Test aus der Berechnung eliminiert. Am Ende der Berechnung kann ein Bericht generiert werden, der alle Ergebnisse enthält.

Für die im Folgenden beschriebenen Regressionsanalysen wird ein α -Fehler von 1% festgelegt.

Die Titration von reinem Tetanustoxin (s. Abbildung 5.29) zeigt eine lineare Abhängigkeit des Signals zwischen Toxinkonzentrationen von 0,5 und 16ng/ml. Die Bindung des α -N-Terminus-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 ergibt ein Signal von 0,14 OD₄₅₀-Einheiten.

Der Ausreißertest des Programms DINtest entfernt die Messwerte für 0 und 32ng/ml aus der Berechnung. Diese ergibt die Geradengleichung $y = 0,079x + 0,206$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9994$ (der komplette Bericht der Analyse befindet sich in Abschnitt 9.2.2 im Anhang).

Die Nachweisgrenze beträgt 0,545 ng/ml, die Erfassungsgrenze liegt bei 1,091ng/ml Tetanustoxin.

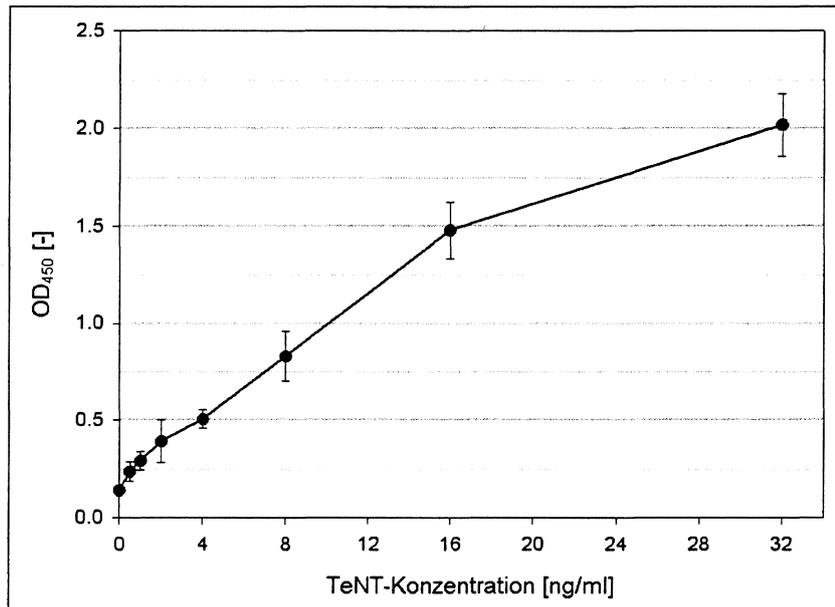


Abbildung 5.29: Sensitivität des ELISA für aufgereinigtes TeNT. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit vier bzw. sechs Parallelen.

Für das reine Tetanustoxin liegen seitens des Herstellers keinerlei Toxizitätsdaten aus Tierversuchen vor. Somit lässt die hier ermittelte Sensitivität keine Schlüsse darauf zu, ob der ELISA in Bezug auf diesen Parameter zum Tierversuch konkurrenzfähig ist. Dieser Vergleich ist aber in Hinblick auf den Ersatz der Tierversuche in der Sicherheitsprüfung von Tetanusimpfstoffen entscheidend, denn im *in-vitro*-System muß Tetanustoxin genauso sensitiv detektiert werden können wie im Tierversuch.

Um die Sensitivität des ELISA im Vergleich zum Tierversuch besser abschätzen zu können, wird der ELISA auch mit krudem Tetanustoxin durchgeführt. Dieses ist, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, einigen Aufreinigungsschritten, jedoch keiner Formaldehydbehandlung unterzogen worden. Der Grad der Aufreinigung entspricht in keiner Weise dem des in allen bisherigen Versuchen verwendeten, reinen TeNT. Nur ein geringer und nicht messbarer Teil des Gesamtproteins der Lösung ist tatsächlich Tetanustoxin, die Lösung enthält im wesentlichen ein nicht näher definiertes Gemisch aus Clostridienproteinen.

Die Toxizität der Lösung wurde vom Hersteller bestimmt, 1 Meerschweinchen-LD₅₀ entspricht demnach 1,5µg Gesamtprotein. Da Meerschweinchen im Test 1ml Toxinlösung injiziert wird, entspricht eine LD₅₀ also einer Konzentration von 1,5µg Protein pro Milliliter. Auf diese Weise kann die im ELISA eingesetzte Menge an krudem Toxin mit der Toxizität für Meerschweinchen korreliert werden.

Das krude Tetanustoxin wird zwischen 0 und 1,28 Meerschweinchen-LD₅₀ titriert. Die Messkurve zeigt nur zwischen 0 und 0,08 Meerschweinchen-LD₅₀ einen linearen Verlauf. Dies ist wichtig, weil nur bei einem linearen Verlauf der Messkurve in einer Regressionsanalyse die Nachweis- und Erfassungsgrenzen berechnet werden können. Dementsprechend wurden die Messwerte der höheren Toxinkonzentrationen aus der Linearitätsanalyse ausgeschlossen. Die Bindung des α -N-Terminus-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 ergibt ein Signal von 0,19 OD₄₅₀-Einheiten.

Das Programm DINtest errechnet für Messwerte zwischen 0-0,08 Meerschweinchen-LD₅₀ die Geradengleichung $y = 9,176x + 0,345$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9809$. Die Nachweisgrenze beträgt 0,049 Meerschweinchen-LD₅₀, die Erfassungsgrenze liegt bei 0,097 Meerschweinchen-LD₅₀.

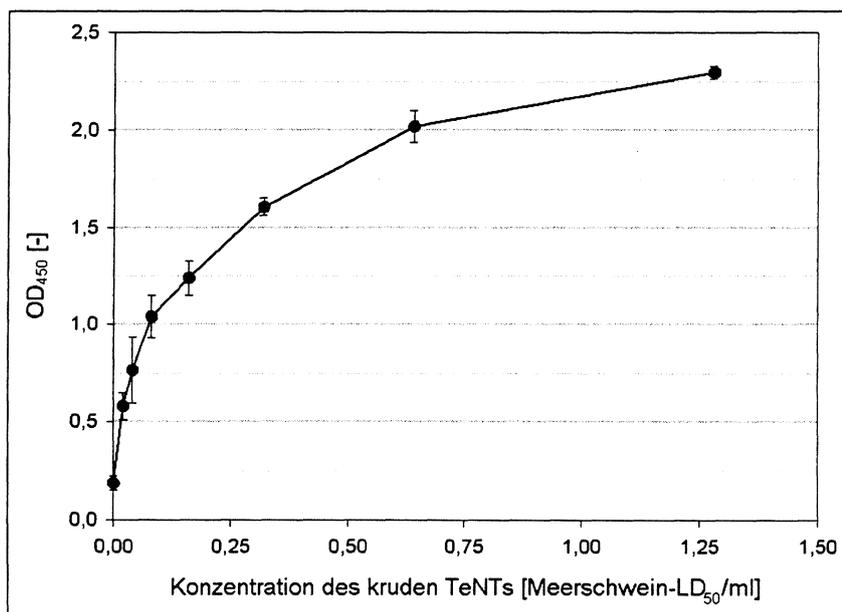
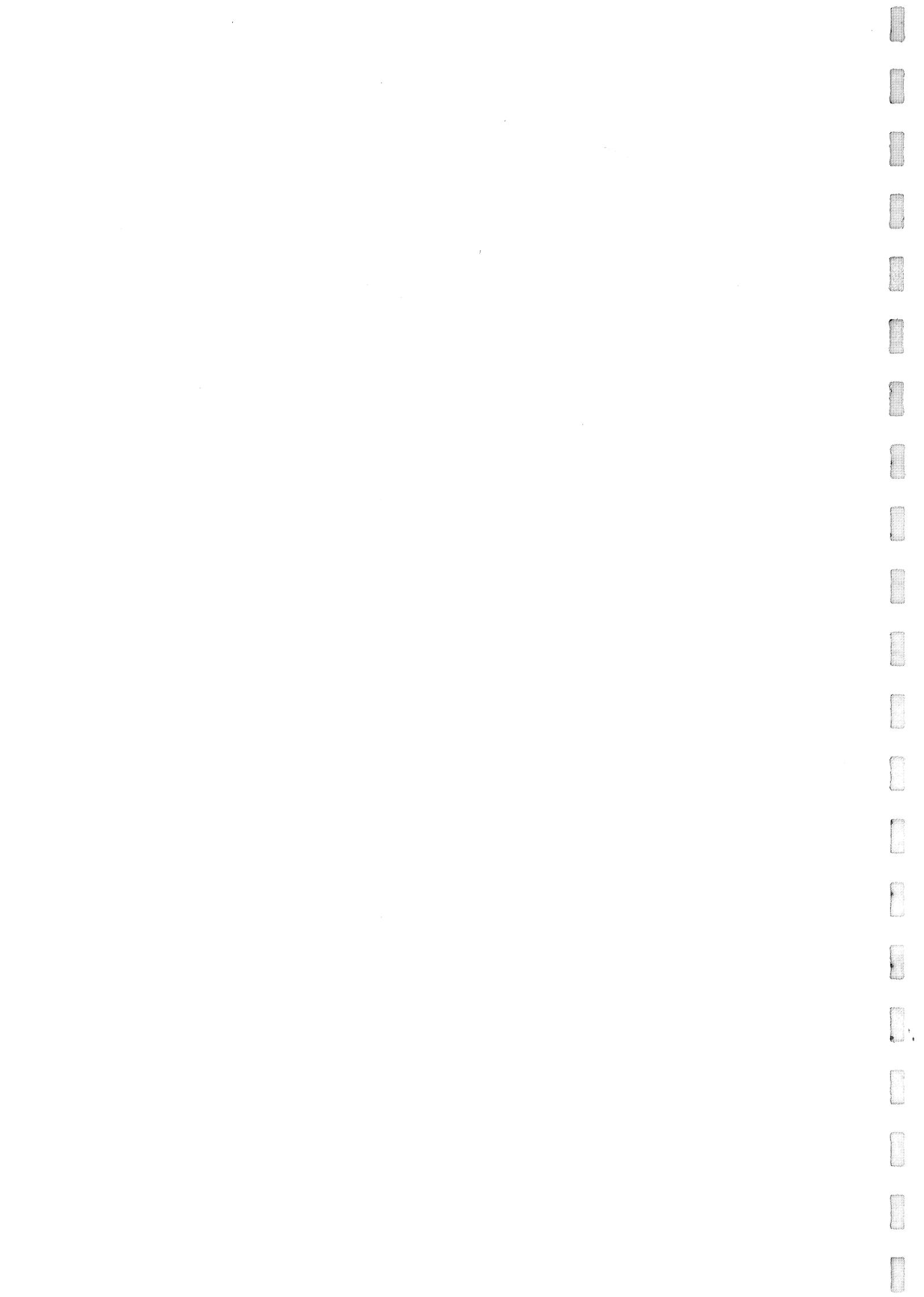


Abbildung 5.30: Sensitivität des ELISA für krudes TeNT. 1 Meerschweinchen-LD₅₀ entspricht 1,5 μ g Gesamtprotein pro Milliliter, aber nur ein geringer und nicht messbarer Teil des Gesamtproteins der Lösung ist Tetanustoxin, die Lösung enthält im wesentlichen ein nicht näher definiertes Gemisch aus Clostridienproteinen. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen mit vier bzw. sechs Parallelen



6 Diskussion

6.1 Essentielle Komponenten für den ELISA

6.1.1 Herstellung der rSyb2-Fragmente

Die vorliegende Arbeit beschreibt zunächst die Herstellung von drei rekombinanten Synaptobrevin-2-Fragmenten, wobei die DNA für das Fragment rSyb2(N;1-97) als Vorlage zur Amplifikation der DNA-Fragmente rSyb2(C;1-97) und rSyb2(C;27-97) diente. Die hergestellten Expressionsvektoren wurden durch Kolonie-PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert. Sie enthalten in den überprüften Bereichen keine Mutationen.

Mit dem Vektor pET15b_rSyb2(N;1-97) wurden drei *E. coli*-Stämme transformiert, um Wachstum und Expression von rSyb2(N;1-97) zu vergleichen. Die Zellen sollen nach einer kurzen Anwuchsphase bis zur Induktion der Proteinexpression exponentiell wachsen. Danach wäre die weitgehende Umstellung des Stoffwechsels zugunsten der Proteinexpression optimal, dabei muss den Zellen aber noch ausreichend Energie zur Zellerhaltung bleiben, weil sonst der Stoffwechsel kollabiert.

E. coli BLR(DE3) zeigt nach einer kurzen Anwuchsphase bis zum Abbruch der Expression ein annähernd lineares Wachstum. Der Zellstoffwechsel wird offenbar nach der Induktion mit IPTG nur teilweise auf die Proteinexpression umgestellt und *E. coli* BLR(DE3) verwendet viel Energie für das weitere Wachstum. Die Proteinausbeute ist mit ca. 1g rSyb2(N;1-97) aus 1 Liter Medium gering.

E. coli Tuner(DE3) braucht im Vergleich etwa die 2,5fache Zeit zum Anwachsen, was den Zeitbedarf für den gesamten Versuch erheblich erhöht. Im Anschluss beschleunigt sich das Wachstum bis zur Induktion. Danach verlangsamt es sich wieder, die Bakterien stellen ihren Stoffwechsel deutlicher zugunsten der Proteinsynthese um als *E. coli* BLR(DE3). Zusätzlich könnte die intrazelluläre Verfügbarkeit des IPTG ein limitierender Faktor in der Expression sein, denn mit *E. coli* Tuner(DE3) kann die Proteinausbeute etwa vervierfacht werden.

Die Wachstumskurve von *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3) entspricht den Vorgaben am besten, da eine kurze Anwuchsphase, bis zur Induktion exponentielles und anschließend ein verlangsamtes Wachstum zu verzeichnen sind. Eine Stunde nach der Induktion stagniert das Wachstum, und die OD₆₀₀ bleibt konstant. Die Proteinausbeute steigt mit diesem Stamm auf fast 10 g/l.

E. coli BL21 CodonPlus(DE3)-RP stellt tRNAs für die Codons AGG, AGA (Arginin) und CCC (Prolin) zur Verfügung. AGG und AGA sind die von *E. coli* am seltensten verwendeten Codons [131], deshalb sind sie besonders häufig für das sogenannte „Hungry Codon Syndrom“ verantwortlich [131,132]. Dieses beruht auf einem Mangel an den für die Translation von mRNA benötigten tRNAs und führt zu Mutationen wie der Substitution der Aminosäure, der Verschiebung des Leserasters oder dem Abbruch der Translation. Die Ursache ist die teils beträchtliche Varianz, mit der

Pro- und Eukaryoten die 64 Codons verwenden, die Folge ist oft eine Limitation der Expression eukaryotischer Proteine wie Synaptobrevin-2 in prokaryotischen Zellen wie *E. coli*. Abbildung 5.1 verdeutlicht dies am Beispiel der Arginin- und Prolincodons: Für diese beiden Aminosäuren ist die Häufigkeit aufgetragen, mit der jeder Codon in *E. coli* oder im Gen für rSyb2(N;1-97) vorkommt. Zur weiteren Verdeutlichung wurde noch der Quotient aus der Häufigkeit eines Codons in rSyb2 zur Häufigkeit in *E. coli* gebildet. Ist dieser Quotient kleiner als 1,0, wird der entsprechende Codon in rSyb2 seltener gebraucht als in *E. coli*, beträgt er 1,0, wird er gleich häufig verwendet. Ein Wert von mehr als 1,0 bedeutet, dass die den Codons der entsprechenden tRNAs bei der Synthese von rSyb2 häufiger benötigt werden als zur Synthese bakterieller Proteine. Für die Arginincodons AGG und AGA ist das der Fall: Fast die Hälfte (43%) der in rSyb2(N;1-97) enthaltenen Arginine werden durch sie codiert, in *E. coli* werden aber nur 8% des Arginins durch diese Codons repräsentiert. Der hohe Bedarf der entsprechenden tRNAs während der rSyb2-Expression kann die Kapazitäten des bakteriellen Expressionsapparates deshalb weit überschreiten. Im Gegensatz dazu scheint der zusätzliche Prolincodon CCC für die Expression in *E. coli* nicht notwendig zu sein, weil drei Viertel der Prolin in rSyb2 durch die Codons CCG und CCT codiert werden.

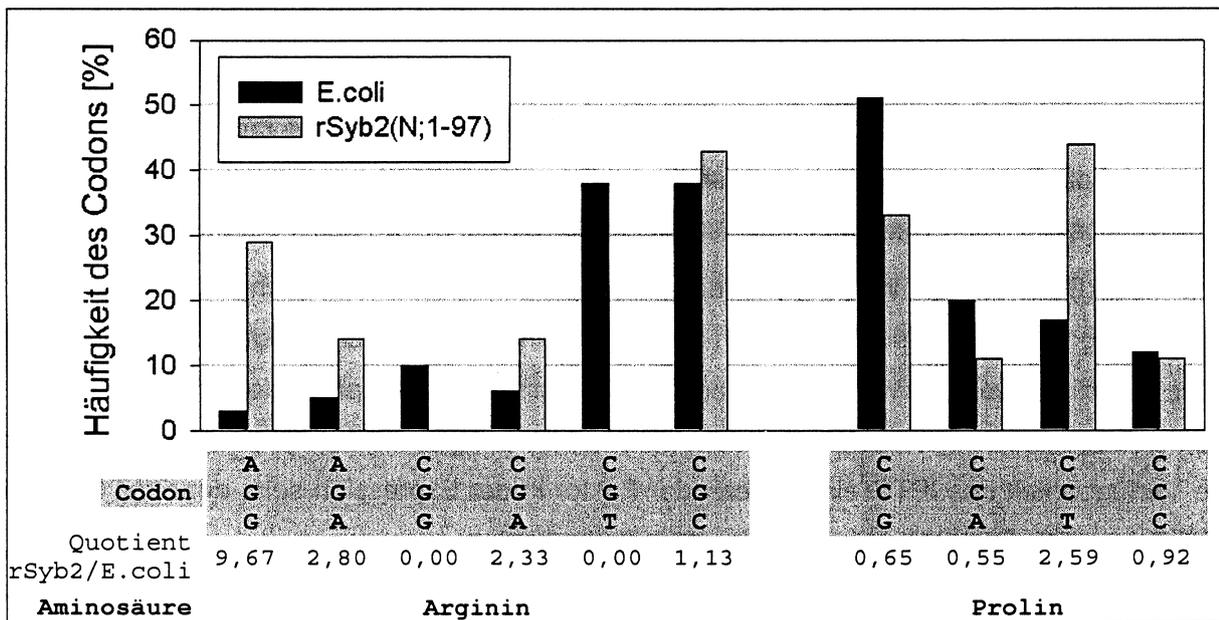


Abbildung 6.1: Häufigkeit der einzelnen Arginin- und Prolincodons im *E. coli*-Genom und in der rSyb2(N;1-97)-DNA. (Daten erhalten durch Eingabe der rSyb2-Basensequenz in <http://gcua.schoedl.de>; 19.02.2004).

Abbildung 9.4 im Anhang zeigt, wie häufig jeder einzelne Codon aus rSyb2(N;1-97) durch *E. coli* verwendet wird. 24 der Codons werden mit einer Häufigkeit von unter 20%, 8 davon sogar unter 10% verwendet. Die Bereitstellung der zusätzlichen Arginin-tRNAs mindert oder deckt also deren hohen Bedarf bei der rSyb2-Expression durch *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP und steigert die Proteinausbeute.

Für die anderen beiden rSyb2-Fragmente ergibt sich fast das gleiche Bild wie für rSyb2(N;1-97): rSyb2(C;1-97) ist in Bezug auf die hier diskutierten Codons identisch zu rSyb2(N;1-97), während rSyb2(C;27-97) kein Prolin- und nur 6 statt 7 Argininreste enthält. Deshalb werden alle rSyb2-Fragmente im *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RP exprimiert.

Durch den Scale-Up kann die Proteinausbeute der Expression nicht weiter gesteigert werden, aber allein aufgrund des 16fachen Kulturvolumens wird natürlich eine entsprechend größere Proteinmasse gewonnen. Außerdem lassen die Daten aus der pH-Regelung einen tieferen Einblick in die Stoffwechselprozesse von *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP zu. Bereits kurz nach Beginn der Fermentation bei einer noch sehr geringen Zelldichte muss der pH-Wert mit Lauge titriert werden, was ein eindeutiges Signal für den Gärungsstoffwechsel und die Säureproduktion der Bakterien ist. Offensichtlich ist die Kultur also bereits ab einer sehr frühen Wachstumsphase sauerstofflimitiert. Dieser ungünstige Umstand kann nicht verändert werden, da die Begasung des Fermenters mit Sauerstoff aus technischen Gründen nicht möglich ist.

Sofort nach der Induktion der Proteinexpression ist ein linear ansteigender Salzsäureverbrauch zu beobachten. Das spricht für eine kontinuierliche Freisetzung von Ammonium, welches aus dem Abbau der Aminosäuren aus dem Medium stammen könnte. Zur Proteinsynthese sollen die Bakterien aber die Aminosäuren aus dem Medium direkt verwenden oder - z. B. im Fall des hohen Bedarfs an Arginin- und Prolin - durch Metabolisierung anderer Aminosäuremoleküle synthetisieren. Die Ammoniumfreisetzung spricht dafür, dass die Aminosäuren parallel als Kohlenstoffquelle herangezogen werden. Ihr Abbau liefert wichtige Metabolite der intermediären Stoffwechselwege, so führt z. B. die oxidative Desaminierung von Glutaminsäure durch Glutamat-Dehydrogenase zu 2-Oxoglutarat, einem Intermediat des Tricarbonsäure-Zyklus. Nach dieser Hypothese unterläge die Produktbildung durch *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RP einer Kohlenstofflimitation. Da keine Gerätschaften zur Stickstoffanalytik zur Verfügung stehen, kann die Hypothese nur indirekt untersucht werden, z. B. müsste die rSyb2-Ausbeute durch kontinuierliche Zufütterung einer Kohlenstoffquelle nach der IPTG-Zugabe (also der Durchführung der Fermentation im Fed-Batch-Verfahren) gesteigert werden können. Das Zufütterungstempo sollte gering sein, um eine wiederholte Umstellung des Stoffwechsels zugunsten des Wachstums zu verhindern.

Für die rSyb2-Aufreinigung hat sich die Präparation der Inclusion Bodies aus den *E. coli*-Zellen mit der anschließenden Metallaffinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen als optimal erwiesen. Zunächst erleichtert die Hydrolyse der Nukleinsäuren während der Zell-Lyse die Durchführung der Chromatographie, weil dadurch die Viskosität der rSyb2-Lösung verringert wird. Die SDS-PAGE der Überstände aus der Präparation der Inclusion Bodies (s. Abbildung 5.9) zeigt, dass ein großer Teil des gelösten Proteins entfernt werden kann. Dass ein Rest bakterielles Protein in den Chromatographieschritt eingebracht wird, untermauert die Notwendigkeit für diesen zusätzlichen Aufreinigungsschritt. Die Proteine sind wahrscheinlich an die Inclusion Bodies adsor-

bierte Membranproteine oder sie entstammen Zellen, die erst unter Harnstoffeinfluss lysiert werden.

Im Gegensatz zur Aufreinigung ohne vorherige Präparation der Inclusion Bodies muss während der Metallaffinitätschromatographie aber nur noch wenig Protein entfernt werden, und das Ergebnis ist rSyb2 ohne detektierbare Verunreinigung durch Fremdprotein.

Die renaturierende Aufreinigung hat im Vergleich zur Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen den Vorteil, dass durch die Kopplung von Chromatographie und Proteinfaltung ein Versuchsschritt (die Dialyse) eingespart werden könnte. Es zeigt sich aber, dass die Elution des renaturierten rSyb2s von den Agarosebeads nur mangelhaft funktioniert. Offenbar ist es nicht möglich, die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Histidinresten des rSyb2s und den Nickelionen der Matrix zu lösen. Möglicherweise faltet sich das Protein derart um sein Histidin₆-tag, dass die Bindungsstelle für die Protonen des Puffers nur schlecht zugänglich ist. Das Resultat ist ein hoher Proteinverlust durch viel auf der Matrix gebundenes, nicht eluierbares rSyb2.

Zur Renaturierung wird das rSyb2 umgepuffert. Dafür wurde die Dialyse als ein Verfahren zur langsamen, kontinuierlichen Entfernung des Harnstoffs gewählt. Die Zusammensetzung des Dialysepuffers ist für die korrekte Faltung des rSyb2s entscheidend. Das angewendete Screeningverfahren hilft beim schnellen und effizienten Ermitteln geeigneter Puffer bzw. Pufferzusätze. Dazu zählen Salze (Magnesium- Zink-, Calciumchlorid, Ammoniumsulfat), Zucker, kurzkettige Alkohole, geringe Konzentrationen von Chaotropen (Harnstoff, Guanidinhydrochlorid), L-Arginin, Tris, Polyethylenglycol und Detergenzien (nicht-ionisch, zwitterionisch, ionisch) [120-122,128]. Da das Screeningverfahren auf einem Verdünnungsschritt beruht, bei dem die Harnstoffkonzentration schlagartig gesenkt wird, müssen mögliche Puffer in der Dialyse überprüft werden.

Die Ergebnisse des Screenings sind eindeutig: Nur der NaCl/Tris-Puffer (pH 7,4) sowie der Natriumacetat-Puffer (pH 4,5-5,0), jeweils mit 0,05% Triton-X-100, sind überhaupt in der Lage, auch nur einen Teil des rSyb2 in löslicher Form zu halten. Alle getesteten Pufferzusätze sowie andere Detergenzien führen wie 0,4 M MgSO₄, das in Abbildung 5.10 beispielhaft gezeigt ist, zur vollständigen Aggregation des rSyb2s. Die Dialyse der rSyb2-Lösung gegen die beiden genannten Puffer stützt die Entscheidung für die langsame und kontinuierlich Harnstoffentfernung zur rSyb2-Renaturierung: Durch die Verdünnung aggregiert zumindest ein Teil des rSyb2s, in der Dialyse kann es vollständig renaturiert werden.

Die Titrationskurve (s. Abbildung 6.2) liefert eine Erklärung für die Tendenz zur Aggregation während der Dialyse gegen NaCl/Tris-Puffer mit einem pH von 7,4: Im Bereich zwischen pH 7,0 und 9,0 verläuft die Titrationskurve sehr nah an der Ordinate, das rSyb2 ist in diesem pH-Bereich nahezu ungeladen und seine Löslichkeit ist gering. pH-Änderungen in diesem Bereich ändern den Ladungszustand des rSyb2s nicht. Beim pH-Wert des Natriumacetat-Puffers (pH 5,0) ist rSyb2(N;1-97) stark positiv geladen, so dass die Löslichkeit der Moleküle bedeutend höher ist.

Warum das rSyb2 während der Dialyse gegen NaCl/Tris-Puffer manchmal aggregiert und manchmal nicht, ist unklar. Möglicherweise ist die Aggregation von der rSyb2-Konzentration in der Lösung oder von Art oder Konzentration der Verunreinigungen abhängig.

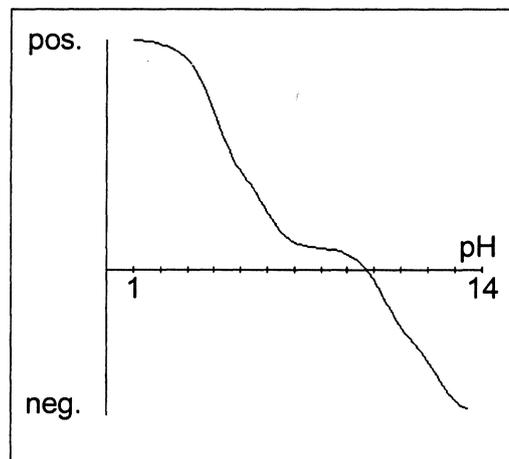


Abbildung 6.2: Titrationskurve für rSyb2(N;1-97). Aufgetragen ist die Gesamtladung des Moleküls in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung (erhalten durch Eingabe der Aminosäuresequenz in http://w3up.univ-mrs.fr/wabim/d_abim/; 19.01.2004).

Die Titrationskurven für die anderen beiden rSyb2-Fragmente verlaufen sehr ähnlich, nur liegen die Isoelektrischen Punkte bei pH 8,89 (im Gegensatz zu pH 9,16 für rSyb2(N;1-97)). Für alle drei rSyb2-Fragmente ist also eine ähnliche Löslichkeit zu erwarten, deshalb werden alle drei Fragmente zur Renaturierung gegen 20mM Natriumacetat-Puffer bei pH 5,0 dialysiert.

Der Vergleich von unterschiedlich aufgereinigtem rSyb2 im ELISA (Abbildung 5.25) zeigt den großen Einfluss dieses Schritts, weil in Abhängigkeit vom Aufreinigungsprotokoll eine starke Bindung des α -N-Terminus-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 bewirkt wird. Wie genau dieser Effekt bewirkt wird, ist unklar.

Die verglichenen rSyb2-Präparationen sind wahrscheinlich unterschiedlich stark mit Fremdprotein verunreinigt. Dies könnte die Proteinfaltung während der Dialyse gestört haben, so dass das Epitop des α -N-Terminus-Antikörpers sehr exponiert ist. Dieses könnte bei geringer Antigenkonzentration auf der Mikrotiterplatte für den Antikörper vielleicht besonders gut zugänglich sein, während Konzentrationen von über 800nM zur dichten Packung der Proteinmoleküle auf der Plattenoberfläche und vor der Spaltung zur Verdeckung des Epitops führen.

Die aufgereinigten rSyb2-Fragmente werden durch Tetanustoxin gespalten (s Abbildung 5.13), dabei entstehen Proteinfragmente der erwarteten Größen (vgl. Abbildung 5.14). Das größere Spaltfragment ist jeweils als kompakte Bande sehr gut erkennbar. Die Banden der kleineren Spaltfragmente wirken im Coomassie-Gel etwas diffus, weil bei dieser Größe die Auftrennungskapazität des Acrylamidgels überschritten ist. Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit Größen ab 2 kDa in Acrylamidgelen ist ein Tris/Tricin-Puffersystem eigentlich besser geeignet als das hier verwendete Tris/Glycin-Puffersystem. rSyb2 kann aber in einem Tris/Tricin-Gel nach der Auftren-

nung nicht angefärbt werden (Gele nicht abgebildet), deshalb muss mit Tris/Glycin-Gelen gearbeitet werden.

6.1.2 Antikörper gegen Synaptobrevin-2 und gegen die TeNT-Spaltfragmente

Zur Detektion von rSyb2 und den TeNT-Spaltfragmenten stehen fünf Antikörper zu Verfügung, die zunächst im Immunoblot verglichen werden (s. Abbildung 5.15). Von den drei kommerziell erhältlichen Antikörpern ist der α -Histidin₆-tag-Antikörper zur Detektion von rSyb2 nicht geeignet, da das Histidin₆-tag scheinbar für den Antikörper nicht zugänglich ist.

Der monoklonale α -VAMP2-Antikörper detektiert nur die beiden längeren rSyb2-Fragmente, und zwar nur, wenn sie ungespalten vorliegen. Dies entspricht den Ergebnissen der Herstellerfirma, die durch Behandlung von Synaptobrevin-2 mit Botulinumtoxin B ein zur Spaltung mit Tetanustoxin identisches Spaltprodukt generierten und dieses mit dem Antikörper ebenfalls nicht mehr detektieren konnten. Das Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass das N-terminale Spaltfragment eine andere Konformation annimmt als die ungespaltenen rSyb2-Fragmente. Durch diese Änderung in der Proteinfaltung wird das Epitop des monoklonalen α -VAMP2-Antikörpers dann offenbar maskiert. Das Fragment rSyb2(C;27-97) wird nicht detektiert, weil es das Epitop dieses Antikörpers nicht enthält.

Das Muster der Banden der anderen drei Antikörper entspricht nicht vollständig den Erwartungen, die Spaltprodukte von rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) verhalten sich konträr zu denen von rSyb2(C;27-97).

Der polyklonale α -VAMP2-Antikörper sollte an alle ungespaltenen Proteine wie auch die N-terminalen Spaltfragmente binden, aber das 5,8 kDa große Spaltfragment von rSyb2(C;27-97) wird nicht erkannt. Der α -N-Terminus-Antikörper detektiert nur die N-terminalen Spaltfragmente von rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97). Dagegen bindet der α -C-Terminus-Antikörper ausschließlich an das C-terminale Spaltfragment von rSyb2(C;27-97), obwohl er die entsprechenden Spaltfragmente der anderen rSyb2s ebenfalls detektieren sollte.

Dieses gegensätzliche Verhalten der Antikörper könnte in der unterschiedlichen Länge oder Konformation der rSyb2-Spaltprodukte begründet sein. Während die C-terminalen Spaltprodukte der längeren rSyb2-Fragmente 21 bzw. 23 Aminosäuren enthalten, besteht das Spaltprodukt von rSyb2(C;27-97) aus 31 Aminosäuren. Das Epitop des α -C-Terminus-Antikörpers nimmt davon 10 Aminosäuren ein. Möglicherweise bindet der Antikörper erst an das 31 Aminosäuren lange Peptid.

Auch die Konformationen der Spaltfragmente kann die Bindung der Antikörper bedingen. Die (identischen) N-terminalen Spaltprodukte von rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) nehmen demnach eine Konformation an, welche die Bindung von α -VAMP2 (pAK) und α -N-Terminus ermöglicht. An das N-terminale Spaltprodukte von rSyb2(C;27-97) binden diese Antikörper aufgrund einer ande-

ren Konformation jedoch nicht. Dieser Effekt würde zudem die Differenzierung zwischen ungespaltenen und gespaltenen rSyb2-Fragmenten durch den monoklonalen α -VAMP2 sowie durch α -N- und α -C-Terminus-Antikörper erklären.

Mit den beiden α -VAMP2-Antikörpern kann die Hydrolyse von rSyb2 detektiert werden. Problematisch wäre jedoch eine Situation, in der ein Toxoid eine Clostridienprotease enthält, die das rSyb2 unspezifisch spaltet. Auch wenn kein aktives TeNT in diesem Toxoid enthalten wäre, würden die α -VAMP2-Antikörper ihr Epitop im entstandenen Spaltprodukt möglicherweise nicht detektieren können, und es käme zu einem falsch-positiven Ergebnis. Die Spezifität der Methode ist in diesem Fall also nicht gewährleistet. Solange nur die Aktivität eines sehr gut aufgereinigten Toxinpräparats untersucht wird, spielt diese Tatsache keine Rolle, weil das Tetanustoxin ausschließlich die Peptidbindung Q₇₆-F₇₇ in Synaptobrevin-2 hydrolysiert.

Die beiden Antikörper gegen die TeNT-Spaltstelle im Synaptobrevin lassen dagegen wesentlich eindeutiger Aussagen über die proteolytische Aktivität zu, weil sie jeweils gegen eine der beiden Seiten der Spaltstelle gerichtet sind. Zur näheren Charakterisierung der Antikörperspezifität wurde die Bindung an die rSyb2-Spaltprodukte im ELISA mit unterschiedlichen Peptiden kompetitiv gehemmt. Diese stellen jeweils kurze Sequenzen aus dem Bereich um die TeNT-Spaltstelle dar. Die Peptide, gegen die die beiden Antikörper in Kaninchen hergestellt wurden, binden erwartungsgemäß besonders gut und unterbinden die Erkennung des jeweiligen rSyb2-Spaltprodukts im ELISA. Der affinitätsgereinigte α -N-Terminus-Antikörper zeigt eine höhere Spezifität als der α -C-Terminus-Antikörper, weil dieser als nicht aufgereinigtes Serum verwendet wird.

Die Versuche identifizieren den α -N-Terminus-Antikörper als hochspezifisches Werkzeug zur Detektion von Tetanustoxin (s. Abbildung 5.11). Zum einen differenziert der Antikörper sehr gut zwischen ungespaltenem und gespaltenem rSyb2. Des Weiteren wird er nur durch das Peptid gehemmt, das an der N-terminalen Seite der TeNT-Spaltstelle in Synaptobrevin-2 liegt (Peptid CLQAGASQ) und gegen das er hergestellt wurde. Die Verschiebung um oder die Addition von nur einer Aminosäure führt dazu, dass der Antikörper durch das entsprechende Peptid nicht mehr hemmbar ist. Würde rSyb2 also durch eine fremde Clostridienprotease im Toxoid in der Nähe der Peptidbindung Q₇₆-F₇₇ gespalten, dürfte der α -N-Terminus-Antikörper das entstandene Spaltprodukt demnach nicht detektieren. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Signale im ELISA gesenkt und dieser wird spezifischer.

Auch der α -C-Terminus-Antikörper wird am stärksten durch das Peptid gehemmt, gegen das er hergestellt wurde (Peptid FETSAAKLKRC) (s. Abbildung 5.12). Bei diesem Antikörper ist der Vergleich der Bindungen an ungespaltenes und gespaltenes rSyb2 sehr interessant, weil die Peptide einen unterschiedlichen Einfluss auf die beiden Bindungen haben. Dies ist dadurch erklärbar, dass der α -C-Terminus-Antikörper eine polyklonale Mischung aus Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität ist. Das Peptid LQAGASQFETSAAKL unterbindet im Wesentlichen die Bindung an un-

gespaltenes rSyb2, möglicherweise „filtert“ es regelrecht die entsprechenden Antikörper, so dass Antikörper übrig bleiben, die das rSyb2-Spaltprodukt besonders gut detektieren. Umgekehrt binden die drei Peptide FETSAAKLKRC, FETSAAKLKRKYWWKC und FETSAAKLKRKYWWKLNKMMC ganz besonders die Antikörper, die das durch TeNT gespaltene rSyb2(C;27-97) erkennen. Die Folge ist, dass für die Bindung an das rSyb2-Spaltprodukt nur noch Antikörper zur Verfügung stehen, die gespaltenes und ungespaltenes rSyb2 gleich gut erkennen, so dass die Mess-Signale in den Ansätzen mit und ohne TeNT gleich hoch sind.

Insgesamt zeigt der α -N-Terminus-Antikörper im Vergleich zum α -C-Terminus-Antikörper nur eine geringe Tendenz zur Bindung an das ungespaltene rSyb2, die aber mit einer sehr guten Erkennung des rSyb2-Spaltprodukts einhergeht. Eine wesentliche Determinante dieses Unterschieds dürfte die Affinitätsreinigung sein, aber die Ausrichtung und die Erreichbarkeit der Epitope könnten ebenfalls zu den Unterschieden zwischen den Antikörpern führen.

6.2 Aufbau des ELISA

Die Ergebnisse der Immunoblots lassen sich nicht einfach auf einen ELISA übertragen, weil die Proteine anders an eine Mikrotiterplatte binden könnten als an die Nitrocellulosemembran. Zudem wurden sie für die elektrophoretische Auftrennung denaturiert, und es ist unbekannt, ob sich Proteine während oder nach der Übertragung aus dem Polyacrylamidgel wieder in ihre native Form zurückfalten können. Deshalb müssen die Spaltung der rSyb2-Fragmente und die Detektion durch die Antikörper ausführlich getestet werden. Zudem zeigen die Ergebnisse, wie wichtig die Immobilisierung des rSyb2 für die Sensitivität des ELISA ist.

6.2.1 Reihenfolge von Spaltung und Immobilisierung des rSyb2s

In den Untersuchungen zur Reihenfolge von Spaltung und Immobilisierung von rSyb2(N;1-97) (s. Abschnitt 5.5.1) wurde die Abnahme des ungespaltenen rSyb2 mit monoklonalem α -VAMP-Antikörper bzw. die Zunahme des N-terminalen Spaltprodukts mit α -N-Terminus-Antikörper detektiert.

Mit α -VAMP (mAK) kann ein mit der TeNT-Konzentration abnehmendes Mess-Signal gezeigt werden, das mit 45 μ g/ml TeNT einen konstanten Wert erreicht (s. Abbildung 5.16). Bei einer vollständigen Spaltung des Synaptobrevins würde man entsprechend eine vollständige Abnahme des Signals erwarten. Da der Antikörper nicht unspezifisch an die Mikrotiterplatte bindet (Daten nicht abgebildet), muss davon ausgegangen werden, dass entweder das Synaptobrevin nicht vollständig gespalten wird oder dass der Antikörper in geringem Maß das Spaltprodukt detektiert.

Mit α -N-Terminus-Antikörper wird bei etwa 22,5 μ g/ml TeNT ein maximales Signal erreicht. Die weitere Erhöhung des Spaltsignals wird wahrscheinlich durch einen Parameter wie die Verfügbarkeit von Substrat oder die Abnahme der Enzymaktivität limitiert.

Die insgesamt eher geringe Sensitivität des Assays beim Spaltansatz in Lösung mit anschließender Immobilisierung ist unerwartet. Ein möglicher Grund ist eine ungleiche Bindung von ungespaltenem und gespaltenem rSyb2. Das Verhältnis zwischen den Polypeptiden könnte sich durch die Immobilisierung an die Festphase verschieben, wenn ungespaltenes rSyb2 deutlich besser bindet als das N-terminale Spaltprodukt. Bei einer solch selektiven Bindung müsste die Abnahme des ungespaltenen rSyb2s sehr viel sensitiver detektiert werden können als die Detektion des Spaltprodukts. Die vorliegenden Ergebnissen zeigen jedoch nur eine etwa vierfache Sensitivität (750ng/ml gegenüber 3µg/ml TeNT), die eher auf Unterschiede der verwendeten Antikörper, z. B. die Affinität und die Erreichbarkeit des jeweiligen Epitops, zurückzuführen ist.

Um die Immobilisierung des rSyb2s an die Festphase als möglichen Schwachpunkt des Assays weiter zu untersuchen, wurden die rSyb2-Fragmente auch an NiNTA-Mikrotiterplatten gebunden. Im Vergleich zur ungerichteten Bindung des rSyb2s sollte theoretisch eine höhere Sensitivität erreicht werden können, weil die Spaltstelle, also das Epitop des α -N-Terminus-Antikörpers, durch die gerichtete Bindung über den Histidin₆-tag in die Lösung ragen und für den Antikörper besonders gut zugänglich sein müsste. Zudem sollte das C-terminale Spaltfragment, das keinen Histidin₆-tag enthält, an der Platte keine Bindungsstellen besetzen können. Aber die Sensitivität für die Detektion des ungespaltenen rSyb2 ist etwa hundertmal und für die Detektion des Spaltprodukts etwa fünfzigmal geringer. Die oben dargestellte Theorie setzt voraus, dass ungespaltenes und gespaltenes rSyb2 gleich gut an die Festphase binden. Der Immunoblot des nicht an die Mikrotiterplatte gebundenen Proteins zeigt, dass nur das ungespaltene rSyb2 an die NiNTA-Platten gebunden werden kann. Im Kontrollansatz ist es nur schwach im Überstand detektierbar, weil es an der Platte gebunden vorliegt. Der Spaltansatz zeigt die vollständige Spaltung an: Das ungespaltene Fragment ist weder im Überstand noch auf der Platte gebunden nachweisbar, dafür enthält der Überstand sehr viel N-terminales Spaltprodukt. Dies ist eine weitere Bestätigung dafür, dass das N-terminale rSyb2-Spaltfragment eine andere Konformation annimmt als das ungespaltene rSyb2, wodurch der Histidin₆-tag nicht mehr an die NiNTA-Matrix binden kann.

Die Versuche mit dem alternativen Assay-Aufbau (Spaltung des zuvor immobilisierten rSyb2s) deuten eine viel höhere Sensitivität dieses Systems an. Das könnte auf die bessere Spaltbarkeit von gebundenem gegenüber gelöstem Synaptobrevin-2 zurückzuführen sein [124]. Diese These impliziert, dass die Ausrichtung des Synaptobrevin-2 keine Rolle für die Aktivität des Tetanustoxins spielt. Denn im Neuron ist Synaptobrevin über den C-Terminus in der Vesikelmembran verankert und nach der Spaltung bleibt das C-terminale Spaltfragment gebunden. Wäre diese Ausrichtung für die Aktivität des Toxins entscheidend, dann wäre seine Wirkung mit dem α -N-Terminus-Antikörper, der das gebundene N-terminale Spaltfragment detektiert, nicht nachweisbar.

Die Abnahme des ungespaltenen rSyb2s ist mit den untersuchten TeNT-Konzentration nicht detektierbar. Möglicherweise ist der Anteil des ungespaltenen rSyb2s auf der Platte noch so hoch, dass der Antikörper nicht zwischen den Ansätzen mit und ohne TeNT differenzieren kann.

6.2.2 Auswahl des rSyb2-Fragments

Der ELISA funktioniert am besten, wenn rSyb2(N;1-97) ungerichtet an die Festphase immobilisiert und das N-terminale Spaltprodukt detektiert wird.

Insgesamt offenbart der ELISA große Unterschiede zwischen den rSyb2-Fragmenten. Ob die Unterschiede durch die Spaltung oder die Detektion mit den jeweils verwendeten Antikörper determiniert werden, ist meist nicht differenzierbar. Theoretisch sollten der Histidin₆-tag, die Aminosäuren 1-27 und die am C-Terminus addierten Aminosäuren für die Spaltung des Tetanustoxins und für die Erkennung der Epitope durch die Antikörper zwar keine Rolle spielen, aber besonders das Verhalten von Proteinen mit artifiziellen Modifikationen ist nicht vorhersehbar. Unterschiede können z. B. durch eine unterschiedliche Immobilisierung an die Festphase hervorgerufen werden - dass dies einen Einfluss auf die Detektion durch Antikörper hat, kann man besonders gut im Vergleich verschiedener Festphasen erkennen (s. Abbildung 5.23).

So funktioniert die Detektion des N-terminalen Spaltprodukts (mit dem α -N-Terminus-Antikörper, s. Abbildung 5.19) von ungerichtet gebundenem rSyb2(N;1-97) wesentlich besser als von rSyb2(C;1-97), obwohl das N-terminale Spaltprodukt der beiden Fragmente identisch ist. Der Vergleich mit den Ergebnissen im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel (s. Abbildung 5.13) und im Immunoblot (s. Abbildung 5.15) gibt keinen genauen Aufschluss darüber, ob beide Fragmente gleich gut gespalten werden: Im Polyacrylamidgel ist ein Rest ungespaltenes rSyb2(C;1-97) erkennbar, der Immunoblot zeigt aber keine Unterschiede. Die Differenz zwischen diesen Fragmenten im ELISA könnte also auf einer etwas unterschiedlichen Bindung an die Festphase beruhen, die sich negativ auf den weiteren Verlauf des Tests auswirkt. Wenn rSyb2(C;1-97) z. B. auch mit dem Cysteinrest an die Mikrotiterplatte bände, dann würde nach der Spaltung das C-terminale Spaltfragment an der Platte verbleiben, welches mit α -N-Terminus-Antikörper nicht detektierbar ist. Das Mess-Signal müsste dann geringer ausfallen, als wenn alle Bindungsstellen mit dem N-terminalen Spaltstück belegt sind. Diese These wird dadurch gestützt, dass auch das N-terminale Spaltfragment von rSyb2(C;27-97) nicht gut detektierbar ist, wenn das Protein ungerichtet gebunden wird. Demgegenüber müsste in diesem Fall das C-terminale Fragment mit dem α -C-Terminus-Antikörper besonders gut nachweisbar sein. Dies ist zumindest mit dem kürzeren rSyb2-Fragment tatsächlich der Fall (s. Abbildung 5.20). An die beiden längeren rSyb2-Fragmente bindet der Antikörper bereits so stark, dass sich das Spaltsignal nicht mehr davon abhebt.

Im Immunoblot bindet der Antikörper interessanterweise weder an die ungespaltenen noch an die gespaltenen Polypeptide (s. Abbildung 5.15). In diesem Fall ist die Bindung an die Platte also ein-

deutig der bestimmende Faktor für die Ergebnisse des ELISA. Der Bereich um die Spaltstelle scheint nach der Immobilisierung so exponiert zu sein, dass der α -C-Terminus-Antikörper unabhängig von der Spaltung des Synaptobrevins daran binden kann. Dieser Umstand wird sicherlich dadurch begünstigt, dass das Epitop von einer Fraktion des polyklonalen Serums einige Aminosäuren von der TeNT-Spaltstelle entfernt liegt (s. Abbildung 5.12).

Die gerichtete Bindung von rSyb2 liefert keine entscheidenden Vorteile zur ungerichteten Bindung. Der α -C-Terminus-Antikörper ist nicht für die Antigendetektion auf NiNTA-Mikrotiterplatten geeignet, weil er stark unspezifisch an die Oberfläche bindet (s. Abbildung 5.21). Die Spaltung von rSyb2(C;27-97) ist nicht mehr vom Hintergrund zu unterscheiden. Auch der α -N-Terminus-Antikörper produziert einen erhöhten Hintergrund, aber er bindet direkt an die beiden längeren ungespaltenen rSyb2-Fragmente. Möglicherweise führt die Bindung über den N-Terminus zu einer stärkeren Exposition des Epitops. Warum die Messkurven bei beiden Fragmenten bei der Zugabe von 0,5ng/ml TeNT absinken, bevor sie mit der TeNT-Konzentration dann langsam wieder ansteigen, ist unklar. Möglicherweise bindet ein kleiner Teil der rSyb2-Fragmente nicht gerichtet an die Oberfläche und wird zunächst auch ungespalten detektiert.

Die beiden Fragmente rSyb2(N;1-97) und rSyb2(C;1-97) werden offensichtlich nicht gleich gut von TeNT gespalten, denn die Messkurve mit rSyb2(N;1-97) weist eine höhere Steigung auf. Dies ist ein recht deutliches Zeichen dafür, dass die Addition von zwei Aminosäureresten am C-Terminus einen Einfluss auf den ELISA hat, zumindest wenn die rSyb2-Fragmente über ihren Histidin₆-tag immobilisiert werden.

Die Bindung der Fragmente rSyb2(C;1-97) und rSyb2(C;27-97) über ihren C-terminalen Cysteinrest bewirkt die Exposition des Epitops des α -C-Terminus-Antikörpers, so dass dieser die ungespaltenen Fragmente erkennt. Dabei bindet der Antikörper stärker an rSyb2(C;1-97) als an das kürzere Fragment. Allerdings kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass alle gebundenen rSyb2-Fragmente ausschließlich über ihren C-Terminus an der Festphase verankert sind, so daß die Hintergründe durch eine teilweise ungerichtete Bindung an der Maleimid-Platte entstehen könnten. Die Spaltung und die Detektion der C-terminalen Spaltprodukte funktionieren bei beiden rSyb2-Fragmenten offensichtlich gleich gut, weil die Messkurven parallel verlaufen. Die hohen Standardabweichungen in der Messkurve von rSyb2(C;27-97) erschweren besonders die Auswertung der Datenpunkte, die mit geringen TeNT-Konzentrationen gewonnen werden und senken deshalb die Sensitivität dieses ELISA.

Die Regressionsanalyse der Daten aus den Beschichtungsversuchen (s. Tabelle 5.5) führt zu dem Entschluss, die Detektion des N-terminalen Spaltprodukts von ungerichtet gebundenem rSyb2(N;1-97) als Methode weiter zu optimieren.

6.2.3 Optimierung des ELISA

In der Optimierungsphase wurden unterschiedliche Varianten der einzelnen Versuchsschritte miteinander verglichen. Die beiden wesentlichsten Schritte bei der Optimierung sind die Beschichtung der Festphase und die Spaltung mit Tetanustoxin.

Zur Beschichtung eignen sich Platten, die Moleküle mit hydrophilen sowie hydrophoben Regionen binden (MaxiSorp, MediSorp) (s. Abbildung 5.23). Offensichtlich sind hydrophile Wechselwirkungen für die Adhäsion von rSyb2 entscheidend, da rSyb2 an PolySorp-Platten, die hydrophobe Moleküle binden, so gut wie gar nicht immobilisiert.

Auf MultiSorp-Platten wird der Einfluss der Mikrotiterplatte auf die Antigen-Antikörper-Bindung deutlich, weil hier die Bindung des α -N-Terminus-Antikörpers an ungespaltenes rSyb2 stark erhöht ist. Das rSyb2 bindet wahrscheinlich in einer Ausrichtung, die der Erkennung des Epitops im ungespaltenen Protein förderlich ist. Die Adhäsion eines Proteins an Polystyren wird im wesentlichen von van-der-Waals-Kräften, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen führen, und Hydrophobie bestimmt [133,134]. Die Ergebnisse mit den unterschiedlichen Plattentypen lassen vermuten, dass rSyb2 durch Wasserstoffbrückenbindungen an der Festphase immobilisiert, und dass hydrophobe Wechselwirkungen eine bestimmte Ausrichtung der Moleküle auf der Oberfläche begünstigen.

Die Beschichtung funktioniert am besten in PBS (s. Abbildung 5.24). Eine deutliche Abweichung des pH-Wertes vom neutralen Bereich führt zu einer Verschlechterung der Ergebnisse. Die Ladung des rSyb2s, die es bei den getesteten pH-Werten 5,0, 6,0 und 9,6 hat, ist also hinderlich für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Polystyrenoberfläche. Vielleicht sind die ionischen Wechselwirkungen zwischen rSyb2-Molekülen und Pufferbestandteilen so stark, dass sich keine Bindung zwischen Platte und rSyb2 ausbilden kann. Da der genaue Mechanismus, mit dem Proteine an Plastik haften, nicht bekannt ist [134], lässt sich die Bindung von rSyb2 an Mikrotiterplatten hier nicht näher charakterisieren. HEPES hat zwar auch einen pH-Wert im neutralen Bereich, aber der ELISA funktioniert auch in diesem Puffer nicht so gut wie in PBS. In Übereinstimmung mit dem Beschichtungsschritt wird für die weiteren Versuchsschritte ebenfalls PBS verwendet.

Dem Tetanustoxin müssen für eine Maximierung der Assay-Sensitivität möglichst optimale Bedingungen geboten werden. Dazu gehören die Dauer der Inkubation (s. Abbildung 5.26) und der Puffer (s. Abbildung 5.27).

Für die Dauer der Inkubation gilt in den ersten sechs Stunden: Je geringer die TeNT-Konzentration, desto länger muss inkubiert werden. Die Sättigung, die mit hohen TeNT-Konzentrationen (hier: 64ng/ml) nach zwei Stunden erreicht ist, ist mit den untersuchten geringeren TeNT-Konzentrationen nicht zu beobachten. In Abhängigkeit von der TeNT-Konzentration sinkt das maximal erreichte Mess-Signal ab, mehr Substrat kann von der geringen Menge Enzym in der

vorgegebenen Zeit nicht gespalten werden. Durch die weitere Verlängerung der Inkubationszeit sollte mit geringen TeNT-Konzentrationen der Anteil an gespaltenem rSyb2 noch erhöht werden können. Demgegenüber steht aber ein Effekt, bei dem es sich wahrscheinlich um eine gesteigerte Dissoziation des rSyb2s von der Festphase handelt. Die Bindung an die Festphase ist eine Gleichgewichtsreaktion, die sich über einen längeren Zeitraum immer weiter in Richtung der Dissoziation verschieben kann [134]. Dies wird von einer erhöhten Umgebungstemperatur beschleunigt. Bei Inkubationszeiten zwischen 6 und 7,5 Stunden unterscheiden sich die Mess-Signale nicht, die Zunahme an Spaltprodukt und die Dissoziation von rSyb2 von der Festphase befinden sich in diesem Zeitraum demnach im Gleichgewicht. Während der Inkubation über Nacht nimmt die Dissoziation überhand und es kommt zum Absinken der Spaltsignale. Die TeNT-Inkubationszeit für alle folgenden Versuche wird auf sechs Stunden festgelegt, weil nach dieser Zeit auch in geringen TeNT-Konzentration die jeweils maximalen Signale erreicht werden, und weil dieser Zeitrahmen eine gute Handhabbarkeit im Hinblick auf die Durchführung als Routinetest bedeutet.

Die Addition von 20µM Zink hat keinen positiven Einfluss auf das Tetanustoxin. Wahrscheinlich ist im Lyophilisat des Toxins ausreichend Zink enthalten, um die Enzymaktivität zu gewährleisten.

Der Abgleich der Ergebnisse aus den Versuchen zur Hemmung der rSyb2-Spaltung mit Literaturdaten unterstreicht die Spezifität des ELISA. Die ausführlichsten TeNT-Hemmstudien wurden von Schiavo et al [22], Foran et al. [90] und Cornille et al. [114] veröffentlicht. Diese zeigen, dass TeNT durch 1-10mM 1,10-Phenanthrolin komplett [22,114] und durch 1-10mM EDTA zu 95% inhibiert wird [22,90]. Die Wirkung von EGTA wurde in diesen Studien nicht untersucht, jedoch chelatiert EGTA wie EDTA zweiwertige Kationen, wobei es eine erhöhte Spezifität für Calcium besitzt. Dieser Unterschied zeigt sich in den hier vorliegenden Untersuchungen nicht, aber dafür könnte der hohe molare Überschuss verantwortlich sein, in dem das EGTA im Verhältnis zum TeNT vorliegt. Dass 0,5mM Phosphoramidon keinen inhibierenden Effekt auf das TeNT ausübt, bestätigt die Literaturangaben.

Der Einfluss von L-Aminosäuren auf Tetanustoxin oder die Botulinumtoxine ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Von den vier getesteten Aminosäuren hat L-Cystein eine inhibierende Wirkung auf eine Vielzahl von Metalloproteasen [135], Tetanustoxin hemmt es dagegen nur leicht. Für Glutaminsäure, Histidin, und Phenylalanin wurde nur die Hemmung einzelner Metalloproteasen veröffentlicht [135]. L-Histidin und L-Glutaminsäure dienen in Metalloproteasen sehr häufig als Liganden für die Metallionen, da sie diese mit ihren Seitenketten koordinieren [123]. In der L-Kette des Tetanustoxins sind sie die entscheidenden Liganden für das Zinkion im HEXXH-Motiv, und ein weiterer Glutamatrest (E₂₇₁) ist zusätzlich für die Funktion des Enzyms verantwortlich (s. Abschnitt 2.2.1). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass L-Glutaminsäure eine stark inhibierende Wirkung auf das Tetanustoxin ausübt: Möglicherweise konkurriert gelöste L-Glutaminsäure mit dem Glutaminsäurerest E₂₇₁ und deprotoniert das im aktiven Zentrum gebun-

dene Wassermolekül. Außerdem könnte gelöstes L-Glutamat das Zinkion chelatieren oder sich in das aktive Zentrum einlagern und dieses blockieren. Letzteres wäre durch die Ähnlichkeit von Glutamat zu Glutamin erklärbar, und diese Aminosäure bildet zusammen mit Phenylalanin die von TeNT hydrolysierte Peptidbindung in rSyb2. L-Phenylalanin hat dagegen nur einen sehr geringen bis gar keinen negativen Effekt auf das Tetanustoxin. Von L-Histidin könnte man erwarten, dass es wie der Histidinrest im aktiven Zentrum das Zinkion chelatiert, aber dies ist offensichtlich nicht der Fall.

Aus der Optimierung des ELISA ergibt sich das in Tabelle 5.6 auf Seite 99 dargestellte Protokoll. Neben den zuvor diskutierten Parametern „Beschichtung“ und „Spaltung“ ist besonders die Verwendung von BSA-haltigem Puffer zur Verdünnung der Antikörper hervorzuheben. Dadurch kann die geringaffine Bindung an ungespaltenes rSyb2 auf ein Niveau von 0,2 OD₄₅₀-Einheiten gesenkt werden.

Alle anderen Schritte sind weniger kritisch. Mit den in Tabelle 5.6 genannten Blockierungspuffern werden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die Tween®-20-Konzentration im Waschpuffer darf nicht mehr als 0,05% betragen, aber die Reduktion auf 0,025% hat keinen Einfluss. Auch der vierte Waschschrift pro Waschgang ist nicht essentiell, um geringe Hintergrundsignale zu gewährleisten. Nichtsdestotrotz werden die jeweils stringenteren Bedingungen gewählt, um die Robustheit des Tests zu gewährleisten.

6.2.4 Sensitivität des ELISA

Für die Berechnungen der Nachweis- und Erfassungsgrenzen wurde ein α -Fehler von 1% festgelegt. Dadurch werden vergleichsweise hohe Werte für die Nachweis- und Erfassungsgrenzen erhalten - mit einem α -Fehler von 5% erhält man für das reine TeNT beispielsweise eine Nachweisgrenze von nur 0,31ng/ml und eine Erfassungsgrenze von nur 0,62ng/ml TeNT. In Hinblick auf die Sicherheitsprüfungen der Tetanusimpfstoffe ist es aber sinnvoll, nur einen geringen Fehler zuzulassen, weil die Wahrscheinlichkeit für falsche Testergebnisse dann gemindert wird.

Der ELISA besitzt mit einer Nachweisgrenze von 0,5ng/ml bzw. einer Erfassungsgrenze von 1,1ng/ml (bei einem α -Fehler von 1%) eine sehr hohe Sensitivität für reines Tetanustoxin. Der Test ist damit sensitiver als die bisher in der Literatur veröffentlichten Methoden zur Detektion von TeNT (s. Tabelle 3.1 auf Seite 25). Die Nachweisgrenze von 0,5ng/ml liegt in dem Bereich der LD₅₀ von TeNT für Meerschweinchen (s. Tabelle 2.2), die in Abschnitt 3.1 „Anforderungen an eine *in-vitro*-Methode zur Sicherheitsprüfung von Tetanus“ mit 0,1-1ng/ml beziffert wurde. Allerdings muss an dieser Stelle wiederholt werden, dass diese LD₅₀-Angabe nur eine grobe Einschätzung ist: Die Toxizität verschiedener Toxinpräparation unterscheidet sich, da sie von Parametern wie der Aufreinigung, sowie der Art der Applikation und der Spezies abhängt.

Für einen aussagekräftigeren Vergleich zwischen ELISA und Tierversuch wurde daher krudes Tetanustoxin im ELISA eingesetzt, für das vom Hersteller (Firma Chiron Behring GmbH & Co KG) freundlicherweise Daten zur Meerschweinchen-LD₅₀ aus Tierversuchen zur Verfügung gestellt wurden. Für den ELISA wird mit diesem kruden Tetanustoxin eine Nachweisgrenze von 0,05 Meerschweinchen-LD₅₀ ermittelt. Der ELISA scheint also deutlich empfindlicher als das *in-vivo*-Testsystem. Auch, wenn man die Erfassungsgrenze mit 0,1 Meerschweinchen-LD₅₀ zugrunde legt, die statistisch besonders in niedrigen Toxinkonzentrationen einen geringeren Fehler hat, ist der ELISA noch etwa zehnmals so sensitiv wie der Tierversuch.

In der Impfstoffprüfung ist das Messkriterium aber nicht die tödliche, sondern die paralytische Dosis, also die Toxinkonzentration, bei der Meerschweinchen erste Symptome einer Tetanusvergiftung zeigen. Ob der Tetanus-ELISA auch in Bezug auf die paralytische Dosis mit dem Tierversuch konkurrieren kann, kann hier nicht abschließend geklärt werden, weil Angaben zur paralytischen Dosis fehlen. Zur Klärung dieser Fragestellung müsste Tetanustoxin in mehreren Konzentrationsstufen parallel im ELISA und im Tierversuch eingesetzt werden. Stimmt die Konzentration, bei der eine Aktivität des Toxins im ELISA detektiert werden kann, mit der Konzentration überein, die in Meerschweinchen spezifische Tetanussymptome auslöst, dann ist die Sensitivität beider Testsysteme vergleichbar.

6.3 Konsequenzen der Untersuchungen

Der entwickelte ELISA soll Tierversuche ersetzen, mit denen aktives Tetanustoxin in zur Impfstoffherstellung vorgesehenen Toxoidpräparationen detektiert wird.

Die Versuche zur Ermittlung der Sensitivität für krudes Tetanustoxin zeigen, dass der ELISA für die Überprüfung derartiger Präparationen grundsätzlich geeignet ist. Dieses Ergebnis sollte in Versuchen mit Tetanustoxinen von verschiedenen Herstellern, die nach unterschiedlichen Protokollen aufgereinigt wurden, bestätigt werden. Auf diese Weise werden Sensitivität und Spezifität unabhängig von der Prüfsubstanz gewährleistet.

Zur weiteren Überprüfung der Sensitivität müssen Toxoidpräparationen getestet werden, die nur unvollständig detoxifiziert sind. Derselbe Test sollte parallel im Tierversuch durchgeführt werden, um die Äquivalenz beider Methoden in Bezug auf ihre Sensitivität zu sichern. In Vorversuchen mit kommerziell erhältlichem Toxoid aus Reinstoxin wurde bereits festgestellt, dass die Formaldehydbehandlung zur Toxininaktivierung zum einen keinen negativen Einfluss auf den ELISA hat, und dass sie zum zweiten zum kompletten Aktivitätsverlust des Tetanustoxins führt.

Toxoide, die zur Impfstoffherstellung verwendet werden, bestehen aber nicht aus derartig hoch aufgereinigtem Tetanustoxin. Deshalb muss überprüft werden, ob Verunreinigungen in den Toxoiden einen Einfluss auf den ELISA haben. Sollte dies der Fall sein, müssen Grenzwerte definiert werden, bis zu denen Mess-Signale im ELISA toleriert werden. Diese Grenzwerte könnten sich bei

Toxoiden unterschiedlicher Hersteller unterscheiden. Es muss aber gesichert sein, dass die Mess-Signale unspezifischer Natur sind.

Grundsätzlich können Signale unspezifischer Natur falsch-positiv oder falsch-negativ sein. Falsch-positive Signale könnten z. B. durch die unspezifische Bindung des α -N-Terminus-Antikörpers an Toxoidbestandteile oder die Spaltung des Synaptobrevins durch bakterielle Proteasen an der TeNT-Spaltstelle bedingt sein. In einem solchen Fall würde ein Tetanustoxoid die Prüfung nicht bestehen, und die Sicherheit müsste mit einem anderen Testsystem nachgewiesen werden. Für die Impflinge haben falsch-positive Testergebnisse keine Auswirkung.

Problematisch für die Sicherheit der Tetanusimpfstoffe sind dagegen falsch-negative Ergebnisse. Sie könnten durch bakterielle Proteasen oder andere Bestandteile eines Toxoids bewirkt werden. Vorstellbar ist, dass das rSyb2 im ELISA durch sie hydrolysiert und als Substrat für TeNT unbrauchbar gemacht oder dass das TeNT inhibiert wird. Ein Toxoid mit einer derartigen Wirkung würde die Sicherheitsprüfung passieren und an Impflinge verabreicht, ohne dass eventuell vorhandenes Tetanustoxin detektiert worden wäre. Falsch-negative Testergebnisse müssen deshalb ausgeschlossen werden können.

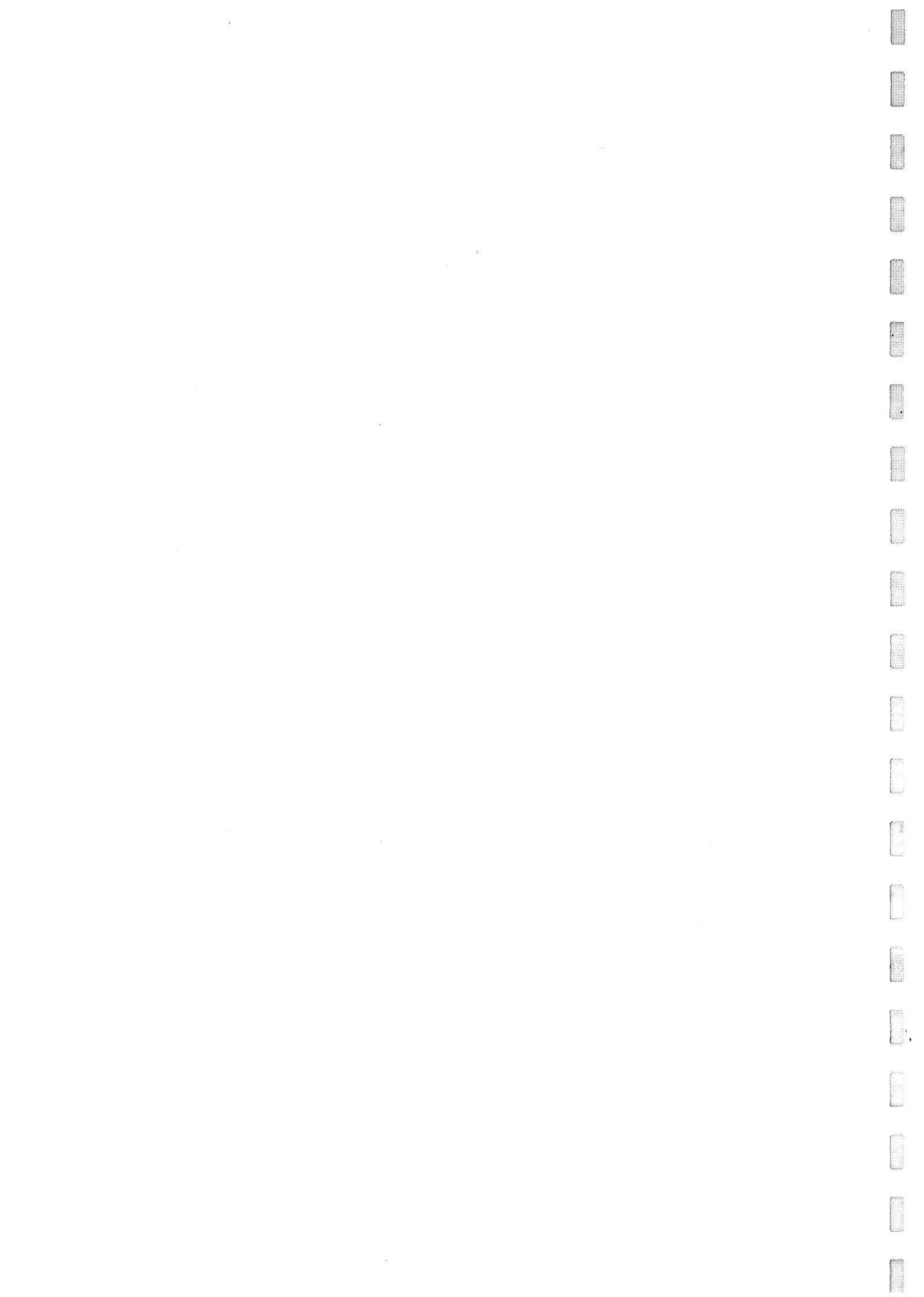
Bevor der TeNT-ELISA für die Sicherheitsprüfung zugelassen werden kann, müssen die Charakteristika der Tetanustoxoide sorgfältig untersucht werden. Unspezifische Aktivität muss limitiert werden, z. B. durch den Zusatz geeigneter Proteaseinhibitoren.

Beim Vergleich des *in-vitro*- mit dem *in-vivo*-Testsystem muss auch geklärt werden, ob die Toxoide positive Signale erzeugen, die klinisch irrelevant sind. Das wäre der Fall, wenn nicht aktive L-Kette detektiert wird, die ohne funktionierende H-Kette nicht in das Zentrale Nervensystem des Versuchstiers bzw. des Impflings gelangen würde. Sollten solche Signale im ELISA erhalten werden, müssten die Toxoide in der Impfstoffprüfung weiteren Tests, gegebenenfalls einem Tierversuch, unterzogen werden. Die Folge wäre, dass der ELISA nur eine Reduktion, nicht aber den vollständigen Ersatz der Tierversuche in der Sicherheitsprüfung von Tetanusimpfstoffen ermöglichen würde.

Für die Sicherheitsprüfung von Tetanustoxoiden müssen die nicht kommerziell erhältlichen Materialien, die für diesen ELISA benötigt werden, zur Verfügung gestellt werden. Dabei handelt es sich um das rekombinante Synaptobrevin-2-Fragment rSyb2(N;1-97) und den α -N-Terminus-Antikörper. Für die Bereitstellung von rSyb2 in größeren Mengen muss die Fermentation weiter standardisiert werden. Besonders wichtig ist auch ein Protokoll für die Metallaffinitäts-Chromatographie in einem größeren Maßstab. Erste Versuche zur Aufreinigung mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) verliefen sehr erfolgversprechend, diese Methode muss nun standardisiert werden. Die Herstellung des α -N-Terminus-Antikörpers wird zur Zeit im Paul-Ehrlich-Institut reproduziert und verläuft nach aktuellen Untersuchungen ebenfalls erfolgversprechend. Abgesehen davon bestehen Überlegungen, diesen Antikörper monoklonal herzustellen. Dabei ist

aber nicht gesichert, ob der monoklonale Antikörper dieselbe Spezifität gegenüber dem N-terminalen rSyb2-Spaltprodukt aufweisen würde. Kann die Bereitstellung des polyklonalen α -N-Terminus-Antikörpers gewährleistet werden, ist die Herstellung der monoklonalen Variante wahrscheinlich nicht notwendig.

Der ELISA muss validiert und in Ringversuchen in verschiedenen Laboratorien getestet werden. Sobald diese Daten ausgewertet sind, können sie den zuständigen EU-Behörden zur Begutachtung vorgelegt werden. Wenn der ELISA als Methode akzeptiert und in das Europäische Arzneibuch aufgenommen wird, kann auf Tierversuche zur Sicherheitsprüfung von Tetanusvakzinen verzichtet werden.



7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Optimierung eines sensitiven, schnellen, immunologischen *in-vitro*-Nachweises für die Endoprotease Tetanustoxin.

Der klassische ELISA, bei dem an eine Festphase immobilisiertes Antigen detektiert wird, wurde hier um einen endoproteolytischen Schritt erweitert, in dem das gebundene Substrat des Tetanustoxins an der Festphase in das nachzuweisende Antigen gespalten wird. Somit wird die Enzymaktivität des Tetanustoxins indirekt bestimmt. Bei dem Substrat handelt es sich um rekombinantes Synaptobrevin-2 (rSyb2), das von Tetanustoxin spezifisch und selektiv an einer Peptidbindung hydrolysiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit molekularbiologischen Methoden drei unterschiedliche rSyb2-Fragmente in *Escherichia coli* hergestellt, die einen unterschiedlichen Aufbau des TeNT-Endopeptidase-Assays ermöglichen. Zur Maximierung der Proteinausbeute wurde die Expression in drei verschiedenen *E. coli*-Stämmen miteinander verglichen. Der Stamm mit der höchsten Expressionsleistung wurde in 500ml-Schüttelkulturen sowie im 10l-Maßstab fermentiert. Es wurde ein Protokoll zur Aufreinigung des rekombinanten Synaptobrevin-2 erstellt und optimiert.

Zur immunologischen Detektion des durch Tetanustoxin gespaltenen rSyb2s standen zwei in Eigenarbeit hergestellte Antikörper zur Verfügung. Im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen Synaptobrevin-2, deren Epitope inmitten der rSyb2-Aminosäuresequenz liegen, detektieren die beiden selbst hergestellten Antikörper die Aminosäuresequenzen, die die N- bzw. die C-terminale Seite der Tetanus-Spaltstelle in Synaptobrevin-2 darstellen. Beide Antikörper vermögen zwischen ungespaltenem und gespaltenem rSyb2 zu differenzieren. Besonders der gegen das N-terminale Spaltfragment gerichtete Antikörper ist ein hochspezifisches Werkzeug, das nur die von Tetanustoxin generierte, terminale Aminosäuresequenz an der Spaltstelle detektiert.

Im ELISA wurde zunächst untersucht, in welcher Reihenfolge Spaltung und Immobilisierung an die Festphase durchgeführt werden sollten. Die Immobilisierung des rSyb2s mit anschließender Spaltung durch Tetanustoxin erwies sich als die sensitivere Methode und wurde deshalb weiter optimiert. Dazu gehörte die Wahl der Festphase, die Untersuchung unterschiedlicher Beschichtungsmethoden, der Vergleich verschiedener Umgebungsbedingungen in der enzymatischen Reaktion sowie die Titration der eingesetzten Antikörper und die Auswahl der geeignetsten Pufferzusammensetzungen und Inkubationszeiträume.

Zur Optimierung der Beschichtung wurden die drei rSyb2-Fragmente an unterschiedliche Polystyrenoberflächen gebunden. Die gezielte Ausrichtung der Moleküle, mit der nach der Inkubation mit Tetanustoxin nur ein bestimmtes Spaltfragment an der Platte gebunden bleibt und mit dem entsprechenden Antikörper detektiert werden kann, bringt dabei keinen Vorteil gegenüber der ungezielten Bindung. Insgesamt differiert die Bindung an die Festphase zwischen Plattentypen und

rSyb2-Fragmenten und hat einen großen Einfluss auf die Aktivität des Tetanustoxins und auf die Bindung des jeweiligen Antikörpers. Diese binden in Abhängigkeit vom Plattentyp teils stark an ungespaltenes rSyb2; offensichtlich ist das Epitop des jeweils eingesetzten Antikörpers in diesen Fällen also auch vor der Spaltung schon exponiert.

Insgesamt zeigen die Versuche, dass die ungerichtete Bindung des Fragments rSyb2(N;1-97) mit der Detektion des N-terminalen Spaltfragments die sensitivste Methode zur Detektion von Tetanustoxin ist.

Durch die Optimierung der weiteren Inkubationsschritte konnte die Nachweisgrenze des ELISA auf 0,54ng/ml Tetanustoxin gesenkt werden. Sie liegt damit im Bereich von Literaturdaten für eine Meerschweinchen-LD₅₀ und könnte bereits unter der Nachweisgrenze des Tierversuchs liegen. Der Mangel an Daten zur Toxizität des in der Testentwicklung verwendeten, hochaufgereinigten Toxins lässt keine genauere Einschätzung zu. Der Vergleich mit der Empfindlichkeit von Tieren ist aber relevant, weil der ELISA die Detektion des Toxins im Tierversuch ersetzen soll und eine vergleichbare Sensitivität aufweisen muss.

Eine bessere Einschätzung kann mit einem krudem Tetanustoxin vorgenommen werden, für das die Meerschweinchen-LD₅₀ vom Hersteller bestimmt wurde. Mit diesem Toxin wurde eine Nachweisgrenze des ELISA von 0,049 Meerschweinchen-LD₅₀ ermittelt. Der ELISA scheint somit eine vielversprechende Methode zur Detektion von Tetanustoxin zu sein und könnte sich deshalb zum Ersatz des Tierversuchs eignen.

8 Literatur

- [1] Olsnes S, Wesche J, Falnes PO (2000). Uptake of Protein Toxins Acting Inside Cells. In *Bacterial Protein Toxins*, S. 1-20. Hrsg.: Aktories K, Just I. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [2] Rossetto O, de Bernard M, Pellizzari R, Vitale G, Caccin P, Schiavo G et al. (2000). Bacterial toxins with intracellular protease activity. *Clin Chim Acta* 291[2]: 189-199.
- [3] Montecucco C, Papini E, Schiavo G (1994). Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett* 346[1]: 92-98.
- [4] Falnes PO, Sandvig K (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* 12[4]: 407-413.
- [5] Lord JM, Roberts LM (1998). Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol* 140[4]: 733-736.
- [6] Allen SD, Emery CL, Lyerly DM (2003). Clostridium. In *Manual of Clinical Microbiology (8. Aufl.)*, S. 835-856. Hrsg.: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. ASM Press, Washington, D.C.
- [7] Schlegel HG (1992). *Allgemeine Mikrobiologie (7. Aufl.)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- [8] Bigalke H, Shoer LF (2000). Clostridial Neurotoxins. In *Bacterial Protein Toxins*, S. 407-443. Hrsg.: Aktories K, Just I. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [9] Ahnert-Hilger G, Bigalke H (1995). Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. *Prog Neurobiol* 46[1]: 83-96.
- [10] Robert-Koch-Institut Berlin (2003) Informationen zu Infektionskrankheiten: Tetanus (www.rki.de/infekt/infekt.htm).
- [11] Rolle M, Mayr A (2001). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre (2. Aufl.)*. Enke Verlag, Stuttgart.
- [12] Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C, Poulain B, Deloye F, Lozzi L et al. (1994). SNARE motif and neurotoxins. *Nature* 372[6505]: 415-416.
- [13] Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 80[2]: 717-766.
- [14] Rossetto O, Montecucco C (2002). Bacterial Toxins with Metalloprotease Activity. In *Perspectives in Molecular Toxinology (1. Aufl.)*, S. 1-22. Hrsg.: Ménez A. J. Wiley & Sons, New York.
- [15] Lacy DB, Stevens RC (1999). Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* 291[5]: 1091-1104.
- [16] Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C (2001). Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon* 39[1]: 27-41.
- [17] Kriegelstein KG, Henschen AH, Weller U, Habermann E (1991). Limited proteolysis of tetanus toxin. Relation to activity and identification of cleavage sites. *Eur J Biochem* 202[1]: 41-51.
- [18] Weller U, Mauler F, Habermann E (1988). Tetanus toxin: biochemical and pharmacological comparison between its protoxin and some isotoxins obtained by limited proteolysis. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 338[2]: 99-106.

- [19] Umland TC, Wingert LM, Swaminathan S, Furey WF, Schmidt JJ, Sax M (1997). Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat Struct Biol* 4[10]: 788-792.
- [20] Lacy DB, Stevens RC (1998). Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins. *Curr Opin Struct Biol* 8[6]: 778-784.
- [21] De Filippis V, Vangelista L, Schiavo G, Tonello F, Montecucco C (1995). Structural studies on the zinc-endopeptidase light chain of tetanus neurotoxin. *Eur J Biochem* 229[1]: 61-69.
- [22] Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, Benfenati F, Tauc L, Montecucco C (1992). Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J* 11[10]: 3577-3583.
- [23] Schiavo G, Rossetto O, Santucci A, DasGupta BR, Montecucco C (1992). Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J Biol Chem* 267[33]: 23479-23483.
- [24] Rossetto O, Caccin P, Rigoni M, Tonello F, Bortoletto N, Stevens RC *et al.* (2001). Active-site mutagenesis of tetanus neurotoxin implicates TYR-375 and GLU-271 in metalloproteolytic activity. *Toxicon* 39[8]: 1151-1159.
- [25] Sanger Institute (2003) MEROPS-Datenbank, Hingston, UK (<http://merops.sanger.ac.uk>).
- [26] Tonello F, Schiavo G, Montecucco C (1997). Metal substitution of tetanus neurotoxin. *Biochem J* 322 (Pt 2) 507-510.
- [27] Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C *et al.* (2000). The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem* 275[12]: 8889-8894.
- [28] Fotinou C, Emsley P, Black I, Ando H, Ishida H, Kiso M *et al.* (2001). The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. *J Biol Chem* 276[34]: 32274-32281.
- [29] Schiavo G, Demel R, Montecucco C (1991). On the role of polysialoglycosphingolipids as tetanus toxin receptors. A study with lipid monolayers. *Eur J Biochem* 199[3]: 705-711.
- [30] Shapiro RE, Specht CD, Collins BE, Woods AS, Cotter RJ, Schnaar RL (1997). Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand. *J Biol Chem* 272[48]: 30380-30386.
- [31] Sinha K, Box M, Lalli G, Schiavo G, Schneider H, Groves M *et al.* (2000). Analysis of mutants of tetanus toxin Hc fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Mol Microbiol* 37[5]: 1041-1051.
- [32] Sutton JM, Chow-Worn O, Spaven L, Silman NJ, Hallis B, Shone CC (2001). Tyrosine-1290 of tetanus neurotoxin plays a key role in its binding to gangliosides and functional binding to neurones. *FEBS Lett* 493[1]: 45-49.
- [33] Williamson RA, Muskett FW, Howard MJ, Freedman RB, Carr MD (1999). The effect of matrix metalloproteinase complex formation on the conformational mobility of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Biol Chem* 274[52]: 37226-37232.
- [34] Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J (2003). *Molecular Cell Biology* (5. Aufl.). W.H. Freeman & Co., New York.
- [35] Lalli G, Herreros J, Osborne SL, Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G (1999). Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J Cell Sci* 112 (Pt 16) 2715-2724.
- [36] Herreros J, Lalli G, Schiavo G (2000). C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem J* 347 Pt 1 199-204.

- [37] **Herreros J, Schiavo G (2002)**. Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins. *Int J Med Microbiol* 291[6-7]: 447-453.
- [38] **Lalli G, Schiavo G (2002)**. Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol* 156[2]: 233-239.
- [39] **Halpern JL, Loftus A (1993)**. Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. *J Biol Chem* 268[15]: 11188-11192.
- [40] **Brown DA, London E (2000)**. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275[23]: 17221-17224.
- [41] **Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, Verastegui C, Schiavo G (2003)**. The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* 11[9]: 431-437.
- [42] **Pelkmans L, Helenius A (2002)**. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3[5]: 311-320.
- [43] **Herreros J, Ng T, Schiavo G (2001)**. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* 12[10]: 2947-2960.
- [44] **Herreros J, Lalli G, Montecucco C, Schiavo G (2000)**. Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem* 74[5]: 1941-1950.
- [45] **Munro P, Kojima H, Dupont JL, Bossu JL, Poulain B, Boquet P (2001)**. High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem Biophys Res Commun* 289[2]: 623-629.
- [46] **Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M et al. (1994)**. Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 269[14]: 10498-10503.
- [47] **Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K et al. (1996)**. The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett* 378[3]: 253-257.
- [48] **Matteoli M, Verderio C, Rossetto O, Iezzi N, Coco S, Schiavo G et al. (1996)**. Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93[23]: 13310-13315.
- [49] **Boquet P, Duflot E (1982)**. Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79[24]: 7614-7618.
- [50] **Roa M, Boquet P (1985)**. Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles at low pH. Protection of specific polypeptides against proteolysis. *J Biol Chem* 260[11]: 6827-6835.
- [51] **Williamson LC, Neale EA (1994)**. Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture. *J Neurochem* 63[6]: 2342-2345.
- [52] **Martoglio B, Hofmann MW, Brunner J, Dobberstein B (1995)**. The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81[2]: 207-214.
- [53] **Fasshauer D (2003)**. Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1641[2-3]: 87-97.
- [54] **Hay JC (2001)**. SNARE complex structure and function. *Exp Cell Res* 271[1]: 10-21.
- [55] **Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, Pabst S, Jahn R (1999)**. Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem* 274[22]: 15440-15446.

- [56] **McNew JA, Weber T, Parlati F, Johnston RJ, Melia TJ, Sollner TH et al. (2000).** Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *J Cell Biol* 150[1]: 105-117.
- [57] **Yang B, Gonzalez L, Jr., Prekeris R, Steegmaier M, Advani RJ, Scheller RH (1999).** SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem* 274[9]: 5649-5653.
- [58] **Cornille F, Deloye F, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Poulain B (1995).** Inhibition of neurotransmitter release by synthetic proline-rich peptides shows that the N-terminal domain of vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin is critical for neuro-exocytosis. *J Biol Chem* 270[28]: 16826-16832.
- [59] **De Haro L, Quetglas S, Iborra C, Leveque C, Seagar M (2003).** Calmodulin-dependent regulation of a lipid binding domain in the v-SNARE synaptobrevin and its role in vesicular fusion. *Biol Cell* 95[7]: 459-464.
- [60] **Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Sudhof TC et al. (1994).** Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* 13[21]: 5051-5061.
- [61] **Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998).** Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395[6700]: 347-353.
- [62] **Bock JB, Scheller RH (1999).** SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96[22]: 12227-12229.
- [63] **Chen YA, Scales SJ, Scheller RH (2001).** Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron* 30[1]: 161-170.
- [64] **Matos MF, Mukherjee K, Chen X, Rizo J, Sudhof TC (2003).** Evidence for SNARE zippering during Ca²⁺-triggered exocytosis in PC12 cells. *Neuropharmacology* 45[6]: 777-786.
- [65] **Veit M (1999).** [Molecular biology of neurosecretion and its inhibition by tetanus and botulinum toxins (review)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 112[5]: 186-191.
- [66] **Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R, Brunger AT (1997).** Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* 272[44]: 28036-28041.
- [67] **Fasshauer D, Bruns D, Shen B, Jahn R, Brunger AT (1997).** A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J Biol Chem* 272[7]: 4582-4590.
- [68] **Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin YK, Bennett MK (1998).** The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol* 5[9]: 765-769.
- [69] **Chen YA, Scales SJ, Patel SM, Doung YC, Scheller RH (1999).** SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion. *Cell* 97[2]: 165-174.
- [70] **Hua SY, Charlton MP (1999).** Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 2[12]: 1078-1083.
- [71] **Schoch S, Deak F, Konigstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Sudhof TC et al. (2001).** SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294[5544]: 1117-1122.
- [72] **McNew JA, Parlati F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F et al. (2000).** Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407[6801]: 153-159.
- [73] **Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P et al. (1993).** SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362[6418]: 318-324.

- [74] Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75[3]: 409-418.
- [75] Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F et al. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92[6]: 759-772.
- [76] Yamasaki S, Baumeister A, Binz T, Blasi J, Link E, Cornille F et al. (1994). Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin. *J Biol Chem* 269[17]: 12764-12772.
- [77] Yamasaki S, Hu Y, Binz T, Kalkuhl A, Kurazono H, Tamura T et al. (1994). Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of *Aplysia californica*: structure and proteolysis by tetanus toxin and botulinum neurotoxins type D and F. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91[11]: 4688-4692.
- [78] Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino dL, DasGupta BR et al. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359[6398]: 832-835.
- [79] Schiavo G, Shone CC, Rossetto O, Alexander FC, Montecucco C (1993). Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J Biol Chem* 268[16]: 11516-11519.
- [80] Schiavo G, Rossetto O, Catsicas S, Polverino dL, DasGupta BR, Benfenati F et al. (1993). Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J Biol Chem* 268[32]: 23784-23787.
- [81] Schiavo G, Malizio C, Trimble WS, Polverino dL, Milan G, Sugiyama H et al. (1994). Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J Biol Chem* 269[32]: 20213-20216.
- [82] Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister A, Link E, Sudhof TC et al. (1994). Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J Biol Chem* 269[3]: 1617-1620.
- [83] Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P et al. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365[6442]: 160-163.
- [84] Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* 12[12]: 4821-4828.
- [85] Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C (1995). Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 270[18]: 10566-10570.
- [86] Williamson LC, Halpern JL, Montecucco C, Brown JE, Neale EA (1996). Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neurotoxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa. *J Biol Chem* 271[13]: 7694-7699.
- [87] Cornille F, Martin L, Lenoir C, Cussac D, Roques BP, Fournie-Zaluski MC (1997). Cooperative exosite-dependent cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin light chain. *J Biol Chem* 272[6]: 3459-3464.
- [88] Pellegrini LL, O'Connor V, Betz H (1994). Fusion complex formation protects synaptobrevin against proteolysis by tetanus toxin light chain. *FEBS Lett* 353[3]: 319-323.
- [89] Pellizzari R, Rossetto O, Lozzi L, Giovedi S, Johnson E, Shone CC et al. (1996). Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. *J Biol Chem* 271[34]: 20353-20358.
- [90] Foran P, Shone CC, Dolly JO (1994). Differences in the protease activities of tetanus and botulinum B toxins revealed by the cleavage of vesicle-associated membrane protein and various sized fragments. *Biochemistry* 33[51]: 15365-15374.

- [91] **Pellegrini LL, O'Connor V, Lottspeich F, Betz H (1995)**. Clostridial neurotoxins compromise the stability of a low energy SNARE complex mediating NSF activation of synaptic vesicle fusion. *EMBO J* 14[19]: 4705-4713.
- [92] **Gill DM (1982)**. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* 46[1]: 86-94.
- [93] **Brandis H, Eggers HJ, Köhler W (2003)**. *Medizinische Mikrobiologie (7. Aufl.)*. Hrsg.: Brandis H, Eggers HJ, Köhler W. Urban & Fischer Verlag, München.
- [94] **Bruggemann H, Baumer S, Fricke WF, Wiezer A, Liesegang H, Decker I et al. (2003)**. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100[3]: 1316-1321.
- [95] **Coen L, Osta R, Maury M, Brulet P (1997)**. Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94[17]: 9400-9405.
- [96] **Naumann M, Jost WH, Toyka KV (1999)**. Botulinum toxin in the treatment of neurological disorders of the autonomic nervous system. *Arch Neurol* 56[8]: 914-916.
- [97] **Eisel U, Jarausch W, Goretzki K, Henschen A, Engels J, Weller U et al. (1986)**. Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J* 5[10]: 2495-2502.
- [98] **Fairweather NF, Lyness VA (1986)**. The complete nucleotide sequence of tetanus toxin. *Nucleic Acids Res* 14[19]: 7809-7812.
- [99] **World Health Organization (WHO) (2003)** WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system (2003 global summary), Genf (www.who.int/vaccines-documents/GlobalSummary/GlobalSummary.pdf).
- [100] **World Health Organization (WHO) (2003)**, Genf (www.who.org).
- [101] **Galazka A, Gasse F (1995)**. The present status of tetanus and tetanus vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 195 31-53.
- [102] **Robert-Koch-Institut Berlin (2003)** Impfempfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO). *Epidemiologisches Bulletin* [32] (www.rki.de).
- [103] **BMVEL: Bundesministerium für Verbraucherschutz EuL (2003)** Tierschutzbericht 2003 Nr. 321321-0869-1/8, Berlin (www.verbraucherministerium.de).
- [104] **Russell WMS, Burch RL (1959)**. *The principles of humane experimental technique* UFAW, London.
- [105] **BMBF: Bundesministerium für Bildung und Forschung (2001)** Hightech statt Tiere (Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen). BMBF, BMVEL, BMG, BMU, Berlin (www.bmbf.de).
- [106] **Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, Bottoms JD, Cheng T, Roh BH et al. (1993)**. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J Clin Microbiol* 31[9]: 2402-2409.
- [107] **Doellgast GJ, Beard GA, Bottoms JD, Cheng T, Roh BH, Roman MG et al. (1994)**. Enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked coagulation assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E and solution-phase complexes with dual-label antibodies. *J Clin Microbiol* 32[1]: 105-111.
- [108] **Williamson LC, Bateman KE, Clifford JC, Neale EA (1999)**. Neuronal sensitivity to tetanus toxin requires gangliosides. *J Biol Chem* 274[35]: 25173-25180.
- [109] **Kasai H, Kishimoto T, Liu TT, Miyashita Y, Podini P, Grohovaz F et al. (1999)**. Multiple and diverse forms of regulated exocytosis in wild-type and defective PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96[3]: 945-949.

- [110] Sandberg K, Berry CJ, Rogers TB (1989). Studies on the intoxication pathway of tetanus toxin in the rat pheochromocytoma (PC12) cell line. Binding, internalization, and inhibition of acetylcholine release. *J Biol Chem* 264[10]: 5679-5686.
- [111] Quetglas S, Iborra C, Sasakawa N, De Haro L, Kumakura K, Sato K et al. (2002). Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *EMBO J* 21[15]: 3970-3979.
- [112] Kegel B, Bonifas U (2003) Persönliche Mitteilungen
- [113] Nowakowski JL, Courtney BC, Bing QA, Adler M (1998). Production of an expression system for a synaptobrevin fragment to monitor cleavage by botulinum neurotoxin B. *J Protein Chem* 17[5]: 453-462.
- [114] Cornille F, Goudreau N, Ficheux D, Niemann H, Roques BP (1994). Solid-phase synthesis, conformational analysis and in vitro cleavage of synthetic human synaptobrevin II 1-93 by tetanus toxin L chain. *Eur J Biochem* 222[1]: 173-181.
- [115] Anne C, Cornille F, Lenoir C, Roques BP (2001). High-throughput fluorogenic assay for determination of botulinum type B neurotoxin protease activity. *Anal Biochem* 291[2]: 253-261.
- [116] Soleilhac JM, Cornille F, Martin L, Lenoir C, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1996). A sensitive and rapid fluorescence-based assay for determination of tetanus toxin peptidase activity. *Anal Biochem* 241[1]: 120-127.
- [117] Perpetuo EA, Juliano L, Prado SM, Fratelli F, Fernandes I, Lebrun I (2002). Development of an operational synaptobrevin-based fluorescent substrate for tetanus neurotoxin quantification. *Biotechnol Appl Biochem* 36[Pt 3]: 155-161.
- [118] Hallis B, James BA, Shone CC (1996). Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. *J Clin Microbiol* 34[8]: 1934-1938.
- [119] Wictome M, Newton K, Jameson K, Hallis B, Dunnigan P, Mackay E et al. (1999). Development of an in vitro bioassay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl Environ Microbiol* 65[9]: 3787-3792.
- [120] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R (1998). Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr Opin Biotechnol* 9[5]: 497-501.
- [121] Clark EDB (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* 12[2]: 202-207.
- [122] Rudolph R, Böhm G, Lilie H, Jaenicke R (1997). Folding Proteins. In *Protein Function - A Practical Approach* (2. Aufl.), S. 57-99. Hrsg.: Creighton TE. Oxford University Press, Oxford.
- [123] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002). *Biochemistry* (5. Aufl.). W.H.Freeman & Co., New York.
- [124] Caccin P, Rossetto O, Rigoni M, Johnson E, Schiavo G, Montecucco C (2003). VAMP/synaptobrevin cleavage by tetanus and botulinum neurotoxins is strongly enhanced by acidic liposomes. *FEBS Lett* 542[1-3]: 132-136.
- [125] Mülhardt C (2000). *Der Experimentator: Molekularbiologie* (2. Aufl.). Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin.
- [126] Dallas-Yang Q, Jiang G, Sladek FM (1998). Avoiding false positives in colony PCR. *Biotechniques* 24[4]: 580-582.
- [127] Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227[259]: 680-685.
- [128] Bondos SE, Bicknell A (2003). Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal Biochem* 316[2]: 223-231.

- [129] **LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951)**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193[1]: 265-275.
- [130] **Rehm H (2000)**. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics* (3. Aufl.). Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin.
- [131] **Kane JF (1995)**. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6[5]: 494-500.
- [132] **Kurland C, Gallant J (1996)**. Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* 7[5]: 489-493.
- [133] **Esser P (1997)**. Principles in Adsorption to Polystyrene. In *Solid Phase Guide* (2. Aufl.) Nunc A/S, Roskilde.
- [134] **Kemeny DM (1994)**. *ELISA* (4. Aufl.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- [135] **Universität Köln (Institut für Biochemie), Prof.Dr.D.Schomburg (2004)** BRENDA Enzymdatenbank (www.brenda.uni-koeln.de).

9 Anhang

9.1 Vektorkarten

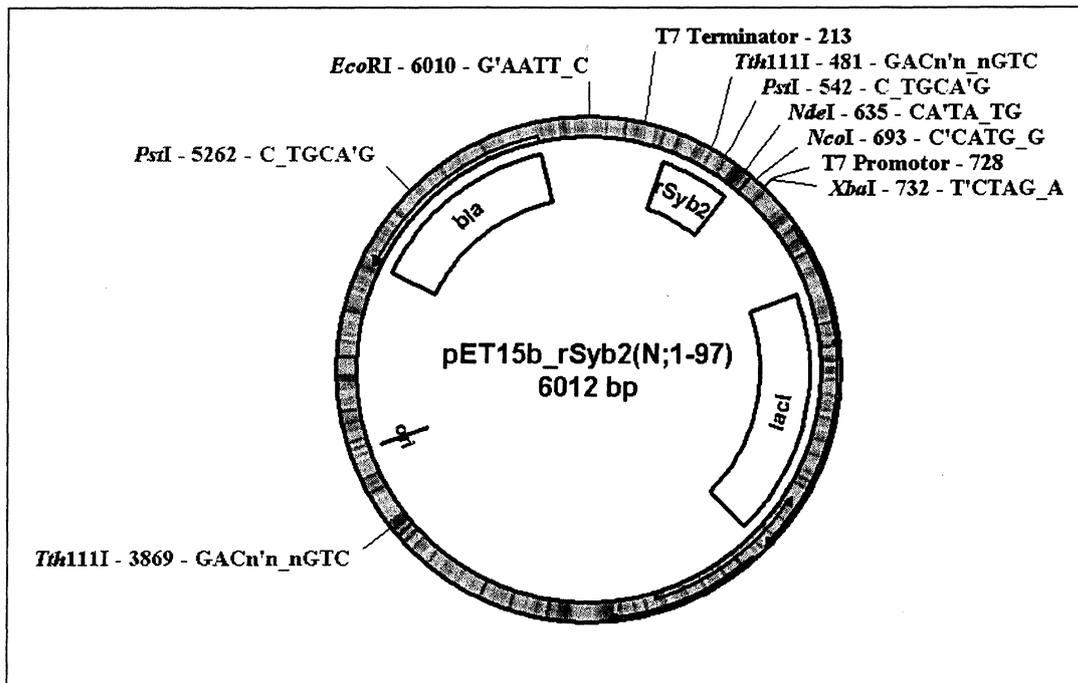


Abbildung 9.1: Vektorkarte des Plasmids pET15b_rSyb2(N;1-97) (nach Binz et al (1994)). Eingezeichnet ist die Lage der Gene für das rekombinante Synaptobrevin2-Fragment rSyb2(N;1-97) (rSyb2), β -Lactamase (bla) und den *lac*-Repressor (*lacI*), außerdem die Schnittstellen für einige Restriktionsenzyme mit der jeweiligen Erkennungssequenz und der Beginn der T7-Promotor- bzw. T7-Terminatorsequenz.

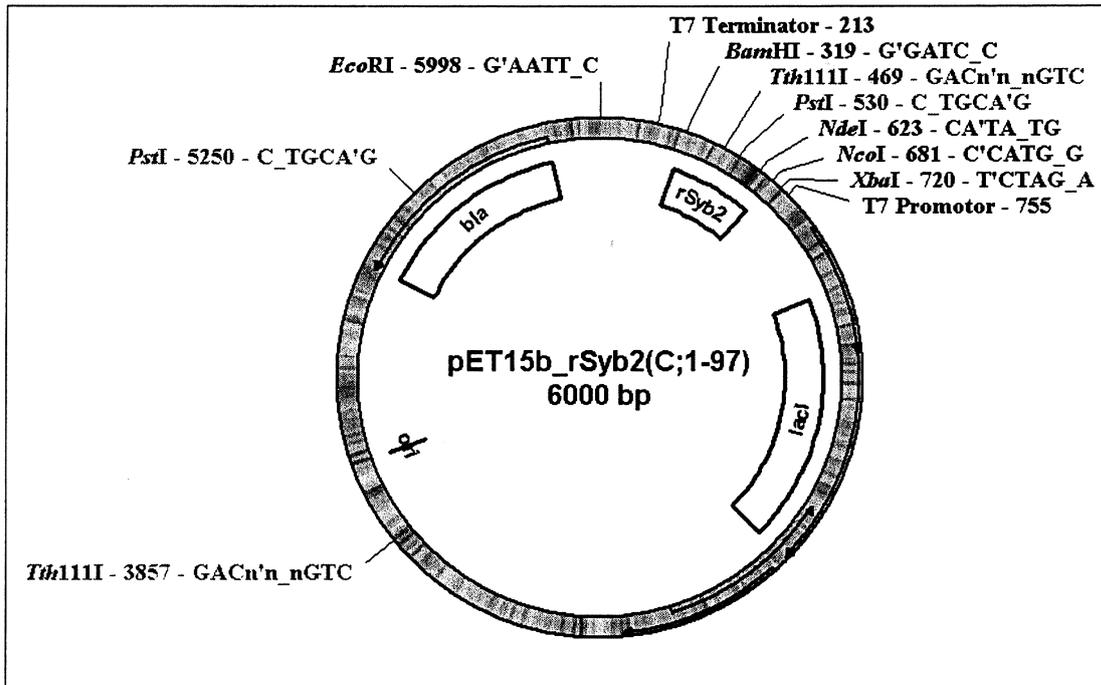


Abbildung 9.2: Vektorkarte des Plasmids pET15b_rSyb2(C;1-97). Eingezeichnet ist die Lage der Gene für das rekombinante Synaptobrevin2-Fragment rSyb2(C;1-97) (rSyb2), β-Lactamase (*bla*) und den *lac*-Repressor (*lacI*), außerdem die Schnittstellen für einige Restriktionsenzyme mit der jeweiligen Erkennungssequenz und der Beginn der T7-Promotor- bzw. T7-Terminatorsequenz.

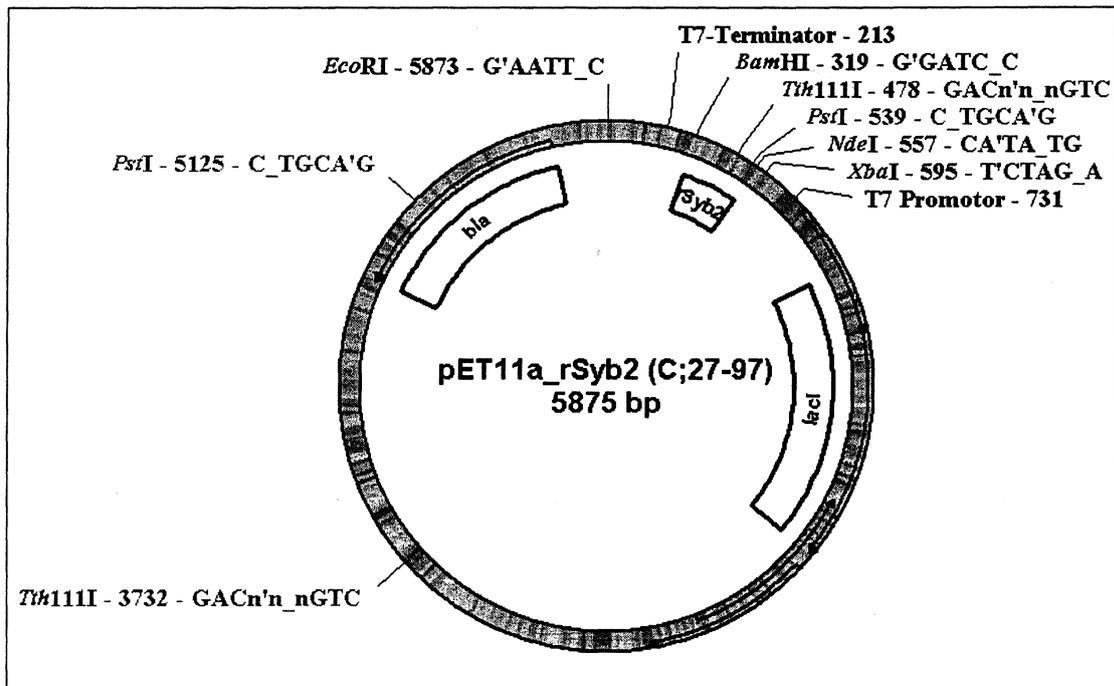


Abbildung 9.3: Vektorkarte des Plasmids pET11a_rSyb2(C;27-97). Eingezeichnet ist die Lage der Gene für das rekombinante Synaptobrevin2-Fragment rSyb2(C;1-97) (rSyb2), β -Lactamase (bla) und den *lac*-Repressor (*lacI*), außerdem die Schnittstellen für einige Restriktionsenzyme mit der jeweiligen Erkennungssequenz und der Beginn der T7-Promotor- bzw. T7-Terminatorsequenz.

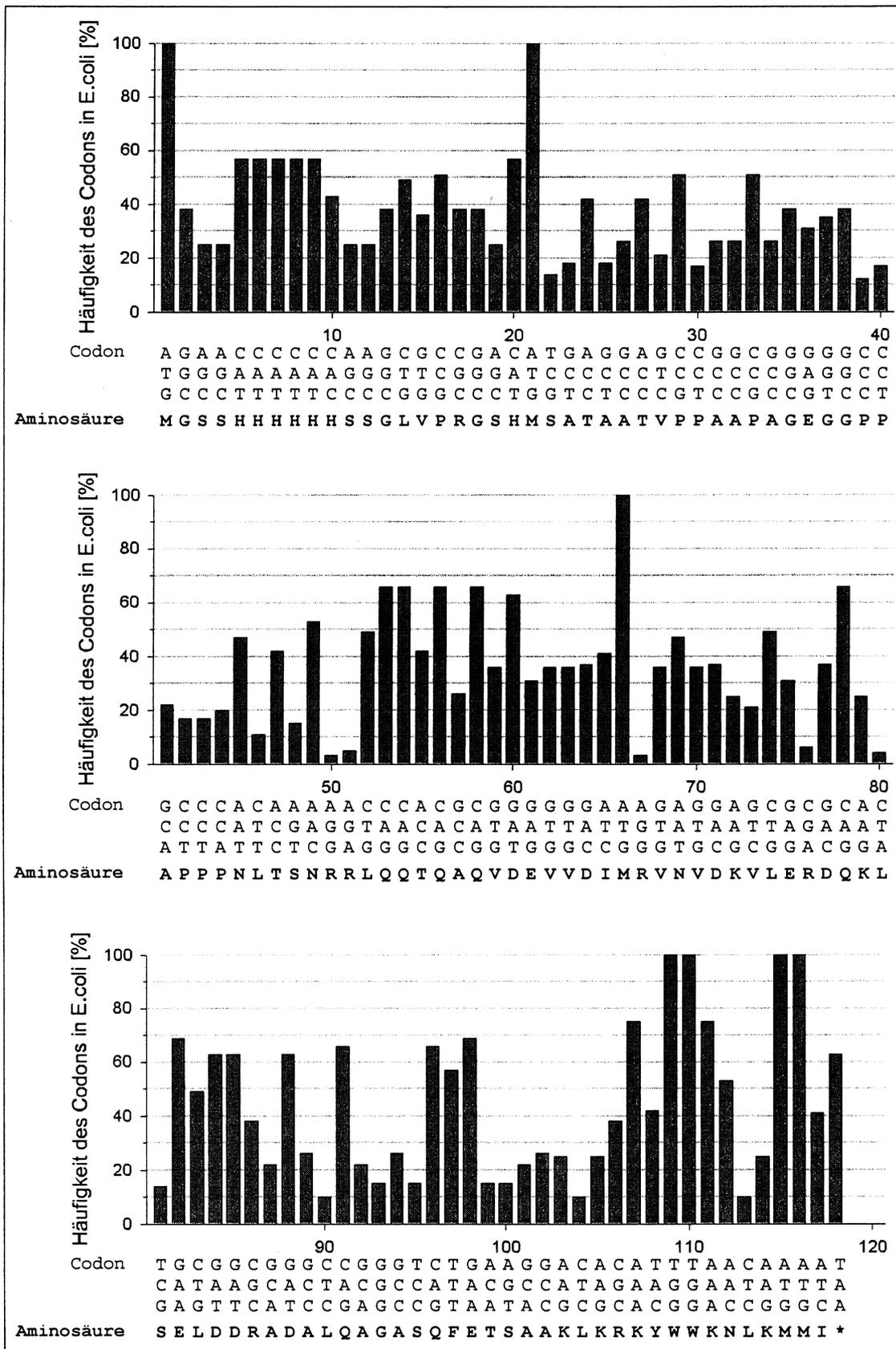


Abbildung 9.4: Häufigkeit der Codons aus rSyb2(N;1-97) in *E. coli*. (erhalten durch Eingabe der Basensequenz in <http://gcu.schoedl.de>; 18.02.2004).

9.2 Auswertung der Messdaten

9.2.1 Regressionsanalysen

Die Regressionsanalysen wurden mit dem Programm SigmaPlot durchgeführt.

9.2.1.1 Wachstumskurven der Bakterienkolonien

Die Regressionsanalyse zeigt für das Wachstum aller drei Bakterienstämme (s. Abbildung 5.5) einen sigmoidalen Kurvenverlauf entsprechend der Formel

$$(Formel 3) \quad y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$$

Tabelle 9.1 enthält die errechneten Parameter a, b und x_0 sowie den ermittelten Regressionskoeffizienten R^2 für die Messkurven der einzelnen Bakterienstämme.

Stamm	a	b	x_0	R^2
E. coli BLR (DE3)	3,1463	1,1866	3,9623	0,9986
E. coli Tuner (DE3)	2,4932	1,0769	5,3002	0,9917
E. coli BL21 CodonPlus(DE3)-RP	2,0736	0,6329	2,8694	0,9830

Tabelle 9.1: Parameter der Regressionskurven für die Wachstumskurven der einzelnen Bakterienstämme.

9.2.1.2 Untersuchungen zur Reihenfolge von Spaltung und Immobilisierung im ELISA

Beide Messkurven in Abbildung 5.16 und die Zunahme des rSyb2-Spaltfragments in Abbildung 5.18 wurden einer Regressionsanalyse unterzogen. Die Kurven verlaufen exponentiell, nähern sich dabei einem Maximum und entsprechen der Formel

$$(Formel 4) \quad y = y_0 + a * (1 - e^{-b*x})$$

Tabelle 9.2 enthält die errechneten Parameter a, b und x_0 sowie den ermittelten Regressionskoeffizienten R^2 für die Messkurven.

		y	a	b	R^2
Abnahme rSyb2	Abbildung 5.16	0,7278	2,3089	0,0866	0,9945
Zunahme rSyb2-Spaltprodukt	Abbildung 5.16	0,0943	1,2652	0,1777	0,9625
Zunahme rSyb2-Spaltprodukt	Abbildung 5.18	0,093	3,2167	5,0964	0,9884

Tabelle 9.2: Parameter der Regressionskurven für die Untersuchungen zur Reihenfolge von rSyb2-Spaltung und -Immobilisierung im ELISA.

9.2.2 Berechnung von Nachweis- und Erfassungsgrenze

Die Nachweis- und Erfassungsgrenzen des ELISA werden mit dem Programm DINtest berechnet. Die Berichte der Analyse für das reine und das krude Tetanustoxin finden sich in Abbildung 9.5

und Abbildung 9.7. Dazu führt dieses Programm außerdem einen Linearitätstest durch- auch diese Ergebnisse sind hier abgedruckt (s. Abbildung 9.6 und Abbildung 9.8).

Bericht

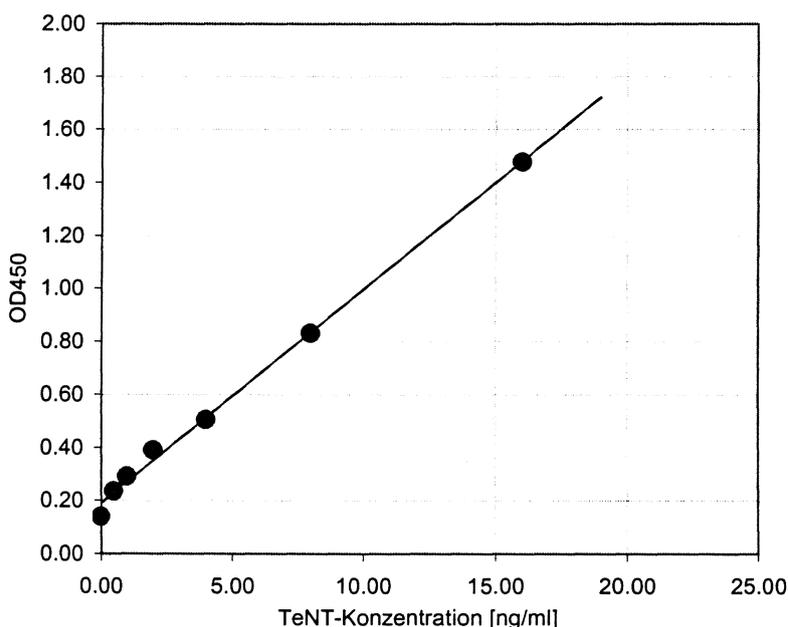
19.3.04 13:10

Durchführung

Rohdaten	
Messdatum	versch.
Operator	Katja Silberbach
Analyt	Tetanustoxin (Calbiochem)
Matrix	
Analysengerät	Tecan Rainbow Elisa Reader
Bemerkungen	

Kalibrationspunkte

Kalibrator		Messwert
Nr.	ng/ml	OD 450
1	0.0	0.1393
2	0.5	0.235
3	1.0	0.2899
4	2.0	0.389889
5	4.0	0.504556
6	8.0	0.8302
7	16.0	1.4776
8	32.0	2.0176
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		



Kenndaten

Steigung	0.079	Anzahl der Messungen	9
Achsenabschnitt	0.206	Reststandardabweichung	0.017
Korrelationskoeffizient	0.9994	Verfahrensstandardabweichung	0.221
Ergebnisunsicherheit	33.33 %	Summe der Abweichungsquadrate	175.875
Irrtumswahrscheinlichkeit	1.00 %	Quantile (einseitig)	2.132
		Quantile (zweiseitig)	2.776

Analytische Grenzwerte nach DIN 32645

Nachweisgrenze	0.545 ng/ml	
Erfassungsgrenze	1.091 ng/ml	
Bestimmungsgrenze	1.810 ng/ml	(Näherung)
	1.793 ng/ml	(exakt)

© DINTEST

Abbildung 9.5: Sensitivität des ELISA für reines Tetanustoxin: Bericht der DINtest-Analyse.

Linearitätstest		19.3.04 13:12	
Lineare Regression $f(x) = a * x + b$			
Steigung a	0.079	±	0.001
Achsenabschnitt b	0.206	±	0.010
Korrelationskoeffizient R	0.9994		
x-Mittelwert	5.250		
Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert	175.875		
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 95%)	ja		PW=2.73 KW=2.28 - 3.01
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 95%)	nein		PW=2.5 KW=0.89
Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test, 95%)	nein		PW=7.43 KW=10.12
Reststandardabweichung	0.017		
Verfahrensstandardabweichung	0.221		
Vertrauensbereich von Steigung a	0.075	bis	0.083
Vertrauensbereich von Achsenabschnitt b	0.178	bis	0.233
Quadratische Regression $f(x) = A * x^2 + B * x + C$			
Koeffizient A	0.000		
Koeffizient B	0.075		
Koeffizient C	0.212		
Korrelationskoeffizient R	0.9995		
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 95%)	ja		PW=2.73 KW=2.28 - 3.01
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 95%)	nein		PW=2.5 KW=0.89
Reststandardabweichung	0.019		
Verfahrensstandardabweichung	0.243		
F-Test nach Mandel			
optimales Regressionsmodell ?	linear		PW=0.42 KW=10.12
lineare Regression vertretbar ?	ja		
© Dintest			

Abbildung 9.6: Linearitätstest der ELISA-Ergebnisse mit reinem Tetanustoxin (DINtest-Analyse).

Bericht

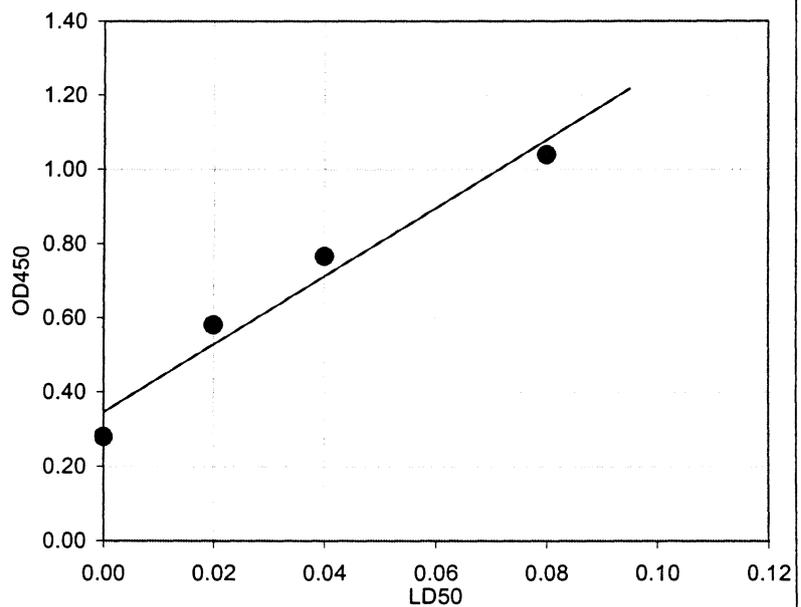
19.3.04 12:36

Durchführung

Rohdaten	
Messdatum	versch.
Operator	Katja Silberbach
Analyt	krudes Tetanustoxin
Matrix	
Analysengerät	Tecan Rainbow Elisa Reader
Bemerkungen	

Kalibrationspunkte

Nr.	Kalibrator	
	LD 50	OD 450
1	0.0	0.278556
2	0.02	0.580333
3	0.04	0.765333
4	0.08	1.038778
5	0.16	1.238111
6	0.32	1.604888
7	0.64	2.019888
8	1.28	2.297333
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		



Kenndaten

Steigung	9.176	Anzahl der Messungen	9
Achsenabschnitt	0.345	Reststandardabweichung	0.076
Korrelationskoeffizient	0.9809	Verfahrensstandardabweichung	0.008
Ergebnisunsicherheit	33.33 %	Summe der Abweichungsquadrate	0.004
Irrtumswahrscheinlichkeit	1.00 %	Quantile (einseitig)	2.920
		Quantile (zweiseitig)	4.303

Analytische Grenzwerte nach DIN 32645

Nachweisgrenze	0.049	LD50	
Erfassungsgrenze	0.097	LD50	
Bestimmungsgrenze	0.486	LD50	(Näherung)
	--	LD50	(exakt)

© DINTEST

Abbildung 9.7: Sensitivität des ELISA für krudes Tetanustoxin: Bericht der DINTest-Analyse.

Linearitätstest		19.3.04 12:58	
Lineare Regression $f(x) = a \cdot x + b$			
Steigung a	9.176	±	1.285
Achsenabschnitt b	0.345	±	0.059
Korrelationskoeffizient R	0.9809		
x-Mittelwert	0.035		
Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert	0.004		
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 95%)	zu wenig Werte		PW=1.95 KW=1.98 - 2.42
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 95%)	zu wenig Werte		PW=1.95 KW=0.78
Max. Abweichung ist ein Ausreisser (F-Test, 95%)	nein		PW=16.36 KW=161.44
Reststandardabweichung	0.076		
Verfahrensstandardabweichung	0.008		
Vertrauensbereich von Steigung a	3.646	bis	14.706
Vertrauensbereich von Achsenabschnitt b	0.091	bis	0.598
Quadratische Regression $f(x) = A \cdot x^2 + B \cdot x + C$			
Koeffizient A	-73.876		
Koeffizient B	15.298		
Koeffizient C	0.285		
Korrelationskoeffizient R	0.9990		
Residuen sind normalverteilt (R/s-Test, 95%)	zu wenig Werte		PW=2.44 KW=1.98 - 2.42
Residuen haben einen Trend (Neumann-Test, 95%)	zu wenig Werte		PW=3 KW=0.78
Reststandardabweichung	0.024		
Verfahrensstandardabweichung	0.002		
F-Test nach Mandel			
optimales Regressionsmodell ?	quadratisch		PW=18.74 KW=161.44
lineare Regression vertretbar ?	ja		
© Dintest			

Abbildung 9.8: Linearitätstest der ELISA-Ergebnisse mit krudem Tetanustoxin (DINtest-Analyse).

9.3 Geräteliste

	<i>Hersteller</i>	<i>Katalognr.</i>
<i>Protein-Analytik</i>		
Elektrophoreseeinheit (SDS-PAGEs) SE250	Amersham (Hoefer)	80-6147-45
Western Blot Apparatur (TE70 Semi Dry Transfer Unit)	Amersham (Hoefer)	80-6210-34
Power Supply (EPS 600)	Amersham (Hoefer)	19-0600-00
<i>Nucleinsäure-Analytik</i>		
PCR Cycler (Thermal Cycler 480)	Perkin-Elmer	
Elektrophoreseeinheit (HE33 Mini Submarine Unit)	Amersham (Hoefer)	80-6052-45
Power Supply (EPS 301)	Amersham	18-1130-01
Photographie der Agarosegele	Polaroid-Kamera	
<i>Zentrifugation</i>		
Zentrifuge J2-21	Beckman	
Rotor JA-14	Beckman	339247
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus	75003280
<i>Lyophilisation</i>		
LYOVAC® GT 2 mit Zubehör	AMSCO Finn-Aqua	diverse
<i>Anzucht von Bakterien</i>		
Schüttelschrank Certomat BS®-T	B.Braun Biotech	
Fermenter Biostat®-B und Zubehör	B.Braun Biotech	diverse
<i>ELISA</i>		
Schüttler für Mikrotiterplatten	IKA-Werke	diverse
Washer (Columbus Washer)	Tecan	F109104
Photometer (Rainbow Reader)	Tecan	F039046

9.4 Liste der verwendeten Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Katalognr.</i>	
1,10-Phenanthrolin-Monohydrat	VWR	1.07225	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich	T 2885	
4-Chloro-1-Naphtol (4CN)	Bio-RAD	170-6534	
30% Acrylamid/ Bis Solution	37,5:1 (2,6% C)	Bio-RAD	161-0158
Agarose für Nucleinsäuretrennung	NuSieve 3:1 Agarose	Biozym	850090
Ammoniumperoxodisulfat	VWR	1.01201	
Ampicillin- Natriumsalz	Serva	13399	
Antikörper	α -VAMP2 (mAK)	Synaptic Systems	104211
Antikörper	α -VAMP2 (pAK)	Calbiochem	627724
Benzamidin	Sigma-Aldrich	B 6506	

Anhang

Bovines Serumalbumin	BSA, Fraktion V	Serva	11926.03
Bromphenol Blau		Sigma-Aldrich	B 0126
Calciumchlorid Dihydrat		Calbiochem	208291
Carbenicillin		Novagen	69101
Chloramphenicol		Calbiochem	220551
Coomassie Brilliantblau 250R		VWR	1.15444
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat		VWR	1.06580
DNA Ligase	T4 DNA Ligase	New England Biolabs	M0202S
DNA- Polymerase	AmpliTaq Gold ®, mit Puffer I	Applied Biosystems	N 8080240
DTT		Sigma-Aldrich	D 9163
<i>E. coli</i> , kompetente Zellen	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3) RP	Stratagene	230255
<i>E. coli</i> , kompetente Zellen	OneShot TOP10	invitrogen	C4040-10
EDTA		Sigma-Aldrich	E 9884
EGTA		Sigma-Aldrich	E 3889
Essigsäure 99 -100%	Eisessig	VWR	8.18755
Ethanol reinst		VWR	1.00983.1000
Ethidiumbromid	500µg/ml	Sigma-Aldrich	E 1385
Glycerol		Calbiochem	356352
Glycin		Bio-RAD	161-0718
Größenstandard (Nucleinsäuretrennung)	100bp Ladder 500bp Ladder	invitrogen	15628-019 10594-018
Größenstandard (Proteintrennung)	Prestained Broad Range Marker	Bio-RAD	161-0318
HEPES		Sigma-Aldrich	H 4034
IPTG		invitrogen	15529-019
Isopropanol		VWR	1.09634
Isopropylthiogalactosid	IPTG	Peqlab	37-2020
Kaliumchlorid		VWR	1.04936.0500
Kaliumdihydrogen-Phosphat		VWR	1.04873
Magnesiumchlorid-Hexahydrat		VWR	1.05833
Methanol		VWR	1.06580
Milchpulver		Difco	232100
NaCl		VWR	1.06400
Natriumacetat	wasserfrei	VWR	1.16100
Natriumazid		VWR	1.06688
Natriumcarbonat		VWR	1.06392
Natriumchlorid		VWR	1.06404
Natrium-Dihydrogenphosphat Dihydrat		VWR	1.06345
Natriumhydroxid		VWR	1.06469
Nucleotide für die PCR	dNTPs	Applied Biosystems	N8080007

Pepstatin		Roche	1359053
pH-Meter Eichlösungen (Qualilab)	pH 4,0; pH 7,0; pH 10,0	VWR	66283
Plasmid- DNA	pET11a	Novagen	69436-3
PMSF		Roche	0837091
Polypropylenglycol 1200		Fluka	81370
Primer für die PCR		Sigma-Aldrich ARK	
Protein- Assay	DC- Assay	Bio-RAD	500-0112
Protein Standard II	Albumin	Bio-RAD	500-0007
Restriktionsenzym	EcoR I	Roche	703737
Restriktionsenzym	Xba I	Roche	674257
Restriktionsenzym	NdeI	New England Biolabs	#R0111S
Restriktionsenzym	BamHI	New England Biolabs	#R0136S
Restriktionsenzym	Tth111I	New England Biolabs	#R0185S
Restriktionsenzym	PfIF I	New England Biolabs	#R0595S
RNase A		Roche	109142
Salzsäure	(32%)	VWR	1.00319
Schwefelsäure	2,5 M	VWR	1.09912
SDS		Roth	2326.2
Sucrose		Sigma-Aldrich	S 1888
TEMED		Amersham	17-1312-01
Tetanustoxin		Calbiochem	582243
tri-Natriumcitrat-Dihydrat		Roth	1.06448
Tris		Amersham	17-1321-01
Triton X-100		Roche	789 704
Tween® 20		Sigma-Aldrich	P 5927
Urea		Sigma-Aldrich	U 5128
Wasserstoffperoxid		VWR	1.07209
Zinkchlorid		VWR	1.08816

9.5 Liste der Verbrauchsmaterialien

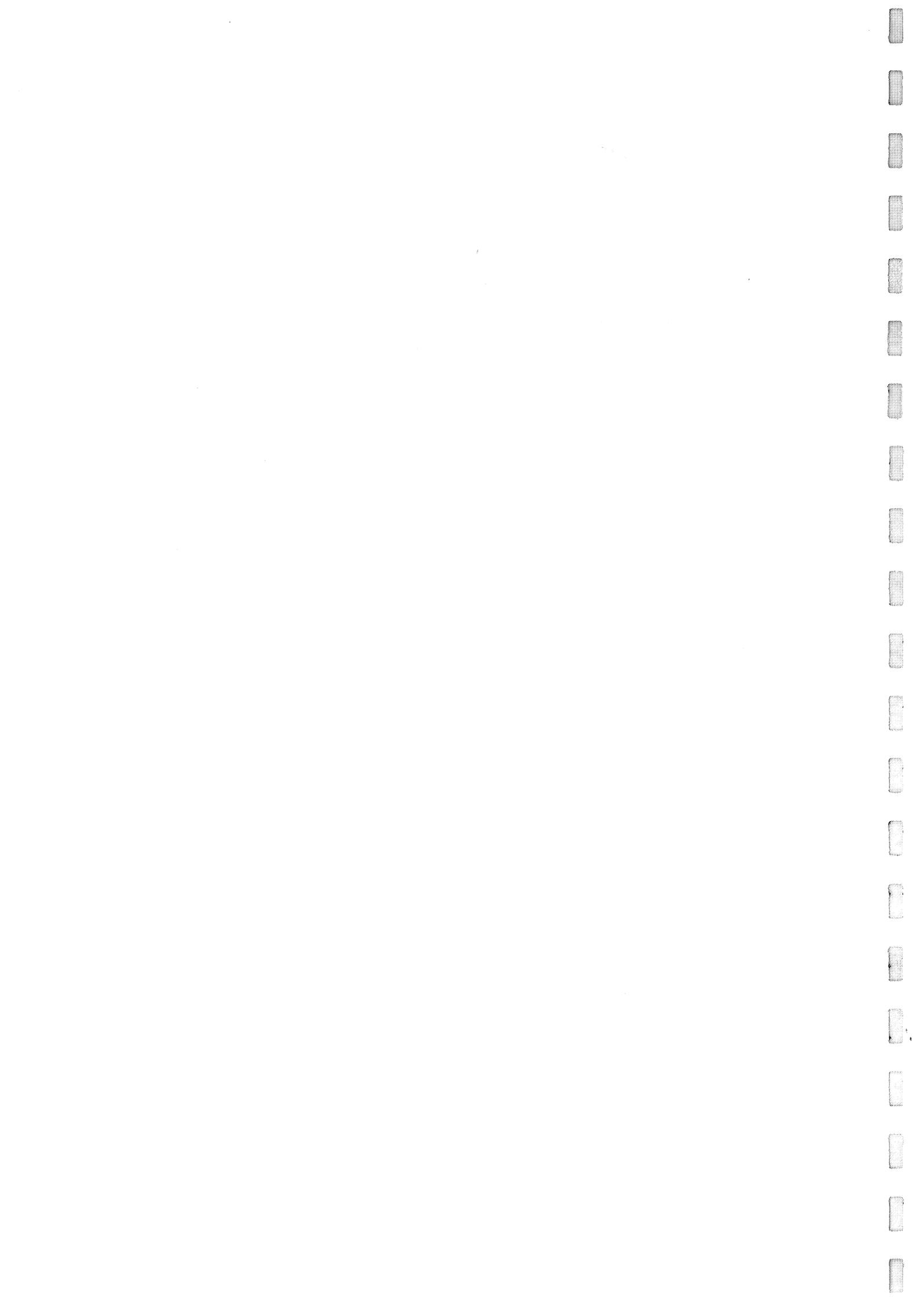
Name		Hersteller	Katalognr.
Dialysekassetten	3500 MW Cutoff	Pierce Endogen	66110
Gel Extraction Kit	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
Mikrotiterplatten	F96 Immuno Plates:	NUNC	
	MaxiSorp		456537
	MediSorp		437320
	MultiSorp		467340
	PolySorp		456529
Mikrotiterplatten	Ni-NTA HisSorb Strips	Qiagen	35024
Mikrotiterplatten	Maleimid-Platten (Sulfhydryl Bind)	Corning	2509
Mikrotiterplatten für DC-Assay	U- Form	Greiner	650 101
Ni-NTA Agarose Beads		Qiagen	30230

Nitrocellulose Membran	Protran BA 85	Schleicher und Schüll	401265
PCR Purification Kit	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28104
Plasmid MiniPrep Kit	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27104
Plasmid MiniPrep Kit	E.Z.N.A Kit I	Peqlab	12-6943-02
Polypropylensäulen	zur Proteinaufreinigung	QIAGEN	34964
Reaktionsgefäße	1,5ml	Eppendorf	0030120.086
	2ml		0030120.094

9.6 Internetadressen der Herstellerfirmen

<i>Name</i>	<i>Homepage</i>
Affina Immuntechnik GmbH	www.affina.de
Amersham Biosciences Europe GmbH	www.amershambiosciences.com
AMSCO Sinn-Aqua (Steris GmbH)	www.amsco.com (www.steris.com)
Applied Biosystems	www.appliedbiosystems.com
B. Braun Biotech International GmbH	www.bbraunbiotech.com
Beckman Coulter, Inc.	www.beckman.com
Bio-RAD Laboratories GmbH	www.bio-rad.com
BIOTREND Chemikalien GmbH	www.biotrend.de
Biozym Diagnostik GmbH	www.biozym.com
Calbiochem (Merck Biosciences GmbH)	www.merckbiosciences.co.uk
Carl Roth GmbH & Co. KG	www.carl-roth.de
Corning GmbH (Corning Inc.)	www.corning.com
Difco (Becton Dickinson GmbH)	www.bd.com
Eppendorf AG	www.eppendorf.com
Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	www.sigmaaldrich.com
GENterprise GmbH	www.genterprise.de
Greiner Bio-One GmbH	www.greinerbioone.com
Heraeus	www.kendro.com
Hofer (Amersham Biosciences Europe GmbH)	www.amershambiosciences.com
IKA-Werke GmbH & CO. KG	www.ika.de
Invitrogen GmbH	www.invitrogen.com
Merck Biosciences GmbH	www.merckbiosciences.co.uk
Merck KGaA	www.merck.de
MWG Biotech AG	www.mwg-biotech.com
New England Biolabs GmbH	www.neb.com
Novagen (Merck Biosciences GmbH)	www.merckbiosciences.co.uk
NUNC A/S	www.nunc.nalgenunc.com
Perkin Elmer Instruments GmbH	www.perkinelmer.com
PEQLAB Biotechnologie GmbH	www.peqlab.com
Pharmacia (Amersham Biosciences Europe GmbH)	www.amershambiosciences.com
Pierce Endogen Perbio Science Deutschland GmbH	www.piercenet.com
Qiagen GmbH	www.qiagen.com

Roche Diagnostics GmbH	www.roche-applied-science.com
Schleicher & Schuell BioScience GmbH	www.schleicher-schuell.com
SERVA Electrophoresis GmbH	www.serva.de
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	www.sigmaaldrich.com
Sigma-Genosys Ltd.	www.sigma-genosys.eu.com
Stratagene	www.stratagene.com
Synaptic Systems Gesellschaft für neurobiologische Forschung, Entwicklung und Produktion mbH	www.sysy.com
TECAN Deutschland GmbH	www.tecan.de
VWR International GmbH	www.vwr.com



Lebenslauf

Persönliche Daten

Katja Silberbach
geboren am 15.09.1974 in Münster
verheiratet

Schul- und Hochschulbildung

seit 01/01	Promotion im Paul-Ehrlich-Institut in Langen Titel: „Entwicklung einer <i>in-vitro</i> -Methode zur Detektion von Resttoxizität in Tetanusimpfstoffen“ Gutachter: Prof. Dr. W. Müller, Institut für Pharmakologie der Naturwissenschaften, Johann Wolfgang Goethe –Universität, Frankfurt am Main PD Dr. A. Hoffmann, Paul-Ehrlich-Institut, Langen
11/99	Diplom (Note „sehr gut“) Vertiefungsrichtungen: Biotechnologie (Prof. Dr. W. Hartmeier, Lehrstuhl für Biotechnologie) Ökologie (Prof. Dr. I. Schuphan, Lehrstuhl für Ökologie, Ökotoxikologie, Ökochemie) Mikrobiologie (Prof. Dr. K. Wolf, Institut für Mikrobiologie) Bioverfahrenstechnik (Prof. Dr. J. Büchs, Institut für Bioverfahrenstechnik)
9/98 - 7/99	Diplomarbeit im Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH (Prof. Dr. C. Wandrey) Titel: „Reaktionstechnische Untersuchungen zur Verweilzeitentkopplung bei Fermentationen mit <i>E. coli</i> “
10/93 - 9/99	Studium der Biologie an der RWTH Aachen
06/93	Abitur
1984 – 1993	Gymnasium Büttgen
1980 – 1984	Gemeinschaftsgrundschule in Kaarst-Büttgen

Beruflicher Werdegang

seit 01/01	Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, als wissenschaftliche Angestellte
08/99 – 12/00	Procter & Gamble Pharmaceuticals - Germany GmbH
während des Studiums	Lehrstühle für Biotechnologie, für Pflanzenphysiologie und für Ökologie, Ökotoxikologie und Ökochemie der RWTH Aachen, als wissenschaftliche Hilfskraft
09/96 – 10/96	Freiwilliges Praktikum an der Estacion Biologica „Jatun Sacha“, Ecuador
05/93 – 08/93	Freiwilliges Praktikum am Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

Weiterbildung, Nebenberufliche Tätigkeiten

12/01	Lehrgang „Wissenschaftsjournalismus“ an der Henri-Nannen-Schule Berlin
10/01 – 02/02	Internet basierter Kurs „Screen-Design und Web-Publishing“ an der FH Furtwangen

Weitere Kenntnisse

EDV	MS-Office, Micrografix Designer
Weiteres	HTML
Sprachen	Englisch in Wort und Schrift Spanisch und Französisch (fortgeschrittene Grundkenntnisse)

Weiterstadt, 25. August 2004
