

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Entwicklung und Wirksamkeitsprüfung eines
Impfstoffes zur aktiven Immunisierung gegen
das *Clostridium perfringens* Alpha-toxin**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Axel Neubauer

Gießen 2002

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Entwicklung und Wirksamkeitsprüfung eines
Impfstoffes zur aktiven Immunisierung gegen
das *Clostridium perfringens* Alphatoxin**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Axel Neubauer
Tierarzt aus Troisdorf

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zahner

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 2002

Meinen Eltern
und
meinen Freunden

"Infectious disease is one of the few genuine adventures left in the world. The dragons are all dead and the lance grows rusty in the chimney corner [...] About the only sporting proposition that remains unimpaired by the relentless domestication of a once free-living human species is the war against those ferocious little fellow creatures, which lurk in the dark corners and stalk us in the bodies of rats, mice, and all kinds of domestic animals; which fly and crawl with the insects, and waylay us in our food and drink and even in our love."

Hans Zinsser, 1935

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Bakterielle Zink-Metallo Phospholipasen C (PLCs).....	2
2.2	Vertreter der Zink-Metallo PLCs	2
2.2.1	Phänotypische Merkmale	3
2.2.2	Genotypische Charakterisierung	8
2.2.3	Dreidimensionale Struktur.....	10
2.3	Molekulare Mechanismen der PLC-spezifischen biologischen Wirkungen.....	13
2.3.1	Wirkmechanismus der enzymatischen Aktivität.....	13
2.3.1.1	Lokalisation des enzymatisch aktiven Zentrums	13
2.3.1.2	Aufbau und Struktur des enzymatisch aktiven Zentrums	13
2.3.1.3	Interaktion zwischen Zink-Metallo Phospholipase C und Substrat	14
2.3.1.4	Prozeß der enzymatischen Spaltung	14
2.3.1.5	Die Bedeutung von Glutaminsäure ₄ und Tyrosin ₅₆ für Phospholipid- spezifität und Substratumsatz.....	15
2.3.2	Mechanismus der Bindung an eukaryontische Membranen.....	16
2.3.2.1	Einflußfaktoren auf die Zell-Bindung	17
2.3.2.1.1	Hydrophobe Aminosäure-Seitenketten	17
2.3.2.1.2	Kalzium-Ionen.....	18
2.3.2.2	Gründe für die fehlende Membranbindung der <i>Bacillus cereus</i> PC-PLC.....	20
2.4	Pathogenetische Bedeutung der Zink-Metallo Phospholipasen C	21
2.5	Impfstoffe gegen Zink-Metallo PLCs	25
2.5.1	Immunogene und protektive Strukturen der Zink-Metallo PLCs.....	25
2.5.2	Stand der Entwicklung von Zink-Metallo Phospholipase C Vakzinen.....	26
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Verwendete Expressionsvektoren	28
3.2	Reklonierung des <i>plc 121A/91</i> -Gens in den Vektor pASK-IBA2.....	29
3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
3.2.2	Gewinnung und Aufreinigung von Restriktionsfragmenten	30
3.2.3	Ligation von Restriktionsfragmenten.....	31

3.2.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	31
3.2.5	Screening der Transformanten	32
3.2.6	DNA-Sequenzierung	33
3.2.6.1	Sequenzierungsreaktion und Probenaufbereitung	34
3.2.6.2	Auftrennung der Syntheseprodukte aus der Sequenzierungsreaktion.....	35
3.2.6.3	Computergestützte Auswertung der Sequenzdaten.....	36
3.3	Mutation des Nukleotids 635 des <i>plc 121A/91</i> -Gens.....	36
3.4	Gewinnung und Aufreinigung der rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His ₂₁₂	38
3.4.1	Induktion und Expression des rAT121A/91 und des rAT121A/91-His ₂₁₂	38
3.4.2	Präparation periplasmatischer Extrakte.....	38
3.4.3	Kontrolle der Expression mittels SDS-Gelelektrophorese.....	38
3.4.4	Aufreinigung und Umpufferung der rekombinanten Proteine	39
3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	40
3.6	Untersuchungen zur Reinheit und Immunogenität der rekombinanten Alphatoxinvarianten (rAT121A/91 und rAT121A/91-His ₂₁₂)	40
3.6.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung der Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper 1E8 und 3B4.....	41
3.6.2	Immunoblot.....	41
3.6.3	Überprüfung der antigenen Eigenschaften der rekombinanten Alphatoxin- varianten im ELISA.....	42
3.7	Untersuchungen zur Überprüfung der biologischen Wirkungen der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His ₂₁₂	44
3.7.1	<i>In vitro</i> Testassays zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität und hämolytischen Wirkung des rAT121A/91-His ₂₁₂	44
3.7.2	<i>In vivo</i> Assay zur Überprüfung der letalen Wirkung der Alphatoxinvariante AT121A/91-His ₂₁₂	44
3.8	Tierexperimentelle Techniken	45
3.8.1	Intraperitoneale Injektion bei der Maus	45
3.8.2	Subkutane Injektion bei der Maus.....	45
3.8.3	Narkose und Euthanasie bei der Maus	45
3.8.4	Dekapitation bei der Maus	46
3.9	Tierhaltung und -verwendung	46
3.10	Immunisierung- und Belastungsversuche an Mäusen.....	46

Inhaltsverzeichnis

3.10.1	Versuchsablauf.....	46
3.10.2	Durchgeführte Immunisierungs- und Belastungsversuche	46
3.10.3	<i>In vitro</i> Testassays zur Bestimmung Alphatoxin-spezifischer Aktivitäten	48
3.10.4	Bestimmung der minimalen letalen Dosis des Alphatoxins in der Maus	49
3.10.5	Belastungsversuche an Mäusen.....	49
3.11	Untersuchung von Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His ₂₁₂]- Hyperimmunseren	50
3.11.1	Serumgewinnung bei der Maus.....	50
3.11.2	ELISA zur Bestimmung des Anti-Alphatoxin Antikörpertiters in Hyperimmunseren	50
3.11.3	<i>In vitro</i> Neutralisation der Hyperimmunseren im Hämolyse-Test.....	52
3.11.3.1	Gewinnung von Mauserythrozyten	52
3.11.3.2	Durchführung des Hämolyse Assays	52
3.11.4	<i>In vitro</i> Neutralisation der Hyperimmunseren im Lezito-Vittelin Test	53
3.11.4.1	Herstellung von Eigelbsuspension	53
3.11.4.2	Durchführung des Lezito-Vittelin Tests	53
3.11.5	<i>In vivo</i> Neutralisationsversuch im Mäuse-Letalitätstest.....	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Reklonierung des <i>plc121A/91</i> -Strukturgens aus pHIT-I-1 in pASK-IBA2	55
4.2	Mutation des Arginin ₂₁₂ im rAT121A/91 zu einem Histidin	58
4.3	Sequenzierung der <i>plc</i> -Strukturgene der Expressionsplasmide pHIT-I-38 und pHIT-I-39	59
4.4	Expression von rAT121A/91 und rAT121A/91-His ₂₁₂ unter Verwendung der Vektoren pASK-IBA2 bzw. pASK-75.....	63
4.4.1	Steigerung der rAT121A/91 Expression bei Verwendung des pASK-IBA2	63
4.4.2	Expression des rAT121A/91-His ₂₁₂ im pASK-75.....	64
4.4.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His ₂₁₂	65
4.5	Ausbeute der monoklonalen Alphatoxin-spezifischen Antikörper 1E8 und 3B4 nach affinitätschromatographischer Aufreinigung	66
4.6	Nachweis der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His ₂₁₂ im Immunoblot mittels Alphatoxin-spezifischem Antikörper 3B4.....	67

4.7	Analyse der Bindungseigenschaften der rekombinanten Alphatoxin-variante 121A/91-His ₂₁₂ gegenüber dem Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper 3B4.....	67
4.8	Nachweis der enzymatischen Aktivität und der hämolytischen Wirkung der Alphatoxinvariante 121A/91-His ₂₁₂ im Eigelb-Agar Diffusionstrübungs- und Hämolysetest.....	68
4.9	Überprüfung der Toxizität der rekombinanten Variante rAT121A/91-His ₂₁₂ im Maus-Letalitätstest.....	69
4.10	Immunisierungsversuche mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His ₂₁₂	69
4.10.1	Verträglichkeit der rekombinanten Alphatoxinvarianten bei der Immunisierung von Mäusen in Abhängigkeit vom Applikationsweg.....	69
4.10.1.1	Intraperitoneale Immunisierung mit rAT121A/91 und rAT121A/91-His ₂₁₂	69
4.10.1.2	Subcutane Immunisierung mit dem rAT121A/91-His ₂₁₂	70
4.10.2	Nachweis von spezifischen Anti-Alphatoxin Antikörpern in Hyperimmunseren von Mäusen (ELISA).....	70
4.10.2.1	Bestimmung der Anti-Alphatoxin Titer nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung von Mäusen mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His ₂₁₂ ohne Adjuvans.....	71
4.10.2.2	Anti-Alphatoxin Titer nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung von Mäusen mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	72
4.10.2.3	Bestimmung der Anti-Alphatoxin Titer nach zweimaliger subcutaner Immunisierung von Mäusen mit rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59 und Alu-Gel.....	73
4.10.3	Nachweis antihämolisierender Antikörper in Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunseren im <i>in vitro</i> Neutralisationsversuch.....	74
4.10.4	Semiquantifizierung antihämolisierender Antikörper in Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunseren im <i>in vitro</i> Neutralisationsversuch.....	76
4.10.5	Nachweis PLC-inhibierender Antikörper in Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunseren	77
4.10.6	<i>In vivo</i> Neutralisation des Alphatoxins im Mäuse-Letalitätstest.....	78
4.10.7	Bestimmung der minimalen <i>Dosis letalis</i> des Alphatoxins im Mausmodell.....	79
4.10.8	Nachweis der enzymatischen Aktivität und der hämolytischen Wirkung der zur Belastung verwendeten Alphatoxincharge (P4039).....	80

Inhaltsverzeichnis

4.10.9	<i>In vivo</i> Neutralisationsversuch zum Nachweis von protektiven Antikörpern in der Maus.....	81
4.10.9.1	Überlebensraten der Impflinge nach zweimaliger Immunisierung mit rAT121A/91-His ₂₁₂ bzw. rAT121A/91 ohne Adjuvans	81
4.10.9.2	Überlebensraten der Impflinge nach zweimaliger Immunisierung mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His ₂₁₂ und dem Adjuvans MF59.....	82
4.10.9.3	Überlebensraten der Impflinge im Toxinchallenge nach zweimaliger sub- cutaner Immunisierung mit der Alphatoxinvariante rAT121A/91-His ₂₁₂ und den Adjuvantien MF59 bzw. Alu-Gel	85
5	DISKUSSION	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	SUMMARY	99
8	LITERATURVERZEICHNIS	101
9	ANHANG	115
9.1	Chemikalien	115
9.2	Antikörperkonjugate und Enzyme.....	115
9.3	Plasmide	115
9.4	Kulturmedien	115
9.5	Puffer und Lösungen	117
9.5.1	SDS-Polyacrylamidelektrophorese Puffer	117
9.5.2	Puffer für den Elektrotransfer mittels Western-Blot-Verfahren	118
9.5.3	Puffer und Lösungen für den Immunoblot.....	119
9.5.4	Puffer für Lösungen für ELISA.....	119
9.5.5	Puffer für Hämolyseversuche.....	120
9.5.6	Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	121
9.6	Injektionsnarkotikum.....	121
10	DANKSAGUNG	122

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aqua
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Hb	Hämoglobin
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton
i.p.	intraperitoneal
IWP	isotoner Waschpuffer
LB	Luria-Bertani-Medium
OD	optische Dichte
omp	Outer Membrane Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLC	Phospholipase C
s.c.	subkutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight

1 Einleitung

Clostridium (C.) perfringens wird aufgrund seiner Fähigkeit zur Bildung von Beta-, Epsilon- und Iotatoxin in die Biotypen A-E eingeteilt (Petit et al., 1999). Alle *C. perfringens* Stämme besitzen das chromosomal lokalisierte Alphatoxin-Gen, dessen molekularbiologischer Nachweis für die Spezies-Identifikation genutzt wird (Schlapp et al., 1995). Das Alphatoxin wird den Zink-Metallo Phospholipasen C zugeordnet (Titball, 1997). Es umfaßt 370 Aminosäuren und weist neben einer enzymatischen (PLC-) Aktivität eine speziesspezifische hämolytische Wirkung auf (Mc Donel, 1986), die mit der letalen Wirkung des Toxins korreliert (Jepson et al., 1999).

Die *C. perfringens* Phospholipase C gilt als wichtigster Virulenzfaktor in der Pathogenese des humanen Gasbrands (Awad et al., 1995). Ätiologisch bedeutsam ist die PLC ebenso bei veterinärmedizinisch relevanten Krankheitskomplexen wie der Enteritis bzw. Enterotoxämie der Saugferkel (Johannsen et al., 1993) und der Kälber (Cygan und Buczek, 1993) sowie bei der nekrotisierenden Enteritis des Wirtschaftsgeflügels (Baba et al., 1992).

Der akute bis perakute klinische Verlauf und die hohe Mortalität erfordern für die Bekämpfung des humanen Gasbrands die Entwicklung einer Alphatoxin-spezifischen Vakzine (Williamson und Titball, 1993). Verschiedene Impfstoffpräparationen wurden bereits in tierexperimentellen Studien getestet. So kamen neben Alphatoxoid-Vakzinen (Owen-Smith, 1968) auch rekombinant hergestellte Subunit-Vakzinen (Williamson und Titball, 1993) zum Einsatz. Aufgrund von Nebenwirkungen oder mangelhafter Protektivität konnte sich jedoch keine der beiden Impfstoffarten durchsetzen.

Bislang noch nicht untersucht wurde die Impfung mit atoxischen Alphatoxinvarianten, die entweder von natürlich vorkommenden *C. perfringens* Defektmutanten gebildet oder durch gentechnische Methoden hergestellt werden können (Titball et al., 1999). Beide Ansätze zur Immunisierung werden in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Im einzelnen werden eine rekombinante atoxische Alphatoxinvariante 121A/91 des *C. perfringens* Feldisolates 121A/91 und ein rekombinantes Alphatoxin (AT121A/91), das durch Rückmutation des Arginins an Position 212 zu dem in der Wildtypoxin-Sequenz vorhandenen Histidin als zweite Variante zur Immunisierung generiert wurde (AT121A/91-His₂₁₂), im Maus-Challenge-Modell auf ihre Eignung als Impfantigen gegen das Alphatoxin von *C. perfringens* geprüft.

2 Schrifttum

2.1 Bakterielle Zink-Metallo Phospholipasen C

Als Phospholipasen werden Enzyme bezeichnet, die Membran-Phospholipide bzw. strukturverwandte Derivate hydrolysieren. Diese Proteine werden von einer Vielzahl pathogener und apathogener Bakterien gebildet und aufgrund ihres Angriffspunktes innerhalb des Phospholipids in die Phospholipasen A1, A2, C und D unterteilt.

Die Phospholipasen C (PLCs) werden anhand ihrer Substratspezifität in Phosphatidylcholin-, Sphingomyelin- und Phosphatidylinositol-bevorzugende PLCs differenziert (Titball et al., 1999). Die bakteriellen Phosphatidylcholin-bevorzugenden PLCs werden auch als Zink-Metallo Phospholipasen C bezeichnet.

In der folgenden Literaturübersicht werden diese Enzymklasse und ihre Eigenschaften dargestellt. Dies schließt die Darstellung der Struktur, der biologischen Wirkungen der Enzyme *in vivo* und *in vitro*, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und die Bedeutung der Enzyme in der Pathogenese ein. Desweiteren wird aufgezeigt, welche Konsequenzen diese Erkenntnisse für die Impfstoffentwicklung gegen den toxischsten Vertreter dieser Gruppe, das Alphatoxin von *Clostridium perfringens* haben.

2.2 Vertreter der Zink-Metallo PLCs

Die bisher bekannten Zink-Metallo Phospholipasen C sind in Tabelle 1 aufgeführt:

Tabelle 1: Zink-Metallo Phospholipasen C

<i>Erreger</i>	<i>Toxin</i>
<i>Clostridium (C.) perfringens</i>	Alphatoxin
<i>C. bifermentans</i>	PLC
<i>Bacillus (B.) cereus</i>	PC-PLC
<i>Listeria (L.) monocytogenes</i>	PLC-B
<i>C. novyi</i>	Gammatoxin
<i>C. absonum</i>	PLC
<i>C. barati</i>	PLC

Das *C. perfringens* **Alphatoxin**, das von allen *C. perfringens* Biotypen (A-E) gebildet wird (Titball, 1997), ist das erste bakterielle Protein dessen enzymatische Aktivität erkannt worden ist (Mac Farlane und Knight, 1941). Dem Alphatoxin kommt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des humanen Gasbrandes, einer zumeist letal verlaufenden Myonekrose des Menschen, zu (Awad et al., 1995; Williamson und Titball, 1993). Die atoxische *C. bifermentans* **PLC** ist seit vielen Jahren aufgrund ihrer Aminosäurehomologie zum Alphatoxin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Durch den Vergleich beider Proteine verspricht man sich Erkenntnisse über die Toxizitätsmechanismen des Alphatoxins.

Die *Bacillus cereus* **PLC (PC-PLC)** gilt neben dem Alphatoxin als die am besten untersuchte Zink-Metallo Phospholipase C, obwohl sie weder human- noch veterinärmedizinisch von pathogenetischer Bedeutung ist. Das wissenschaftliche Interesse an der PC-PLC ist in ihrer strukturellen Analogie zu Säugetier-PLCs begründet (Martin und Hergenrother, 1998).

Listeria monocytogenes gilt als Modellerreger für die Erforschung der Biologie von intrazellulär parasitierenden Bakterien. Als essentielle Virulenzfaktoren für die intrazelluläre Phase gelten die Phosphatidylinositol-spezifische PLC (PLC-A), das Listeriolysin O und die Phosphatidylcholin-bevorzugende Zink-Metallo PLC (**PLC-B**) (Smith et al., 1995). *L. monocytogenes* kann bei Mensch und Tier zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, wobei Aborte und Meningitiden dominieren (Goldfine et al., 1998).

Bislang liegen nur wenige Daten zum **Gammatoxin** von *C. novyi* Typ A und den **Phospholipasen C** von *C. barati* und *C. absonum* vor (Tsutsui et al., 1995; Nakamura et al., 1976). Es wird vermutet, daß mit dem Gammatoxin von *C. novyi* Typ A eine weitere Zink-Metallo PLC an der Pathogenese des Gasbrandes beteiligt ist (Songer, 1997).

Die PLCs von *C. barati* und *C. absonum* werden dieser Enzymgruppe aufgrund ihrer immunologischen Kreuzreaktivität zum Alphatoxin zugeordnet. Alphatoxin-Gen spezifische Sonden hybridisieren zudem unter wenig stringenten Bedingungen mit den PLC Genen dieser *Clostridium* Spezies (Nakamura et al., 1976; Titball, 1997). Weiterführende Charakterisierungen sind bislang nicht durchgeführt worden.

2.2.1 Phänotypische Merkmale

Die Zink-Metallo PLCs werden als mature Proteine in den Kulturüberstand sezerniert (Titball, 1998). Lediglich die *Bacillus cereus* PC-PLC und die *Listeria monocytogenes* Phospholipase C werden nach der Translation prozessiert, wobei die PC-PLC durch die N-

terminale Abspaltung von 14 Aminosäuren aktiviert wird (Johansen et al., 1988). Die *Listeria monocytogenes* PLC-B wird mit einer 26 Aminosäure umfassenden Prosequenz exprimiert, die von der erregerigenen Metalloprotease (MP1) bzw. von einer Wirtsprotease im sauren Milieu abgespalten wird (Vazquez-Boland, 1992).

Die in Tabelle 2 aufgeführten Massengewichte der Zink-Metallo Phospholipasen C variieren zwischen 30,0 und 42,5 kDa (Takahashi et al., 1981; Geoffroy et al., 1991; Titball, 1998).

Tabelle 2: Molekulargewichte der Zink-Metallo PLCs

<i>Toxin</i>	<i>Molekulargewicht</i>
Alphatoxin	42,50 kDa
PC-PLC	28,52 kDa
<i>C. bifermentans</i> PLC	42,75 kDa
Gammatoxin	30,00 kDa
PLC-B	39,00 kDa

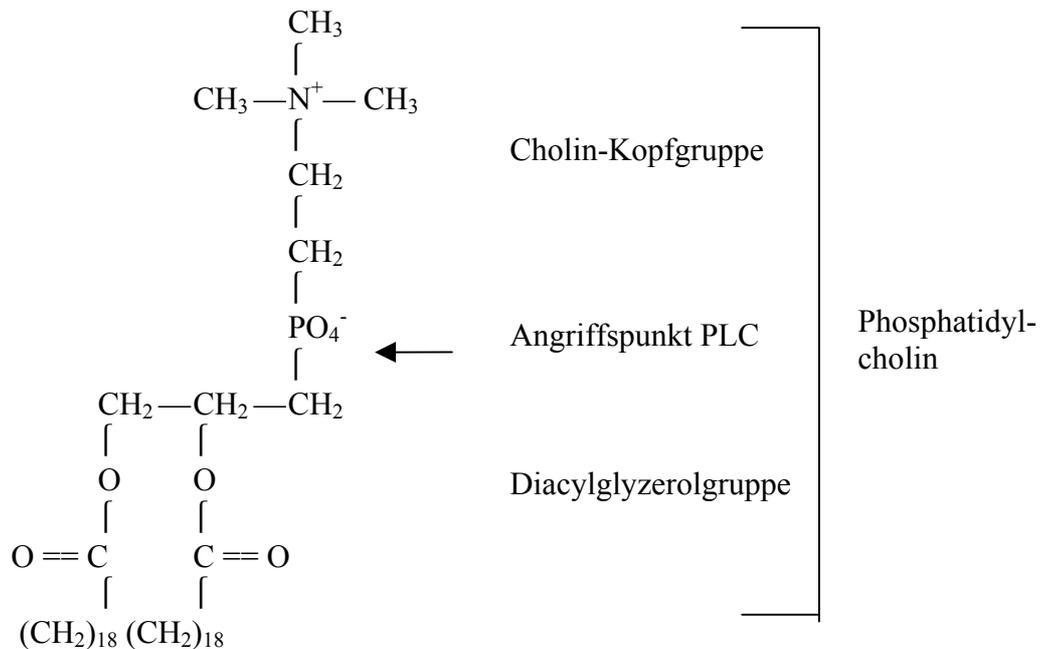
Alle Vertreter dieser Enzymgruppe benötigen für ihre Funktion Zink-Ionen (Titball, 1993), deren essentielle Bedeutung für die Stabilität und Aktivität der Zink-Metallo Enzyme anhand des Alphatoxins dargestellt worden ist.

In Zink-reduziertem Medium produziertes Alphatoxin ist instabil und enzymatisch inaktiv. Gleichzeitig besitzt es eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Proteasen. Bei der Zugabe von Zink entsteht ein stabiles, enzymatisch aktives und Protease-unempfindliches Protein (Sato et al., 1978; Logan et al., 1991). Diese Beobachtung wird von Krug und Kent (1984) bestätigt. Sie haben gezeigt, daß Zink-Metallo PLCs durch die Zugabe von Chelatbildnern zu inaktivieren sind.

Die biologische Wirkung des Alphatoxins, der PC-PLC von *Bacillus cereus* und des Gammatoxins ist Kalzium-abhängig (Titball, 1993). Studien am Alphatoxin deuten daraufhin, daß Kalzium-Ionen essentiell für die Interaktion von Enzym und Phospholipid sind. Vermutlich neutralisieren Kalzium-Ionen die Ladung der Substrat-Phosphatgruppe und reduzieren so die intermolekulare Abstoßung (Young et al., 1991; Moreau et al., 1988). Alle Zink-Metallo PLCs hydrolysieren bevorzugt Phosphatidylcholin (Nakamura et al., 1976; Titball, 1997) und besitzen einen gemeinsamen Angriffspunkt innerhalb des Phospholipids. Durch die Spaltung der Phosphordiesterbindung entsteht eine wasserunlösliche Diacylglycerolgruppe und eine geladene Kopfgruppe (Titball et al, 1999). Eine schematische

Darstellung des Phosphatidylcholins, des Angriffspunktes der Zink-Metallo PLCs und der durch die Spaltung entstehenden Reaktionsprodukte findet sich in Abbildung 1.

Abbildung 1: Strukturformel des Phosphatidylcholin



In Tabelle 3 sind verschiedene andere Substrate aufgeführt, die von den Enzymen gespalten werden (nach Titball, 1993).

Tabelle 3: Substratspezifität der Zink-Metallo PLCs

<i>Toxin</i>	<i>Substrat</i>
Alphatoxin	PC ¹ , SPM ² , PS ³ , LPC ⁴
PC-PLC	PC, PE ⁵ , PS
<i>C. bifermentans</i> PLC	PC, SPM, weitere nicht untersucht
Gammatoxin	PC, SPM, LPC, PE, PI ⁶ , PG ⁷
PLC-B	PC, PE, PS, SPM

1 Phosphatidylcholin

2 Sphingomyelin

3 Phosphatidylserin

4 Lysophosphatidylcholin

5 Phosphatidylethanolamin

6 Phosphatidylinositol

7 Phosphatidylglyzerol

Die enzymatische Aktivität der Zink-Metallo Phospholipasen C variiert innerhalb der Enzymgruppe und ist zudem Substrat-abhängig (Jepson et al., 1999). Studien mit rekombinanter *C. bifermentans* PLC und einem rekombinanten Alphatoxin zeigen, daß die Aktivität der PLC gegenüber Phosphatidylcholin, verglichen mit der Wirkung des Alphatoxins, um 98% reduziert ist (Tso und Siebel, 1989). Andererseits hydrolysiert das Alphatoxin Phosphatidylcholin in Eigelb oder in Liposomen lediglich doppelt so effektiv wie die *C. bifermentans* PLC (Jepson et al., 1999).

Neben ihrer enzymatischen Aktivität weisen einige Zink-Metallo PLCs auch eine hämolysierende Wirkung auf. Diese Phospholipasen C sind in der Lage, Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, die Hauptbestandteile von Erythrozytenmembranen, zu hydrolysieren. Nicht hämolysierende PLCs besitzen hingegen keine oder nur eine geringe Aktivität gegenüber Sphingomyelin (Ostroff et al., 1990; Titball, 1993).

Rinder- und Mäuseerythrozyten sind empfindlicher gegenüber dem Alphatoxin als Erythrozyten von Kaninchen, Mensch oder Schaf (McDonel, 1986). Dies scheint teilweise durch die unterschiedliche Phospholipidzusammensetzung des äußeren Anteils der Zellmembran bedingt zu sein. Erythrozyten, deren Zellmembran in diesem Bereich vorwiegend aus Phosphatidylcholin und Sphingomyelin besteht, sind am empfindlichsten (Taguchi und Ikezawa, 1976). Die Zellmembran von Schaferythrozyten weist kaum Phosphatidylcholin auf (De Gier und van Deenen, 1961). Schaferythrozyten sind daher durch das Alphatoxin nur durch eine zusätzliche Kälte-Inkubation zu lysieren, die sich der Inkubation bei 37°C anschließt (Hot-Cold Hämolys; McDonel, 1986). Bei der Hot-Cold

Hämolyse kommt es nicht direkt im Rahmen des Abbaus der Phospholipide zur Lyse. Die Hydrolyse induziert jedoch eine erhöhte Fragilität der Erythrozyten, die durch die Einwirkung von Kälte nachfolgend zur Hämolyse führt (Titball, 1993).

Eine mit dem Alphatoxin vergleichbare hämolysierende Wirkung weist das *C. novyi* Typ A Gammatoxin auf (Tagushi und Ikezawa, 1975). Da das Toxin in *E. coli* nicht überexprimiert wird (Tsutsui et al., 1995), sind bisher alle phänotypischen Untersuchungen mit aus dem Kulturüberstand aufgereinigtem Toxin durchgeführt worden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß Kontaminationen mit der ebenfalls in den Kulturüberstand exprimierten Inositol-spezifischen PLC die erhobenen Daten beeinflusst haben (Taguchi und Ikezawa, 1975). Besonders empfindlich gegenüber dem Gammatoxin sind die Phosphatidylcholin-reichen Pferdeerythrozyten, wohingegen auf Schafblutagar lediglich eine "Hot-Cold" Hämolyse zu verzeichnen ist (Titball, 1997).

Die *C. bifermentans* PLC besitzt eine schwache hämolysierende Wirkung (Miles und Miles, 1948). Bei vergleichenden Studien mit rekombinant hergestellten Phospholipasen C hat sich gezeigt, daß Mäuseerythrozyten durch das Alphatoxin 132-fach und Schaferythrozyten 50-mal effektiver lysiert werden als mit der *C. bifermentans* PLC (Jepson et al., 1999; Tso und Siebel, 1989). Vermutlich ist dies zum Teil durch die vergleichsweise geringe Aktivität der *C. bifermentans* PLC gegenüber Sphingomyelin bedingt (Ostroff et al., 1990).

Die *Bacillus cereus* PC-PLC besitzt keine hämolysierende Wirkung, da das Enzym nicht in der Lage ist, effektiv Sphingomyelin zu hydrolysieren (Otnaess et al., 1977). Die Kombination der *B. cereus* PC-PLC und der *B. cereus* Sphingomyelinase, Cereolysin A-B, führt hingegen zur Hämolyse (Gilmore et al., 1989).

Die hämolysierende Wirkung der *Listeria monocytogenes* PLC-B wird kontrovers diskutiert. Während Titball (1998) dieses Enzym als nicht-hämolysierend einstuft, haben Geoffroy et al. (1991) dargestellt, daß aus dem Kulturüberstand aufgereinigtes Protein eine Kalzium-unabhängige schwache hämolysierende Wirkung gegenüber den Erythrozyten verschiedener Spezies aufweist. Empfänglich sind Erythrozyten vom Meerschweinchen, Pferd und vom Menschen. Bei Schaferythrozyten ist keine Wirkung festgestellt worden.

Vermutlich werden die Erythrozyten nicht allein durch den Phospholipidabbau der Zink-Metallo PLCs lysiert. Die Metaboliten der hydrolysierten Phospholipide scheinen im Erythrozyt als Second-Messenger zu wirken. Diacylglycerol aktiviert die Protein-Kinase C (PKC), die ihrerseits die membrangebundenen zellulären PLCs (A_2 und Pi-PLC) induziert. Diese sind in der Lage, die Zellmembran anzugreifen und eine Lyse zu vermitteln (Sakurai et al., 1994).

Für alle Zink-Metallo PLCs sind *in vivo* Toxizitätsbestimmungen durchgeführt worden. Die verwendete Spezies ist zumeist die Maus.

Das Alphatoxin weist die höchste Toxizität innerhalb der Enzymgruppe auf. Die minimale letale Dosis beträgt in der Maus etwa 1µg und führt bei intraperitonealer Injektion nach durchschnittlich 2,5 Stunden zum Tod (Titball et al., 1989, und Jepson et al., 1999).

Möglicherweise ist auch das *C. novyi* Typ A Gammatoxin letal. Versuche, bei denen Mäusen *C. novyi* Typ A Kulturüberstand intraperitoneal appliziert wurde, führten zum Tod der Tiere (Mac Farlane, 1950). Da keine Versuche mit rekombinantem oder aufgereinigtem Gammatoxin durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, daß andere in den Kulturüberstand sezernierte Proteine die Letalität vermittelt haben (Tsutsui et al., 1995).

Die *Listeria monocytogenes* PLC-B, die *Bacillus cereus* PC-PLC und die *Clostridium bifermentans* PLC weisen keine Toxizität im Mausmodell auf. Geoffroy et al. (1991) applizierten Mäusen folgenlos bis zu 25µg aufgereinigte PLC-B intravenös. Otnaess et al. (1977) haben PC-PLC aufgereinigt und das Protein an Mäuse verimpft. Die Tiere tolerieren bis zu 30µg Toxin. Jepson et al. (1999) haben Mäusen 10µg rekombinant hergestellte *Clostridium bifermentans* PLC intraperitoneal injiziert. Keines der Tiere ist verstorben.

2.2.2 Genotypische Charakterisierung

Die immunologische Kreuzreaktivität zwischen den Vertretern der Zink-Metallo PLCs (Willis, 1969; Lewis und Mac Farlane, 1953) hat eine enge Verwandtschaft zwischen den einzelnen Zink-Metallo Enzymen vermuten lassen (Titball, 1997). Beweisend ist die Sequenzierung der korrespondierenden Gene (Titball et al., 1989; Tso und Siebel, 1989; Gilmore et al., 1989; Hough et al., 1989; Tsutsui et al., 1995). Die vergleichende Darstellung der aus der Sequenzierung abgeleiteten Aminosäuresequenz findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenz der Zink-Metallo PLCs

CPA ¹	W---DGKIDGTGTHAMIVTQGVSI LENDLSKNEPESVRKN-LEILKENMHQLGSGTYPD
CNG ²	W---DGKKDGTGTHSMIVTOAVKVLENDMSKDEPEIVKON-FKILODNMHKFQLGSGTYPD
CBPLC ³	W---DGKKDGTGTHSLIAEHGLSMLNNDLSGNEYQQVKDN-IKILNEYLGDLKLGSGTYPD
PC-PLC ⁴	WSAEDKHKEGVNSHLWIVNRAIDIMSRNT-----TLVKQDRVAILNEWRTLENGIYAAD
PLC-B ⁵	WSADNPTNTDVNTHYWLFKQAEEKILAKDV-----NHMRANLMNELKKFQDKQIAQGIYDAD
CPA	YDKNAYDL--YQDHFWDPTDNNFSKDNSWYLAYSIPDTGESQIRKFSALARYEWQRGNY
CNG	YDPNAYKL--FQDHFWDPTDHNFSKDNLWYLSYSIKDTAESQVRKFTALARNEWKGNV
CBPLC	YDPNAYDL--YQDHFYDPTDGNFTIDNSWYASYPIYDTSRNSVRKFATLAKNEWKGNV
PC-PLC	YENPYDNSTFASHFYDPDNGKTYI-----PFAKQAKETGAKYFKLAGESYKNKDM
PLC-B	HKNPYDSTFSLSHFYNPDRDNTYL-----PGFANAKITGAKYFNQSVTDYREGKF
CPA	KQATFYLGAMHYFGDIDTPYHPANVTAVDSAG--HVKFETFAEERKEQYKINTAGCKTN
CNG	EKATFYHGQAMHYFGDLNTPYHAANVTAVDSIG--HTKYEGFAEKRKDQYRINTTGIKTN
CBPLC	KEATFLLGQGLHYLGDLNTPYHASNVTAVDSPG--HVKYETFVEERKDNALNTSGNDTT
PC-PLC	KQAFFYLGSLHYLGVDNQPMAANFTNLSYPQGFHSHKYENFVDTIKDNKYV-----TD
PLC-B	DTAFYKLGLAIHYYTDISQPMHANNFTAISYPPGYHCAYENYVDTIKHNYYQA-----TE
CPA	EAFYTDILKNKDFNAWSKEYAR----GFAKTGKSI---YYSHASMSHSW-DDWDYAAKVT
CNG	EGFYADALKNSNFDSSKEYCK----GWAKQAKNL---YYSHSTMKHTN-FDWDYSASHA
CBPLC	SGVYKEAMENPSFNKWMQTQNSI----KYAKIAKDL---YYSHSTMSHSW-DDWDYSGREA
PC-PLC	GNGYWN-WKGTNPEEWIHGAAVVAKQDYSGIVNDNTKDFWVKAASVQYADKWRAEVT'PM
PLC-B	DMVAKR-FCSDDVKDWLYENAKRAKADYPKIVNAKTKKSYLVGN-----SEWKKD'TVEP
CPA	----LANSQKGTAGYIYRFLHVDSEGNDPSVGKNVKELVAYI STSGEKDAGTDDYMYFGI
CNG	----LKNAQMGTAGCIYRFLYDVSKDLLPTENHKINGLMVVIKTANETAAGTDDYVYFGI
CBPLC	----IKNSQVCTAGFLYRFMNEVSNNGTGDNISLTNEFNIVLKTADNKYAGTDDNVYFGF
PC-PLC	TGKRLMDAQRVTAGYIQLWFD--TYGDR
PLC-B	TGARLRDSQQTLAGFLEFWSK--K-TNE
CPA	KTKDGKTQEWEMDNPNGDFMTGSKDITYTFKLKD-ENLKIDDIQNMWIRKRKYTAFSDAYK
CNG	ERKDGTVQEWTLNPNDFEANQEDTYILKIKK-PSIKFSDINRMWIRKANFT'PVSDDWK
CBPLC	ETNEGKKFEWKLDNAGNFFERNQVDNYILKTKDGEEVDINNISNYWIRKERLTSISDDWE
CPA	PENIKIIANGKVVVDKIDNEWISGNSTYNI-K
CNG	VKGIKVIADGSVQYEQINKWIHGNEKYIIN
CBPLC	LSNFKLIANGKVIQQQDVNKVFTGNETYIINK

¹CPA = *C. perfringens* Alphatoxin Gen

²CNG = *C. novyi Typ A* Gammatoxin Gen

³CBPLC = *C. bifermentans* PLC Gen

⁴PC-PLC = *B. cereus* PC-PLC Gen

⁵PLC-B = *L. monocytogenes* PLC-B Gen

Die Gesamthomologie (Aminosäure 1-250) beträgt innerhalb dieser Gruppe etwa 30% (Naylor et al., 1998). Die Übereinstimmung ist noch größer, wenn das Alphatoxin, das Gammatoxin und die *C. bifermentans* PLC sowie die PC-PLC und die PLC-B getrennt betrachtet werden. So weist der COOH-Terminus des Gammatoxins eine Homologie von 49% zum COOH-terminalen Bereich des Alphatoxins und von 44% zum COOH-terminalen Abschnitt der *C. bifermentans* PLC auf. Die N-terminale Homologie liegt bei 68% und 57% (Tsutsui et al., 1995). Bei der *B. cereus* PC-PLC und der *L. monocytogenes* PLC-B sind etwa 50% der Aminosäuresequenz identisch (Vazquez-Boland et al., 1992).

Hybridisierungsstudien mit der *C. bifermentans* PLC haben demonstriert, daß die Toxin-kodierenden DNA-Abschnitte nicht bei allen Isolaten übereinstimmen. Dies könnte die Erklärung für die unterschiedliche enzymatische Aktivität von verschiedenen *C. bifermentans* Stämmen sein (Titball, 1997).

Bei vergleichenden Sequenzierungsstudien des Alphatoxins wurde bewiesen, daß sich das Alphatoxin Gen von *C. perfringens* Typ B und C Stämmen von Typ A Isolaten in ihrer Basenabfolge und der sich daraus ergebenden Aminosäuresequenz unterscheiden können. Ginter et al. (1996) haben dargestellt, daß bei diesen Varianten die Aminosäure Alanin an Position 174 durch ein Asparagin, das Threonin an Position 177 durch ein Alanin und das Serin an Position 335 durch Prolin substituiert ist. Obwohl die Aktivität des Toxins dadurch unbeeinflusst bleibt, wird vermutet, daß diese Toxinvarianten eine erhöhte Chymotrypsinresistenz aufweisen.

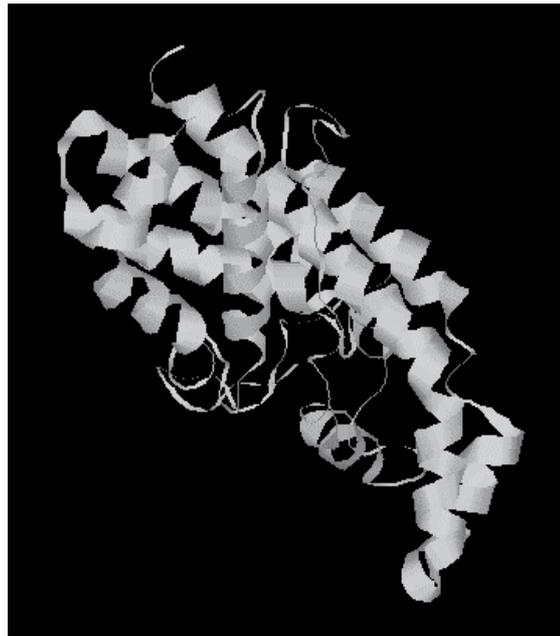
2.2.3 Dreidimensionale Struktur

Daten zur räumlichen Struktur von Proteinen können durch kristallographische Untersuchungen gewonnen werden. Entsprechende Arbeiten liegen zum Alphatoxin und der *B. cereus* PC-PLC vor (Naylor et al., 1998; Hough et al., 1989). Diese demonstrieren große Unterschiede zwischen der Tertiärstruktur des Alphatoxins und der *Bacillus cereus* PC-PLC. Naylor et al. (1998) haben dargestellt, daß die Tertiärstruktur des Alphatoxins zwei kompakte Bereiche bildet, die durch ein flexibles Polypeptidsegment verbunden sind. Diese räumliche Anordnung wird als Zwei-Domänen Struktur bezeichnet (Stryer, 1996). Die *Bacillus cereus* PC-PLC besteht hingegen aus einer Domäne (Hough et al., 1989).

Die *Bacillus cereus* PC-PLC ist zu einer ellipsoiden Struktur gefaltet und besitzt eine Größe von 40Å x 30Å x 20Å. Sie besteht aus 10 Alpha-helikalen Strukturen, die dicht in einer Domäne zusammenliegen. 34% der Aminosäuren sind nicht in die Helices integriert und bilden Schleifen aus, die zwischen den Helices liegen. Die Oberfläche der PC-PLC weist eine Spalte auf (8Å tief, 5Å breit), die als das aktive Zentrum des Enzyms gilt (Hansen et al., 1993) und in dem drei Zink-Ionen gebunden sind (Hansen et al., 1992). Solche Tri-Metall Zentren sind bei Proteinen selten. Derzeit sind analoge Metall-Konstellationen nur von der Alkalischen Phosphatase von *E. coli* und der PI Nuclease von *Penicillium citrinum* bekannt (Martin und Hergenrother, 1998). Die Zink-Ionen sind von essentieller Bedeutung für die

Tertiärstruktur der PLCs. Diese läßt sich in Guanidin-Hydrochlorid durch die Zugabe bzw. das Fehlen von Zink reversibel verändern (Titball et al., 1999). Eine Darstellung der *B. cereus* PC-PLC findet sich in Abbildung 2.

Abbildung 2: Dreidimensionales Modell der *Bacillus cereus* PC-PLC (Entrez Molecular Modeling Database, ID 6850)



Das Alphatoxin bildet eine N-terminale Domäne (Aminosäure (AS) 1-247) aus, die durch eine Linkerstruktur (AS 248-255) mit der COOH-terminalen Domäne (AS 256-370) verbunden ist. Im N-Terminus ist das aktive Zentrum lokalisiert, wohingegen der COOH-terminale Abschnitt essentiell für die Bindung des Toxins an eukaryontische Membranen ist (Nagahama et al., 1995, Naylor et al., 1998). Kristallographische Untersuchungen lassen die Vermutung zu, daß das Alphatoxin in zwei Konformationsformen vorliegen kann: als offene und geschlossene Form (Naylor et al., 1999).

Studien an der offenen Form offenbarten große strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen der N-terminalen Domäne des Alphatoxins und der PC-PLC von *B. cereus*. Im Unterschied zur PC-PLC weist das Alphatoxin dennoch eine zusätzliche Helix auf (AS 179-184). Zudem sind zwei der bei der PC-PLC ausgebildeten Schleifen beim Alphatoxin (AS 212-213) aufgrund von Aminosäuredeletionen nicht vorhanden (Naylor et al., 1998).

Der Alphatoxin COOH-Terminus liegt in einer viersträngigen β -Faltblattstruktur vor. Diese Immunglobulin-ähnliche Faltung ist bisher bei keinem anderen prokaryontischen Protein nachgewiesen worden. Es ähnelt jedoch den C2-Typ Domänen, die bei eukaryontischen

Proteinen angetroffen werden können (Nalefski und Falke, 1996). Typischerweise liegen diese C2-Typ Strukturen, zu denen auch Membran- bzw. Phospholipid-interagierende Proteine gehören, in achtsträngigen antiparallelen β -Faltblättern vor.

Beim Alphatoxin sind COOH-terminal kristallographisch Bindungsstellen für drei Kalzium-Ionen an der Oberfläche der mutmaßlichen Phospholipid-Bindungsstelle identifiziert worden (Naylor et al., 1999). Eine Darstellung der offenen Form des Alphatoxins findet sich in Abbildung 3.

Abbildung 3: Dreidimensionales Modell des Alphatoxins in der offenen Form (Naylor et al., 1998)



Bei der geschlossenen Konformation ist das aktive Zentrum für die Phospholipide nicht zugänglich, sondern durch eine Schleife verlegt (AS 135-155). Desweiteren ist eine Helix (AS 60-90) in Richtung COOH-Terminus verlagert.

Es wird vermutet, daß diese beiden Konformationsformen durch die Zugabe von Kalzium ineinander überführt werden und auf diese Weise das Alphatoxin aktivieren (Naylor et al., 1999; Moreau et al., 1988). Experimentell ist es jedoch bislang nicht gelungen, bei der geschlossenen Form durch die Zugabe von Kalzium signifikante Konformationsänderungen auszulösen. Lediglich die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem N-Terminus (Tyrosin₆₂) und dem COOH-terminalen Bereich (Asparagin₂₉₄) ist beobachtet worden. Dies ist vermutlich die Folge der veränderten intramolekularen Kräfte durch die Kalziumbindung (Naylor et al., 1999).

Aufgrund der Aminosäurehomologie des Alphatoxins mit der Phospholipase C von *Clostridium bifermentans* und *Clostridium novyi* wird davon ausgegangen, daß bei diesen Proteinen ein entsprechender Aufbau vorliegt (Jepson et al., 1999).

2.3 Molekulare Mechanismen der PLC-spezifischen biologischen Wirkungen

2.3.1 Wirkmechanismus der enzymatischen Aktivität

2.3.1.1 Lokalisation des enzymatisch aktiven Zentrums

Durch Kristallographieuntersuchungen in Anwesenheit von Substrat kann demonstriert werden, daß die glatte Oberfläche der *B. cereus* PC-PLC N-terminal eine Spalte aufweist, die als das enzymatisch aktive Zentrum gilt (Hough et al., 1989 und Hansen et al., 1993). Studien zum dreidimensionalen Aufbau des Alphatoxins (Naylor et al. 1998) beweisen das Vorhandensein einer entsprechenden Struktur in der N-terminalen Domäne des Toxins.

Neben den strukturellen Untersuchungen zur Lokalisation der enzymatischen Aktivität sind auch funktionelle Studien durchgeführt worden. Titball et al. (1991) haben den N-Terminus des α -Toxins in *E. coli* kloniert und festgestellt, daß das gewonnene Protein enzymatische Aktivität aufweist. Zudem gelingt es mit dem N-terminal bindenden monoklonalen Antikörper 3B4, die enzymatische Aktivität der *C. perfringens* Phospholipase C zu neutralisieren (Schoepe et al., 1997).

2.3.1.2 Aufbau und Struktur des enzymatisch aktiven Zentrums

Kristallographische Untersuchungen am Alphatoxin und der *Bacillus cereus* PC-PLC demonstrieren, daß der Aufbau des aktiven Zentrums den Eintritt von Phospholipiden ohne sterische Behinderung erlaubt. Alle Seitenketten, die in diesem Bereich in einem Abstand von weniger als 5 Å vom Phospholipid entfernt vorliegen sind im Alphatoxin und der PC-PLC entweder konserviert oder durch Aminosäuren mit vergleichbaren Seitenketten mutiert (Naylor et al., 1998 und Hough et al., 1989).

2.3.1.3 Interaktion zwischen Zink-Metallo Phospholipase C und Substrat

Neben dem aktiven Zentrum sind weitere Bereiche des Toxins an der Enzym/Substrat Interaktion beteiligt. Die Schwanzgruppen des Phospholipids lagern sich im Modell von Naylor et al. (1998) in die hydrophoben Gräben an der Oberfläche des Alphatoxins an. Für eine optimale Interaktion mit dem Enzym wird zumindest eine cis-Doppelbindung in der Schwanzgruppe benötigt. Dies bietet eine Struktur-bedingte Erklärung für die Beobachtung, daß Phospholipide mit ungesättigten Fettsäureketten bevorzugt vom Alphatoxin hydrolysiert werden (Nagahama et al., 1996). Der enzymatische Abbau von Sphingomyelin stellt eine Besonderheit bei der Enzym/Phospholipid Interaktion dar. Hier interagiert die Schwanzgruppe mit COOH-terminalen Aminosäuren (295-305) des Alphatoxins, die einen hydrophoben Kontakt ermöglichen (Naylor et al., 1998). Diese Besonderheit bei der Phospholipidspaltung kann experimentell bestätigt werden. Titball (1993) haben gezeigt, daß der isolierte N-Terminus keine Sphingomyelinase-Aktivität besitzt. Die Spaltung des Substrates wird erst durch Zugabe der COOH-terminalen Domäne ermöglicht.

Neben der Stabilisierung der intermolekularen Interaktion durch die Schwanzgruppe des Phospholipids wird der Kontakt zwischen Phospholipid und dem Enzym zusätzlich über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken intensiviert, die durch die polaren Bereiche im aktiven Zentrum vermittelt werden (Hansen et al., 1993)

2.3.1.4 Prozeß der enzymatischen Spaltung

Die enzymatische Spaltung der Phospholipide durch die Zink-Metallo PLCs ist eng an die drei Zink-Ionen geknüpft, die im aktiven Zentrum lokalisiert sind (Titball et al., 1999). Diese werden von einer Tryptophan-, einer Glutaminsäure-, zwei Aspartat- und fünf Histidinseitenketten gebunden, die bei allen untersuchten Zink-Metallo Enzymen konserviert sind (Vazquez-Boland et al, 1992, Tsutsui et al., 1995, Naylor et al., 1998).

Kristallographiestudien an der PC-PLC (Hansen et al., 1992) haben gezeigt, daß anorganisches Phosphat bei der Bindung im aktiven Zentrum die gebundenen Wassermoleküle verdrängt und die Zink-Ionen mit dem Phosphat interagieren. Es wird vermutet, daß dieser Vorgang zu intramolekularen Elektronenverschiebungen führt, die die Phosphordiesterbindung destabilisieren (Martin und Hergenrother, 1999).

Die Bedeutung der Zink-Ionen für die enzymatische Aktivität ist zudem durch Substitution der Zink-koordinierenden Aminosäuren dargestellt worden. Bei diesen Untersuchungen sind enzymatisch inaktive Proteine entstanden, die einen reduzierten Zinkgehalt aufweisen. Untersuchungen beim Alphatoxin belegen, daß die Proteine weder eine hämolytische noch eine letale Wirkung aufweisen (Nagahama et al., 1995 und 1997; Guillouard et al., 1996). Bei der *Listeria monocytogenes* PLC-B führt die Substitution von an der Zinkbindung beteiligten Histidin-Seitenketten (Histidin₆₉ bzw. Histidin₁₁₈) zu stabilen aber inaktiven Mutanten der PLC-B (Zückert et al., 1998).

Die eigentliche Spaltung der durch die Zink/Phospholipid-Interaktion destabilisierten Phosphordiesterbindung erfolgt über eine nukleophile Substitution (S_N2). Das angreifende Molekül ist ein aktiviertes Wasser. Die Aktivierung erfolgt bei der PC-PLC vermutlich über die Asparaginsäure an Position 55, wobei die Aminosäure hier als Base wirkt. Die Substitution der Asparaginsäure₅₅ durch eine nicht ionisierbare Aminosäure führt bei der PC-PLC zu einem signifikanten Verlust enzymatischer Aktivität (Martin und Hergenrother, 1998). Andererseits haben Nagahama et al. (1997) gezeigt, daß auch die Insertion der ionisierbaren Glutaminsäure beim Alphatoxin zu einem völligen Wirkverlust führt. Die Asparaginsäure, die bei allen sequenzierten Zink-Metallo PLCs konserviert ist, scheint für die Aktivierung des Wassermoleküls somit essentiell zu sein.

Die Spaltung der Phosphordiesterbindung durch die S_N2 -Reaktion führt zur Bildung eines instabilen Zwischenproduktes, das zu Diacylglycerin und einem weiteren substratspezifischen Produkt zerfällt.

2.3.1.5 Die Bedeutung von Glutaminsäure₄ und Tyrosin₅₆ für Phospholipidspezifität und Substratumsatz

Sowohl die Substratspezifität als auch der Substratumsatz ist eng mit der molekularen Struktur des Enzyms verknüpft. Um die hierfür relevanten Aminosäuren zu identifizieren, sind bei der *B. cereus* PC-PLC Mutationen im aktiven Zentrum vorgenommen und die entstandenen Proteine auf ihre Substratspezifität untersucht worden (Tan und Roberts, 1998; Martin und Hergenrother, 1998). Bei der Substitution der Glutaminsäure an Position 4 durch Leucin nimmt die Substratspezifität ab. Die daraufhin aufgestellte These, Glutaminsäure₄ würde mit dem Substrat interagieren, ist durch kristallographische Untersuchungen bestätigt worden.

Die Amino-terminale Schleife, in der die Glutaminsäure enthalten ist, wird in Anwesenheit von Substrat einer Konformationsänderung unterworfen, obwohl die Gesamtstruktur des Enzyms starr ist (Hough et al., 1989; Hansen et al., 1993). Durch diesen Vorgang befindet sich die Carboxyl-Gruppe von Glutaminsäure₄ dann in einer räumlichen Position zum Phosphat, die eine Interaktion ermöglicht (Hansen und Hough, 1993).

Die durch die Arbeiten an der *B. cereus* PC-PLC gewonnenen Erkenntnisse werden durch Mutagenesestudien an dem PLC-B toxinkodierenden Gen von *Listeria monocytogenes* bestätigt (Zückert et al., 1998). Diese Phospholipase C besitzt eine geringere Phosphatidylcholin-Spezifität als die *B. cereus* PC-PLC. Im Gegensatz zur PC-PLC weist die PLC-B an Position 4 eine Asparaginsäure auf. Durch die Substitution der Asparaginsäure durch Glutaminsäure kann die Phosphatidylcholin-Spezifität der PLC-B um den Faktor 1,5 erhöht werden. Vermutlich gleicht die Carboxyl-Seitenkette der Glutaminsäure an dieser Position die Ladung der Cholin Kopfgruppe optimal aus und stabilisiert die Bindung auf diese Weise (Zückert et al., 1998). Bei *Clostridium perfringens*, *Clostridium bifermentans* und *Clostridium novyi* befindet sich an dieser Stelle ein Lysin (Tsutsui et al. 1995; Tso und Siebel 1989). Möglicherweise verbessert auch dessen geladene Seitenkette die Substratbindung entscheidend (Tan und Roberts, 1998).

Mutagenesestudien zum Substratumsatz der Zink-Metallo PLCs haben gezeigt, daß das Tyrosin an Position 56 maßgeblich für die Aktivität der Enzyme verantwortlich ist. Diese Aminosäure ist bei allen Zink-Metallo PLCs konserviert und lediglich bei der *Listeria monocytogenes* PLC-B durch ein Histidin ersetzt (Zückert et al., 1998).

Die PLC-B besitzt im Vergleich zur PC-PLC eine um den Faktor 5-10 geringere enzymatische Aktivität (Goldfine et al., 1993). Durch Rückmutation des Histidin₅₆ zu einem Tyrosin kann die Phosphatidylcholinaktivität um 77% und die Sphingomyelinaktivität um 169% erhöht werden (Zückert et al., 1998).

2.3.2 Mechanismus der Bindung an eukaryontische Membranen

Das Alphatoxin ist das Modellprotein zur Untersuchung des Membranbindungsmechanismus, wobei der Vorgang nicht vollständig aufgeklärt ist. Zum einen wird diskutiert, ob im Rahmen der Membranbindung hochgradig exponierte Seitenketten in die Membran eingeführt werden. Andererseits wird vermutet, daß hydrophobe Seitenketten des N- und COOH-Terminus eine hydrophobe Oberfläche ausbilden, die es dem Toxin ermöglichen, an die Membran zu binden.

Eine weitere These lautet, daß Kalzium-Ionen sowohl von den N- und COOH-terminal lokalisierten sauren Seitenketten des Enzyms als auch von den Phosphatgruppen des Phospholipids gebunden werden und auf diese Weise die Bindung vermitteln. Als letztes wird diskutiert, ob die im Rahmen einer Kalzium-induzierten Konformationsänderung zur Freilegung von Bindungsdomänen führen könnte (Naylor et al., 1998). Die verschiedenen Theorien zur Membranbindung werden nachfolgend detailliert dargestellt.

2.3.2.1 Einflußfaktoren auf die Zell-Bindung

2.3.2.1.1 Hydrophobe Aminosäure-Seitenketten

Kristallographische Untersuchungen des Alphatoxins deuten daraufhin, daß die exponierten hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren Tryptophan₂₁₄ und Phenylalanin₃₃₄ an der Membranbindung beteiligt sind. Sie dringen möglicherweise in die Zellmembran ein und interagieren mit den Fettsäureestern der Phospholipidschwanzgruppen (Naylor et al., 1998). Eine vergleichbare Funktion erfüllt die hydrophobe Schleife der C2-Domäne der Cytosolische Phospholipase A2. Diese penetriert die Zielmembran und ermöglicht so die Enzym/Membran-Interaktion (Perisic et al., 1998).

Die zu spaltende Phosphordiesterbindung liegt jedoch beim partiellen Eintritt der hydrophoben Seitenketten des Alphatoxins in die Membran 5 Å vom katalytischen Zentrum entfernt. Dieser Abstand ist vermutlich zu groß, um den enzymatischen Prozeß zu ermöglichen (Naylor et al., 1999). Um die Distanz zu verringern, könnte das zu spaltende Phospholipid aus der Membran herangezogen werden (Titball, 1998). Dieser Vorgang ist jedoch energetisch ungünstig (Naylor et al., 1999).

Einer anderen Theorie zufolge, sind hydrophobe Seitenketten möglicherweise durch die Bildung einer hydrophoben Oberfläche an der Membranbindung beteiligt. Dies könnte die abstoßenden Kräfte im Übergangsbereich von Enzym und Phospholipid reduzieren und dadurch die Bindungsstabilität erhöhen. Aufgrund der kristallographischen Ergebnisse von Naylor et al. (1998) wird vermutet, daß die N-terminalen Aminosäuren 59-65, 78-83, 135, 139-154, 204-205 und 208-217, sowie der Bereiche 268-275, 293-301, 329-337 und 364 des COOH-Terminus an diesem Vorgang beteiligt sind.

2.3.2.1.2 Kalzium-Ionen

Möglicherweise wird die Membranbindung durch die gleichzeitige Koordination von Kalzium-Ionen sowohl durch die COOH- und N-terminal lokalisierten sauren Seitenketten des Enzyms als auch durch die Phosphatgruppen des Phospholipids ermöglicht. Dieser Mechanismus findet sich bei der Cytosolischen Phospholipase A₂, die unter Bildung eines tertiären Komplexes an Membranen bindet (Scott et al., 1990). Dieses Modell würde erklären, warum die hämolytische Wirkung des Alphatoxins Kalzium abhängig ist (Krug und Kent, 1984), nicht jedoch die enzymatische Aktivität (Ottolenghi, 1965).

Die Bindung von drei Kalzium-Ionen durch das Alphatoxin können Naylor et al. (1999) kristallographisch darstellen. Kalzium 1 interagiert mit den folgenden Aminosäuren: Asparaginsäure₂₆₉, Glycin₂₇₁, Asparaginsäure₃₃₆, Alanin₃₃₇ und Glutaminsäure₃₂. Kalzium 2 reagiert mit Asparaginsäure₂₉₃, Asparagin₂₉₄, Glycin₂₉₆ und Asparaginsäure₂₉₈. Und Kalzium 3 mit Threonin₂₇₂, Asparaginsäure₂₇₃, Asparagin₂₉₇, Asparaginsäure₂₉₈ und einem Wassermolekül.

Diese These wird durch kristallographische Untersuchungen untermauert, die zeigen, daß der COOH-Terminus eine hohe Analogie zu eukaryontischen, kalziumabhängigen Phospholipid-Bindungsdomänen des sogenannten C2 Typs aufweist.

C2-Typ Domänen sind Kalzium und/oder Phospholipid- bindende Proteinbereiche, die etwa 120 Aminosäuren umfassen und bei eukaryontischen Signalproteinen relativ häufig angetroffen werden (Naylor et al., 1998). Signifikante Homologien zum COOH-Terminus des Alphatoxins weisen die C2-Typ Domänen der Pankreaslipase, des Synaptotagmin I, der humanen Arachidonsäure 5-Lipoxygenase (HA5L) und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C δ 1 auf (Nalefski und Falke, 1996). Weiterhin sind die Aspartat Seitenketten, die bei der C2-Typ Domäne von HA5L an der Kalzium-vermittelten Bindung beteiligt sind, auch beim Alphatoxin konserviert (Naylor et al., 1998).

Die von Naylor et al. (1998) determinierten Kalzium-Bindungsstellen liegen in einer Geraden entlang der mutmaßlichen Phospholipid-Bindungsstelle dicht nebeneinander (Naylor et al., 1999). Die Koordination der Kalzium-Ionen wird durch die Phospholipid-Kopfgruppen vervollständigt, wenn der Komplex an eine Membran bindet. Dieser Vorgang ermöglicht eine stabile Membran/Enzym-Bindung.

Bei diesem Modell befinden sich die Zink-Ionen des aktiven Zentrums in einem Abstand von maximal 2Å von der mutmaßlichen Phospholipid-Bindungsstelle, die aufgrund der Kalzium-koordinierenden Aminosäuren postuliert worden ist. Damit ist das Enzym optimal positioniert, um die Phospholipide im aktiven Zentrum zu binden, ohne den energetisch ungünstigen Schritt der Phospholipidretraktion durchzuführen (Naylor et al., 1999).

Die *C. bifermentans* PLC und das Gammatoxin (PLCs mit zwei Domänen), weisen vermutlich ein dem Alphatoxin entsprechendes Kalzium-abhängiges Bindungsverhalten auf. Die Aminosäuren, die zwei der drei Kalzium-Ionen koordinieren, sind sowohl bei der *Clostridium novyi* Typ A PLC als auch bei der PLC von *C. bifermentans* konserviert. Gleichzeitig ist experimentell gezeigt worden, daß die *C. bifermentans* PLC durch Kalzium-Ionen analog zum Alphatoxin in seiner Aktivität zu steigern ist (Jepson et al., 1999). Es gibt jedoch auch Unterschiede. So bilden die COOH-terminal liegenden Aminosäuren 329-337 des Alphatoxins eine Schleife, die über die Membranbindungsfläche herausragt und an der Bildung der hydrophoben Kontaktfläche zwischen Enzym und Phospholipid beteiligt ist (Naylor et al., 1998). Diese Schleife enthält bei der *C. bifermentans* PLC im Vergleich zur Alphatoxinsequenz überproportional viele Mutationen. Von besonderer Bedeutung ist der Austausch von Tyrosin₃₃₁ und Phenylalanin₃₃₄ zu Isoleucin. Die Seitenketten des Isoleucins reduzieren die hydrophobe Oberfläche zwischen der *C. bifermentans* PLC und dem Phospholipid. Dies führt zu einer verminderten Stabilität des PLC-/Membran-Komplexes. Das Resultat dieser verminderten Enzym/Phospholipid Interaktion scheint die reduzierte hämolysierende Wirkung der *C. bifermentans* PLC im Vergleich zum Alphatoxin zu sein (Jepson et al., 1999), obwohl beide Enzyme im aktiven Zentrum und in den mutmaßlich membranbindenden Regionen 75% Aminosäurehomologie aufweisen (Titball, 1998).

Jepson et al. (1999) haben gezeigt, daß auch N-terminale Mutationen im Bindungsbereich zu diesem Phänomen beitragen. Die Arbeitsgruppe synthetisierte ein Hybridprotein, bei dem der N-Terminus der *Clostridium bifermentans* PLC mit dem COOH-terminalen Abschnitt des Alphatoxins fusioniert worden ist. Das entstandene Produkt weist im Vergleich zur *Clostridium bifermentans* PLC eine signifikant gesteigerte enzymatische Aktivität und hämolysierende Wirkung auf. Die Aktivität des Alphatoxins wird jedoch nicht erreicht. Da sich die enzymatische Aktivität der *C. bifermentans* PLC je nach Substrat kaum von der Hydrolyserate des Alphatoxins unterscheidet, wird vermutet, daß Substitutionen im Membranbindungsbereich des N-Terminus für die reduzierte hämolysierende Wirkung verantwortlich sind (Naylor et al., 1998, und Jepson et al., 1999).

Ein weiteres Modell im Rahmen der Membranbindung ist die Kalzium-abhängige Konformationsänderung. Hierbei könnte es zur Exposition von funktionellen Gruppen kommen. Diese enthalten möglicherweise hydrophobe Aminosäuren, die in die Membran eintreten, oder aber geladene Seitenketten, die spezifisch an die Phospholipidkopfgruppen binden (Newton, 1995). Ersteres wird für Annexin V beschrieben. Bei diesem Protein kommt es bei der Kalzium-abhängigen Bindung zur Exposition eines Tryptophanrestes, der in die Zielmembran eintritt (Nalefski und Falke, 1996). Bei kristallographischen Untersuchungen am Alphatoxin kann durch die Anwesenheit von Kalzium-Ionen jedoch keine entsprechende Strukturänderung induziert werden (Naylor et al., 1999), so daß diese These nicht abschließend beurteilt werden kann.

2.3.2.2 Gründe für die fehlende Membranbindung der *Bacillus cereus* PC- PLC

Die nicht hämolysierende *Bacillus cereus* PC-PLC bindet nicht an eukaryontische Zellen, da bei diesem Enzym essentielle Membranbindungsregionen nicht ausgebildet sind. So besitzt die PC-PLC keinen dem Alphatoxin entsprechenden COOH-Terminus. Zusätzlich ist die Sequenz-Homologie mit dem Alphatoxin N-Terminus im mutmaßlichen Bindungsbereich gering (16%), wohingegen die Gesamthomologie bis zur Aminosäure 247 etwa 30% beträgt. Weiterhin ist bei der PC-PLC die exponierte Tryptophan₂₁₄ Seitenkette durch zwei Helices ersetzt und eine Schleife (AS 78-83) deletiert. Beiden Strukturen wird eine Bedeutung für die Membranbindung zugeschrieben (Naylor et al., 1998).

2.4 Pathogenetische Bedeutung der Zink-Metallo Phospholipasen C

Zwei Vertretern der Zink-Metallo Phospholipasen wird eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese von Erkrankungen zugesprochen: dem Alphatoxin von *C. perfringens* und der PLC-B von *Listeria monocytogenes*.

Das Alphatoxin ist aufgrund seiner Bedeutung beim Gasbrand, einer septikämischen Myositis des Menschen, bereits seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung (Titball et al., 1999). Der sogenannte exogene Gasbrand hat in beiden Weltkriegen zu schwerwiegenden Verlusten geführt und ist auch heute aufgrund der raschen Progression der Erkrankung schwierig zu therapieren (Rood und Cole, 1991). Diese Erkrankungsform ist in der Regel die Folge einer traumatischen Verletzung, bei der es zu Kontaminationen mit *Clostridium perfringens* Zellen bzw. Sporen kommt. Obgleich die Verunreinigung von Wundflächen häufig ist (Mac Lennan, 1962), wird der Gasbrand nur selten beobachtet. Bei klinischen Fällen wird zumeist zusätzlich eine Störung der Blutversorgung diagnostiziert, die die Bildung eines anaeroben Milieus begünstigt. Wenngleich der klassische Gasbrand häufig mit Kriegs- und Katastrophenfällen in Zusammenhang gebracht wird, so ist diese Erkrankung auch bei älteren Patienten und Diabetikern zu finden, die unter Ischämien der Extremitäten leiden (Titball et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist der endogene Gasbrand zumeist die Folge von operativen Eingriffen am Magen-Darm-Trakt bei denen angrenzende Gewebe kontaminiert werden (Moreau et al., 1988).

Obwohl das Alphatoxin lange Zeit als Hauptvirulenzfaktor dieser Erkrankung angesehen worden ist, konnte der eindeutige Beweis erst in jüngster Zeit geführt werden. Williamson und Titball (1993) haben dargestellt, daß mit dem COOH-terminalen Fragment des Alphatoxins immunisierte Mäuse eine Belastung mit *C. perfringens* Keimen überleben. Zudem führen *C. perfringens plc*-Deletionsmutanten im murinen Infektionsversuch nur zu minimalen Muskelnekrosen und nicht zu Todesfällen (Awad et al., 1995).

Anders als bei anderen bakteriellen Wundinfektionen, werden beim exogenen Gasbrand in den gangränösen Geweben keine Phagozyten nachgewiesen (McNee und Dunn, 1917). Dieses Bild ist ebenfalls bei Mäusen zu beobachten, die experimentell mit *C. perfringens* infiziert werden, jedoch nicht bei den Tieren, die mit einer Δplc -Mutante belastet werden (Stevens et al., 1997). Die Abwesenheit von Phagozyten im betroffenen Gewebe geht mit einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in den versorgenden Blutgefäßen einher (Bryant et al., 1993). Diese beiden Phänomene scheinen die Folge einer Alphatoxin-bedingten Expressionssteigerung von Endothel-Adhäsions Molekülen (ICAM-1 und ELAM-1) sowie

der vermehrten Produktion von IL-8 zu sein (Bryant und Stevens, 1996). Im Mausmodell kann gezeigt werden, daß Phagozyten an diese Marker binden und daraufhin in den Gefäßen akkumulieren. Das Alphatoxin führt auf diese Weise zu einer Reduktion der Phagozytose.

Aufgrund der ausgeprägten hämolysierenden Wirkung des Alphatoxins *in vitro* ist lange vermutet worden, daß dies der primär wirtsschädigende Mechanismus ist (Strunk et al., 1967). Obgleich beim experimentellen Gasbrand Hämaturie beobachtet wird, gibt es keine Hinweise auf eine extensive Hämolyse bei Erkrankungen des Menschen. Neuere Studien lassen vermuten, daß die Produkte der Phospholipid-Hydrolyse für die Schädigung des Wirtes verantwortlich sind (Titball et al., 1999). Diese wirken als Second-Messenger innerhalb der betroffenen eukaryontischen Zellen (Exton, 1990) und können sowohl lokale als auch systemische Wirkungen induzieren.

So ist *in vitro* dargestellt worden, daß Diacylglycerol durch eine spezifische Lipase zu Arachidonsäure überführt und im Arachidonsäure-Zyklus zu Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen umgebaut wird (Fujii und Sakurai, 1989, Bunting et al., 1997). Die Produkte der Arachidonsäurekaskade führen zur Vasokonstriktion, die den Milieuanforderungen der Clostridien entgegenkommt (Samuelsson, 1983). Als Second-Messenger kann Diacylglycerol zudem die Protein-Kinase C (PKC) aktivieren (Sakurai et al., 1994). Diese stimuliert den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF), der eine für das Alphatoxin typische Thrombozytenaggregation herbeiführen kann (Ohsaka et al., 1978). Auch dieser Vorgang unterstützt die Ausbildung einer Anoxie. PKC ist zudem in der Lage, die zelleigene Phospholipase A zu aktivieren. Diese bildet neben dem Diacylglycerin bei der Hydrolyse von Phospholipiden einen weiteren Metaboliten, der als Second-Messenger fungieren kann: Inositoltriphosphat (IP₃). IP₃ kann über das endoplasmatische Retikulum und die zelleigenen Kalziumkanäle einen Kalziuminflux auslösen (Fujii et al., 1986). Dies ist von besonderer Bedeutung für den Ionenhaushalt von Herz- und Muskelzellen und ist möglicherweise die Ursache für die Muskelkontraktionen (Boethius et al., 1973) und die kardiotoxischen Effekte bei Gasbrandfällen (Asmuth et al., 1995).

Die durch die verschiedenen Einflüsse induzierte Ischämie führt in den betroffenen Zellen zu einem Mangel an UDP-Glukose. Dies sensibilisiert die Zellen zusätzlich gegenüber den Wirkungen des Alphatoxins. *In vitro* kann demonstriert werden, daß Fibroblasten mit einem genetisch bedingten UDP-Glukosedefizit eine 10⁵-fach erhöhte Reaktivität gegenüber dem Alphatoxin aufweisen. Der molekulare Mechanismus ist unklar (Flores-Diaz et al., 1997).

In jüngster Zeit häufen sich die Indizien für eine Beteiligung des Alphatoxins bei weiteren Erkrankungen von Mensch und Tier. Ausgangspunkt dieser Erkrankungen ist der Darm.

Da *Clostridium perfringens* als Kommensale gilt, wird vermutet, daß unter bestimmten Umständen eine starke Vermehrungen des Erregers stattfindet, die mit der Produktion von großen Mengen Alphatoxin einhergeht. Es ist jedoch häufig schwierig, einen Kausalzusammenhang zwischen hohen *C. perfringens* Keimzahlen und einer Erkrankung herzustellen, da die Dysbakterie auch Folge der Erkrankung bzw. des Todes sein können, statt seiner Ursache (Titball et al., 1999).

Als Alphatoxin-assoziierte Erkrankungen beim Tier gelten Enteritiden bzw. Enterotoxämien bei Kalb und Ferkel (Cygan und Buczek, 1993; Johannsen et al., 1993) und die nekrotisierende Enteritis (NE) der Broiler, die die größte wirtschaftliche Bedeutung besitzt. Prädisponierende Faktoren beim Geflügel scheinen der gleichzeitige Befall mit Eimerien (Baba et al., 1992) und die Verfütterung von Zink-reichem Futter zu sein (Long und Truscott, 1976).

Beim Menschen wird das Alphatoxin mit dem sogenannten "Plötzlichen Kindstod" (sudden infant death syndrome, SIDS) in Verbindung gebracht. Bei einigen SIDS Fällen wird vermehrt *C. perfringens* Typ A im Darm nachgewiesen. Ein weiteres Indiz ist der Nachweis von Alphatoxin im Serum von verstorbenen Patienten (Murrell et al., 1993, und Siarakas et al., 1997). Die *C. perfringens* PLC wird zudem für verschiedene inflammatorische Erkrankungen beim Menschen verantwortlich gemacht. Hierzu gehören Morbus Crohn (Gustafson et al., 1990) und die rheumatische Arthritis (Olhagen, 1976). Die ätiologische Bedeutung des Alphatoxins scheint bei diesen Erkrankungsformen die Stimulation des Arachidonsäure-Zyklus eukaryontischer Zellen zu sein. Erste *in vitro* Untersuchungen deuten zudem auf ein möglicherweise kanzerogenes Potential des Alphatoxins hin (Titball et al., 1999).

Ein weiterer Vertreter der Zink-Metallo Phospholipasen C mit erheblichem toxischen Potential ist die PLC-B von *Listeria monocytogenes*. Dieser fakultativ intrazelluläre Erreger ist an einer Vielzahl von opportunistischen Erkrankungen bei Mensch und Tier beteiligt (Songer, 1997), wobei als Hauptinfektionsquelle die Nahrung gilt. Beim Menschen kann die klinische Listeriose mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen einhergehen. Besonders gefürchtet sind septische Aborte bei der Frau sowie Septikämien, Meningitiden und Hirnabszesse vor allem bei immunsupprimierten und älteren Patienten (Goldfine et al., 1998). Beim Tier dominieren septikämische bzw. meningoenzephalitische Manifestationen sowie Aborte; seltener werden Mastitiden beobachtet (Songer, 1997). Wiederkäuer sind am empfänglichsten für den Erreger, wohingegen bei den übrigen Haustierarten nur sporadische Infektionen beobachtet werden (Selbitz, 1992).

Listeria monocytogenes bildet zwei Phospholipasen: die Inositol-spezifische PLC (PLC-A) und die Phosphatidylcholin-bevorzugende PLC-B. Bei Infektionen wirken beide PLCs synergistisch mit dem Listeriolysin O (LLO): sie ermöglichen dem Erreger den Eintritt in die Wirtszelle, den Übertritt in das angrenzende Gewebe ohne extrazelluläre Phase sowie das Verlassen von Phagozyten (Songer, 1997).

Nach der Aufnahme durch einen Phagozyten sind die Listerien in der Lage, das Phagosom (primäre Vakuole) zu verlassen und sich ungehindert im Zytoplasma der Wirtszelle zu vermehren (Gaillard et al., 1987). Um wiederum die Wirtszelle zu verlassen, induziert der Erreger die Polymerisation des wirtseigenen Aktin. Dieser Vorgang führt durch die Bildung von Filopoden-ähnlichen Ausstülpungen zur Austreibung der Listerien aus der Zelle, in denen die Bakterien enthalten sind. Diese werden von den Nachbarzellen aufgenommen und mit der Zellmembran der Zielzelle umschlossen. Nach dem Übertritt in eine Zelle befindet sich der Erreger somit in einer Doppelmembran (sekundäre Vakuole), aus der er sich befreien kann. Der Erreger vermehrt sich danach im Cytoplasma und ist durch weitere Zell-Zell Übertritte in der Lage, einen Infektionsherd zu bilden (Tilney und Portnoy, 1989).

Die spezielle Biologie der Listerien ermöglicht dem Erreger die Penetration der Darmschleimhaut, die Verteilung über das Blutgefäßsystem, die Etablierung von Infektionsherden in Geweben und die Passage der Blut-Hirnschranke (Titball, 1993).

Es ist nicht vollständig geklärt, auf welche Weise die PLC-B das Verlassen von Membranvakuolen unterstützt. Analog zum Alphatoxin sind verschiedene Mechanismen denkbar. Die Phospholipidhydrolyse kann zum einen dem direkten Zell-Membranabbau dienen oder primär der Bildung von Second-Messengern, die über die Induktion einer zelleigenen Reaktionskaskade indirekt zur Schädigung der Membran beitragen (Goldfine et al., 1993). Zum Verlassen von Phagosomen nutzen die Listerien wahrscheinlich beide Mechanismen. Es wird vermutet, daß die PLC-B zum Verlassen des Phagosoms die luminal liegenden Phospholipide der Vakuole direkt abbauen. Die Bildung von Diacylglycerin führt zur transmembranalen Migration der cytosolisch angeordneten Phospholipide, die nach luminal wandern und abgebaut werden (Fehrenbach und Jürgens, 1991). Nachdem die Listerie die Vakuole verlassen hat, wird die PLC-B umgehend deaktiviert (Goldfine et al., 1998).

2.5 Impfstoffe gegen Zink-Metallo PLCs

2.5.1 Immunogene und protektive Strukturen der Zink-Metallo PLCs

Zink-Metallo PLCs sind immunogen und die gewonnenen polyklonalen Seren neutralisieren die biologischen Wirkungen *in vitro* (Titball, 1998). Arbeiten zur Eingrenzung von antigenen Domänen und ihre Charakterisierung für die biologische Funktion des Toxins sind bislang nur für das Alphatoxin durchgeführt worden.

So haben Williamson und Titball (1993) Polypeptide generiert, die den N-Terminus (Cpa₁₋₂₄₉) bzw. die COOH-terminale Domäne (Cpa₂₄₇₋₃₇₀) des Alphatoxins umfassen. Es wird vermutet, daß die Fragmente in einer Wildtyptoxin-spezifischen Konformation vorliegen, da die Antikörper, die durch die Immunisierung mit diesen Proteinen gewonnen werden, das Holotoxin detektieren.

Anti-Cpa₁₋₂₄₉ Hyperimmunseren neutralisieren zwar die Phospholipase C Aktivität des Alphatoxins *in vitro*, nicht jedoch die hämolysierende Wirkung. Eine belastbare Immunität gegen das Alphatoxin ist im Mausmodell durch die Immunisierung mit dem Cpa₁₋₂₄₉ ebenfalls nicht zu erzielen.

Mit den durch die Immunisierung mit Cpa₂₄₇₋₃₇₀ induzierten polyklonalen Seren gelingt es ebenfalls, die PLC Aktivität des Alphatoxins zu inhibieren. Diese Seren sind jedoch zusätzlich in der Lage, die hämolysierende Wirkung *in vitro* zu neutralisieren und eine passive Immunität in der Maus zu induzieren.

Dies zeigt, daß der für die Membranbindung essentielle COOH-Terminus die hämolytische Wirkung *in vitro* und die Letalität *in vivo* vermittelt, obwohl er isoliert keine biologische Aktivität besitzt (Titball et al., 1999). Es erstaunt, daß Antikörper gegen den enzymatisch aktiven N-Terminus weder eine Protektivität *in vivo* vermitteln noch *in vitro* die Hämolyse inhibieren. Vermutlich kommt es im Rahmen der Membranbindung des Holotoxins zu einer Konformationsänderung. Dies könnte N-terminale Epitope dergestalt verändern, daß entscheidende Strukturen von den Antikörpern nicht oder nur mit geringer Affinität erkannt werden (Titball, 1998).

Diese These wird durch die Arbeit von Logan et al. (1991) unterstützt. Die Arbeitsgruppe hat einen Alphatoxin-spezifischen Antikörper generiert (3 α 4D10), dessen Bindungsbereich N-terminal im Bereich der Aminosäuren 193-198 liegt. Der Antikörper der Subklasse IgG1 ist in der Lage, die enzymatische Aktivität des Alphatoxins effektiv zu neutralisieren. Die hämolysierende Wirkung des Toxins wird jedoch nur bei einem hohen Überschuß des mAk

inhibiert (Ratio mAk:Toxin 70:1). Bei der Verwendung im *in vivo* Toxizitätstest in der Maus, gelingt es lediglich, die Überlebenszeit der Tiere gegenüber den Kontrollgruppen zu verlängern; die Tiere versterben jedoch vor dem Ende des Beobachtungszeitraumes.

Eine Konformationsänderung von Enzymen nach der Bindung an die eukaryontischen Zielzellen wird auch für die Phospholipase A₂ und die Lipase von *Rhizomucor miechei* beschrieben (Blow, 1991; Brzozowski et al., 1991).

Weitere Arbeiten zur Charakterisierung von immunogenen Domänen des Alphatoxins sind von Schoepe et al. (1997) mit den Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörpern 3B4 und 1E8 der Subklasse IgG1 durchgeführt worden.

Der mAk 3B4 ist in der Lage, die enzymatische Aktivität des Alphatoxins dosisabhängig signifikant zu reduzieren. Die hämolysierende Wirkung des Alphatoxin und seine letale Aktivität in der Maus wird jedoch nur in Kombination mit dem Antikörper 1E8 inhibiert. Durch Bindungsversuche mit Antikörper 1E8, der alleine die biologischen Wirkungen des Toxins nicht beeinflusst, und einem COOH-terminalen Alphatoxinfragment (Aminosäure 248-370) ist gezeigt worden, daß dieser mAk am COOH-Terminus bindet.

Diese Daten lassen vermuten, daß beide Antikörper für die Membranbindung essentielle Bereiche blockieren. Die Kombination beider Antikörper verhindert infolgedessen die Membranbindung und die Induktion der toxischen Effekte. Der mAk 3B4 ist offenbar so positioniert, daß gleichzeitig das aktive Zentrum zumindest partiell geblockt wird.

2.5.2 Stand der Entwicklung von Zink-Metallo Phospholipase C Vakzinen

Aufgrund der intrazellulären Lebensform der Listerien ist die Induktion von Antikörpern gegen PLC-A, PLC-B und LLO kein geeignetes Mittel zur Prävention von klinischen Listeriosen. Ein Impfstoff gegen *Listeria monocytogenes* kann nur über die Induktion einer zellulären Immunität protektiv sein (Portnoy und Jones, 1994).

Das Alphatoxin von *C. perfringens* ist hingegen durch die Induktion von humoralen Antikörpern *in vivo* zu neutralisieren (Williamson und Titball, 1993). Dies eröffnet die Möglichkeit, das Toxin bzw. von diesem abgeleitete Proteine zur Gewinnung von Antisera und zur aktiven Immunisierung zu nutzen.

Aufgrund der massiven Verluste durch Gasbrand in Kriegszeiten stammen die ersten Arbeiten zur passiven Immunisierung aus den 40' er Jahren. In einer Studie von Mac Lennan (1943) hat die zweimalige Antiserumgabe zur Genesung von 75% der Probanden geführt. Conwey (1946) berichtet hingegen von Fehlschlägen bei der passiven Immunisierung. Dies ist auf die Verwendung von nicht immunogenen Toxoid-Präparationen zur Antiserumgewinnung und den raschen Krankheitsverlauf zurückzuführen.

Schoepe et al. (1997) haben dargestellt, daß die passive Immunisierung auch mit monoklonalen Antikörpern möglich ist. Bei der gleichzeitigen Applikation der mAk 1E8 und 3B4 gelingt es, die letale Wirkung des Alphatoxins im Mausmodell zu neutralisieren.

Erste Versuche zur aktiven Immunisierung gegen das Alphatoxin sind mit Toxoid-Präparationen durchgeführt worden, gewonnen aus dem Überstand von *C. perfringens* Kulturen. Diese Toxoide waren in der Lage, eine belastbare Immunität gegen den experimentellen Gasbrand zu induzieren (Roberston und Keppie, 1943). Laut Ito (1968) erwiesen sich die Antigenpräparationen jedoch nicht immer als immunogen und gleichzeitig nicht frei von Nebenwirkungen, da sie Formaldehydreste, sonstige detoxifizierte *C. perfringens* Proteine sowie nur unvollständig toxoidierte Materialien enthalten können.

Bei rekombinant hergestelltem Impfantigenen bestehen diese Nachteile nicht. Verschiedene Herangehensweisen zur Antigengewinnung sind denkbar. Zum einen könnten durch Mutagenese Alphatoxinvarianten hergestellt werden, die eine reduzierte bzw. keine biologische Wirkung aufweisen. Entsprechende Varianten mit reduzierter enzymatischer Aktivität und zytolytischer Wirkung sind von verschiedenen Arbeitsgruppen generiert worden (Nagahama et al., 1995 und 1997; Guillouard et al., 1996). Die *in vivo* Überprüfung ihrer Eignung als Impfantigen gegen das Alphatoxin steht jedoch noch aus. Voraussetzung für die Verwendung dieser Alphatoxinvarianten sind Mehrfachmutationen, die das Risiko einer Reversion reduzieren (Titball et al., 1999).

Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung von atoxischen Alphatoxinfragmenten. Williamson und Titball (1993) haben gezeigt, daß das COOH-terminale Fragment (Cpa 247-370) Alphatoxin-spezifische Antikörper induziert, die *in vitro* die enzymatische Aktivität und die hämolytische Wirkung des Alphatoxins inhibieren. Im Mäuse Toxin-Challenge sind die Tiere sowohl vor einer Belastung mit der fünfzigfachen letalen Dosis eines rekombinant hergestellten Alphatoxins als auch vor dem Gasbrand nach i.m. Verabreichung einer *C. perfringens* Kultur in 10-facher letaler Dosis geschützt.

3 Material und Methoden

3.1. Verwendete Expressionsvektoren

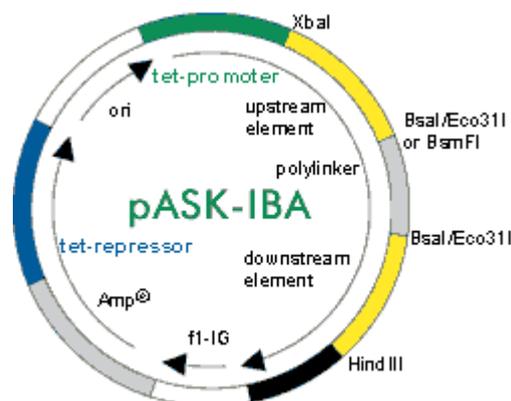
Die verwendeten Vektoren pASK-75 und pASK-IBA2 (Institut für Bioanalytik, Göttingen) erlauben die Gewinnung von rekombinanten Proteinen in *E. coli*. Die Regulation der Klonierungskassette durch das tetA-Promotor/Operator-System ermöglicht die gezielte Expression der inserierten Gene. Die Induktion des tetA-Promotors erfolgt durch die Zugabe von nicht antibiotisch wirkenden Konzentrationen Anhydrotetracyclin.

Die vom Vektor kodierte OmpA-Signalsequenz führt zur Sekretion des rekombinanten Zielproteins in den periplasmatischen Raum der *E. coli* Wirtszelle.

Das Expressionsprodukt ist an ein Streptavidin-bindendes Octapeptid (Strep-Tag beim pASK-75 bzw. Strep-Tag II beim pASK-IBA2) fusioniert. Dadurch kann das Protein in einem Chromatographieschritt an immobilisiertem StepTactin, einem Streptavidinderivat, von *E. coli* Verunreinigungen abgetrennt werden. Die Elution des rekombinanten Produkts erfolgt durch die spezifische Konkurrenz mit Desthiobiotin. Die native Faltung des Zielproteins wird durch das Octapeptid nicht beeinflusst.

Bei dem Vektor pASK-IBA2 handelt es sich um die Weiterentwicklung des pASK-75. Neben der Modifikation des Strep-Tags, unterscheiden sich die Vektoren zudem durch die Position des Anhangs: Beim pASK-75 kann das Strep-Tag ausschließlich mit dem C-Terminus fusioniert werden; beim pASK-IBA2 hingegen ist eine Fusion zudem N-terminal und als Linker zwischen zwei Proteindomänen möglich. In Abbildung 4 ist der Aufbau des pASK-IBA2 modellhaft dargestellt.

Abb. 4: schematische Darstellung des Expressionsvektors pASK-IBA 2



Legende zu Abb. 1:

Amp	→ Ampicillin-Resistenzgen
ori	→ Replikationsursprung
tet-promotor/repressor	→ Promotor/Operator-Region des Tetracyclin-Resistenzgens
polylinker	→ Insertionsstelle für Protein-kodierende Sequenzen
downstream element	→ beinhaltet Strep-Tag kodierende Sequenz
fl-IG	→ intergenische Region des Phagen fl
<i>XbaI</i> , <i>BsaI</i> , <i>Eco3II</i> und <i>Hind III</i>	→ Schnittstellen für Restriktionsenzyme

3.2 Reklonierung des *plc 121A/91*-Gens in den Vektor pASK-IBA2

Um die Ausbeute des im Rahmen der Induktion und Expression gewonnenen rekombinanten Alphatoxins (AT) 121A/91 zu optimieren, wurde das *plc*-Gen des *C. perfringens* Isolates 121/91 aus dem Expressionsvektor pASK-75 (Plasmid pHIT-I-1) in den Vektor pASK-IBA2 rekloniert.

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3ml LB-Medium (siehe Anhang) mit Ampicillin (100 µg/ml) wurden mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Klons JM83/pHIT-I-1 beimpft und in einem Schüttelinkubator (KS 500, Ika-Werk, Staufen) über Nacht bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (15 min, 6000 x g, 4°C, SORVALL RC5B Kühlzentrifuge, U.S.A) zur Gewinnung der Zellen aus der Übernachtskultur. Die Extraktion der Plasmid-DNA aus dem Bakterienzellpellet gelang unter Verwendung der Reagenzien des QIAGEN Plasmid Mini Kits (Qiagen, Hilden). Die Quantifizierung und die Bestimmung des Reinheitsgrades der aufgereinigten Plasmid-DNA erfolgte durch spektrophotometrische Extinktionsmessungen bei 260, 280 und 320 nm (Beckmann DU-600 Photometer, U.S.A).

3.2.2 Gewinnung und Aufreinigung von Restriktionsfragmenten

Die präparative Restriktion der Plasmid-DNA des rekombinanten Plasmids pHIT-I-1 sowie des Expressionsvektors pASK-IBA2 erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *Eco47III* und *Xba* I nach folgendem Ansatz:

2µl	<i>Eco47III</i> (10U/µl, MBI Fermentas Deutschland, St.Leon-Rot)
2µl	<i>XbaI</i> (10U/µl, MBI Fermentas Deutschland, St. Leon-Rot)
2µl	präparierte Plasmid-DNA
2µl	Puffer O ⁺ (50mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,1mg/ml BSA; MBI Fermentas Deutschland, St. Leon-Rot)
ad 20µl	A. bidest

Nach dreistündiger Inkubation im Wasserbad (Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei 37°C, folgte die gelektrophoretische Auftrennung der Ansätze über ein 0,8%iges Agarosegel (SeaKem^R LE-Agarose, Biozym, Hess Oldendorf) in einem 1 x TAE-Puffersystem (siehe Anhang). Hierzu wurden 20µl des Restriktionsansatzes mit 4,5µl eines 6 x Loading Buffers (MBI Fermentas Deutschland, St. Leon-Rot) aufgetragen. Die Spannung betrug 100mV bei einer Laufzeit von 45 min. Nach der Färbung im Ethidiumbromidbad, folgte die Visualisierung der DNA mittels UV-Licht auf einem Transilluminator (TFL 20M, Bios Corporation, Frankreich). Die für die Ligationsreaktion benötigten DNA-Fragmente (*XbaI/Eco47III*-pHIT-I-1 bzw. *Eco47III/XbaI*-pASK-IBA2) wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

Die Agaroseextraktion der Restriktionsfragmente erfolgte unter Verwendung des GenEluteTM Kits (Supelco Deutschland, Deisenhofen) nach Anweisung des Herstellers. Nach der Aufreinigung lagen die Restriktionsfragmente in 20µl Aqua bidest gelöst vor. Es folgte die semiquantitative Ausbeute- bzw. Konzentrationsbestimmung durch gelektrophoretische Auftrennung von je 2µl Eluat in einem 0,8%igen 1 x TAE-Agarosegel.

3.2.3 Ligation von Restriktionsfragmenten

Die Ligation der Restriktionsfragmente *XbaI/Eco47III*-pHIT-I-1 bzw. *Eco47III/XbaI*-pASK-IBA2 erfolgte nach folgendem Ansatz:

- 1µl *Eco47III/XbaI*-pASK-IBA2
- 12µl *XbaI/Eco47III*-pHIT-I-1
- 2µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl, Gibco BRL Life Technologies Deutschland, Eggenstein)
- 4µl 5x Ligase Puffer (Gibco BRL Life Technologies Deutschland, Eggenstein)
- 1µl Aqua bidest.

Nach zweistündiger Inkubation bei 16°C und 15 minütiger Inaktivierung der Ligase bei 65°C (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg) schloß sich die Fällung des Ligationsansatzes mit den Reagenzien des „Roger Rapid“-Kits (biodelta, Bad Oeynhausen) nach Anleitung des Herstellers an. Der Ansatz wurde dann 15 Minuten bei 14 000 U/min und 4°C zentrifugiert (Tischzentrifuge 5145 C, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand dekantiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 70%igen Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10µl Aqua bidest gelöst.

3.2.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Die Transformation der DNA des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes TOP 10 (relevanter Genotyp F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ$, $\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *gal K*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*) des Elektrocomp Transformation Kit TOP 10 (Invitrogen, Niederlande) erfolgte mittels Elektroporation nach Anleitung des Herstellers.

Der Transformationsansatz enthielt 2µl der gefällten Ligationsreaktion und 40µl einer Suspension elektrokompenter *E. coli*-Zellen in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvetten, 0,1 cm, BioRad, München).

Bei den für die Elektroporation eingesetzten Geräten handelte es sich um einen Gene Pulser II (BioRad, München) und einen Pulse Controller Plus (BioRad, München). Die angelegte Spannung betrug 1,25 KV (=12,5 KV/cm) bei einer Kapazität von 25µF, einem low range von 200 Ohm, einem high range von 800 Ohm und einer Puls-Zeit von 4,68-4,80 msec.

Nach der Transformation wurde der Reaktion 1ml SOC-Medium (siehe Anhang) zugefügt, die Lösung vorsichtig gemischt, in ein steriles 1,5ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und anschließend für 60 min bei 37°C inkubiert (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg).

100µl des Reaktionsansatzes wurden auf LB-Agarplatten (siehe Anhang) mit Ampicillin (100 µg/ml) plattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (BB6220 CU, Heraeus, Hanau) inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und der Klon im folgenden unter der Bezeichnung TOP10/pHIT-I-38 geführt.

3.2.5 Screening der Transformanten

Zur Kontrolle der Insertion des *XbaI/Eco47III*-Fragmentes des pHIT-I-1 in das *Eco47III/XbaI*-Fragment des pASK-IBA2 schloß sich der Transformation eine Alphatoxin-spezifische PCR an (Schlapp et al., 1995). Die Extraktion der Gesamt-DNA des Transformanten erfolgte durch die „Lysis by boiling“-Methode. Hierfür wurden 75µl einer *E. coli* Übernachtskultur (Anzucht siehe 3.1.2.1) mit 50µl Aqua bidest gemischt und diese Suspension für 10 min bei 100°C aufgeköcht. Nach der Zentrifugation des Bakterienzellysates bei 14 000 U/min (Tischzentrifuge 5145 C, Eppendorf, Hamburg) dienten 10µl des gewonnenen Überstandes als Matrizen-DNA für die Polymerase-Kettenreaktion.

Die Sequenz der in der PCR eingesetzten *plc*-genspezifischen Primer (Synthese MWG, Ebersberg) ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Sequenz der verwendeten *plc*-genspezifische Primer

Primer	Primersequenz
Cp 224	5'-AGG AAC TCA TGC TAT GAT TGT AAC TCA AGG-3'
Cp 972i	5'-ACC ACT AGT TGA TAT GTA AGC TAC TAG-3'

Die Testansätze wiesen folgende Konzentrationen bzw. Volumina auf:

- 1 μ M *plc*-spezifischer Primer1
- 1 μ M *plc*-spezifischer Primer2
- 1xTaq Puffer (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- 2,5 U Taq DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- 200 μ M dNTPs (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- BSA (MBI Fermentas Deutschland, St. Leon-Rot)
- 10 μ l Bakterienzellysat
- Aqua bidest ad 50 μ l

Das Thermocyclerprogramm (Mastercycler 5330, Eppendorf, Hamburg) für die Durchführung der PCR lautete wie folgt:

initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 30 Zyklen
Annealing	52°C	2 min	
Extension	72°C	3 min	
finale Extension	72°C	5 min	

Die Visualisierung der gewonnenen Amplifikate erfolgte nach der Auftrennung der PCR Produkte in einem 2%igen Agarose Gel bei 100 V über 45 min mittels UV-Licht (siehe 3.2.2). Zur Bestätigung des PCR-Ergebnisses wurde Plasmid-DNA des Transformanten aufgereinigt, mit *Xba*I/*Eco*47III geschnitten und die Größe der entstandenen Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung bestimmt (siehe 3.2.1-2).

3.2.6 DNA-Sequenzierung

Um die Screeningergebnisse abzusichern und die Insertion unter Einhaltung des korrekten Leserahmens zu bestätigen, erfolgte die Sequenzierung des *plc*-Gens sowie der Vektor/Insert Übergänge des Expressionsklons.

3.2.6.1 Sequenzierungsreaktion und Probenaufbereitung

Zur DNA-Sequenzierung diente die von Sanger et al. (1977) beschriebene Methode der Didesoxysequenzierung mit den Reagenzien des BIG DYE Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt).

Die Reaktionsansätze enthielten 400ng aufgereinigte Plasmid-DNA, 3,2pmol des jeweiligen Primers sowie 8µl des Terminator Premix in einem Gesamtvolumen von 20µl.

Die in den Sequenzierungsreaktionen verwendeten Primer (Synthese MWG, Ebersberg) sind in Tabelle 6 und 7 aufgeführt.

Tabelle 6: Sequenz der verwendeten *plc*-spezifischen Sequenzierungsprimer

Primer	Nukleotidsequenz	Position im <i>plc</i> -Strukturgen
cp 24	5'-AGG AAC TCA TGC TAT GAT TGT AAC TCA AGG-3'	nt 24 – 53 des Positiv-Stranges
cp 310	5'-TTA GCT AGA TAT GAA TGG CAA AGA GGA AA-3'	nt 310 - 338 des Positiv-Stranges
cp 559	5'-GCA TGG TCA AAA GAA TAT GCA AGA GG-3'	nt 559 - 584 des Positiv-Stranges
cp 735	5'-GGG TAA TGA TCC ATC AGT TGG AAA-3'	nt 735 - 758 des Positiv-Stranges
cp1088i	5'-GGA CTT TAG GTC AGC AAA TAT AGA AAC AGG-3'	nt 1059 - 1088 des Negativ-Stranges

Die Sequenz der zur Kontrolle der Vektor/Insert-Übergänge eingesetzten Primer (Synthese MWG, Ebersberg) ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Sequenz der Vektor-spezifischen Primer

Primer	Nukleotidsequenz
FpASK75	5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'
BpASK75	5'-GAC GCA GTA GCG GTA AAC G-3'

Das Programm der Sequenzierungsreaktion-PCR (Gene Amp PCR System 2400-Thermocycler, Perkin Elmer, Weiterstadt) lautete wie folgt:

initiale Denaturierung	96°C	2min	
Denaturierung	96°C	10sec	—
Annealing	50°C	5sec	—
Extension	60°C	4min	—

} 25 Zyklen

Im Anschluß an die PCR wurden die Ansätze mit 80µl A. bidest aufgefüllt und die Syntheseprodukte nach Zugabe von 10µl 3M Natriumazetat-Lösung (pH 4,6) und 300µl Ethanol (98%ig) durch 30 minütige Inkubation auf Eis gefällt.

Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 14000 U/min (Tischzentrifuge 5145 C, Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen, im Exsikkator (Fischer, Frankfurt) getrocknet und schließlich in 4µl Probenpuffer gelöst (deionisiertes Formamid [pH 7,0], EDTA-Lösung [pH 8,0] im Verhältnis 5:1).

3.2.6.2 Auftrennung der Syntheseprodukte aus der Sequenzierungsreaktion

Die Auftrennung der Syntheseprodukte aus der Sequenzierungsreaktion erfolgte durch vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in einem 373A DNA-Sequencer von Applied Biosystems (Weiterstadt). Zur Herstellung des 7%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gels wurden 30g Harnstoff mit 9,5ml einer Acrylamid/Bisacrylamidlösung versetzt und ad 54ml mit A. bidest aufgefüllt. Die Reagentien lösten sich unter Wärmezufuhr. Anschließend wurde dem Ansatz 1,5g Amberlite (Serva, Heidelberg) hinzugefügt und die Lösung filtriert (0,2µl Filter, Milipore, Eschborn). Dann folgte die Zugabe von 6ml 1xTBE Puffer (siehe Anhang) und die Entgasung des Gemisches an. Es folgte die Zugabe von 180µl 10%iger APS Lösung und 24µl Temed. Nach Polymerisation des Gels erfolgte die Elektrophorese nach Anleitung des Herstellers. Die von den Syntheseprodukten emittierten Fluoreszenzsignale wurden durch den Sequenzierungsautomaten in DNA-Sequenzen übersetzt.

3.2.6.3 Computergestützte Auswertung der Sequenzdaten

Zur Auswertung der gewonnenen Sequenzdaten dienten die Computerprogramme EditSeq und MegAlign des Programmpaketes Lasergene 2000 (DNA-Star, London, UK).

3.3 Mutation des Nukleotids 635 des *plc 121A/91*-Gens

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91 und des Wildtyptoxins des *C. perfringens* Stammes ATCC 13124 (siehe Ergebnisteil) zeigt, daß das rAT121A/91 an Position 212 ein Arginin statt eines Histidins aufweist.

Um zu prüfen, ob die Substitution des Arginins₂₁₂ durch ein Histidin die Präsentation protektiver Epitope der rekombinanten Alphatoxinvariante beeinflusst, wurde eine site-directed Mutagenese durchgeführt.

Durch die Mutation des Guanin₆₃₅ des 121A/91-Alphatoxingens im pHIT-I-1 zu einem Adenin, entstand das für die Aminosäure Histidin kodierende Basentriplet *CAT*. Die Durchführung der Reaktion erfolgte unter Verwendung des EXSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Cat. No. 200502, Stratagene, U.S.A) nach Anleitung des Herstellers.

Die Vorgehensweise war angelehnt an die Methode von Kunkel (1985) die die Mutation von doppelsträngiger Plasmid-DNA erlaubte. Der Nukleotidaustausch wird über modifizierte Primer während einer PCR vorgenommen. Die DNA wird anschließend über *Dpn I* verdaut und kann im folgenden über Agarose-Elektrophorese von der mutierten DNA getrennt werden. Die Enden der entstandenen linearen DNA werden mittels klonierter *pfu* DNA-Polymerase geglättet und danach ligiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle im folgenden beschriebenen Reagenzien und Enzyme von der Firma Stratagene, U.S.A, bezogen.

0,5pmol der präparierten DNA des pHIT-I-1 dienten als Template in der Mutagenese-PCR. Die Präparation ist unter 3.1.2.1 beschrieben. Es folgte die Zugabe von 2,5µl 10fach Mutagenesepuffer, 1µl 25mM dNTP Mix, je 15pmol Primer, 1µl ExSite DNA Polymerase Blend (5U/µl) und A. bidest zu einem Volumen von 24µl. Die Sequenz der eingesetzten Primer (Synthese MWG, Ebersberg) ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Sequenz der Mutagenese Primer

Primer	Nukleotidsequenz
Cp Muta-1	5'-CAT GCT AGC ATG ACT ATA GTA TAT TGA TTT-3'
Cp Muta-2	5'-AGT CAT AGT TGG GAT GAT TGG GAT TAT GCA-3'

Beide eingesetzten Primer waren am 5'-Ende phosphoriliert. Die PCR wurde in einem Gene-Amp PCR System 2400-Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Die verwendeten Temperaturen, Zyklenanzahlen und deren Dauer sind Tabelle 9 zu entnehmen:

Tabelle 9: Profil der Mutagenese PCR

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C 50°C 72°C	4 Minuten 2 Minuten 2 Minuten
2	8	94°C 56°C 72°C	1 Minuten 2 Minuten 1 Minuten
3	1	72°C	5 Minuten

Vor der Zugabe von 1µl *Dpn* I (10U/µl) und 0,5µl klonierter *Pfu* DNA Polymerase (2,5U/µl), erfolgte die zweiminütige Inkubation der Reaktion auf Eis. Der Ansatz wurde sanft gevortext (Minishaker MS-1, IKA, Staufen) und eine Minute bei 14 000 U/min in der Tischzentrifuge (5145 C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C und einer anschließenden halbstündigen Inkubation bei 72°C (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg), erfolgte die Zugabe von 100µl A. bidest, 10µl 10x Mutagenese Puffer und 5µl 10mM rATP. Der Ansatz wurde erneut sanft gevortext und eine Minute in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Restriktion der parenteralen DNA erfolgte eine Visualisierung der gewonnenen DNA in einem Agarosegel (siehe 3.1.2.1).

10µl des Produktes wurde in ein neues Eppendorf –Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und 1µl T4 DNA Ligase (4U/µl) zugegeben bevor sich eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur anschloß. Die weitere Vorgehensweise ist unter 3.1.2.4 – 3.1.2.6.3 beschrieben. Der entstandene Klon trägt die Bezeichnung JM83/pHIT-I-39.

3.4 Gewinnung und Aufreinigung der rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂

3.4.1 Induktion und Expression des rAT121A/91 und des rAT 121A/91-His₂₁₂

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 10ml LB-Medium/Ampicillin [100 µg/ml] (siehe Anhang) mit einer frischen Einzelkolonie des Expressionsklons *E. coli* TOP10/pHIT-I-38 bzw. des JM83/pHIT-I-39 angeimpft und 16 Stunden bei 32°C und 100 U/min in einem Schüttelinkubator (KSA 500, IKA, Staufen) inkubiert. Die Vorkultur wurde dann in eine Expressionskultur (500ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/ml]) überführt und diese ebenfalls bei 32°C auf einem Schüttelinkubator (100 U/min) inkubiert.

Die Induktion der Expressionslösung erfolgte bei einer OD_{550nm} von 0,5 (Beckmann DU-600 Photometer, U.S.A) durch die Zugabe von 12,5µl einer Anhydrotetracyclin-Lösung (2 mg/ml Anhydrotetracyclin in Dimethylformamid). Dem schloß sich eine weiterer dreistündige Inkubation unter den genannten Bedingungen an.

3.4.2 Präparation periplasmatischer Extrakte

Die durch Zentrifugation (4500 x g, 20 min., 4°C, SORVALL RC5B Kühlzentrifuge, U.S.A) geernteten *E. coli*-Zellen wurden nach Verwerfen des Kulturüberstandes in Periplasmapuffer P (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM Saccharose; 1 mM EDTA, 1ml je 100ml Kultur) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14 000 U/min, 15 min., Tischzentrifuge 5145 C, Eppendorf, Hamburg) konnten durch Abnahme des periplasmatischen Extraktes (Überstand) die entstandenen Sphäroblasten abgetrennt werden.

3.4.3 Kontrolle der Expression mittels SDS-Gelelektrophorese

Die Kontrolle der Proteinexpression erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese. Hierzu wurden 10µl Periplasmaextrakt, 3µg Alphatoxin (Sigma, Deisenhofen) und ein Größenstandart (10µl Sea Blue, Novex, San Diego, U.S.A.) 1:2 mit Probenpuffer nach Laemmli (1970) gemischt und 10 Minuten bei 100°C gekocht. Nach vollständiger Polymerisation der Gelmassen (die Zusammensetzung zeigt Tabelle 10) erfolgte die Beschickung des Gels.

Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Page

Stammlösung	Trenngel 12,5%ig	Sammelgel
Tris-HCl Puffer (2M pH 8,6)	1,5ml	-
Tris-Phosphat Puffer (0,6mM pH 6,8)	-	250µl
Acrylamid: N,N'-Methylen-bis-acrylamid 30:0,8	3ml	-
Acrylamid: N,N'-Methylen-bis-acrylamid 50:1,5	-	250µl
Harnstoff (8M)	2,25ml	1,5ml
SDS (20%ig)	37,5µl	12,5µl
Aqua bidest	84µl	450µl
Ammoniumpersulfat (30mg/ml)	36µl	75µl
TEMED	6µl	2,5µl

Es schloß sich die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 25mA an. Die Visualisierung der aufgetrennten Proteine erfolgte durch die Anfärbung mit Coomassie-Brilliantblau (siehe Anhang). Das Gel wurde nach einer einstündigen Färbung bis zur völligen Klärung in Entfärbelösung (siehe Anhang) bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Lösung wurde mehrmals gewechselt.

3.4.4 Aufreinigung und Umpufferung der rekombinanten Proteine

Das am COOH-Terminus der rekombinanten Alphatoxinvarianten fusionierte Tag (Strep-Tag bzw. Strep-Tag II) ermöglichte die affinitätschromatographische Aufreinigung der exprimierten Proteine mittels einer StrepTactin-Sepharose-Matrix (Institut für Bioanalytik, Göttingen).

Vor der Chromatographie erfolgte die Spülung der Säulenmatrix mit 2x 5ml Waschpuffer (Puffer W, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0). Dann wurden 5x 1,5ml Periplasmaextrakt aufgetragen. Die bis zur Aufarbeitung bei -20°C eingefrorenen Extrakte waren zuvor 15 min. bei 14 000 U/min zentrifugiert worden (Tischzentrifuge 5145 C, Eppendorf, Hamburg).

Nach dem vollständigen Durchfluß der Proteinlösung wurde die Säule mit 6ml Waschpuffer gespült und die spezifischen Proteine mit 8x 1ml Elutionspuffer (Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin) fraktioniert eluiert. Zur Regeneration der StrepTactin-Matrix war es erforderlich, den zur Elution eingesetzten Kompetitor Desthiobiotin aus der Bindung zum StrepTactin zu verdrängen. Dafür wurden 4x 5ml Puffer R (Puffer W mit 1 mM HABA [4-Hydroxybenzen-2-carboxylsäure]) auf die Säule aufgebracht. Dem schloß sich eine

erneute Spülung mit 3x 5ml Puffer W an. Die Matrix wurde nach der Aufreinigung mit Puffer W überschichtet und bei 4°C gelagert. Die Lagerung der aufgereinigten Proteine erfolgte bei -20°C.

Vor der Verwendung als Impfprotein, wurden die rekombinanten Alphatoxinvarianten gegen 1 x PBS (pH 7,4) dialysiert. Die Dialyseschläuche (SERVAPOR, Ausschlußgrenze 5 kDa; Serva, Heidelberg) waren vor der Verwendung 30 Minuten in A. bidest gewässert worden. Die Dialyse des Eluates erfolgte mit 1x PBS (pH 7,4) bei 4°C unter leichtem Rühren. Das Verhältnis Eluat zu Puffer betrug etwa 1:500. Der Wechsel des Dialysepuffers fand nach 2, 4 und 18 Stunden statt. Nach 24h wurden die Alphatoxinvarianten geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration dienten die Reagenzien des BCA-Protein Assay Reagent Kits der Firma Pierce (USA; Durchführung nach Anleitung des Herstellers). Die Messung der optischen Dichte der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 562nm in einem UVIKON 810 Spektrophotometer (Kontron AG, Zürich, Schweiz). Aus dem Wert wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe nach folgender Formel berechnet:

$$x \mu\text{gProtein/ml} = \text{OD}_{562\text{nm}} \times \text{Umrechnungskoeffizient.}$$

Der Umrechnungskoeffizient der Formel wurde anhand einer geometrischen Verdünnungsreihe der BSA-Standardlösung (BCA-Protein Assay Reagent Kits; Pierce,USA) berechnet.

3.6 Untersuchungen zur Reinheit und Immunogenität der rekombinanten Alphatoxinvarianten (rAT121A/91 und rAT121A/91-His₂₁₂)

Die Überprüfung der Reinheit der rekombinanten Alphatoxinvarianten nach affinitätschromatographischer Aufreinigung erfolgte mittels SDS-Page. Jeweils 5µg des rAT121A/91, des rAT121A/91-His₂₁₂ und des Wildtyptoxins (PLC, Sigma, Deisenhofen) wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (siehe 3.4.3). Zur Kontrolle der Immunogenität diente der Immunoblot mit Wildtyptoxin spezifischen monoklonalen Antikörpern.

3.6.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper 1E8 und 3B4

Die Aufreinigung der monoklonalen Antikörper 1E8 und 3B4 der Subklasse IgG1 (Schoepe et al., 1997) erfolgte aus Hybridomakulturüberständen. Diese wurden über eine Amicon Filterzelle TCF 10 (Filter YM 30, Amicon, Witten) nach Anleitung des Herstellers eingengt und gegen 1x PBS (pH 6,9) umgepuffert.

Das Konzentrat wurde über einen Millex-GV 0,22µl Filter (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert und über Nacht bei 4°C gelagert. Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung diente eine Protein G Sepharose 4 Fast Flow Säule (Pharmacia, Freiburg). Bei dieser Säule ist rekombinantes Protein G an eine Sepharosematrix gekoppelt. Dies erlaubt die spezifische Aufreinigung von IgG mit hohen Ausbeuten. Die optische Dichte des Durchflusses wurde bei der Aufreinigung kontinuierlich photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt und von einem Schreiber protokolliert (Pharmacia, Freiburg). Vor Benutzung der Säule erfolgte die Äquilibrierung mit 1xPBS (pH 7,0) und die Einstellung des Schreibers auf die Basislinie. Nach dem Auftragen der eingengten Proteinlösung wurde die Säule mit 1xPBS (pH 7,0) gewaschen, bis der Schreiber erneut eine stabile Nulllinie aufzeichnete. Die gebundenen Antikörper wurden mit 0,1 M Glycin/HCl (pH 2,7) eluiert und das gewonnenen Eluat in 1ml Fraktionen aufgefangen. Zur Abpufferung der gewonnenen Lösungen dienten je 65µl 1M Tris/HCl (pH 9,0). Es folgte die Neutralisation der Säule mit 1xPBS (pH 7,0). Je 15 Fraktionen wurden gepoolt, in der Amicon Zelle gegen 1x PBS (pH 7,4) umgepuffert und auf 1,5ml eingengt. Nach der Sterilfiltration (DynaGard Kurzfilter, Wiesbaden) erfolgte die Proteinbestimmung (BCA-Kit, Pierce, USA) und die Einstellung der Antikörperkonzentration auf 2µg/µl. Dem schloß sich die Portionierung der Proteine in 50µl Aliquods und deren Lagerung bei -20°C an.

3.6.2 Immunoblot

Der Transfer der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Protan, Schleicher und Schüll, Dassel) erfolgte im Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984). Die hierfür verwendeten Elektrodenpapiere und die Nitrocellulose-Membran besaßen die Größe des Polyacrylamidgeles. Auf die untere Graphitplatte (Anode) der Elektroblokkammer (Keutz, Reiskirchen) wurde in folgender Reihenfolge geschichtet: sechs

in Anodenpuffer I und drei in Anodenpuffer II getränkte Elektrodenpapiere, die in 1xPBS (pH 7,4) getränkte Nitrocellulose-Membran, das in Anodenpuffer II äquilibriumierte SDS-Polyacrylamidgel und neun in Kathodenpuffer getränkte Elektrodenpapiere. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist dem Anhang zu entnehmen. Nach Aufsetzen der oberen Graphitplatte (Kathode) erfolgte der Transfer bei $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ für 90 min. Dem schloß sich die Überprüfung des Vorganges durch Färben des Gels mit Coomassie-Brilliantblau an (siehe 3.1.4.3).

Die Nitrocellulose-Membran wurde zum Renaturieren der Proteine für eine Stunde in 1x PBS (pH 7,4) gelegt und dann zum Absättigen freier Bindungsstellen über Nacht in 1:10 mit Aqua bidest verdünnten Pepton-Blockpuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in 1x PBS + 0,05% Tween 20 wurde die Nitrocellulose-Membran in Streifen geschnitten. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit den Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörpern 1E8 und 3B4 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ 1xPBS, pH 7,4). Nach dreimaligem Waschen, erfolgte die Inkubation der Membran mit 1:1000 in 1x PBS (pH 7,4) verdünntem Anti-Mouse-IgG-Peroxidase-Konjugat (Amersham Buchler, Braunschweig) für 1h bei 37°C . Vor der Zugabe der Substratlösung [2ml Chloronaphtol (3mg 4-Chlor-1-Naphtol / ml Methanol) mit 8ml 1x PBS (pH 7,4) und $5\mu\text{l}$ H_2O_2 versetzt] wurde die Membran dreimal gewaschen. Nach deutlichem Sichtbarwerden der Enzymreaktion wurde die Reaktion mit Aqua bidest gestoppt. Die Durchführung der Inkubationsschritte erfolgte auf einer Wippe bei Raumtemperatur.

3.6.3 Überprüfung der antigenen Eigenschaften der rekombinanten Alphatoxinvarianten im ELISA

Jeweils $2\mu\text{g}$ der rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂ und des Wildtyptoxins wurden in $100\mu\text{l}$ Coatingpuffer (siehe Anhang) gelöst. Die Proben wurden im Dreifachansatz auf eine 96-Loch Microtiterplatten (NUNC Maxisorb, NUNC, Wiesbaden) aufgetragen und eine Stunde bei 37°C auf einem Schütteler (Flow Laboratories, Meckenheim) inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal für jeweils 5 Minuten mit $200\mu\text{l}$ Waschpuffer (1xPBS, 0,05% Tween 20, pH 7,2) bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Blockierung freier Bindungsstellen dienten $200\mu\text{l}$ eines 1:10 mit Aqua bidest verdünnten ELISA Pepton-Blockpuffers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pro „well“. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttelinkubator. Nach Ablauf der Inkubationszeit

wurden die Vertiefungen der 96-Loch-Platten wie oben beschrieben dreimal gewaschen. Zur Immundekoration des Alphatoxins bzw. der rekombinanten Alphatoxinvarianten diente der mAk 3B4 (100µl, bei einer Konzentration von 5µg/ml 1xPBS, pH 7,4). Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttelinkubator und das dreimalige Waschen der Platten. Zum Nachweis gebundener Antikörper wurde ein 1:5000 in Waschpuffer verdünntes polyklonales Anti-Maus-Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat (Pharmacia-Amersham, Braunschweig) verwendet. 100µl der Konjugatgebrauchslösung wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten pipettiert. Es folgte die erneute Inkubation der Titerplatten bei 37°C auf dem Schüttelinkubator. Nach einer Stunde wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten ein letztes Mal in der beschriebenen Weise gewaschen.

In jede Vertiefung wurden abschließend 100µl einer frisch angesetzten 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic Acid) (ABTS)-Substratlösung (5mg ABTS [Serva, Heidelberg] in 10ml Substratpuffer [20mM Na-Citrat/PBS pH 4,2] + 5µl 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung [Merck, Darmstadt]) pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden danach noch einmal für 15 Minuten auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert.

Abschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte der Substratlösung bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Titertek-Multiscan Photometer (Flow Laboratories, Meckenheim).

Folgende Kontrollen wurden auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt:

1. Positivkontrollen: Beschichtung der Vertiefung mit 0,5µg Alphatoxin; Immundekoration mit den affinitätsgereinigten mAK 3B4 und 1E8 (0,5µg in 100µl PBS, pH 7,4) im Dreifachansatz;
2. Blanks: Zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit 100µl Coatingpuffer ohne Antigen beschichtet; die Immundekoration erfolgte mit 100µl mAK 3B4 und 1E8 (5µg/ml 1xPBS, pH 7,4) im Dreifachansatz.

3.7 Untersuchungen zur Überprüfung der biologischen Wirkungen der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂

3.7.1 *In vitro* Testassays zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität und hämolytischen Wirkung des rAT121A/91-His₂₁₂

Die Charakterisierung der durch die Mutation des Arginin₂₁₂ generierten rekombinanten Alphatoxinvariante AT121A/91-His₂₁₂ hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und der hämolytischen Wirkung erfolgte mit einem Eigelb-Laktose-Agar (ELA) und einer Zeissler-Blutagarplatte (siehe Anhang). Hierfür wurden Vertiefungen mit einem Durchmesser von 4 mm aus den Platten gestanzt. Anschließend wurden 0,4µg, 0,6µg, 0,8µg, 1,0µg und 1,2µg der Variante in IWP (siehe Anhang) gelöst und in einem Volumen von jeweils 10µl in die Vertiefungen der Agarplatten pipettiert. Als Kontrollen dienten rAT121A/91, Wildtypoxin und IWP. Nach zweistündiger Inkubation der Eigelb-Laktose- bzw. Zeissler-Blutagarplatte bei 37°C und weiteren 10 Minuten Inkubation bei 4°C erfolgte die Bestimmung der Durchmesser (mm) der entstandenen Trübungshöfe (ELA) bzw. der Hot-cold-Hämolyse-Zonen (Zeissler-Blutagar).

3.7.2 *In vivo* Assay zur Überprüfung der letalen Wirkung der Alphatoxinvariante AT121A/91-His₂₁₂

Zur Bestimmung der letalen Wirkung des rAT121A/91-His₂₁₂ wurde die Alphatoxinvariante parenteral an Mäuse verabreicht. Je sechs NMRI Mäusen (sechs Wochen alt) wurden 10, 20, 40 bzw. 80µg des rAT121A/91-His₂₁₂ in 500µl 1xPBS (pH 7,4) intraperitoneal appliziert. Die Mäuse wurden 72 Stunden regelmäßig auf Symptome einer Alphatoxin-Intoxikation untersucht. Den Kontrollgruppen wurde, analog zu den Testgruppen, rAT121A/91 bzw. 1xPBS verabreicht.

3.8 Tierexperimentelle Techniken

3.8.1 Intraperitoneale Injektion bei der Maus

Zur intraperitonealen Injektion wurden die Tiere von einem Helfer durch einen Griff am Nackenfell und am Schwanz fixiert, leicht gestreckt und kopfüber gehalten. Die injizierende Person führte die Kanüle (10x 0,5mm, Braun, Melsungen) seitlich der Medianen in Höhe des Nabels etwa 1 cm ein und setzte die Vakzine ab.

3.8.2 Subkutane Injektion bei der Maus

Bei der subkutanen Applikation wurden die Mäuse auf den Gitterdeckel des Käfigs gesetzt und durch einen Helfer am Schwanz fixiert. Die Tiere versuchten zu fliehen und umklammerten dabei die Gitterstäbe. Durch einen leichten Zug am Schwanz konnte die Fluchtbewegung des Tieres zur Immobilisation genutzt werden. Die injizierende Person zog dann eine Dreiecksfalte im Genick des Tieres und stach mit der Nadel (10x 0,5mm, Braun, Melsungen) in den entstehenden Hohlraum. Der korrekte Sitz der Kanüle wurde durch eine leichte Bewegung der Nadel überprüft. Dann wurde die Injektionslösung subkutan abgesetzt.

3.8.3 Narkose und Euthanasie bei der Maus

Die Mäuse wurden durch die intraperitoneale Verabreichung des Injektionsanästhetikum Avertin (300µl/Tier, siehe Anhang) narkotisiert. Die Betäubungstiefe wurde mittels Lidreflex kontrolliert.

Die schmerzlose Tötung der Tiere erfolgte durch die intraperitoneale Applikation von 150mg/kg Pentobarbital.

3.8.4 Dekapitation bei der Maus

Zur terminalen Blutentnahme wurden die Mäuse dekapitiert. Hierfür wurden die Tiere narkotisiert und das Genick nachfolgend mit einem Scherenschenkel stumpf durchtrennt. Der Maus wurde dann mit der Schere der Kopf vom Körper abgelöst.

3.9 Tierhaltung und -verwendung

Für die Gewinnung von Erythrozyten, Serum sowie zur Nutzung in Immunisierungsversuchen und Toxizitätsassays wurden weibliche NMRI und Balb/c Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) verwendet. Die Tiere wurden auf Sägespäne-Einstreu in Typ III Standardkäfigen aus Makrolon gehalten. Jeder Gruppe von Mäusen wurde, gemäß den Vorschlägen von van de Weerd (1996) zum "environmental enrichment" von Labormäusen, ein Metallhaus zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden ad libitum mit einem pelletiertem Alleinfutter gefüttert und über Flaschentränken mit Wasser versorgt.

3.10 Immunisierungs- und Belastungsversuche an Mäusen

3.10.1 Versuchsablauf

Die zu Versuchsbeginn 8-9 Wochen alten weiblichen Balb/c Mäuse wurden am Tag 0 und 21 immunisiert. Am Tag 35 erfolgte entweder die Tötung der Tiere zur Serumgewinnung oder die Belastung der Impflinge mit Wildtypotoxin. Überlebende Versuchstiere wurden nach Ende des Beobachtungszeitraumes ebenfalls zur Serumgewinnung herangezogen.

3.10.2 Durchgeführte Immunisierungs- und Belastungsversuche

Bei den Immunisierungsversuchen mit anschließender Belastung wurden die Mäuse jeweils zweimal mit einer rekombinanten Alphatoxinvariante (rAT121A/91 oder rAT121A/91-His₂₁₂) mit oder ohne Adjuvans immunisiert. Die Applikation erfolgte intraperitoneal bzw. subkutan. Die Tiere wurden am Tag 35 entweder mit der minimalen Dosis letalis Alphatoxin

(Belastungsversuch 1-4) bzw. mit 1,6µg Toxin (Belastungsversuch 5) belastet. Neben den Impf- wurden entsprechende Kontrollgruppen mitgeführt. Die Gruppeneinteilung und -stärke sowie die verimpften Substanzen und die Applikationsroute sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Gruppeneinteilung und -stärke sowie Impfstoffzusammensetzung und Applikationsroute bei den Immunisierungsversuchen

<i>Belastungsversuch 1</i>			
Status der Tiere	Anzahl (n)	Impfstoff ¹⁾	Placebo ¹⁾
Impflinge	6	rAT121A/91-His ₂₁₂	-
Kontrolltiere	6	-	1xPBS (pH 7,4)
Impflinge	6	rAT-121A/91	-
Kontrolltiere	6	-	1xPBS (pH 7,4)

<i>Belastungsversuch 2</i>			
Status der Tiere	Anzahl (n)	Impfstoff ¹⁾	Placebo ¹⁾
Impflinge	6	rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	-
Kontrolltiere	6	-	1xPBS (pH 7,4)
Impflinge ²⁾	12	rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	-
Kontrolltiere ²⁾	12	-	1xPBS (pH 7,4)
Impflinge ²⁾	21	rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	-
Kontrolltiere ²⁾	6	-	1xPBS (pH 7,4)
Impflinge	6	rAT-121A/91 in MF59	-
Kontrolltiere	6	-	1xPBS (pH 7,4)
Kontrolltiere	12	-	MF59

<i>Belastungsversuch 3</i>			
Status der Tiere	Anzahl (n)	Impfstoff ²⁾	Placebo ²⁾
Impflinge	12	rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	-
Kontrolltiere	6	-	1xPBS (pH 7,4)
Kontrolltiere	12	-	MF59
Impflinge	12	rAT-121A/91 in Alu-Gel	-
Kontrolltiere	6	-	1xPBS (pH 7,4)
Kontrolltier	6		Alu-Gel

¹⁾ intraperitoneale Injektion

²⁾ subkutane Injektion

3.10.3 *In vitro* Testassays zur Bestimmung Alphatoxin-spezifischer Aktivitäten

Vor der Verwendung des Wildtyptoxins im Belastungsversuch, erfolgte die Kontrolle der enzymatischen Aktivität und der hämolytischen Wirkung der Alphatoxin-Charge. Zu diesem Zweck wurden Vertiefungen mit einem Durchmesser von 4mm in einen Eigelb-Laktose-Agar (ELA) und eine Zeissler-Blutagarplatte (siehe Anhang) gestanzt. Anschließend wurden 0,4µg, 0,6µg, 0,8µg, 1,0µg und 1,2µg α-Toxin in 1x PBS überführt (pH 7,4; Gesamtvolumen 10µl) und in die Vertiefungen der Agarplatten pipettiert.

Nach zweistündiger Inkubation der Platten bei 37°C und weiteren 10 Minuten Inkubation bei 4°C erfolgte die Bestimmung der Durchmesser (mm) der entstandenen Trübungshöfe (ELA) bzw. der Hot-cold-Hämolyse-Zonen (Zeissler-Blutagar).

3.10.4 Bestimmung der minimalen letalen Dosis des Alphatoxins in der Maus

Um die minimale letale Dosis des zur Belastung verwendeten Wildtyptoxins (PLC, Sigma, Deisenhofen) zu bestimmen, wurden je sechs 12-14 Wochen alte Balb/c Mäuse mit 0,15µg, 0,3µg, 0,4µg, 0,6µg, 0,8µg, 1,0µg, 1,2µg bzw. 4,8µg Toxin in 400µl 1xPBS (pH 7,4) intraperitoneal belastet. Als minimale Dosis letalis wurde die Toxinmenge definiert, bei der alle Tiere der Gruppe während des Beobachtungszeitraumes von 72 Stunden starben.

3.10.5 Belastungsversuche an Mäusen

Zur Wirksamkeitsprüfung der einzelnen Impfstoffpräparationen diente die Belastung der vakzinierten Tiere am Tag 35 mit 1,2µg Alphatoxin/Maus (Sigma, Deisenhofen) in 400µl 1xPBS (pH 7,4). Die Versuchstiere wurden während des Beobachtungszeitraumes regelmäßig kontrolliert und die Anzahl der lebenden und toten Impflinge protokolliert. Mäuse deren Allgemeinbefinden darauf schließen ließ, daß sie vor Ende des Beobachtungszeitraumes versterben würden, wurden schmerzfrei getötet.

3.11 Untersuchung von Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂]- Hyperimmunsere

3.11.1 Serumgewinnung bei der Maus

Die Serumgewinnung erfolgte durch Dekapitation narkotisierter Mäuse am Tag 35 (Serumgruppen) bzw. am dritten Tag nach Belastung (Belastungsgruppen). Das Blut wurde in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) aufgefangen und zunächst für eine Stunde bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C stehengelassen.

Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g (Tischzentrifuge 5145 C, Eppendorf, Hamburg) wurde das Serum abgenommen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.11.2 ELISA zur Bestimmung des Anti-Alphaotoxin Antikörpertiters in Hyperimmunsere

Die Bestimmung der Alphaotoxin-spezifischen Antikörpertiter erfolgte mittels ELISA. Hierfür wurden die „wells“ von 96-Loch-Mikrotiterplatten (NUNC-Maxisorb; NUNC, Wiesbaden) mit 0,5µg Alphaotoxin (Sigma, Deisenhofen), vorgelegt in 100µl Coatingpuffer (siehe Anhang), beschichtet. Nach einstündiger Inkubation der Platten bei 37°C auf einem Schüttelinkubator (Flow Laboratories, Meckenheim), wurden die Titerplatten dreimal 5 Minuten mit 200µl Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween 20; pH 7,2) bei Raumtemperatur gewaschen.

Zur Blockierung freier Bindungsstellen dienten 200µl eines 1:10 mit Aqua bidest verdünnten ELISA Pepton-Blockpuffers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pro „well“. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttelinkubator. Dann wurden die Vertiefungen der 96-Loch-Platten wie oben beschrieben dreimal gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Testseren (Analyte) in einer geometrischen Verdünnungsreihe (log₂-Verdünnungsstufen) in 1 x PBS (pH 7,4) beginnend bei einer Anfangsverdünnung von 1:1000 bis zu einer Endverdünnung von 1:2.024x10⁶ im Doppelansatz auf die Mikrotiterplatten aufgetragen (100µl/Vertiefung). Der einstündigen Inkubation bei 37°C auf dem Schüttelinkubator folgte das dreimalige Waschen der ELISA-Platten.

Zum Nachweis gebundener Antikörper wurde ein 1:5000 in Waschpuffer verdünntes polyklonales Anti-Maus-Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat (Pharmacia-Amersham,

Braunschweig) verwendet. Je 100µl der Konjugatgebrauchslösung wurden in die Vertiefungen der ELISA-Platten pipettiert. Es schloß sich eine erneute Inkubation der Platten bei 37°C an. Nach einer Stunde erfolgte ein letzter Waschschrift.

In jede Vertiefung wurden abschließend 100µl einer frisch angesetzten 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic Acid) (ABTS)-Substratlösung (5mg ABTS [Serva, Heidelberg] in 10ml Substratpuffer [20mM Na-Citrat/PBS pH 4,2] + 5µl 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung [Merck, Darmstadt]) pipettiert. Dem folgte eine 15 minütige Inkubation auf dem Schüttelinkubator bei 37°C.

Dann wurde die optische Dichte der Substratlösung bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Titertek-Multiscan Photometer (Flow Laboratories, Meckenheim) bestimmt.

Folgende Ansätze wurden als Kontrollen mitgeführt:

Positivkontrolle (interne Systemkontrolle): Beschichtung der Vertiefungen mit 0,5µg Alphatoxin; anstelle der Testseren wurden in 1 x PBS (pH 7,4) verdünnte Hybridoma-Zellkulturüberstände der Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörpern 3B4 (1:5 Verdünnung des Klonüberstandes) bzw. 1E8 (1:2 Verdünnung des Klonüberstandes) als primäre Antikörper eingesetzt (Durchführung jeweils im Dreifachansatz),

Negativkontrolle: Die Vertiefungen wurden ebenfalls mit 0,5µg Alphatoxin beschichtet; 100µl des 1:1000 in 1 x PBS (pH 7,4) verdünnten Serums der PBS-Kontrolltiere dienten als primäre Antikörper anstelle der Testseren (Dreifachansatz),

Blanks: Das Coating erfolgte ohne Antigen; anstelle der Testseren wurden in 1 x PBS (pH 7,4) verdünnte Hybridoma-Zellkulturüberstände der Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörpern 3B4 (1:5 Verdünnung des Klonüberstandes) bzw. 1E8 (1:2 Verdünnung des Klonüberstandes) als primäre Antikörper verwendet (Durchführung jeweils im Dreifachansatz).

3.11.3 *In vitro* Neutralisation der Hyperimmunseren im Hämolyse-Test

3.11.3.1 Gewinnung von Mauserythrozyten

Zur Gewinnung von Mäuseerythrozyten dienten adulte NMRI Mäuse. Die Blutentnahme erfolgte durch Dekapitation in Narkose.

Das gewonnene Blut wurde mit einer Natrium-Citrat-Lösung im Verhältnis 1:3 (v/v, Blut: Natrium-Citrat-Lösung) versetzt und anschließend bei 500 x g 15 min. zentrifugiert (Tischzentrifuge 5145 C, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde dekantiert und durch isotonen Waschpuffer (IWP, Zusammensetzung siehe Anhang) ersetzt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das IWP nach der Zentrifugation klar war.

3.11.3.2 Durchführung des Hämolyse Assays

In den Hämolyse-Assays fanden 100µl unverdünntes Immuserum (Serum 1-8 der Tabelle 12) bzw. 50µl, 25µl und 10µl mit IWP/25mM CaCl₂ ad 100µl aufgefülltes Hyperimmunserum (Serum 3-8 der Tabelle 12) Verwendung. Die Seren wurden 30 Minuten mit 0,5µg Alphatoxin (Sigma, Deisenhofen) in 200µl IWP/25mM CaCl₂ bei 37°C im Rotator (Hybaid, Heidelberg) präinkubiert. Es folgte die Zugabe von 100µl (etwa 4,0 x 10⁸ Zellen) einer Suspension gewaschener Mäuseerythrozyten. Der Ansatz wurde für weitere 30 Minuten bei 37°C im Rotator inkubiert. Zur Abtrennung der unlysierten Erythrozyten wurde eine 15 minütige Zentrifugation bei 500 x g in einer Tischzentrifuge (5145 C, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt und 200µl des Überstandes abgenommen. Die Menge des freigesetzten Hämoglobins wurde im Überstand bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch bestimmt (Beckmann DU-600 Photometer, U.S.A). Die Durchführung der Versuche erfolgte im Doppelansatz.

Zur Aktivitätskontrolle des Alphatoxins wurden Ansätze mitgeführt, bei denen statt des Hyperimmunserums Nullserum bzw. IWP/25mM CaCl₂ eingesetzt wurde. Eine Aufstellung der getesteten Hyperimmun- und Kontrollseren ist in Tabelle 12 zu finden.

Tabelle 12: Charakterisierung der im Hämolyse-Assay verwendeten Seren

Nr.	Bezeichnung der Hyperimmunseren / Kontrollseren
1	Anti-[rAT-121A/91]-Hyperimmunserum ¹⁾
2	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunserum ¹⁾
3	Anti-[MF59]-Kontrollserum ¹⁾
4	Anti-[rAT-121A/91 in MF59]-Hyperimmunserum ¹⁾
5	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum ¹⁾
6	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum ²⁾
7	Anti-[Alu-Gel]-Kontrollserum ²⁾
8	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂ in Alu-Gel]-Hyperimmunserum ²⁾

¹⁾ gewonnen durch zweimalige intraperitoneale Injektion

²⁾ gewonnen durch zweimalige subkutane Injektion

3.11.4 *In vitro* Neutralisation der Hyperimmunseren im Lezito-Vittelin Test

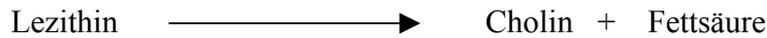
3.11.4.1. Herstellung von Eigelbsuspension

Zwei Eigelb wurden mit 200µl physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Danach folgte eine 20 minütige Zentrifugation der Suspension bei 27000 x g (SORVALL RC5B Kühlzentrifuge, U.S.A) und die Abnahme des Überstandes zur weiteren Verwendung.

3.11.4.2. Durchführung des Lezito-Vittelin Tests

0,5µg Wildtyptoxin (Sigma, Deisenhofen) wurde in 100µl IWP/25µM CaCl₂ vorgelegt und 30 min. bei 37°C mit Seren aus den Immunisierungsversuchen präinkubiert. Dann wurden 200µl der Eigelbsuspension hinzupipettiert und der Ansatz gevortext (Minishaker MS-1, IKA, Staufen). Vor der Auswertung erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C.

Das Alphatoxin, eine Phospholipase C, spaltet das in der Suspension befindliche Lezithin in Cholin und eine Fettsäure, hierdurch verliert das Lezithin seine emulgatorische Wirkung und der Ansatz wird trüb.



Die Neutralisation der enzymatischen Aktivität war erfolgt, wenn die Lösung nach der letzten Inkubation klar blieb. Zur Aktivitätskontrolle des Alphatoxins wurde in einem Ansatz statt eines Serums NaCl (Positivkontrolle) verwendet. Eine Beschreibung der verwendeten Seren ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Charakterisierung der im Lezito-Vittelin-Test verwendeten Seren

Nr.	Bezeichnung der Hyperimmunseren / Kontrollseren
1	Anti-[rAT-121A/91]-Hyperimmunserum ¹⁾
2	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunserum ¹⁾
3	MF 59 Adjuvans Kontrollserum ¹⁾
4	Anti-[rAT-121A/91 in MF59]-Hyperimmunserum ¹⁾
5	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum ¹⁾
6	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum ²⁾
7	Alu-Gel Adjuvans Kontrollserum ²⁾
8	Anti-[rAT-121A/91-His ₂₁₂ in Alu-Gel]-Hyperimmunserum ²⁾

¹⁾ gewonnen durch zweimalige intraperitoneale Injektion

²⁾ gewonnen durch zweimalige subkutane Injektion

3.11.5 *In vivo* Neutralisationsversuch im Mäuse-Letalitätstest

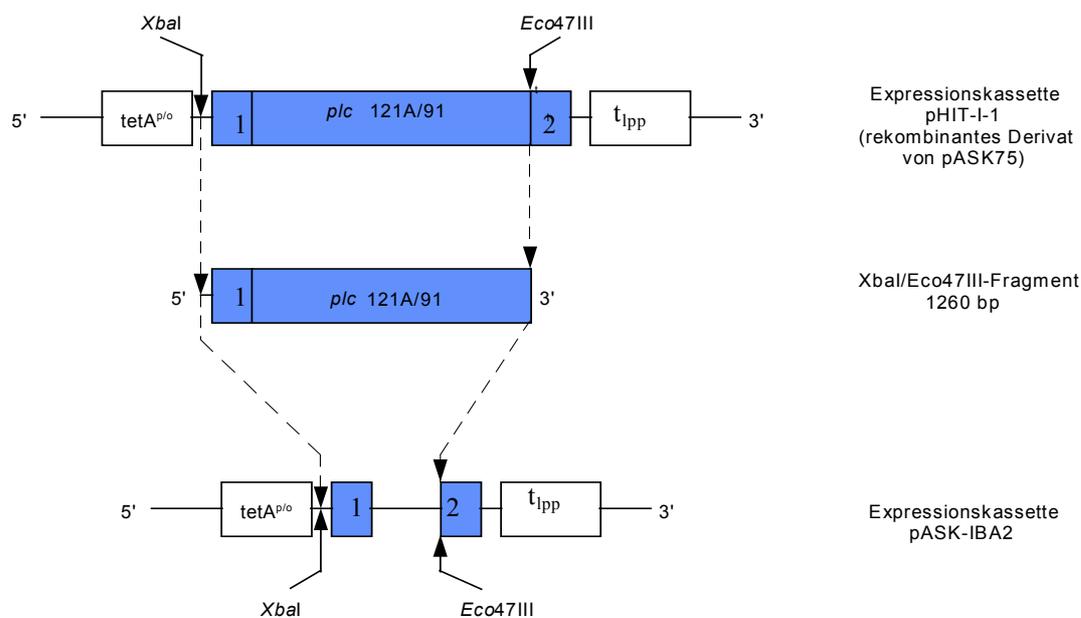
Die Überprüfung der Antiseren hinsichtlich ihrer Fähigkeit die letale Wirkung des Alphatoxins zu neutralisieren, erfolgte im Mausmodell. Hierfür wurden 200µl Anti-[rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum, Anti-[rAT121A/91]-Serum bzw. Nullserum mit Alphatoxin [2,2µg in 40µl IWP/25µM CaCl₂] bei 37°C im Rotator (Hybaid, Heidelberg) präinkubiert. Jedem Ansatz wurde 100µl 1xPBS (pH 7,4) hinzugefügt bevor dieser intraperitoneal 10-12 Wochen alten NMRI-Mäusen injiziert wurde. Es schloß sich ein Beobachtungszeitraum von 72 Stunden an. Die Durchführung erfolgte im Doppelsatz.

4 Ergebnisse

4.1 Reklonierung des *plc*121A/91-Strukturgens aus pHIT-I-1 in pASK-IBA2

Um die Ausbeute an rekombinantem Alphatoxin 121A/91 zu optimieren, wurde das *plc*-Strukturgen des *C. perfringens*-Stammes 121A/91 aus dem bislang verwendeten Expressionsvektor pASK-75 in den Folgevektor pASK-IBA2 umkloniert. Abbildung 5 zeigt schematisch die Vorgehensweise der Reklonierung.

Abb. 5: Schematische Darstellung der Reklonierung des *plc*-Strukturgens der Alphatoxinvariante 121A/91 aus pHIT-I-1 in pASK-IBA2



Legende zu Abbildung 5:

- tetA^{p/o} : tetA-Promotor/Operator
- t_{lpp} : Transkriptionsterminator
- 1 : omp A / Sekretionsapparat
- 2 : Strep Tag II kodierendes Gen

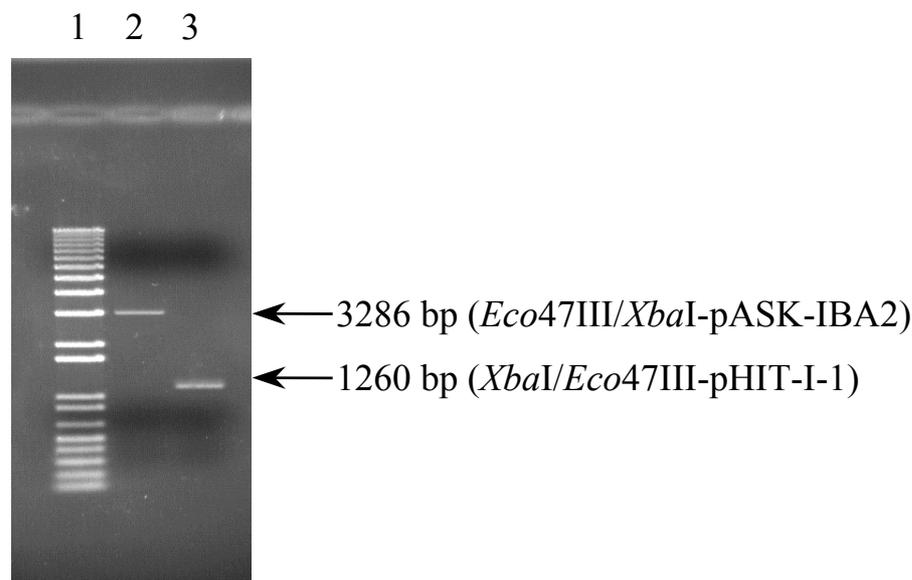
Das im pHIT-I-1, einem rekombinanten Derivat des pASK-75, enthaltene *plc*-Gen des *C. perfringens*-Stammes 121A/91 wurde für die Klonierung unter Ausnutzung der singulären Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *Eco47III* als Fragment mit einer Größe von 1260 bp

reisoliert. Das Restriktionsfragment enthielt darüberhinaus ein an den 5'-Terminus fusioniertes ompA-Genfragment, das die für die periplasmatische Expression des rekombinanten Proteins benötigte Signalsequenz kodiert.

Das *XbaI/Eco47III*-Fragment wurde erfolgreich mit dem entsprechend geschnittenen *Eco47III/XbaI*-Fragment des Expressionsvektors pASK-IBA2 ligiert.

Abbildung 6 zeigt die in die Reaktion eingesetzten aufgereinigten Restriktionsfragmente.

Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der in die Ligationsreaktion eingesetzten DNA-Fragmente (0,8%iges Agarosegel)



Legende zu Abbildung 6:

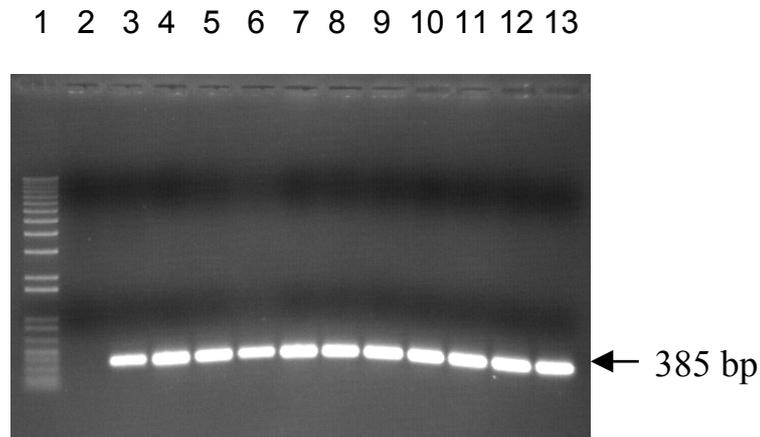
Spur 1: 1 kb DNA-Leiter (Molekulargewichtsstandard)

Spur 2: *Eco47III/XbaI*-Fragment aus pASK-IBA2

Spur 3: *XbaI/Eco47III*-Fragment aus pHIT-I-1

Das durch die Ligation gewonnene neue Vektorkonstrukt wurde in *E. coli* transformiert. Bei der Überprüfung der Reklonierung mittels PCR gelang der *plc*-Nachweis in allen getesteten Klonen. Abbildung 7 zeigt die in der Polymerase-Kettenreaktion entstandenen Amplifikate.

Abb. 7: Auftrennung der Amplifikate nach Screening der Transformanten mittels Alphatoxigen-spezifischer PCR

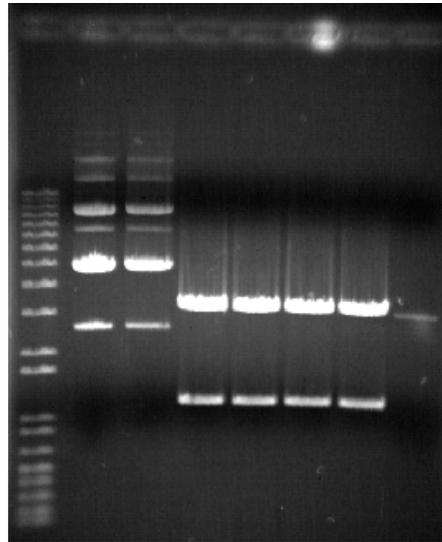


Legende zu Abbildung 7:

- Spur 1: 1 kb DNA-Leiter (Molekulargewichtsstandard)
- Spur 2: Negativkontrolle (*E. coli* transformiert ohne Insert)
- Spuren 3-13: Amplifikate (385bp) rekombinanter *E. coli*-Klone (pASK-IBA2 mit Insert)

Die Absicherung des PCR-Ergebnis erfolgte durch die *XbaI/Eco47III* Restriktionsanalyse präparierter Plasmid-DNA. In Abbildung 8 ist das erwartete Fragmentmuster nach dem Doppelverdau dargestellt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Klon mit der Bezeichnung Top10/pHIT-I-38 in die Stammsammlung übernommen.

Abb. 8: *XbaI/Eco47III*-Restriktionsmuster der Plasmid-DNA PCR-positiver *E. coli*-Klone



Legende zu Abbildung 8:

- Spur 1: 1 kb DNA-Leiter (Molekulargewichtsstandard)
- Spur 2: *plc121A/91*-pASK-IBA2 ungeschnitten (Klon 8)
- Spur 3: *plc121A/91*-pASK-IBA2 ungeschnitten (Klon 19)
- Spur 4 und 5: *plc121A/91*-pASK-IBA2 *XbaI/Eco47III*-geschnitten (Klon 8)
- Spur 6 und 7: *plc121A/91*-pASK-IBA2 *XbaI/Eco47III*-geschnitten (Klon 19)

4.2 Mutation des Arginin₂₁₂ im rAT121A/91 zu einem Histidin

Die rekombinante Alphatoxinvariante 121A/91 weist im Vergleich zum Alphatoxin des *C. perfringens* Stammes ATCC 13124 an Position 212 der Aminosäuresequenz ein Arginin anstelle eines Histidins auf. Für die Rückmutation zum Histidin wurde die Base Guanin₆₃₅ im pHIT-I-1 durch ein Adenin ersetzt. Das neu entstandene Plasmid wurde als pHIT-I-39 und das korrespondierende Genprodukt als rAT121A/91-His₂₁₂ bezeichnet.

Der Nukleotidaustausch erfolgte über modifizierte Primer in der PCR, wobei als Template präparierte pHIT-I-1 Plasmid-DNA Verwendung fand. Nach dem *DpnI*-Verdau der parentalen DNA wurde der Ansatz mittels Elektrophorese aufgetrennt und die mutierte DNA aus dem Agarosegel eluiert. Vor der Ligation erfolgte die Glättung der Enden mit Polymerase.

Das entstandene Plasmid (pHIT-I-39) wurde in *E. coli* transformiert. Die Überprüfung der Klonierung erfolgte mittels einer Alphatoxigen-spezifischen PCR. Bei dem in die Reaktion eingesetzten Klon (JM83/pHIT-I-39) wurde das modifizierte *plc*-Gen nachgewiesen.

4.3 Sequenzierung der *plc*-Strukturgene der Expressionsplasmide pHIT-I-38 und pHIT-I-39

Um die erfolgreiche Mutation des Nukleotids 635 und die Umklonierung des *plc*_{121/91}-Strukturgens in den Vektor pASK-IBA2 auf Nukleotidebene zu kontrollieren, wurde Plasmid-DNA des pHIT-I-38 und des pHIT-I-39 sequenziert. Die analysierten Abschnitte umfaßten sowohl die Protein kodierenden Bereiche als auch die Vektor-Insert Übergänge.

Die Untersuchung erfolgte mit Primerpaaren, die die Sequenzierung von überlappenden DNA-Bereichen ermöglichten. Die ermittelten Daten für die Vektor-Bereiche wurden mit den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Sequenzen verglichen und bewiesen die fehlerfreie Insertion im Rahmen der Umklonierung.

Die Basenabfolge der für die Alphatoxinvarianten kodierenden Bereiche wurden mit der *plc*-Sequenz des *C. perfringens* Referenzstammes ATCC 13124 (Titball et al., 1989) abgeglichen. Diese Ergebnisse sind Abb. 10 zu entnehmen. Positionen, bei denen die Basen der beiden Varianten und des Wildtyptoxins übereinstimmen, sind mit einem „ = “ gekennzeichnet; Abweichungen mit einem „ * “.

ATCC 13124	967	AAT	ATG	TGG	ATT	AGA	AAA	AGA	AAA	TAT	ACA	GCA	TTC	TCA	GAT
PHIT-I-39		AAT	ATG	TGG	ATT	AGA	AAA	AGA	AAA	TAT	ACA	GCA	TTC	CCA	GAT
PHIT-I-38		AAT	ATG	TGG	ATT	AGA	AAA	AGA	AAA	TAT	ACA	GCA	TTC	CCA	GAT
		===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	===	*==
ATCC 13124	1009	GCT	TAT	AAG	CCA	GAA	AAC	ATA	AAG	ATA	ATA	GCA	AAT	GGA	AAA
PHIT-I-39		GCT	TAT	AAG	CCA	GAA	AAT	ATA	AAG	GTA	ATA	GCA	AAT	GGA	AAA
PHIT-I-38		GCT	TAT	AAG	CCA	GAA	AAT	ATA	AAG	GTA	ATA	GCA	AAT	GGA	AAA
		===	===	===	===	===	==*	===	===	*==	===	===	===	===	===
ATCC 13124	1051	GTT	GTA	GTG	GAC	AAA	GAT	ATA	AAC	GAG	TGG	ATT	TCA	GGA	AAT
PHIT-I-39		GTT	GTA	GTA	GAC	AAA	GAT	ATA	AAT	GAG	GGG	ATT	TCA	GGA	AAT
PHIT-I-38		GTT	GTA	GTA	GAC	AAA	GAT	ATA	AAT	GAG	GGG	ATT	TCA	GGA	AAT
		===	===	==*	===	===	===	===	==*	===	*==	===	===	===	===
ATCC 13124	1093	TCA	ACT	TAT	AAT	ATA	AAA	TAA							
PHIT-I-39		TCA	ACT	TAT	AAT	ATA	AAA	TAA							
PHIT-I-38		TCA	ACT	TAT	AAT	ATA	AAA	TAA							
		===	===	===	===	===	===	===							

Die Sequenz des *plc*-Strukturgens des pHIT-I-38 wies zwölf Basenaustausche im Vergleich zur Referenzsequenz auf, die zum Austausch von acht Aminosäuren führte. Dieses Ergebnis entsprach der Sequenz des pHIT-I-1 und zeigte, daß im Rahmen der Umklonierung keine Nukleotidaustausche eingeführt wurden.

Die Analyse des pHIT-I-39 führte zur Identifikation von elf Nukleotid- und sieben Aminosäuresubstitutionen. Die Mutation des Guanin an Position 635 zu einem Adenin, analog zur Wildtypoxin-Sequenz, führte zur Reversion des Arginin₂₁₂ zum Histidin. Damit wurde der Erfolg der site-directed Mutagenese dargestellt.

Eine Zusammenfassung der kartierten Nukleotidmutationen und den daraus resultierenden Veränderungen auf Aminosäureebene findet sich in Abbildung 9.

Abb. 9: Darstellung der Nukleotid- und Aminosäureaustausche der *plc*-Strukturgene des pHIT-I-38 und pHIT-I-39 im Vergleich zum *C. perfringens* ATCC 13124

Base/ <i>plc</i> -Gen	37	521	529	635	801	884	1003	1026	1033	1059	1074	1078
<i>ATTC13124</i>	A	C	A	A	G	C	T	C	A	G	C	T
pHIT-I-38	G	A	G	G	A	A	C	T	G	A	T	G
pHIT-I-39	G	A	G	A	A	A	C	T	G	A	T	G
Aminosäure/ <i>plc</i> -Gen	37	521	529	635	801	884	1003	1026	1033	1059	1074	1078
<i>ATTC13124</i>	Met	Ala	Thr	His	Glu	Pro	Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Trp
pHIT-I-38	Val	Asp	Ala	Arg	Glu	Gln	Pro	Val	Asn	Val	Asn	Gly
pHIT-I-39	Val	Asp	Ala	His	Glu	Gln	Pro	Val	Asn	Val	Asn	Gly

4.4 Expression von rAT121A/91 und rAT121A/91-His₂₁₂ unter Verwendung der Vektoren pASK-IBA2 bzw. pASK-75

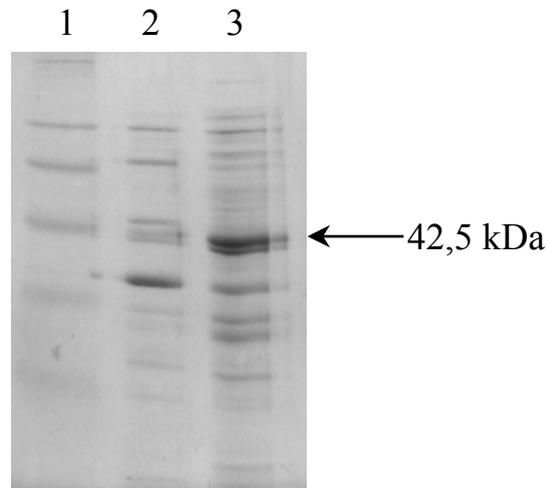
Die Gewinnung der rekombinanten Alpha-toxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂ erfolgte in den *E. coli* Expressionssystemen pASK-IBA2 und pASK-75.

4.4.1 Steigerung der rAT121A/91 Expression bei Verwendung des pASK-IBA2

Für den Nachweis der gesteigerten Produktion des rAT121A/91 im Vektorsystem pASK-IBA2 (TOP10/pHIT-I-38) wurde eine Induktion und Expression mit beiden Vektoren unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Die SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der gewonnenen periplasmatischen Extrakte (Abb. 10) demonstrierte, daß die Expression des rAT121A/91 durch die Verwendung des Vektors pASK-IBA2 deutlich verbessert werden konnte. Die Proteinausbeute pro Liter Expressionskultur konnte von ca. 250µg auf maximal 2mg erhöht werden. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor acht.

Abb. 10: SDS-gelelektrophoretische Auftrennung periplasmatischer Extrakte nach Induktion des rAT121A/91 in den Vektoren pASK-75 und pASK-IBA2 (12,5%-iges SDS-Gel, Coomassie-Färbung)



Legende zu Abbildung 10:

Spur 1: SeeBlue Molekulargewichtsmarker

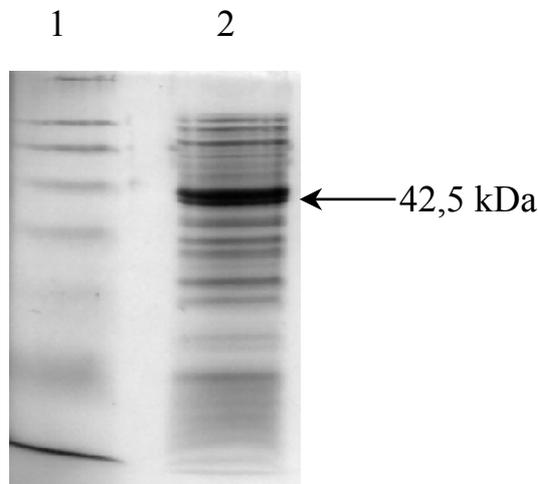
Spur 2: 10µl Periplasmaextrakt JM83/pHIT-I-1 (Vektor pASK-75)

Spur 3: 10µl Periplasmaextrakt TOP10/pHIT-I-38 (Vektor pASK-IBA2)

4.4.2 Expression des rAT121A/91-His₂₁₂ im pASK-75

Die Ausbeute des rAT121A/91-His₂₁₂ belief sich nach affinitätschromatographischer Aufreinigung auf durchschnittlich 750µg pro Liter Expressionskultur. Die Darstellung eines periplasmatischen Extraktes des pHIT-I-39 nach Induktion findet sich in Abbildung 11.

Abb. 11: SDS-gelelektrophoretische Auftrennung periplasmatischer Extrakte nach Induktion des rAT121A/91-His₂₁₂ im pASK-75 (12,5%-iges SDS-Gel, Coomassie-Färbung)



Legende zu Abbildung 11:

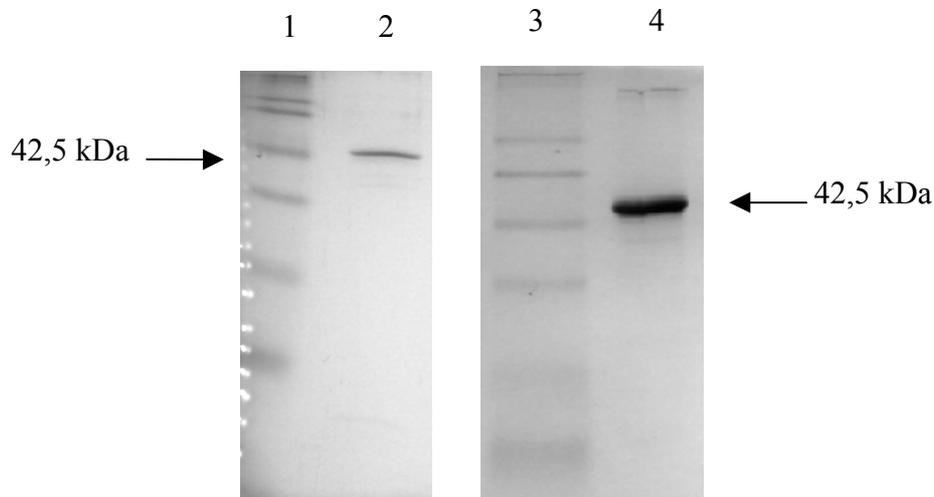
Spur 1: SeeBlue Molekulargewichtsmarker

Spur 2: 20µl Periplasmaextrakt JM83/pHIT-I-39

4.4.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂

Die rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂ lagen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung frei von *E. coli* Proteinen vor. Abbildung 12 zeigt eine SDS-gelelektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten Alphatoxinvarianten.

Abb. 12: Kontrolle des Reinigungsgrades nach affinitätschromatographischer Aufreinigung des rAT121A/91 und rAT121A/91-His₂₁ (SDS-Gelelektrophorese, 12,5%-ig, Coomassie-Färbung)



Legende zu Abbildung 12:

- Spur 1: SeeBlue Molekulargewichtsmarker
- Spur 2: 1 µg rAT121A/91 in Elutionspuffer
- Spur 3: SeeBlue Molekulargewichtsmarker
- Spur 4: 5 µg rAT121A/91-His₂₁₂ in Elutionspuffer

4.5 Ausbeute der monoklonalen Alphatoxin-spezifischen Antikörper 1E8 und 3B4 nach affinitätschromatographischer Aufreinigung

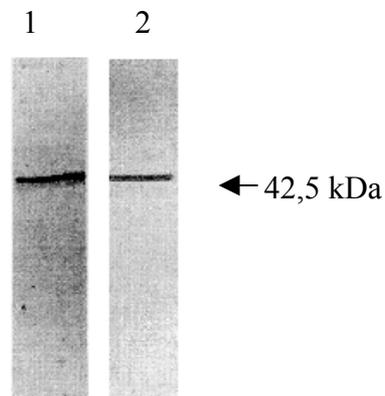
Die Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) 1E8 und 3B4 der Subklasse IgG1 wurden mittels Protein-G Sepharose Säule gereinigt.

Hierbei gelang es, aus 600ml Hybridomaüberstand 1300 µg des 1E8 zu gewinnen. Aus 1450ml des mAk 3B4 Überstandes erfolgte die Aufreinigung von 6400 µg Protein. Dies entsprach einer Proteinausbeute von 2164 µg/Liter Hybridomaüberstand für den 1E8 und 4412 µg/Liter für den 3B4.

4.6 Nachweis der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ im Immunoblot mittels Alphatoxin-spezifischem Antikörper 3B4

Im Immunoblot wurde getestet, ob die rekombinante Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ im denaturierten Zustand vom monoklonalen Antikörper 3B4 detektiert wird. In Abbildung 13 ist in Spur 1 die 42,5 kDa große Bande des Wildtyptoxins zu erkennen. Korrespondierend dazu, findet sich in Spur 2 auf der selben Höhe die Variante 121A/91A-His₂₁₂.

Abb. 13: Immunologischer Nachweis der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ mit dem Alphatoxin-spezifischen mAk 3B4



Legende zu Abbildung 13:

Spur 1: Wildtyp toxin (positiv Kontrolle) in 1x PBS, pH 7,4

Spur 2: rAT121/91-His₂₁₂ in 1x PBS, pH 7,4

4.7 Analyse der Bindungseigenschaften der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ gegenüber dem Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper 3B4

Um zu überprüfen, ob die Rückmutation des Histidin₂₁₂ die Bindungseigenschaften des monoklonalen Antikörpers 3B4 gegenüber der nativen Alphatoxinvariante rAT121A/91-His₂₁₂ beeinflusste, wurden beide rekombinanten Alphatoxinvarianten in definierten Konzentrationen im ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, daß das rAT121A/91-His₂₁₂ ($\bar{x}_{OD405} = 1175 \pm 19$) vom mAk 3B4 stärker erkannt wird, als das rAT121A/91 ($\bar{x}_{OD405} = 1049 \pm 25$). Dies deutete daraufhin, daß sich das Histidin₂₁₂ in einem für die Bindung des Alphatoxin-spezifischen Antikörper 3B4 essentiellen Aminosäurebereich befand.

4.8 Nachweis der enzymatischen Aktivität und der hämolytischen Wirkung der Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ im Eigelb-Agar-Diffusions-trübungstest und Hämolyse Assay

Die Charakterisierung der Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und hämolytischen Wirkung erfolgte im Eigelb-Agar-Diffusionstrübungstest (EADT) und im Hämolyse Assay. Die Ergebnisse zeigten, daß das rAT121A/91-His₂₁₂ keine *in vitro* nachweisbare biologische Aktivität aufwies.

Die ermittelten Daten sind in Tabelle 14 dargestellt. Der mit dem Wildtyptoxin zu erzielende Trübungshofdurchmesser bzw. die optische Dichte des im Überstand freigesetzten Hämoglobins diente als Vergleichswert (100% Alphatoxin-spezifische enzymatische Aktivität bzw. Hämolyse). Die übrigen Ergebnisse wurden zu diesem Wert in Relation gesetzt (in %).

Tabelle 14: Bestimmung der enzymatischen Aktivität und der hämolytischen Wirkung des rAT121A/91-His₂₁₂

Probe	Trübungshofdurchmesser im EADT-Test ¹⁾	Hb-Freisetzung (540nm) im Hämolysetest
rAT121A/91-His ₂₁₂	0,3%	0,5%
rAT121A/91	0,2%	0,3%
IWP	0,3%	1,0%
Wildtyptoxin	100%	100%

¹⁾ Eigelb-Agar Diffusionstrübungs Test

4.9 Überprüfung der Toxizität der rekombinanten Variante rAT121A/91-His₂₁₂ im Maus-Letalitätstest

Um zu testen, ob die Rückmutation des Histidin₂₁₂ einen Einfluß auf die Toxizität der Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ hatte, wurde sechs Wochen alten NMRI Mäusen 10, 20, 40 bzw. 80µg des rekombinanten Proteins intraperitoneal appliziert. Vergleichsgruppen wurde analog rAT121A/91 bzw. PBS i.p. injiziert. Die Tiere zeigten während der 72 stündigen Beobachtungsphase keinerlei klinische Anzeichen einer Alphatoxin-Intoxikation. Somit konnte geschlußfolgert werden, daß das rAT121A/91-His₂₁₂ keine Toxizität für die Maus aufwies.

4.10 Immunisierungsversuche mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂

4.10.1 Verträglichkeit der rekombinanten Alphatoxinvarianten bei der Immunisierung von Mäusen in Abhängigkeit vom Applikationsweg

Zur Bestimmung der Verträglichkeit der rekombinanten Antigene bei s.c. und i.p. Applikation sowie in Kombination mit den Adjuvantien MF59 und Alu-Gel, wurden die Mäuse nach der Immunisierung regelmäßig auf lokale (u.a. Quaddelbildung an der Injektionsstelle, Abszeßbildung) und systemische Reaktionen (u.a. reduzierte Aktivität, verminderte Futteraufnahme, Todesfälle) kontrolliert.

4.10.1.1 Intraperitoneale Immunisierung mit rAT121A/91 und rAT121A/91-His₂₁₂

Bei der intraperitonealen Applikation der rekombinanten Impfproteine ohne Adjuvans zeigten die Tiere eine geringgradige Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens über einen Zeitraum von 6-12 Stunden. Enthielt die Impfstoffpräparation zusätzlich MF59, wiesen die Mäuse über eine Dauer von 24 Stunden ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden auf. Die alleinige intraperitoneale Injektion von MF59 führte zu keinen feststellbaren Beeinträchtigungen der Tiere.

4.10.1.2 Subcutane Immunisierung mit dem rAT121A/91-His₂₁₂

Die Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ war bei subcutaner Injektion, alleine und in Kombination mit MF59, gut verträglich.

Bei der subcutanen Applikation von rAT121A/91-His₂₁₂ in Kombination mit Alu-Gel bildeten sich nach 7-10 Tagen an der Injektionsstelle tastbare, derbe Knoten, die einen Umfang von bis 2x2cm annahmen. Die Impflinge, denen MF59 bzw. Alu-Gel s.c. ohne das Impfpotein verabreicht wurde, zeigten keine lokalen oder systemischen Beeinträchtigungen.

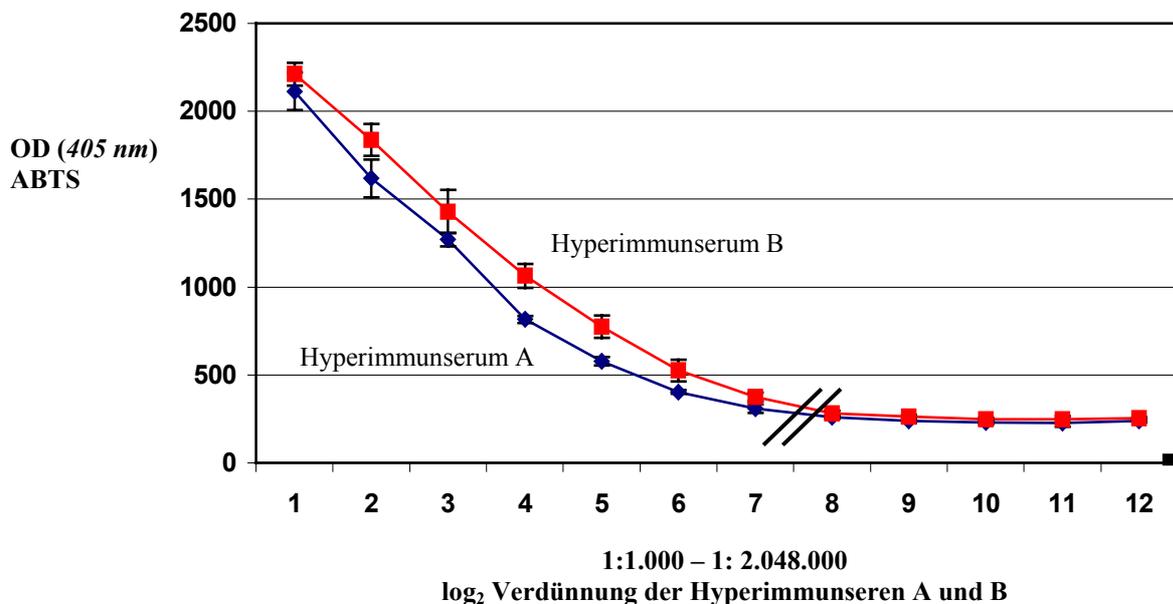
4.10.2 Nachweis von spezifischen Anti-Alphatoxin Antikörpern in Hyperimmunseren von Mäusen (ELISA)

Zur Überprüfung der Immunogenität der rekombinanten Alphatoxinvarianten in Abhängigkeit vom verwendeten Adjuvans und dem Applikationsweg, wurden die Hyperimmunseren von Mäusen im ELISA vergleichend auf ihre Anti-Alphatoxin Titer untersucht. Die Titerhöhe berechnet sich aus der letzten log₂-Verdünnungsstufe, deren OD₄₀₅ über der zweifachen Extinktion des 1:1000 verdünnten Nullserums lag.

4.10.2.1 Bestimmung der Anti-Alphaotoxin Titer nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung von Mäusen mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ ohne Adjuvans

Bei der zweimaligen intraperitonealen Immunisierung von Mäusen mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ konnten spezifische Anti-Alphaotoxin Titer bis 1: 64.000 erzielt werden. Die graphische Darstellung der Titerverläufe ist Abbildung 14 zu entnehmen. Auf der Abszisse sind die bei 405nm gemessenen Extinktionen aufgetragen; auf der Ordinate die in log₂-Schritten vorgenommenen Verdünnungsstufen (1-12).

Abb. 14: Nachweis Alphaotoxin-spezifischer Antikörpertiter in Hyperimmunseren von Mäusen nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung mit rAT121/91-His₂₁₂ und rAT121/91



Legende zu Abbildung 14:

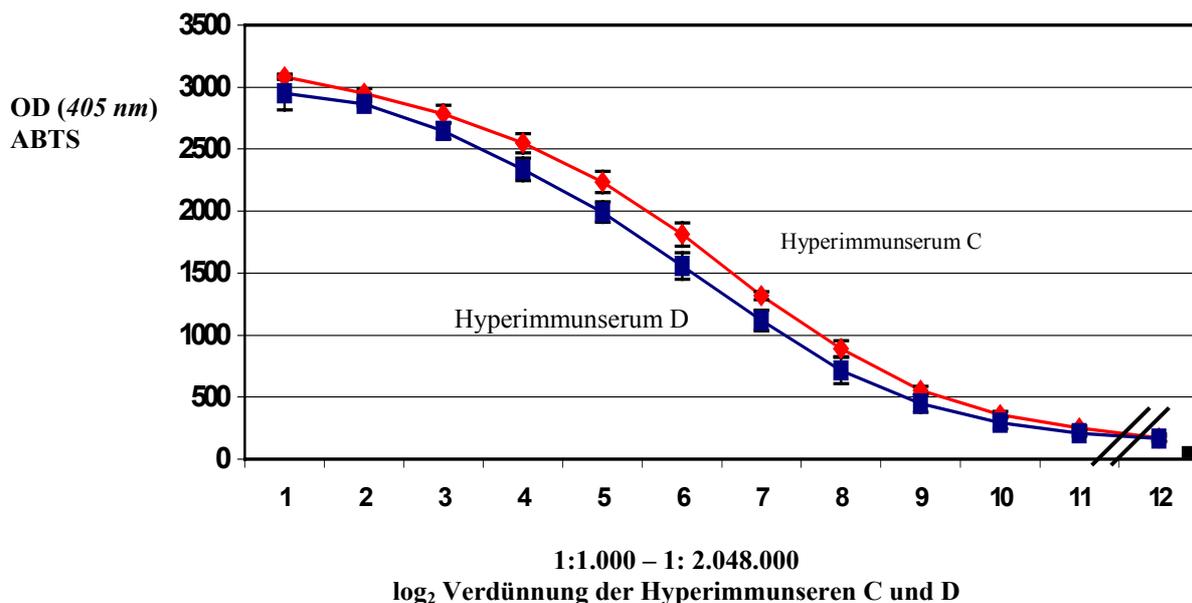
Hyperimmunserum A	Anti-[rAT121A/91]-Hyperimmunserum intraperitoneale Applikation
Hyperimmunserum B	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunserum intraperitoneale Applikation
ABTS (Farbstoff)	2,2'Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfinic Acid)
//	Kennzeichnung des Cut-Offs
■	gemessener Blank

4.10.2.2 Anti-Alpha toxin Titer nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung von Mäusen mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59

Im weiteren Versuchsablauf wurden Mäuse mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 bzw. 121A/91-His₂₁₂ und MF59 immunisiert. Dies sollte zeigen, ob die Immunogenität der Impfproteine durch die Zugabe von Adjuvans zu verbessern war.

Durch die zweimalige intraperitoneale Applikation gelang es, mit beiden Varianten Titerhöhen bis 1: 1.024.000 zu erzielen. Im Vergleich zu den Titern, die ohne Adjuvans induziert wurden (siehe Punkt 4.9.1; Abb. 14), entsprach dies einer Steigerung der Alphatoxin-spezifischen Antikörperkonzentrationen um den Faktor 16. Die Titerverläufe zeigt Abbildung 15.

Abb. 15: Nachweis Alphatoxin-spezifischer Antikörpertiter in Hyperimmunseren von Mäusen nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung mit rAT121A/91-His₂₁₂ und rAT121A/91 in MF59



Legende zu Abbildung 15	
Hyperimmunserum C	Anti-[rAT121A/91 in MF59]-Hyperimmunserum intraperitoneale Applikation
Hyperimmunserum D	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum intraperitoneale Applikation
ABTS (Farbstoff)	2,2'Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfinic Acid)
//	Kennzeichnung des Cut-Offs
■	gemessener Blank

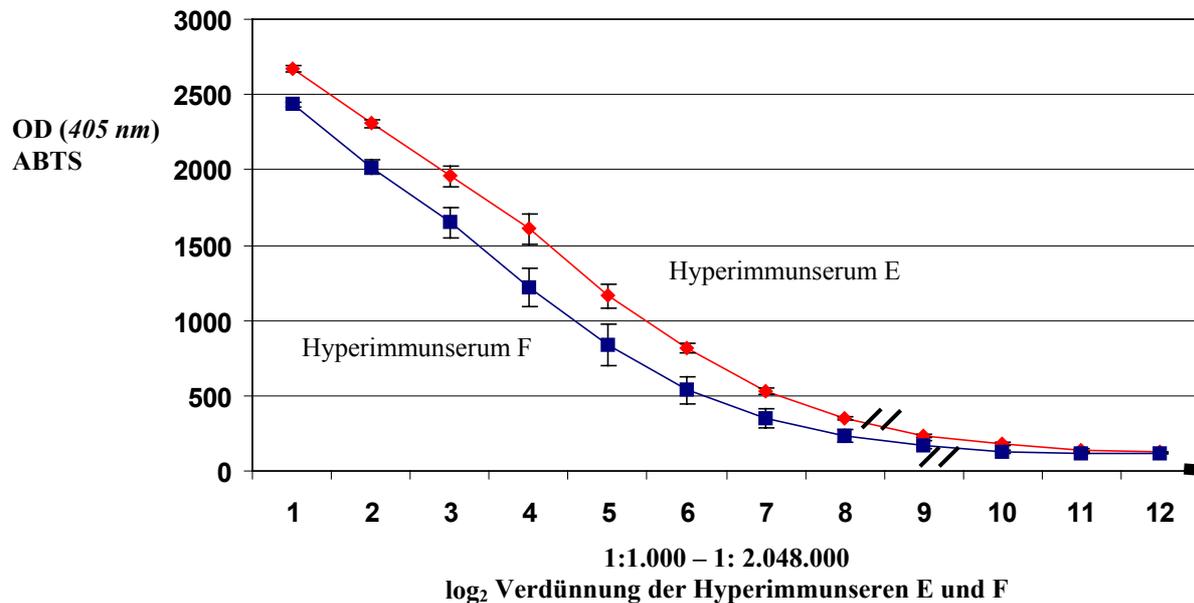
4.10.2.3 Bestimmung der Anti-Alpha-toxin Titer nach zweimaliger subcutaner Immunisierung von Mäusen mit rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59 und Alu-Gel

Um zu prüfen, ob durch die subcutane Applikation der Alpha-toxinvariante 121A/91-His₂₁₂ die Immunantwort der Impflinge weiter zu verbessern war, wurden entsprechende Versuche mit den Adjuvantien MF59 und Alu-Gel durchgeführt.

Die zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossenen ersten Belastungsversuche hatten gezeigt, daß die intraperitoneale Immunisierung mit dem rAT121A/91 in MF59 nicht zu einer Erhöhung der Überlebensrate im Vergleich zu den Kontrollgruppen führte (siehe 4.10.9.2). Aus diesem Grund wurde auf weitergehende Untersuchungen mit dieser Alpha-toxinvariante verzichtet.

Eine weitere Erhöhung der Alpha-toxin-spezifischen Antikörperkonzentrationen ließ sich durch die subcutane Applikation jedoch nicht erzielen. Die mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59 bzw. Alu-Gel erzielten Titer betragen 1:256.000 bzw. 1:128.000. Die Werte lagen somit um den Faktor vier bzw. acht unter dem Titer, der mittels intraperitonealer Applikation der rekombinanten Alpha-toxinvariante in MF59 zu erzielen war. Die Titerverläufe sind in Abbildung 16 dargestellt.

Abb. 16: Nachweis Alphatoxin-spezifischer Antikörpertiter in Hyperimmunseren von Mäusen nach zweimaliger subcutaner Immunisierung mit rAT121A/91-His₂₁₂ und MF59 oder Alu-Gel



Legende zu Abbildung 16:

Hyperimmunserum E	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂ - in MF59]-Hyperimmunserum subcutane Applikation
Hyperimmunserum F	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂ in Alu-Gel]-Hyperimmunserum subcutane Applikation
ABTS (Farbstoff)	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic Acid)
//	Kennzeichnung des Cut-Offs
■	gemessener Blank

4.10.3 Nachweis antihämolisierender Antikörper in Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂]-Hyperimmunseren im *in vitro* Neutralisationsversuch

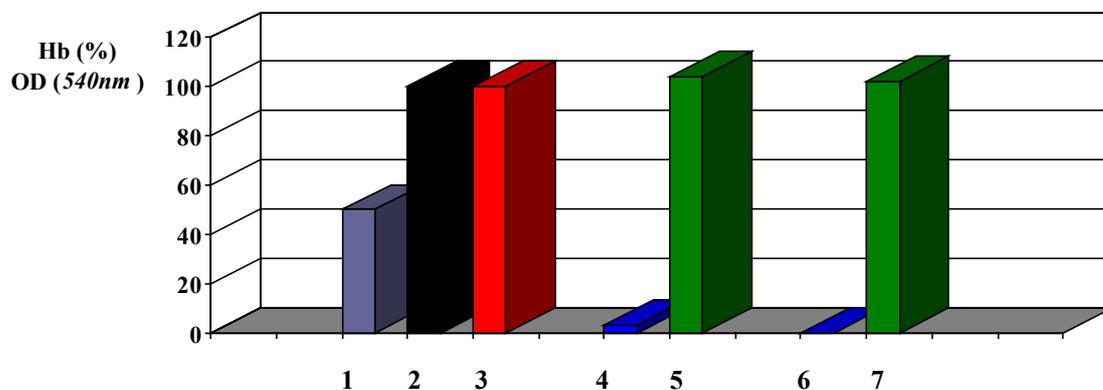
Vergleichende Untersuchungen mit den induzierten Hyperimmunseren sollten klären, ob und inwieweit die Applikationsroute, das Adjuvans und das Impfantigen die Konzentration der antihämolisierenden Antikörper in Seren von Mäusen beeinflusste. Hierzu wurden die Antiseren mit Alphatoxin (0,5µg in IWP/25µM CaCl₂) präinkubiert und die Alphatoxin-spezifische Hämolyse von Mauserythrozyten im *in vitro* Neutralisationsversuch bestimmt.

In den Hyperimmunseren, die durch Immunisierung mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten rAT121A/91 und rAT121A/91-His₂₁₂ ohne die Zugabe eines Adjuvans induziert worden waren, ließen sich keine antihämolisierenden Antikörper nachweisen.

Antiseren, gewonnen nach zweimaliger Immunisierung mit den Varianten in MF59, inhibierten hingegen die hämolysierende Wirkung des Toxins vollständig.

Die Ergebnisse des *in vitro* Neutralisationsversuches sind graphisch in Abbildung 17 dargestellt. Die optische Dichte des im Überstand freigesetzten Hämoglobins nach Präinkubation mit einem Nullserum diente als Vergleichswert (100% Alphatoxin-spezifische Hämolyse). Die Abszisse der Abbildung zeigt die Alphatoxin-spezifische Hämolyse nach Präinkubation mit verschiedenen Hyperimmunseren in Relation zum Vergleichswert (in %).

Abb. 17: Nachweis von antihämolysierenden Antikörper in Hyperimmunseren von der Maus nach zweimaliger Immunisierung mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂



Legende zu Abbildung 17:

Säule	Alphatoxin (0,5µg in IWP/25µM CaCl ₂) präinkubiert mit	Hämolyse (%)
1	IWP (Pufferkontrolle)	50
2	Nullserum (Positivkontrolle)	100
3	Anti-[MF59]-Kontrollserum ¹⁾	100
4	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum ¹⁾	3
5	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunserum ¹⁾	104
6	Anti-[rAT121A/91 in MF59]-Hyperimmunserum ¹⁾	0
7	Anti-[rAT121A/91]-Hyperimmunserum ¹⁾	102

¹⁾ intraperitoneale Immunisierung /Applikation

4.10.4 Semiquantifizierung antihämolsierender Antikörper in Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂]-Hyperimmunseren im *in vitro* Neutralisationsversuch

Für den Nachweis einer dosisabhängigen Reduktion der Alphatoxin-spezifischen Hämolyse durch die Hyperimmunseren, wurde das Alphatoxin mit unterschiedlichen Konzentrationen [100µl, 50µl, 25µl und 10µl] der Mäuseseren präinkubiert und im *in vitro* Neutralisationsversuch eingesetzt.

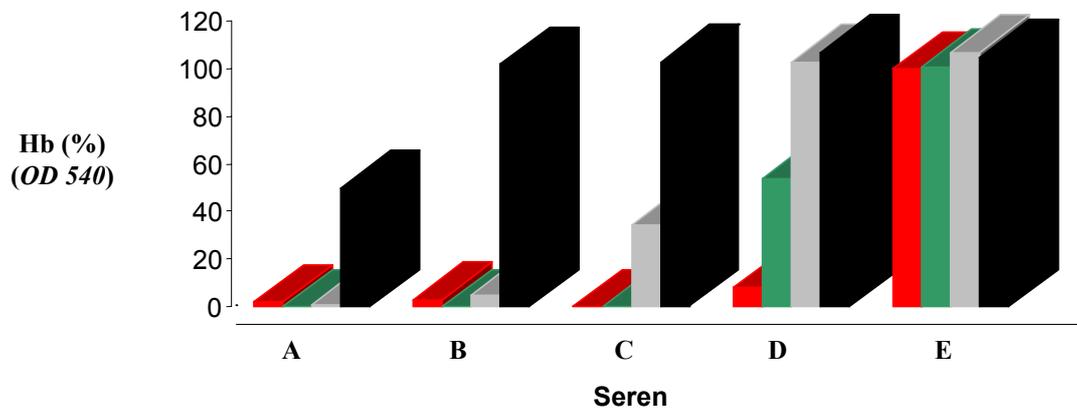
Serum, das nach zweimaliger subcutaner Injektion von rAT121A/91-His₂₁₂ in Alu-Gel gewonnen worden war, reduzierte bei einem eingesetzten Volumen von 50µl die Alphatoxin-induzierte Hämolyse lediglich um 50%. Geringere Testvolumina beeinflussten die Hämolyse nicht.

Antiseren, die durch Immunisierung mit der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ und dem Adjuvans MF59 induziert worden waren, inhibierten hingegen noch bei einem Volumen von 25µl die Alphatoxin-spezifische Hämolyse nahezu vollständig. Dies galt sowohl für die nach subcutaner, als auch für die durch intraperitoneale Injektion gewonnenen Hyperimmunseren.

Seren, die durch die zweimalige intraperitoneale Vakzinierung mit der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91 in MF59 gewonnen worden waren, verhielten sich bei einem eingesetzten Volumen von 100µl und 50µl wie die mittels rAT121A/91-His₂₁₂ induzierten Hyperimmunseren. Bei einem Testvolumen von 25µl reduzierten die rAT121A/91-Testseren die Hämolyse jedoch um etwa 30% weniger effektiv, als die Anti-[rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunseren.

Bei einem Testvolumen von 10µl reduzierte lediglich das nach subcutaner Applikation gewonnene Anti-[rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59]-Serum die Alphatoxin-spezifische Hämolyse (50% Resthämolyse). Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammengefaßt.

Abb. 18: Alphatoxin-induzierte Hämolyse nach Präinkubation mit Hyperimmunsere
aus Immunisierungsversuchen mit den Alphatoxinvarianten rAT-121/91 und
rAT-121/91-His₂₁₂



Legende zu Abbildung 18:

Alphatoxin-induzierte Hämolyse nach Präinkubation mit Serum					
A ^{1) 6)}	B ^{1) 5)}	C ^{2) 5)}	D ^{3) 6)}	E ⁴⁾	Serum(µl)
2%	3%	0%	8%	100%	100 ■
0%	0%	0%	54%	101%	50 ■
1%	5%	34%	103%	107%	25 ■
50%	102%	103%	107%	105%	10 ■

¹⁾ Anti-[rAT-121/91-His₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunsere

²⁾ Anti-[rAT-121/91 in MF59]-Hyperimmunsere

³⁾ Anti-[rAT-121/91-His₂₁₂ in Alu-Gel]-Hyperimmunsere

⁴⁾ Nullsere

⁵⁾ intraperitoneale Applikation

⁶⁾ subcutane Applikation

4.10.5 Nachweis PLC-inhibierender Antikörper in Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂]-Hyperimmunsere

Die Hyperimmunsere wurden weiterhin im Lezito-Vittelin-Test geprüft, um ihre Fähigkeit zur Neutralisation der PLC-Aktivität des Alphatoxins zu bestimmen.

Mit Sere, die durch Immunisierung mit dem rAT121A/91 in MF59 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59 induziert worden waren, gelang es, die enzymatische Aktivität zu neutralisieren. Diese galt sowohl für die nach subcutaner Immunisierung gewonnen Antisere, als auch die durch intraperitoneale Applikation induzierten Hyperimmunsere. Die durch zweimalige

Injektion von MF59 gewonnenen Kontrollseren beeinflussten die enzymatische Aktivität des Alphatoxins nicht.

Testseren, die durch die subcutane Immunisierung mit rAT121A/91-His₂₁₂ in Alu-Gel bzw. durch die zweimalige Vakzinierung mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten ohne Adjuvans induziert worden waren, eigneten sich nicht zur Neutralisation der PLC-Aktivität. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 15.

Tabelle 15: Neutralisation der Alphatoxin-spezifischen enzymatischen Aktivität durch Anti-[rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂]-Hyperimmunseren

Nr.	Präinkubation ¹⁾ von Alphatoxin (0,5µg in IWP/25µM CaCl ₂) mit	Trübungsgrad des Ansatzes nach Zugabe der Eigelbsuspension ²⁾
1	NaCl (Positivkontrolle)	trüb
2	MF59 Adjuvans Kontrollserum ³⁾	trüb
3	Alu-Gel Adjuvans Kontrollserum ³⁾	trüb
4	Anti-[rAT-121/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunserum ⁴⁾	trüb
5	Anti-[rAT-121/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum ⁴⁾	klar
6	Anti-[rAT-121/91-His ₂₁₂ in MF59]-Hyperimmunserum ⁵⁾	klar
7	Anti-[rAT-121/91-His ₂₁₂ in Alu-Gel]-Hyperimmunserum ⁵⁾	trüb
8	Anti-[rAT-121/91 in MF59]-Hyperimmunserum ⁴⁾	klar
9	Anti-[rAT-121/91]-Hyperimmunserum ⁴⁾	trüb

1) 30 Minuten Präinkubation bei 37°C

2) zweistündige Inkubation bei 37°C

3) gewonnen nach zweimaliger Applikation des Adjuvans

4) zweimalige intraperitoneale Impfung

5) zweimalige subcutane Impfung

4.10.6 *In vivo* Neutralisation des Alphatoxins im Mäuse-Letalitätstest

Um zu testen, ob die in den Immunisierungsversuchen gewonnenen Hyperimmunseren in der Lage sind, die letale Wirkung des Alphatoxins in der Maus zu neutralisieren, wurde Alphatoxin (2,2µg in 20µl IWP/25µM CaCl₂) mit Antiserum präinkubiert und intraperitoneal Mäusen appliziert.

Die Tiere, denen Wildtyptoxin (2,2µg/Tier) und Anti-[rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59]-Serum injiziert wurden, zeigten während des Versuches ein ungestörtes Allgemeinbefinden und keinerlei Symptome einer Alphatoxin-Intoxikation.

Die Präinkubation von Alphatoxin mit Hyperimmunserum, das durch die i.p. Immunisierung mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ ohne Adjuvans gewonnen worden war, blieb wirkungslos auf die Alphatoxin-induzierte Wirkung im Mausmodell. Alle Versuchstiere zeigten Intoxikations-Symptome und starben innerhalb von 2,5 Stunden.

Dieses klinische Bild trat auch bei den Mäusen auf, denen mit Nullserum bzw. mit 1xPBS inkubiertes Alphatoxin verabreicht worden war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: *In vivo* Neutralisation der letalen Wirkung des Alphatoxins nach Präinkubation mit Hyperimmunseren und Applikation an Mäuse

Gruppe	Alphatoxin (2,2µg in IWP/25µM CaCl ₂) präinkubiert mit	(lebende/ tote Tiere) 12 h nach i.p. Applikation des Prä- inkubationsgemisches ¹⁾
1	Nullserum	(0/2)
2	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59]- Hyperimmunserum	(2/0)
3	Anti-[rAT121A/91-His ₂₁₂]-Hyperimmunserum	(0/2)
4	Kontrolle (PBS (pH 7,4))	(0/1)

¹⁾Alphatoxin (2,2µg in 20µl IWP/25µM CaCl₂) und Hyperimmunserum (200µl) nach 30min Präinkubation bei 37°C.

4.10.7 Bestimmung der minimalen Dosis letalis des Alphatoxins im Mausmodell

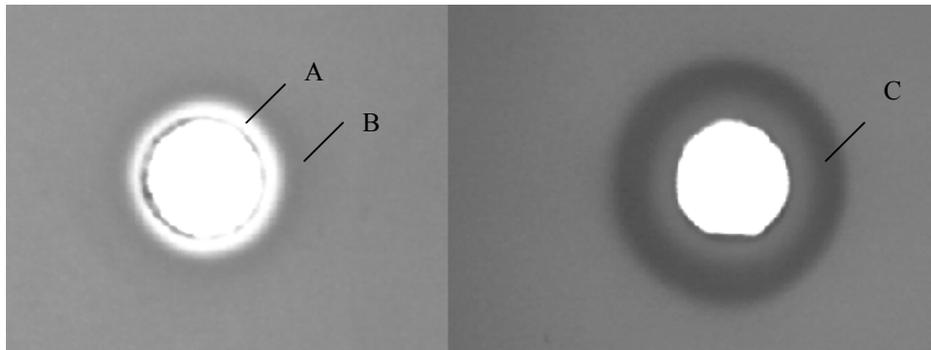
In den Immunisierungsversuchen mit anschließendem Toxinchallenge wurden die geimpften Mäuse mit der minimalen Dosis letalis des Alphatoxins belastet. Die Dosis minimalis letalis wird definiert als die kleinste Menge Wildtyptoxin, die alle Tiere einer Gruppe tötet. Zu ihrer Bestimmung wurden Einheiten von je sechs 12-13 Wochen alten Balb/c Mäusen mit aufsteigenden Dosen Wildtyptoxin intraperitoneal belastet.

Die Gruppen wurden über 72 Stunden regelmäßig kontrolliert und der Zeitpunkt des Todes protokolliert. Hierbei wurde eine Dosis minimalis letalis von 1,2µg pro Tier ermittelt.

4.10.8 Nachweis der enzymatischen Aktivität und der hämolytischen Wirkung der zur Belastung verwendeten Alphatoxincharge (P4039)

Um die hämolytische Wirkung und die enzymatische (PLC-) Aktivität der zur Belastung verwendeten Toxin-Charge zu kontrollieren, wurden aufsteigende Wildtypotoxin-Konzentrationen auf Blut-Platten bzw. auf Eigelb-Laktose Platten aufgetragen. Dies führte zur Alphatoxin-typischen Doppelzonenhämolysen bzw. zur Ausbildung von Trübungshöfen, wie Abbildung 19 zeigt.

Abb. 19: Darstellung der Alphatoxin induzierten Hämolysen auf einer Blutplatte (links) und der enzymatischen Aktivität auf einer Eigelb-Laktose-Platte (rechts)



- A = klare Hämolyszone
- B = trübe Hämolyszone
- C = enzymatischer Trübungshof

Die Ergebnisse in Tabelle 17 zeigen eine dosisabhängige Steigerung der Trübungshof- bzw. Hämolysenhofdurchmesser bedingt durch die Alphatoxin-induzierte enzymatische Aktivität und hämolytische Wirkung.

Tabelle 17: *In vitro* Nachweis der enzymatischen Aktivität und hämolytischen Wirkung des im Toxinchallenge verwendeten Alphatoxins

Alphatoxin-Konzentration (µg)	EADT-Test ¹⁾ (ELA ²⁾ -Platte)		Hämolyse-Test (Blut-Platte)	
	-----Durchmesser der entstandenen Höfe in mm-----			
0,6		2,25		-
1,2		2,75		0,625
1,8		3,0		1,0
2,4		3,0		1,25
3,0		3,0		1,5

¹⁾ Eigelb-Agar-Diffusionstrübungs-Test

²⁾ Eigelb-Laktose Agar

4.10.9 *In vivo* Neutralisationsversuch zum Nachweis von protektiven Antikörpern in der Maus

Im weiteren Verlauf wurde geprüft, ob die Immunisierung mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten geeignet ist, eine belastbare Immunität gegenüber der letalen Wirkung des Alphatoxins im Mausmodell zu induzieren.

Hierfür wurden Mäuse zweimal im Abstand von 21 Tagen mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ unter der Verwendung verschiedener Applikationsrouten mit und ohne Adjuvans immunisiert und nach weiteren 10 Tagen mit der minimalen Dosis letalis Alphatoxin intraperitoneal belastet. Nach dem Toxinchallenge wurden die Tiere über einen Zeitraum von 72h regelmäßig auf Intoxikationserscheinungen kontrolliert und die Zahl der lebenden bzw. toten Versuchstiere protokolliert. Mäuse von denen zu erwarten war, daß sie vor dem Ende des Beobachtungszeitraumes versterben würden, wurden schmerzlos getötet.

4.10.9.1 Überlebensraten der Impflinge nach zweimaliger Immunisierung mit rAT121A/91-His₂₁₂ bzw. rAT121A/91 ohne Adjuvans

Nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ ohne Adjuvans erfolgte die Belastung der Impflinge und der Tiere der PBS-Kontrollgruppe i.p. mit der minimalen Dosis letalis von 1,2µg Alphatoxin.

Die Versuchstiere zeigten die typischen Symptome einer Alphatoxin-Intoxikation und saßen apathisch bis somnolent mit aufgekrümmten Körpern und gestäubtem Fell im Käfig. Die Tiere nahmen weder Futter noch Wasser auf und zeigten teilweise Hämaturie. Bis auf eine Maus starben alle Tiere innerhalb von 12 Stunden post intoxicationem bzw. wurden agonal getötet. Eine Versuchstier überlebte den Versuch, wobei diese Maus während des gesamten Versuches keine Alphatoxin-spezifischen Symptome gezeigt hatte. Die Zahl der lebenden bzw. toten Tiere zu den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Beobachtungszeitraumes ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18 : Überlebensraten von Mäusen nach zweimaliger Immunisierung mit dem rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ ohne Adjuvans und nachfolgendem Toxinchallenge

Versuchsgruppen	Zahl der lebenden/toten Mäuse zu verschiedenen Zeiten post intoxicationem ¹⁾						Überlebensrate %
	0h	6h	12h	24h	48h	72h	
Impflinge rAT121A/91-His ₂₁₂	(6/0)	(4/2)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	0%
Kontrolltiere – PBS	(6/0)	(3/3)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	0%
Impflinge rAT-121/91	(6/0)	(3/3)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	0%
Kontrolltiere – PBS	(6/0)	(3/3)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	17%

¹⁾ minimale Dosis letalis = 1,2µg Alphatoxin/Tier

4.10.9.2 Überlebensraten der Impflinge nach zweimaliger Immunisierung mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ und dem Adjuvans MF59

Weiterhin wurden Mäuse nach zweimaliger intraperitonealer Immunisierung mit der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91 in MF59 bzw. mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59 mit der Dosis minimalis letalis (1,2µg) Wildtyptoxin belastet.

Die zu beobachtende Intoxikationssymptomatik entsprach den Erscheinungen, die bereits unter 4.10.9.1 beschrieben wurden. Bei den überlebenden Tieren war der Verlauf jedoch milder und es trat keine Hämaturie auf.

Die Impflinge, die mit der Alphatoxinvariante rAT121A/91 in MF59 immunisiert worden waren, zeigten innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Belastung eine erhöhte Überlebensrate im Vergleich zu den Adjuvans- und PBS-Kontrollgruppen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes war die Zahl der lebenden Tiere in der Impf- und den Kontrollgruppen jedoch identisch.

Bei den Tieren, die mit rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59 vakziniert worden waren, war die Überlebensrate hingegen mit Werten zwischen 58 und 76% signifikant erhöht. Der Anteil der den Challenge überlebenden Kontrolltiere variierte zwischen 0 und 17%. Tabelle 19 zeigt die Zahl der lebenden und toten Mäuse dieses dreimal durchgeführten Versuches in Abhängigkeit zur Zeit.

Tabelle 19: Überlebensraten von Mäusen nach zweimaliger Immunisierung mit dem rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ in Kombination mit MF59 und nachfolgendem Toxinchallenge

Versuchsgruppen	Zahl der lebenden/toten Mäuse zu verschiedenen Zeiten post intoxicationem ¹⁾						Überlebensrate %
	0h	6h	12h	24h	48h	72h	
Impflinge rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	(6/0)	(6/0)	(4/2)	(4/2)	(4/2)	(4/2)	67%
Kontrolltiere – PBS	(6/0)	(6/0)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	0%
Impflinge ²⁾ rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	(12/0)	(11/1)	(8/4)	(8/4)	(7/5)	(7/5)	58%
Kontrolltiere – PBS ₂₎	(12/0)	(8/4)	(1/11)	(1/11)	(1/11)	(1/11)	8%
Impflinge ²⁾ rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	(21/0)	(21/0)	(19/2)	(17/4)	(16/5)	(16/5)	76%
Kontrolltiere – PBS ₂₎	(6/0)	(3/3)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	17%
Impflinge rAT-121/91 in MF59	(6/0)	(6/0)	(4/2)	(4/2)	(1/5)	(1/5)	17%
Kontrolltiere – PBS	(6/0)	(3/3)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	17%
Kontrolltiere – MF59	(12/0)	(10/2)	(2/10)	(2/10)	(2/10)	(2/10)	17%

¹⁾ minimale Dosis letalis = 1,2µg Alphatoxin/Tier ²⁾ Wiederholung des Belastungsversuches

Aufgrund der bis dato ermittelten Ergebnisse zur Protektivität der Alphatoxinvariante rAT121A/91, wurden die nachfolgenden Belastungsversuche ausschließlich mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ durchgeführt.

4.10.9.3 Überlebensraten der Impflinge im Toxinchallenge nach zweimaliger subcutaner Immunisierung mit der Alphatoxinvariante rAT121A/91-His₂₁₂ und den Adjuvantien MF59 bzw. Alu-Gel

Für eine mögliche Anwendung des Impfstoffes beim Menschen sowie bei anderen Tierarten, wurde die Eignung der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ als Impfantigen nach subcutaner Applikation geprüft. Hierbei fanden ebenfalls die Adjuvantien MF59 und Alu-Gel Verwendung. Die Belastung der Mäuse erfolgte mit der Dosis minimalis letalis von 1,2µg. Den Kontrollgruppen wurde nur Adjuvans bzw. PBS subcutan appliziert.

Von den Impfungen, denen rAT121A/91-His₂₁₂ mit Alu-Gel verimpft worden war, überlebten 8% den Toxinchallenge. Die Gruppen, die subcutan mit rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59 immunisiert worden waren, zeigten im Belastungsversuch Überlebensraten von 42%. Der Anteil der überlebenden Kontrolltiere variierte zwischen 8-17%. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Überlebensraten von Mäusen nach zweimaliger subcutaner Immunisierung mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ in Kombination mit MF59 bzw. Alu-Gel und nachfolgendem Toxinchallenge

Versuchsgruppen ¹⁾	Zahl der lebenden/toten Mäuse zu verschiedenen Zeiten post intoxicationem ²⁾						Überlebensrate %
	0h	6h	12h	24h	48h	72h	
Impflinge rAT121A/91-His ₂₁₂ in MF59	(12/0)	(10/2)	(5/7)	(5/7)	(5/7)	(5/7)	42%
Kontrolltiere– PBS	(6/0)	(3/3)	(5/1)	(5/1)	(5/1)	(5/1)	17%
Kontrolltiere– MF59	(12/0)	(10/2)	(1/11)	(1/11)	(1/11)	(1/11)	8%
Impflinge rAT-121/91 in Alu-Gel	(12/0)	(6/6)	(1/11)	(1/11)	(1/11)	(1/11)	8%
Kontrolltiere– PBS	(6/0)	(3/3)	(5/1)	(5/1)	(5/1)	(5/1)	17%
Kontrolltiere – Alu-Gel	(6/0)	(3/3)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	(1/5)	16%

¹⁾ subcutane Applikation

²⁾ minimale Dosis letalis = 1,2µg Alphatoxin/Tier

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals zwei gentechnisch hergestellte atoxische Alphatoxinvarianten (rAT121A/91 und rAT121A/91-His₂₁₂) auf ihre Eignung als Impfantigen gegen das *C. perfringens* Alphatoxin im Mausmodell getestet. Das rAT121A/91 ist das rekombinante Analog einer natürlich vorkommenden Alphatoxinvariante. Durch *in vitro* Mutagenese wurde das rAT121A/91-His₂₁₂ generiert. Hierbei bildete die für das rAT121A/91 kodierende Sequenz die Grundlage. Die mit diesen Varianten induzierten Immunsereen waren in der Lage, die biologischen Wirkungen des Alphatoxins *in vitro* zu neutralisieren. Mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ gelang es zudem, eine belastbare Immunität *in vivo* zu erzielen.

Der Ursprung der rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91 war das *C. perfringens* Feldisolat 121A/91. Dieser Stamm fiel phänotypisch durch das Fehlen der Alphatoxin-assoziierten enzymatischen (Lezithinase-) Aktivität und der hämolytischen Wirkung auf. Das Isolat wurde jedoch kulturell, mikroskopisch und biochemisch sowie durch den Nachweis des Alphatoxin-Gens mittels PCR zweifelsfrei als *C. perfringens* identifiziert (Pache et al., 1996). Bei weiteren Untersuchungen konnte dargestellt werden, daß es sich bei dem Stamm nicht, wie bei den bislang charakterisierten Lezithinase-negativen *C. perfringens* Stämmen KZ 1340-1343 (Nakamura et al., 1976), um eine Expressionsmutante handelt. Das Isolat 121A/91 sezerniert eine enzymatisch inaktive und zugleich nicht hämolytisch oder letal wirkende Alphatoxinvariante in den Kulturüberstand.

Da das AT121A/91 von den Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörpern 1E8 und 3B4 erkannt wird, ist zu vermuten, daß die Alphatoxinvariante eine dem Wildtypotoxin vergleichbare Tertiärstruktur aufweist (Schoepe et al., 2001).

Durch den Aminosäuresequenzvergleich der Alphatoxinvariante 121A/91 und des Alphatoxins des *C. perfringens* Referenzstammes ATCC 13124 ließen sich acht Aminosäuresubstitutionen nachweisen.

Vier der Mutationen (Ala₁₇₄ -> Asp₁₇₄, Thr₁₇₇ -> Ala₁₇₇, Ser₃₃₅ -> Pro₃₃₅, Ile₃₄₅ -> Val₃₄₅) gelten als wenig relevant für die biologischen Wirkungen des Toxins, da diese Substitutionen auch bei aktiven *C. perfringens* Alphatoxinmolekülen nachgewiesen werden konnten (Tsutsui et al., 1995; Titball et al., 1999). Die Mutationen Met₁₃ -> Val₁₃, **His₂₁₂** -> **Arg₂₁₂**, Pro₂₉₅ -> Gln₂₉₅ und Trp₃₆₀ -> Gly₃₆₀ hingegen, wurden bislang nicht beschrieben. Dies gibt Hinweise

darauf, daß diese Aminosäuren für den Verlust der enzymatischen Aktivität sowie der hämolytischen und letalen Wirkung verantwortlich sind (Schoepe et al., 2001).

Histidin besitzt beim Alphatoxin aufgrund seiner Fähigkeit zur Koordination von Zink-Atomen eine wichtige strukturgebende Funktion (Vallee und Auld, 1990). Zink wiederum ist essentiell zur Erhaltung der dreidimensionalen Struktur und der biologischen Wirkungen des Toxins. In Zink-reduziertem Medium produziertes Alphatoxin ist instabil und besitzt gleichzeitig eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Proteasen (Sato et al., 1978; Logan et al., 1991).

Aus diesem Grund wurde das bei der Alphatoxindefektmutante 121A/91 an Position 212 vorliegende Arginin mittels *in vitro* Mutagenese zu einem Histidin zurückmutiert.

Dies sollte die Konformation der Alphatoxinvariante der dreidimensionalen Struktur des Wildtyptoxins weiter annähern. Die so generierte Sequenz kodierte für die zweite untersuchte Variante: das rAT121A/91-His₂₁₂.

Eine Reversion der Toxizität war durch die Aminosäuresubstitution nicht zu erwarten, da dem Histidin₂₁₂ keine Schlüsselrolle bei den biologischen Wirkungen des Alphatoxins zukommt. So ließ sich durch die Substitution des Histidins₂₁₂ durch Glyzin mittels site-directed Mutagenese kein Effekt auf die Toxin-spezifischen Wirkungen nachweisen (Nagahama et al., 1995).

Diese Ergebnisse wurden durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Die Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ besaß weder enzymatische Aktivität noch hämolytische Wirkung und war atoxisch in der Maus. Der immunologische Nachweis der Variante mit dem monoklonalen Alphatoxin-spezifischen Antikörper 3B4 demonstrierte jedoch, daß das 121A/91-His₂₁₂ in einer dem Wildtyp toxin vergleichbaren Tertiärstruktur vorlag.

Da sowohl das rAT121A/91 als auch das rAT121A/91-His₂₁₂ eine dem Wildtyp toxin entsprechende Konformation aufwiesen und dabei gleichzeitig keine der biologischen Wirkungen des Alphatoxins zeigten, eigneten sich diese Alphatoxinvarianten für Immunisierungsstudien im Tiermodell.

Beide Varianten wurden in einem pASK *E. coli* Expressionsvektor hergestellt. Die rekombinante Produktion des AT121A/91 wurde der Aufreinigung der Alphatoxinvariante aus dem *C. perfringens* Kulturüberstand vorgezogen, da Präparationen aus dem Kulturmedium häufig mit Fremdproteinen kontaminiert sind (Krug und Kent, 1984). Desweiteren ist die Reinigung der Zielproteine aufwendiger, als dies bei rekombinant hergestellten Toxinen der Fall ist (Jolivet-Reynaud et al., 1988). Im Gegensatz zur gentechnischen Herstellung im pASK-75 Expressionssystem, bei dem die Gewinnung von nativ gefalteten Proteinen durch eine einstufige Affinitätschromatographie möglich ist (Anonym, 1997), erfordert die Aufreinigung aus dem Überstand zumeist zwei Reinigungsschritte (Krug und Kent, 1984).

Die Expressionsregulation des für das Alphatoxin kodierenden *cpa* ist bislang nur unzureichend untersucht (Titball et al., 1999). Daher wäre die Standardisierung der Sekretion bzw. die Überexpression der Alphatoxinvariante bei einer Gewinnung aus dem Kulturüberstand im Großmaßstab schwierig umzusetzen. Demgegenüber unterliegt die Regulation der Proteinexpression im pASK-System dem tetA-Promotor. Dieser wird gezielt durch die Zugabe von Anhydrotetrazyklin stimuliert. Das System ist somit unabhängig von zellulären Regulationsmechanismen (Skerra, 1994).

Die rekombinante Herstellung der Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ erfolgte im pASK-75 und führte zu Proteinausbeuten von durchschnittlich 750µg pro Liter Expressionskultur. Die Gewinnung des rAT121A/91 im pASK-75 war hingegen weniger erfolgreich. Hier wurden lediglich Ausbeuten von 250µg/Liter Kultur erzielt. Durch die Umklonierung der *plc* kodierenden Sequenz aus dem pASK-75 in den Nachfolgevektor pASK-IBA2 wurde die Expressionsrate weiter optimiert. Hierbei konnte bis zu 2mg Protein pro Liter Medium gewonnen werden.

Die pASK-IBA Vektoren ermöglichen im Gegensatz zum Vorläufermodell pASK-75 die Fusion des Affinitätspeptids (Strep-Tag) sowohl N- als auch C-terminal an das Zielprotein und verfügen über ein modifiziertes Strep-Tag zur Minimierung der Aufreinigungsverluste (Voss und Skerra, 1997). Die Ursache für die Expressionssteigerung ist hingegen unklar, da die transkriptionelle Kontrolle der Expressionskassette bei der Entwicklung der pASK-IBA Vektoren nicht verändert wurde (Anonym, 1997).

Bei der Gewinnung von Alphatoxin aus dem Kulturüberstand von *C. perfringens* Übernachtkulturen liegt die Ausbeute bei bis zu 650µg Toxin/Liter Kultur (Krug und Kent, 1984).

Das Phospholipase C von *C. perfringens* ist ein hochaktives Toxin. Bereits 1µg Alphatoxin ist letal für die Maus (Titball et al., 1989). Da ein effektiver Schutz gegen das Alphatoxin nur durch die Induktion einer humoralen Immunität erreicht werden kann (Williamson und Titball, 1993), wurde versucht, mit den Varianten hochtitrige Antiseren in der Maus zu induzieren.

Erwartungsgemäß wiesen die rekombinanten Impfantigene bei der intraperitonealen Immunisierung ohne Adjuvans in der Maus nur eine mittlere Immunogenität auf (Titer bis 1: 64.000). Dies ist vermutlich auf den hohen Reinheitsgrad der Alphatoxinvarianten zurückzuführen, der durch die Affinitätschromatographische Aufreinigung erzielt wird.

Durch die Zugabe der Adjuvantien Alu-Gel oder MF59 zu den verwendeten Impfantigenen wurde die Immunogenität signifikant gesteigert. So wurde bei der i.p. Vakzinierung mit MF59 eine 16-fache Steigerung der Antikörperantwort erzielt.

Untersuchungen zur Verträglichkeit der Impfstoffpräparationen zeigten, daß die rekombinanten Alphatoxinvarianten mit MF59 bei s.c. Applikation von den Tieren sehr gut toleriert wurden. Diese Injektionsform gilt bei der Maus als Immunisierungsrouten der Wahl (Anonym, 1999; Hanly et al., 1995).

Bei der subcutanen Applikation der Varianten in Alu-Gel kam es hingegen Tage bzw. Wochen nach der Impfung zu entzündlichen Veränderungen im Bereich der Injektionsstelle. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bei der Verwendung von Aluminium-haltigen Adjuvantien beobachtet. White et al. (1955) führen dies auf einen zu hohen Anteil des Adjuvans an der Impfpräparation zurück. Bei den Alu-Gel Kontrollgruppen wurden keine Entzündungssymptome festgestellt.

Bei der intraperitonealen Immunisierung mit den Alphatoxinvarianten und MF59 kam es zu einer vorübergehenden Störung des Allgemeinbefindens der Impflinge. Diese war bei der Applikation der rekombinanten Impfantigene ohne Adjuvans geringer ausgeprägt und trat bei

den MF59 Kontrollgruppen nicht auf. Da MF59 bei der i.m. und s.c. Immunisierung als ausgesprochen gut verträglich gilt (Ott et al., 1995), ist zu vermuten, daß die transienten Erscheinungen die Folge der raschen Resorption beider Komponenten der Impfstoffpräparation sind (Hanly et al., 1995).

In Anlehnung an die Richtlinie zur tierschutzkonformen Gewinnung von Antikörpern (Anonym, 1999), wurde die intramuskuläre Applikationsform aufgrund der geringen Muskelmasse bei der Maus nicht evaluiert.

Die Analyse der immunogenitätssteigernden Wirkung der Adjuvantien machte deutlich, daß MF59 dem Alu-Gel in dieser Hinsicht überlegen ist. So führte die subcutane Immunisierung mit den Alphatoxinvarianten und MF59 zu doppelt so hohen Titern (1: 256.000), verglichen mit der s.c. Applikation der Antigene mit Alu-Gel (1: 128.000).

Dies steht in Einklang mit den Untersuchungen von Valensi et al. (1994). Hier wurde gezeigt, daß bei vergleichbaren Immunisierungsschemata, unabhängig von der verwendeten Spezies und dem injizierten Antigen, die mit MF59 induzierten Titerhöhen die mit Alu-Gel gewonnenen Antikörperkonzentrationen bis um den Faktor 50 übertreffen.

Bei vergleichenden Untersuchungen zum Einfluß der Injektionsroute auf die Titerhöhe, lagen die mittels subcutaner Vakzinierung induzierten Titer um den Faktor 2-4 unter den durch intraperitoneale Applikation erzielten Antikörperkonzentrationen. Dies galt für die Immunisierung mit rAT121A/91 und rAT121A/91-His₂₁₂ in Kombination mit bzw. ohne Adjuvans. Die Ergebnisse von Hurn and Chantler (1980) sowie Hanly et al. (1995), die die intraperitoneale Verabreichung zur Induktion von hohen Titern im Mausmodell favorisieren, bestätigen diese Beobachtungen.

Es ist unbestritten, daß die hämolytische Wirkung mit den letalen Eigenschaften des Alphatoxins korreliert (Jepson et al., 1999). Daher müssen für einen wirksamen Impfschutz antihämolytische Antikörper induziert werden (Williamson und Titball, 1993).

Die Antiseren, die nach zweimaliger s.c. bzw. i.p. Immunisierung mit rAT121A/91-His₂₁₂ und MF59 gewonnen worden waren, inhibierten bei Verwendung im Überschuß sowohl die

enzymatische Aktivität als auch die hämolytische Wirkung des Alphatoxins von *C. perfringens* vollständig (Restaktivität von maximal 5%).

Durch die Titration der Seren im *in vitro* Neutralisationsassay zeigte sich, daß die nach subcutaner Applikation des Impfstoffes gewonnenen Immunsereen eine um den Faktor zwei stärkere antihämolytische Wirkung besaßen als die durch i.p. Vakzinierung induzierten Seren. Gleichzeitig wiesen die s.c. induzierten Antiseren geringere Alphatoxin-spezifische Antikörperkonzentrationen auf (1: 256.000 zu 1: 128.000).

Es ist nicht zu erwarten, daß die Applikationsroute einen Einfluß auf den Anteil der neutralisierenden Antikörper in den Seren hat. Möglicherweise beeinflußt jedoch die Immunisierungsrouten die Antikörperaffinität gegen das Alphatoxin von *C. perfringens*. Kenney et al. (1989) demonstrierten mittels Radio-Immuno-Assays (RIA), daß die Affinität von spezifischen Antikörpern gegen das humane Serumalbumin (HSA) je nach Applikationsweg variieren kann. So führte die s.c. Immunisierung mit HSA und $\text{Al}(\text{OH})_3$ /[Thr¹]MDP als Adjuvans zu Antiseren, die signifikant affiner waren als die durch die i.p. Applikation induzierten Antikörper. Vermutlich ist dies durch die verzögerte Resorption nach subcutaner Injektion im Vergleich zur intraperitonealen Applikation bedingt (Hanly et al., 1995).

Mit den durch i.p. Immunisierung mit rAT121A/91 und MF59 gewonnenen Antiseren gelang es bei Zugabe der Seren im Überschuß ebenfalls, die enzymatische Aktivität und die hämolytische Wirkung des Alphatoxins zu inhibieren. Im Titrationsversuch zeigte sich jedoch, daß die Hyperimmunsereen im Vergleich zu den entsprechenden rAT121A/91-His₂₁₂-Antiseren eine geringere Neutralisationsfähigkeit aufwiesen. So gelang es mit rAT121A/91-Seren bei einer Verdünnung von 1:4, die Alphatoxin-spezifische Hämolyse um 66% zu reduzieren. Das rAT121A/91-His₂₁₂-Antiserum inhibierte hingegen in derselben Verdünnung die hämolytische Wirkung zu 95%. Da beide Seren dieselbe Titerhöhe aufwiesen, ist zu vermuten, daß essentielle Epitope zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern beim rAT121A/91 offenbar nicht in einer dem rAT121A/91-His₂₁₂ entsprechenden Weise präsentiert werden.

Da sich die Aminosäuresequenz beider Alphatoxinvarianten nur in einer Position unterscheidet, muß die Reversion des Histidins₂₁₂ für dieses Phänomen verantwortlich sein.

Daß der Austausch von einer Aminosäure zur Modifikation von immunogenen Epitopen führen kann, bewiesen Sharma et al. (1991). Sie generierten mittels site-directed Mutagenese eine Variante des *E. coli* HPr (Histidine-containing Protein). Hierbei wurde das Histidin an Position 76 durch ein Alanin ersetzt. Das Protein wies enzymatische Aktivität auf und wurde von den HPr-spezifischen monoklonalen Antikörpern Jel42 und Jel323 in einer dem Wildtypprotein entsprechenden Weise erkannt. Dies läßt auf eine erhaltene Tertiärstruktur schließen. Die HPr Variante besaß jedoch gleichzeitig veränderte Bindungseigenschaften gegenüber dem HPr-spezifischen monoklonalen Antikörper Jel44.

Die These wird zudem durch Studien mit dem Alphatoxin-spezifischen Antikörper 3B4 und den beiden rekombinanten Alphatoxinvarianten bestätigt. Hier ließ sich darstellen, daß die Bindungsaktivität des 3B4 zum rAT121A/91-His₂₁₂ höher ist als gegenüber dem rAT121/91.

Die Neutralisationsfähigkeit der Antiseren wird auch durch das Adjuvans beeinflusst. So inhibierte ein nach s.c. Immunisierung mit Alu-Gel und rAT121A/91-His₂₁₂ gewonnenes Serum bei einer Verdünnung von 1:2 die Alphatoxin-induzierte Hämolyse lediglich zu 46%. Zudem gelang es mit diesem Antiserum nicht, die enzymatische Aktivität zu neutralisieren.

Die Ursache für die reduzierte Neutralisationsfähigkeit dieses Serums ist zum einen die geringere immunogenitätssteigernde Wirkung des Alu-Gels gegenüber MF59. Die Titer von 1:128.000 reichen nicht aus, um die Wirkungen der vorgelegten Alphatoxinkonzentration effektiv zu inhibieren. Entsprechendes gilt für die Antiseren, die mit den rekombinanten Alphatoxinvarianten ohne Adjuvans gewonnen wurden. Bei Antikörpertitern von 1:64.000 waren diese ebenfalls weder im Hämolyse- noch im Lezithinase-Assay in der Lage, die Alphatoxin-spezifischen Aktivitäten zu neutralisieren.

Desweiteren beeinflusst das Alu-Gel möglicherweise neben der Titerhöhe auch die Affinität der induzierten Alphatoxin-spezifischen Antikörper. Kenney et al. (1989) stellten mittels HSA Hyperimmunseren im RIA dar, daß die Affinität der mit Alu-Gel gewonnenen Antikörper um den Faktor 3-7 unter den mit RAS, einem Öl in Wasser Adjuvans, oder Quil A induzierten Antikörpern lag. Somit nimmt neben der Applikationsroute auch das Adjuvans Einfluß auf die Affinität und somit auf die Neutralisationsfähigkeit der Antiseren.

Eine weiterer Grund für die reduzierte Neutralisationsfähigkeit dieser Seren könnte die Modifikation der Tertiärstruktur des Impfpoteins durch die Absorption an das Alu-Gel sein. Diese ist erst im Rahmen einer mehrwöchigen Lagerung reversibel (Hartinger und Mateis, 1998). Möglicherweise führte dies bei den Alphatoxinvarianten zu einer partiellen Maskierung von essentiellen Epitopen.

Um die protektive Wirkung der rekombinanten Alphatoxinvarianten *in vivo* zu überprüfen, wurden Mäuse zweimal vakziniert und dann mit der minimalen Dosis letalis des Alphatoxins von 1,2µg intraperitoneal belastet.

Die mit den Immunseren im *in vitro* Hämolyse Assay erzielte Inhibition des Toxins gilt als wichtiger Indikator für die zu erwartende Protektion im *in vivo* Modell, da die hämolysierende Wirkung des Alphatoxins mit der Toxizität *in vivo* korreliert (Jepson et al., 1999).

Auch in der vorliegenden Studie konnte dieser Zusammenhang dargestellt werden. So überlebten die mit rAT121A/91 bzw. rAT121A/91-His₂₁₂ ohne Adjuvans bzw. mit Alu-Gel immunisierten Tiere, deren Seren im *in vitro* Versuch die Alphatoxin-induzierte Hämolyse nicht beeinflusst oder nur geringgradig reduziert hatten, die Intoxikation nicht.

Die mit rAT121A/91 und MF59 immunisierten Tiere zeigten zwar eine verlängerte Überlebensdauer, wiesen aber, im Gegensatz zu den mit rAT121A/91-His₂₁₂ und MF59 vakzinierten Mäusen, nach Ende der Beobachtungszeit keine erhöhte Überlebensrate im Vergleich zu den Kontrollgruppen auf. Dieses Ergebnis korreliert ebenfalls mit den *in vitro* erhobenen Daten. Hier lag die mit den Antiseren erzielte Reduktion der Alphatoxin-spezifischen Hämolyse bei einer Serumverdünnung von 1:10 signifikant unter dem Wert, der mit rAT121A/91-His₂₁₂ und MF59 induzierten Seren erreicht wurde.

Dies unterstreicht die Vermutung, daß aufgrund der Mutation des rAT121A/91 an Position 212 essentielle Epitope offenbar nicht in einer dem Wildtypotoxin vergleichbaren Weise dargestellt werden. Es ist daher anzunehmen, daß die Antikörperaffinität und die damit verbundenen Neutralisationsfähigkeit der mit dem rAT121A/91 induzierten Antikörper zu gering ist, um eine belastbare Immunität zu vermitteln.

Diese Ergebnisse gehen einher mit den Beobachtungen von Logan et al. (1991) und Williamson und Titball (1993) zum Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper 3α4D10. Dieser ist erst bei einem 70-fachem molaren Überschuß (Verhältnis Toxin:

Antikörper) in der Lage, die hämolytische Wirkung des Alphatoxins zu neutralisieren. Bei polyklonalen Seren liegt das Verhältnis bei 1:28.

Bei einem Belastungsversuch mit der minimalen Dosis letalis von 1 µg betrug die Überlebensrate der Tiere, denen gleichzeitig der mAk 3α4D10 appliziert worden war, nach 16 Stunden bei 83%. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits alle Kontrolltiere verstorben. Nach Abschluß des Beobachtungszeitraumes lag die Überlebensrate der Testgruppen jedoch nur noch bei 50%.

Mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ in Kombination mit MF59 gelang es hingegen sowohl im *in vivo* Belastungs- als auch im *in vitro* Neutralisationsversuch die letale Wirkung des Alphatoxins signifikant zu reduzieren bzw. vollständig zu inhibieren.

Die i.p. Immunisierung mit der Alphatoxinvariante und dem Adjuvant führte nach Belastung mit Wildtyptoxin zu Überlebensraten von bis zu 76%, wohingegen maximal 17% der Adjuvanskontrollen das Ende des Challengeversuches erlebten. Im *in vivo* Neutralisationsversuch wurde Alphatoxin mit dem entsprechenden Hyperimmunserum präinkubiert und das Gemisch intraperitoneal an Mäuse appliziert. Dies wurde von den Tieren ohne Anzeichen einer Alphatoxinintoxikation toleriert.

Wurden die Mäuse hingegen subcutan mit rAT121A/91-His₂₁₂ und MF59 immunisiert, so zeigten diese bei intraperitonealer Belastung eine signifikant niedrigere Überlebensrate (bis zu 42%; max. 17% Überlebende bei den Adjuvanskontrollen) als die i.p. vakzinierten Tiere. Dies ist insofern bemerkenswert, da die s.c. induzierten Antiseren den nach intraperitonealer Applikation gewonnenen Seren im *in vitro* Hämolyseversuch überlegen waren.

Es ist denkbar, dass in die Bauchhöhle sezernierte Antikörper diese erhöhte Protektivität bedingen (Pauels, 2001). Die Zell zu Zell-Interaktion im Rahmen der Immunabwehr und Immunitätsbildung findet generell in den sekundären lymphatischen Geweben statt. Bei subcutaner Applikation im Nackenbereich sind dies vor allem die Axillarlymphknoten und bei intraperitonealer Injektion die Milz (Hanly et al., 1995). Bei der i.p. Immunisierung kann dies möglicherweise zu erhöhten Antikörperkonzentrationen im Peritoneum führen (Pauels, persönliche Kommunikation), die die Neutralisation des Alphatoxins unterstützen könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, daß die rekombinanten Alphatoxinvarianten 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂ in der Lage sind, Wildtyptoxin-spezifische

Antikörper zu induzieren. Diese Antikörper sind geeignet, die enzymatische Aktivität sowie die hämolytische und die letale Wirkung des Alphatoxins *in vitro* signifikant zu reduzieren bzw. vollständig aufzuheben.

Mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ gelang es weiterhin im Toxinchallenge, die Überlebensrate der geimpften Tiere im Vergleich zu den Adjuvanskontrollen signifikant zu erhöhen. Damit konnte erstmals dargestellt werden, daß sich durch gentechnische Methoden generierte atoxische Varianten des Alphatoxins von *C. perfringens* als Impfantigen eignen.

Vergleichbare Ergebnisse ließen sich mit einem atoxischen *C. perfringens* Epsilontoxin erzielen. Oyston et al. (1998) generierten mittels Mutagenese eine Epsilontoxinvariante, die eine Aminosäuresubstitution im Vergleich zur Referenzsequenz aufwies. Das Protein wurde von Epsilontoxin spezifischen Antikörpern erkannt und induzierte als Impfprotein eine belastbare Immunität gegen das Wildtypotoxin im Mausmodell.

Mit der durch *in vitro* Mutagenese gewonnenen rekombinanten Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ wurde die Grundlage für eine aktive Immunisierung gegen das Alphatoxin von *C. perfringens* geschaffen. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob das verwendete Adjuvans und die gewählte Applikationsroute auch für die Induktion einer langandauernden Immunität geeignet ist.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die atoxischen gentechnisch hergestellten Alphatoxinvarianten (rAT) 121A/91 und 121A/91-His₂₁₂ die zur Immunisierung gegen das *C. perfringens* Alphatoxin Verwendung finden können.

Das rAT121A/91 ist das rekombinante Analog der atoxischen Alphatoxinvariante 121A/91, die vom natürlich vorkommenden *C. perfringens* Feldisolat 121A/91 sezerniert wird. Die Variante 121A/91-His₂₁₂ ist durch *in vitro* Mutagenese aus dem AT121A/91 hervorgegangen. Hierbei wurde das Arginin an Position 212, entsprechend der Wildtyp-toxin-Sequenz, durch ein Histidin ersetzt. Studien mit den beiden rekombinanten Varianten und dem Alphatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper 3B4 zeigten, daß die Alphatoxinvariante 121A/91-His₂₁₂ eine höhere Bindungsaktivität gegenüber dem monoklonalen Antikörper aufweist als das rAT121A/91. Dies läßt darauf schließen, daß sich das His₂₁₂ in einem für die Bindung essentiellen Aminosäurebereich befindet.

Die beiden Alphatoxinvarianten ließen sich effektiv in *E. coli* pASK-IBA2-Expressionsvektoren exprimieren und affinitätschromatographisch aus dem Periplasmaextrakt aufreinigen.

Die Alphatoxinvarianten waren bei Immunisierungsversuchen in der Maus gut verträglich. Bei der Verwendung der Impfkandidaten in MF59, einem Öl in Wasser Adjuvans, traten bei der s.c. Immunisierung keine und bei der i.p. Applikation nur geringgradige Allgemeinstörungen auf. Die s.c. Vakzinierung mit dem durch *in vitro* Mutagenese gewonnenen rAT121/91-His₂₁₂ in Alu-Gel führte hingegen zu entzündlichen Veränderungen an der Applikationsstelle.

Im ELISA konnte gezeigt werden, daß die i.p. Immunisierung mit beiden Varianten in MF59 zu Alphatoxin-spezifischen Antikörper Titern von 1: 1.024.000 führte. Obwohl sich die Titer nicht in ihrer Höhe unterschieden, konnte im *in vitro* Hämolyse-Neutralisationsassay nachgewiesen werden, daß die mit dem rAT121A/91-His₂₁₂ induzierten Antiseren eine stärkere antihämolytische Wirkung aufwiesen.

Da die intraperitoneale Applikation auf die Anwendung im Mausmodell begrenzt ist, wurde das rAT121A/91-His₂₁₂ zudem bei subcutaner Immunisierung getestet. In Kombination mit MF59 führte dies zu vierfach geringeren Antikörperkonzentrationen als nach intraperitonealer Immunisierung. Trotz niedrigerer Alphatoxin-erkennender Antikörpertiter war der Anteil antihämolysierender Antikörper jedoch um den Faktor zwei höher, als nach entsprechender i.p. Immunisierung.

Die enzymatische Aktivität des Alphatoxins konnte mit beiden Seren in Kombination mit MF59 unabhängig vom Applikationsweg neutralisiert werden. Die Seren, die mit Alu-Gel als Adjuvans bzw. ohne die Zugabe eines Adjuvans gewonnen worden waren, besaßen keine PLC-inhibierende Wirkung.

Im Toxinchallenge-Versuch war das rAT121A/91-His₂₁₂ dem rAT121A/91 eindeutig überlegen. Bei der Verwendung von rAT121A/91-His₂₁₂ in Kombination mit MF59 überlebten bei i.p. Immunisierung bis zu 76% und bei s.c. Applikation bis zu 42% der Tiere die Belastung mit dem Wildtyptoxin. Bei den Tieren der Adjuvanskontrollen betrug die maximale Überlebensrate 17%. Die i.p. Immunisierung mit rAT121A/91 in MF59 führte hingegen nicht zu einer nachweisbaren Schutz der Tiere.

Die im *in vivo* Belastungsversuch gewonnenen Ergebnisse wurden in einem *in vitro* Neutralisationsversuch bestätigt. Hierbei wurde mit Antiserum präinkubiertes Alphatoxin Mäusen intraperitoneal appliziert. Nur Tiere, denen ein Gemisch aus Alphatoxin mit durch i.p. Immunisierung von rAT121A/91-His₂₁₂ in MF59 gewonnenem Serum injiziert wurde, überlebten.

Nach Vakzinierung von Mäusen mit dem durch *in vitro* Mutagenese gewonnenen rAT121A/91-His₂₁₂ gelang es, Antiseren zu gewinnen, die sowohl die enzymatische Aktivität, als auch die hämolytische Wirkung des Alphatoxins neutralisierten. Die intraperitoneale Vakzinierung mit der Alphatoxinvariante und einem Öl in Wasser Adjuvans war zudem geeignet, die letale Wirkung des Wildtyptoxins sowohl im *in vitro* Neutralisationsassay als auch im *in vivo* Belastungsversuch vollständig zu inhibieren bzw. signifikant zu reduzieren. Das rAT121A/91-His₂₁₂ ist somit ein Impfantigen, das sich für eine aktive Immunisierung gegen das Alphatoxin von *C. perfringens* eignet.

7 Summary

The goal of the present study was to determine the suitability of two non-toxic recombinant *Clostridium perfringens* alphatoxin variants (rAT), 121A/91 and 121A/91-His₂₁₂, for use as potential vaccines. The rAT121A/91 is the recombinant analogue of the naturally occurring, non-toxic variant 121/91A. The 121A/91-His₂₁₂ was constructed from 121/A91 using *in vitro* mutagenesis. The Arg at position 212 was substituted for a His residue to mimic the toxin sequence of the wild type toxic alphatoxin.

Studies examining the binding of the alphatoxin-specific monoclonal antibody 3B4 indicated more mab 3B4 bound to the 121A/91-His₂₁₂ protein than the 121A/91 protein. This indicates that the His 212 residue is located in a region which is essential for mab 3B4 binding.

Both variant alphatoxins could be effectively expressed using *E. coli* pASK-IBA2-expression vectors and were purified from the periplasmic extract.

Immunisations with the alphatoxin variants were well tolerated by mice. Combined with the oil-in-water emulsion MF59, the IP immunisation resulted in a slight reaction measured by change in the condition of the mice and no change was seen with the SC immunisation. The rAT121A/91-His₂₁₂ was also combined with aluminum gel and given by the SC route. This immunisation resulted in an inflammatory reaction at the injection site.

Sera from mice immunised IP with either of the variant alphatoxins in MF59 were tested in an ELISA and in an *in vitro* haemolysis neutralisation assay. This route of immunisation induced ELISA anti-alphatoxin titres of 1:1,024,000. Although the magnitude of the ELISA titre was the same for both variants, the rAT121A/91-His₂₁₂ variant induced anti-sera with higher anti-haemolytic activity. As the IP immunisation is restricted to the mouse model, SC vaccination was also evaluated. Using this route with rAT121A/91-His₂₁₂ and MF59 resulted in four-fold lower ELISA titres than induced by the IP immunisation. However, the anti-haemolytic activity of the sera induced by the SC immunisation were twice the magnitude of the IP immunisation.

Sera from the immunised mice were also tested for the ability to inhibit the enzymatic cleavage of alphatoxin substrates. Sera from mice immunised with either variant and MF59 were able to inhibit this reaction, however sera from aluminum gel adjuvanted vaccine groups or non-adjuvanted groups did not inhibit PLC-hydrolysis.

In toxin challenge assays the rAT121A/91-His₂₁₂ was clearly superior to the rAT121A/91. When the animals were vaccinated using the MF59 adjuvant, survival rates for the rAT121A/91-His₂₁₂ variant were 76% for the IP vaccinated group and 42% for the SC vaccinated group. Immunisation with the rAT121A/91 variant in MF59 did not produce any enhancement of survival when compared to the adjuvant controls. In these studies the highest survival rate in the adjuvant controls was 17%.

The results from the *in vivo* challenge studies were verified by an *in vitro* neutralisation assay. In this assay alphatoxin is pre-incubated with antiserum prior to injection into mice. The results of this study showed that only animals that were injected with alphatoxin, which had been pre-incubated with anti-sera from rAT121A/91-His₂₁₂ and MF59 immunised animals, survived.

After the vaccination of mice with the construct rAT121A/91-His₂₁₂, which was obtained through *in vitro* mutagenesis, anti-sera that neutralised the enzymatic activity and the haemolytic activity of *C. perfringens* alphatoxin were induced. The intraperitoneal immunisation using this construct and an oil-in-water adjuvant inhibited the lethal effects of the wild-type toxin in *in vitro* neutralisation assays and significantly reduced it *in vivo* challenge assays. This shows that the rAT121A/91-His₂₁₂ variant can be used for the active immunisation against the alphatoxin of *C. perfringens*.

8 Literaturverzeichnis

Anonym, 1997. Strep-tag: Produktion rekombinanter Proteine. Handbuch des Instituts für Bioanalytik, Göttingen, Deutschland.

Anonym, 1999. Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörperproduktion in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren. Richtlinie Tierschutz 3.04 des Bundesamts für Veterinärwesen, Bern, Schweiz.

Asmuth, D.M., R.D. Olson, S.P. Hackett, A.E. Bryant, R.K. Tweten, J.Y. Tso, T. Zollerman, and D.L. Stevens. 1995. Effects of *Clostridium perfringens* recombinant and crude phospholipase C and theta-toxin on rabbit hemodynamic parameters. J. Infect. Dis. **172**: 1317-1323.

Awad, M.M., A.E. Bryant, D.L. Stevens, and J.I. Rood. 1995. Virulence studies on chromosomal alpha-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. Mol. Microbiol. **15**: 191-202.

Baba, E., A.L. Fuller, J.M. Gilbert, S.G. Thayer, and L.R. Mc Dougald. 1992. Effects of *Eimeria burnetti* infection and dietary zinc on experimental induction of necrotic enteritis in broiler chickens. Avian Dis. **36**: 59-62.

Blow, D. 1991. Enzymology. Lipases reach the surface. Nature **351**: 444-445.

Boethius, J., B. Rydqvist, R. Möllby, and T. Waldström. 1973. Effect of a highly purified phospholipase C on some electrophysiological properties of the frog muscle fibre membrane. Life Sci. **13**: 411-418.

Bryant, A.E., R. Bergstrom, G.A. Zimmerman, J.L. Salyer, H.R. Hill, R.K. Tweten, H. Sato, and D.L. Stevens. 1993. *Clostridium perfringens* invasiveness is enhanced by effects of theta-toxin upon PMNL structure and function: the roles of leukocytotoxicity and expression of CD11/CD18 adherence glycoprotein. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **7**: 321-336.

Bryant, A.E., and D.L. Stevens. 1996. Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**: 358-362.

Brzozowski, A.M., U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hüge-Jensen, S.A. Patkar, and L. Thim. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**: 491-494.

Bunting, M., D.E. Lorant, A.E. Bryant, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, D.L. Stevens, and S.M. Prescott. 1997. Alpha-toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **100**: 565-574.

Conway, H. 1946. Anaerobic infection and gangrene of war wounds in casualties from the Philippine Islands. *Surgery* **19**: 553-561.

Cygan, Z., and J. Buczek. 1993. Nonenterotoxigenic anaerobe *Clostridium perfringens* A as a cause of calf diarrhoea. *Medycyna Wet* **49**: 469-471.

De Gier, J., and L.L.M. van Deenen. 1961. Some lipid characteristics of red cell membranes of various animal species. *Biochim. Biophys. Acta* **49**: 286-296.

Exton, J.H. 1990. Signalling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* **265**: 1-4.

Fehrenbach, F.J., and D. Jürgens. 1991. Co-operative membrane-active (lytic) processes. *In* Sourcebook of bacterial Protein Toxins ed. J.E. Alouf, and J.H. Freer pp. 187-213. London: Academic Press.

Flores-Diaz, M., A. Alape-Girón, B. Persson, P. Pollosello, M. Moos, C. von Eichel-Streiber, M. Thelestam, and I. Florin. 1997. Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 23784-23791.

Fuji, Y., S. Nomura, Y. Oshita, and J. Sakurai. 1986. Excitatory effect of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on the rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **88**: 531-539.

Fuji, Y., and J. Sakurai. 1989. Contraction of the rat isolated aorta caused by *Clostridium perfringens* alpha-toxin (phospholipase C); evidence for the involvement of arachidonic acid metabolism. *Br. J. Pharmacol.* **97**: 119-124.

Gaillard, J.-L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti. 1987. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **55**: 2822-2829.

Geoffroy, C. J., J.-L. Raveneau, A. Beretti, J.-A. Leckroisey, J.E. Vaquez-Boland, J.E. Alouf, and P. Berche. 1991. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **59**: 2382-2388.

Gilmore, M.S., A.L. Cruz-Rodz, M. Leimeister-Wachter, J. Kreft, and W. Goebbel. 1989. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes; nucleotide sequence and genetic linkage. *J. Bacteriol.* **171**: 744-753.

Ginter, A., E.D. Williamson, F. Dessy, P. Coppe, A. Fearn, and R.W. Titball. 1996. Molecular variation between the alpha-toxin from the type strain (NCTC8237) and clinical isolates of *Clostridium perfringens* associated with disease in man and animals. *Microbiology* **142**: 191-198.

Goldfine, H., T. Bannam, N.C. Johnston, and W.R. Zückert. 1998. Bacterial phospholipases and intracellular growth: the two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes*. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Sup.* **84**: 7S-14S.

Goldfine, H., N.C. Johnston, and C. Knob. 1993. Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100 mixed micelles and in biological membranes. *J. Bacteriol.* **175**: 4298-4306.

- Guillouard, I., P.M. Alzari, B. Saliou, and S.T. Cole.** 1997. The carboxy-terminal C₂-like domain of the alpha-toxin from *Clostridium perfringens* mediates calcium-dependent membrane recognition. *Mol. Microbiol.* **26**: 867-876.
- Guillouard, I., T. Garnier, and S.T. Cole.** 1996. Use of site-directed mutagenesis to probe structure-function relationship of alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **64**: 2440-2444.
- Gustafson, C., R. Sjødahl, and C. Tagesson.** 1990. Phospholipase C activation and arachidonic acid release in intestinal epithelial cells from patients with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **25**: 1151-1160.
- Hanly, W.C., J.E. Artwohl, and B.T. Bennet.** 1995. Review of polyclonal antibody procedures in mammals and poultry. *ILAR Journal* **37**: 1-36.
- Hansen, S., L.K. Hansen, and E. Hough.** 1992. Crystal structures of phosphate, iodide, and iodide-inhibited phospholipase C from *Bacillus cereus* and structural investigations of the binding of reaction products and a substrate analogue. *J. Mol. Biol.* **225**: 543-549.
- Hansen, S., L.K. Hansen, and E. Hough.** 1993. The crystal structure of tris-inhibited phospholipase C from *Bacillus cereus* at 1.9Å resolution; nature of the metal ion in site 2. *J. Mol. Biol.* **231**: 870-876.
- Hansen, S., and E. Hough.** 1993. Crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus* complexed with a substrate analog. *J. Mol. Biol.* **234**: 179-187.
- Hartinger, J., and W. Mateis.** 1998. Steckbriefe immunologischer Adjuvantien II: Alum, Aluminiumgel, Allhydrogel, Adjuphos, Alu-Gel-S. *Der Tierschutzbeauftragte* **1**: 47-48.
- Hough, E., L.K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordvik, C. Little, E. Dodson, and Z. Derewenda.** 1989. High resolution crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature* **338**: 357-360.

Hurn, B.A.L., and S.M. Chantler. 1980. Production of reagent antibodies. *Methods Enzymol.* **70**: 104-142.

Ito, A. 1968. Purification and toxoiding of alpha-toxin of *Clostridium perfringens (welchii)*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **21**: 379-391.

Jepson, M., A. Howells, H.L. Bullifent, B. Bolgiano, D. Crane, J. Miller, J. Holley, P. Jayasekerea, and R.W. Titball. 1999. Differences in the carboxy-terminal (putative phospholipid binding) domains of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans* phospholipases C influence the hemolytic and lethal properties of these enzymes. *Infect. Immun.* **67**: 3297-3301.

Johannsen, U., P. Arnold, B. Köhler, and H.-J. Selbitz. 1993. Untersuchungen zur experimentellen *Clostridium perfringens* Typ A Enterotoxämie der Saugferkel. *Mh. Vet. Med.* **48**: 129-136.

Johansen, T., T. Holm, P.H. Guddal, K. Sletten, F.B. Haugli, and C. Little. 1988. Cloning and sequencing of the gene encoding the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C of *Bacillus cereus*. *Gene* **65**: 293-304.

Jolivet-Reynaud, C., H. Moreau, and J.E. Alouf. 1988. Purification of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* phospholipase C. *Methods Enzymol.* **165**: 91-94.

Kenney, J.S., B.W. Hughes, M.P. Masada, and A.C. Allison. 1989. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *J. Immunol. Methods* **121**: 157-166.

Kunkel, T.A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 488-492.

Krug, E.L., and C. Kent. 1984. Phospholipase C from *Clostridium perfringens*: preparation and characterisation of homogenous enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **231**: 400-410.

- Kyhse-Anderson, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203-209.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lewis, G.M., and M.G. Mac Farlane.** 1953. The lecithinase of *Clostridium bifermentans* toxin. *Biochem. J.* **54**: 138-142.
- Logan, A.J., E.D. Williamson, R.W. Titball, D.A. Percival, A.D. Shuttleworth, J.W. Conlan, and D.C. Kelly.** 1991. Epitope mapping of the alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **59**: 4338-4342.
- Long, J.R., and R.B. Truscott.** 1976. Necrotic enteritis in broiler chickens. III Reproduction of disease. *Can. J. Comp. Med.* **40**: 53-59.
- Mac Farlane, M.G.** 1950. The biochemistry of bacterial toxins. 4. The lecithinase activity of *Clostridium haemolyticum* toxin. *Biochem. J.* **47**: 267-270.
- Mac Farlane, M.G., and B.C.J.G. Knight.** 1941. The biochemistry of bacterial toxins. 1. Lecithinase activity of *Clostridium welchii* toxins. *Biochem. J.* **35**: 884-902.
- Mac Lennan, J.D.** 1943. Anaerobic infections in war wounds in the middle east. *Lancet* **63**: 94-99.
- Mac Lennan, J.D.** 1962. The histotoxic clostridial infections of man. *Bac. Rev.* **26**: 77-274.
- Martin, S.F., and P.J. Hergenrother.** 1998. General base catalysis by the phosphatidylcholin-preferring phospholipase C from *Bacillus cereus*: The role of Glu4 and Asp55. *Biochemistry* **37**: 5755-5760.

- Martin, S.F., and P.J. Hergenrother.** 1999. Catalytic cycle of the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C from *Bacillus cereus*. Solvent viscosity, deuterium isotope effects, and proton inventory studies. *Biochemistry* **38**: 4403-4408.
- McDonel, J.L.** 1986. Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D, D, and E. In *Pharmacology of bacterial toxins* ed. F. Dorner and J. Drews pp. 477-517. Oxford: Pergamon Press.
- McNee, J.W., and J.S. Dunn.** 1917. The method of spread of gas gangrene into living muscle. *Br. Med. J.* **1**: 727-729.
- Miles, E.M., and A.A. Miles.** 1948. The lecithinase of *Clostridium bifermentans* and its relation to the alpha-toxin of *Clostridium welchii*. *J. Gen. Microbiol.* **1**: 385-399.
- Moreau, H., G. Pieroni, C. Jolivet-Reynaud, J.E. Alouf, and R. Verger.** 1988. A new kinetic approach for studying phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha-toxin) activity on phospholipid monolayers. *Biochemistry* **27**: 2319-2323.
- Murrell, W.G., B.J. Stewart, C. O'Neil, S. Sirkas, and S. Kariks.** 1993. Enterotoxigenic bacteria in the sudden infant death syndrome. *J. Med. Microbiol.* **39**: 114-127.
- Nagahama, M., Michiue, K., and J. Sakurai.** 1996. Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1280**: 120-126.
- Nagahama, M., T. Nakayama, K. Michiue, and J. Sakurai.** 1997. Site specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130 or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities. *Infect. Immun.* **65**: 3489-3492.
- Nagahama, M., Y. Okagawa, T. Nakayama, E. Nishioka, and J. Sakurai.** 1995. Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J. Bacteriol.* **177**: 1179-1185.

- Nakamura, A., T. Shimamura, M. Hayase, and S. Nishida.** 1976. Numerical taxonomy of saccharolytic Clostridia, particularly *Clostridium perfringens*-like strains: descriptions of *Clostridium absonum* sp. n. and *Clostridium paraperfringens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 419-429.
- Nalefski, E.A., and J.J. Falke.** 1996. The C2 domain calcium binding motif: structural and functional diversity. *Prot. Sci.* **12**: 2375-2390.
- Naylor, C.E., J.T. Eaton, A. Howells, N. Justin, D.S. Moss, R.W. Titball, and A.K. Basak.** 1998. Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 738-746.
- Naylor, C.E., M. Jepson, D.T. Crane, R.W. Titball, J. Miller, A.K. Basak, and B. Bolgiano.** 1999. Characterisation of the calcium-binding C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J. Mol. Biol.* **294**: 757-770.
- Newton, A.C.** 1995. Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr. Biol.* **5**: 973-976.
- Ohsaka, A., M. Tsuchiya, C. Oshio, M. Miyairi, K. Suzuki, and Y. Yamakawa.** 1978. Aggregation of platelets in the mesenteric microcirculation of the rat induced by alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Toxicon* **16**: 333-341.
- Olhagen, B.** 1976. Intestinal *Clostridium perfringens* in arthritis and allied conditions. *In* *Infection and Immunology in the Rheumatic Disease* ed. D.C. Dumonde pp. 141-145. London: Blackwell Scientific Publikations.
- Ostroff, R.M., A.I. Vasil, and M.L. Vasil.** 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**: 5915-5923.
- Otnaess, A.-B., C. Little, K. Sletten, R. Wallin, S. Johnsen, R. Flensgrud, and H. Prydz.** 1977. Some characteristics of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Eur. J. Biochem.* **79**: 459-468.

Ott, G., G.L. Barchfeld, D. Chernoff, R. Radhakrishnan, P. van Hoogevest, and G. van Nest. 1995. MF59-Design and Evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *In Vaccine Design: The subunit and Adjuvant Approach* ed. M.F. Powell, and M.J. Newman pp. 277-296. Plenum Press, New York.

Ott, G., G.L. Barchfeld, G. van Nest. 1995. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with a simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine* **13**: 1557-62.

Ottolenghi, A.C. 1965. Phospholipase C from *Bacillus cereus*, a zinc requiring metalloenzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **106**: 510-518.

Owen-Smith, M.S. 1968. Successful prophylaxis of gas gangrene of the high-velocity missile wound in sheep. *Br. J. Surg.* **55**: 36-39.

Oyston, P.C., D.W. Payne, H.L. Havard, E.D. Williamson, and R.W. Titball. 1998. Production of a non-toxic site directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin which induces protective immunity in mice. *Microbiology* **144**: 333-341.

Pache, C., H. Potschka, P. van Moll, H. Schoepe, L.H. Wieler und T. Schlapp. 1996. Molekulare Charakterisierung von *Clostridium perfringens* Feldstämmen. Posterbeitrag zur Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und bakterielle Krankheiten der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.

Pauels, H.-G. 2001

Persönliche Kommunikation.

Perisic, O., S. Fong, D.E. Lynch, M. Bycroft, and R.L. Williams. 1998. Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **273**: 1596-1604.

Petit, L., M. Gibert, and M.R. Popoff. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* **7**: 104-110.

- Portnoy D.A., and S. Jones.** 1994. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection (escape from a vacuole). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **730**: 15-25.
- Roberston, M., and J. Keppie.** 1943. Gas gangrene. Active immunisation by means of concentrated toxoids. *Lancet* **2**: 311-314.
- Rood, J.I., and S.T. Cole.** 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55**: 621-648.
- Sakurai, J., S. Ochi, and H. Tanaka.** 1994. Regulation of *Clostridium perfringens* alpha-toxin activated phospholipase C in rabbit erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* **62**: 717-721.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5464-5467.
- Samuelsson, B.** 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**: 568-575.
- Sato, H., Y. Yamakawa, A. Ito, and R. Murata.** 1978. Effect of zinc and calcium ions on the production of alpha-toxin and proteases by *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **20**: 325-333.
- Schlapp, T., I. Blaha, R. Bauerfeind, L.H. Wieler, H. Schoepe, R. Weiss and G. Baljer.** 1995. Synthesis and evaluation of a non-radioactive gene probe for the detection of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Mol. Cell. Probes* **9**: 101-109.
- Schoepe, H., C. Pache, A. Neubauer, H. Potschka, T. Schlapp, L.H. Wieler, and G. Baljer.** 2001. Naturally occurring *Clostridium perfringens* nontoxic alpha-toxin variant as a potential vaccine candidate against alpha-toxin-associated diseases. *Infect. Immun.* **69**: 7194-7196.
- Schoepe, H., L.H. Wieler, R. Bauerfeind, T. Schlapp, H. Potschka, H.-R. Hehnen, and G. Baljer.** 1997. Neutralization of hemolytic and mouse lethal activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin needs simultaneous blockade of two epitopes by monoclonal antibodies. *Microb. Pathog.* **23**: 1-10.

Scott, D.L., S.P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.H. Gelb, and P.B. Sigler. 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science* **250**: 1541-1546.

Selbitz, H.-J. 1992. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Stuttgart: Enke Verlag.

Sharma S., F. Georges, L.T. Delbaere, J.S. Lee, R.E. Klevit, and E.B. Waygood. 1991. Epitope mapping by mutagenesis distinguishes between the two tertiary structures of the histidine-containing protein HPr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4877-4881.

Siarakas, S., E. Damas, and W.G. Murrell. 1997. The effect of enteric bacterial toxins on the catecholamine levels of the rabbit. *Pathology* **29**: 278-285.

Skerra, A. 1994. Use of the tetracyclin promotor for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**: 131-135.

Smith, G.A., H. Marquis, S. Jones, N.C. Johnston, D.A. Portnoy, and H. Goldfine. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **63**: 4231-4237.

Songer, J.G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* **5**: 156-161.

Stevens, D.L., T.K. Tweten, M.M. Awad, J.I. Rood, and A.E. Bryant. 1997. Clostridial gas gangrene: evidence that alpha- and theta- toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis. *J. Infect. Dis.* **176**: 189-195.

Strunk, S.W., C.W. Smith, and J.M. Blumberg. 1967. Ultrastructural changes on the lesion produced in skeletal muscle fibres by *Clostridium welchii* type A toxin. *Am. J. Pathol.* **50**: 89-107.

Stryer, L. 1996. Biochemie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Taguchi, R., and H. Ikezawa. 1975. Phospholipase C from *Clostridium novyi* type A. *Biochim. Biophys. Acta* **409**: 75-85.

Taguchi, R., and H. Ikezawa. 1976. Studies of the hemolytic and hydrolytic actions of phospholipases against mammalian erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**: 538-545.

Takahashi, T., T. Sugahara, and A. Ohsake. 1981. Phospholipase C from *Clostridium perfringens*. *Methods Enzymol.* **71**: 710-725.

Tan, C.A., and M.F. Roberts. 1998. Engineering of the nonspecific phospholipase C from *Bacillus cereus*: replacement of glutamin acid-4 by alanine results in loss of activity of interfacial catalysis and enhanced phosphomonoesterase activity. *Biochemistry* **37**: 4275-4279.

Tilney, L.G., and D.A. Portnoy. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **109**: 1597-1608.

Titball, R.W. 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiol. Rev.* **57**: 347-366.

Titball, R.W. 1997. Clostridial phospholipases. *In* *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis* pp. 224-241. London: Academic Press Ltd.

Titball, R.W. 1998. Bacterial phospholipases. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Sup.* **84**: 127S-137S.

Titball, R.W., S.E.C. Hunter, K.L. Martin, B.C. Morris, A.D. Shuttleworth, T. Rubidge, D.W. Anderson, and D.C. Kelly. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **57**: 367-376.

Titball, R.W., D.L. Leslie, S. Harvey, and D. Kelly. 1991. Hemolytic and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin are dependent on a domain homologous to that of an enzyme from the human arachidonic acid pathway. *Infect. Immun.* **59**: 1872-1874.

Titball, R.W., C.E. Naylor, and A.K. Basak. 1999. The *Clostridium perfringens* alphatoxin. *Anaerobe* **5**: 51-64.

Tso, J.Y., and C. Siebel. 1989. Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Infect. Immun.* **57**: 468-476.

- Tsutsui, K., J. Minami, O. Matsushita, S. Katayama, Y. Taniguchi, S. Nakamura, M. Nishioka, and A. Okabe.** 1995. Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* types A to E and *Clostridium novyi*. *J. Bacteriol.* **177**: 7164-7170.
- Van de Weerd, H.A.** 1996. Environmental enrichment for laboratory mice. Preferences and consequences. *Vet. Med. Diss.*, Utrecht, Niederlande.
- Valensi, J.-P. M., J.R. Carlson, and G.A. van Nest.** 1994. Systemic cytokine profiles in balb/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J. Immunol.* **153**: 4029-4039.
- Vallee, B.L., and D.S. Auld.** 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* **29**: 5647-5659.
- Vazquez-Boland, J.-A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossard.** 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-cell spread. *Infect. Immun.* **60**: 219-230.
- Voss, S., and A. Skerra.** 1997. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**: 975-982.
- White, R.G., A.H. Coons, and J.M. Connolly.** 1955. Studies on antibody production. III The alum granuloma. *J. Exp. Med.* **102**: 73-82.
- Willis, T.A.** 1969. *Clostridia of wound infection*. London: Butterworths.
- Williamson, E.D., and R.W. Titball.** 1993. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine* **11**: 1253-1258.
- Young, P.R., W.R. Snyder, and F. McMahon.** 1991. Inhibition of the *Clostridium perfringens* phospholipase C hydrolysis of a thiophosphate analog of lysophosphatidylcholine by micelle-bound ammonium and sulfonium cations. *Lipids* **26**: 957-959.

Zückert, W.R., H. Marquis, and H. Goldfine. 1998. Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad range phospholipase C by amino acid substitution and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog. *Infect. Immun.* **66**: 4823-4831.

9 Anhang

9.1 Chemikalien

Anorganische und organische Reagenzien wurden von Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen.

9.2 Antikörperkonjugate und Enzyme

Antikörperkonjugate wurden bezogen von Amersham (Braunschweig), Dianova (Hamburg) und Jackson Immuno Research (U.S.A.). Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden bezogen von Amersham (Braunschweig), Biolabs (Schwalbach), Biozym (Hameln), MBI Fermentas (St. Leon Roth) und Pharmacia (Freiburg).

9.3 Plasmide

pASK-75	Amp ^r	Institut für Bioanalytik Göttingen
pASK-IBA2	Amp ^r	Institut für Bioanalytik Göttingen

9.4 Kulturmedien

LB-Medium

Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	10g
Aqua bidest	ad 1000ml

LB-Agar

Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	10g
Agar-Agar	20g
Aqua bidest	ad 1000ml

Eigelblaktoseagar

Laktose	1g
Bromkresolpurpurlösung 0,4%	1ml
Eigelb	15-20ml
NaCl-Lösung 0,85%ig	15-20ml

EADT-Agar

Agar-Agar	1,1g
NaCl-Lösung 20%ig	11,0ml
ZnCl-Lösung (1M)	15,0µl
Eigelbsuspension	11,0ml
Aqua bidest	88,0ml

Zeissleragar

Columbiaagar	52g
Glucose	10g
Blut	ca. 50ml
Aqua bidest	ad 1000ml

SOB-Medium

Trypton	20g
Hefeextrakt	5g
NaCl	0,5g
Aqua bidest	ad 1000ml
1M MgCl	10ml
1M MgSO ₄	10ml

SOC Medium

SOB Medium	100ml
20% (w/v) Glukose	2ml

9.5 Puffer und Lösungen**9.5.1 SDS-Polyacryamidgelelektrophorese Puffer**

Trenngelpuffer (1,5M, pH 8.8)

Tris	181,71g
Aqua bidest	ad 1000ml
pH-Wert einstellen mit 37% HCl	

Sammelgelpuffer (1M, pH 8.9)

Tris	121,14g
Aqua bidest	ad 1000 ml
pH-Wert einstellen mit 37% HCl	

Elektrophoreselaufpuffer

Tris	3,03g
Glycin	14,40g
SDS	1,00g
Aqua bidest	ad 1000ml

Probenpuffer nach LAEMMLI

Bromphenolblau	0,05g
SDS	23,00g
Glyzerol	100,00g
Tris	7,50g
Aqua bidest	ad 1000ml
pH 6.8 einstellen mit 37% HCl	

Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung

Coomassie-Brilliantblau	100ml
Eisessig	10ml
Methanol	40ml
Aqua bidest	50ml

Coomassie-Entfärber

Eisessig	10ml
Methanol	40ml
Aqua bidest	50ml

9.5.2 Puffer für den Elektrotransfer mittels Western-Blot-Verfahren

Tris-Lösung (1M, pH 9.0)

Tris	121,14g
Aqua bidest	ad 1000ml

Anodenpuffer I

1M Tris	300ml
Methanol	200ml
Aqua bidest	500ml

Anodenpuffer II

1M Tris	25ml
Methanol	200ml
Aqua bidest	770ml

Kathodenpuffer

1M Tris	25ml
Epsilon-Aminocaprinsäure	5,25g
Methanol	200ml
Aqua bidest	770ml

9.5.3 Puffer und Lösungen für den Immunoblot

PBS-Stammlösung (10-fach)

NaCl	100,00g
KCl	2,50g
KH ₂ PO ₄	2,50g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	18,00g
Aqua bidest	ad 1000ml

pH-Wert der Gebrauchslösung mittels 37% HCl bzw. gesättigter NaOH einstellen

PBS-Tween

NaH ₂ PO ₄	0,94g
Na ₂ HPO ₄	1,00g
NaCl	16,36g
Tween 20	1,00ml
Aqua bidest.	ad 2000ml

pH-Wert einstellen mittels 37% HCl bzw. gesättigter NaOH

Substratlösung für den Immunoblot

4-Chlor-1-Naphtol	3mg
Methanol	1ml

Substratgebrauchslösung für den Immunoblot

Stammlösung	2ml
1xPBS, pH 7.4	8ml
H ₂ O ₂	5µl

9.5.4 Puffer und Lösungen für ELISA

Coating-Puffer Stammlösung A

Na ₂ CO ₃	2,12g
Aqua bidest.	ad 100ml

Coating-Puffer Stammlösung B

NaHCO ₃	1,68g
Aqua bidest.	ad 100ml

Gebrauchslösung Coating-Puffer

Stammlösung A	85,00ml
Stammlösung B	40,00ml

Substratpuffer

C ₆ H ₈ O ₇	2,34g
Na ₂ HPO ₄	5,09g
Aqua bidest	ad 500ml

9.5.5 Puffer für Hämolyseversuche

Natrium-Citrat-Lösung

Na-Citrat	3,8g
Aqua bidest	100ml

Isotoner Waschpuffer

NaCl	135,00mM
NaHCO ₃	11,90mM
NaH ₂ PO ₄	0,36mM
Dextrose	5,00mM
KCl	1,50mM
MgCl ₂	0,98mM
Hepes	4,60mM

pH-Wert einstellen mit HCl

9.5.6 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (10x) pH8,3

Tris-Cl	1M
Borsäure	1M
EDTA	20mM

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25%
XylenCyanol FF	0,25%
Ficoll	15%

KB-Ladder Gebrauchslösung

KB-Ladder (Gibco, Eggenstein)	20µl
Aqua bidest	20µl
DNA-Probenpuffer	10µl

9.6 Injektionsnarkotikum

Avertin^R

2,2,2 Tribrommethanol	2g
tertiärer Amylalkohol	2ml
Aqua bidest	ad 100ml

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die stets gewährte Unterstützung während der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Des weiteren danke ich Heike Schoepe für die Betreuung und Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Bei der Zusammenarbeit mit Heike habe ich grundlegende Strategien des wissenschaftlichen Arbeitens gelernt - hiervon profitiere ich heute noch. Ein besonderer Dank gilt den (ehemaligen) Mitarbeitern/Innen der Clostridien Arbeitsgruppe Sabine Grözl-Krug, Christian Pache, Astrid König, und Annette Kiessling, die mich - jeder auf seine Art - konsequent unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Co-Doktoranden/Innen für den Spaß den ich mit ihnen hatte- besonders bei Steffi Barth, Kai-Uwe Brodersen und Barbara Busse. Ein herzlicher Dank geht auch an alle übrigen MitarbeiterInnen des Instituts für das angenehme Arbeitsklima.

Obwohl er nicht direkt in meine Arbeit involviert war, ist es eine schöne Gelegenheit mich bei Reinhard Weiss für seine stets wertvollen Ratschläge zu bedanken.

Danke auch an alle MitarbeiterInnen der Firma bioScreen, die mich ertragen haben, wenn ich Montags übellaunig ins Labor gekommen bin, weil ich mit dem Schreiben nicht vorangekommen bin. Hervorheben möchte ich hier Stefan Pesch, der aus den gleichen Gründen immer noch schlechter drauf war, und Petra Trahe, die sich immer geduldig mein Gejammer angehört hat.

Beim finalen Korrekturlesen in großer Hektik haben mich netterweise meine Kollegen/Innen der Boehringer Ingelheim Vetmedica -besonders Doris Westhoff und Ulrike Helm- tatkräftig unterstützt. Vielen Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Sandy Sell, die mich während des praktischen Teils in ihrer unnachahmlichen Art immer wieder aufgefangen und motiviert hat. Vielen lieben Dank auch für die tolle Unterstützung kurz vor dem Einreichen, als es noch mal so richtig häßlich wurde. Danken möchte ich auch meinen Freunden Kai-Uwe Radomski, Veit Kostka und ganz besonders Maike Blessenohl, die ich immer an meiner Seite wußte.