

**Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig**

**Untersuchungen zum Einfluss von
neurotoxinhaltigen Kulturüberständen der
Clostridium botulinum Toxovare A bis G auf
eukaryote Degradierungssysteme am
Modellorganismus *Tetrahymena pyriformis* GL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Norman Martin Ständer
aus Hagenow

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. sc. Monika Krüger

Gutachter: Prof. Dr. sc. Monika Krüger
Institut für Bakteriologie und Mykologie,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

PD Dr. Reinhard Straubinger
Institut für Immunologie,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Dr. Helge Böhnelt
Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen,
Georg-August-Universität Göttingen

Tag der Verteidigung: 12. Dezember 2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abkürzungsverzeichnis	
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	<i>Clostridium botulinum</i> (<i>C. botulinum</i>)	2
2.1.1	Einführung	2
2.1.2	Taxonomie	2
2.1.3	Vorkommen	4
2.1.4	Toxine	4
2.1.4.1	Botulinumneurotoxine (BoNTs)	5
2.1.4.1.1	Bedeutung	8
2.1.4.1.2	Wirkungsweise	8
2.1.4.1.3	Wege in die Zelle	9
2.1.4.1.4	Nachweis von BoNTs	10
2.1.4.1.5	Einsatz als molekularbiologisches Werkzeug	12
2.2	SNARE-Komplex	12
2.2.1	Vorkommen und Bedeutung	12
2.2.2	Aufbau und Prinzip	12
2.2.3	Der SNARE-Komplex und BoNTs	14
2.3	SNAREs und eukaryote Degradierungssysteme	16
2.3.1	Die Rolle von SNAREs in Degradierungssystemen bei Metazoa	16
2.3.1.1	Nutzung der BoNT-beeinflussten Phagozytose als diagnostisches Verfahren	16
2.3.2	Die Rolle von SNAREs in Degradierungssystemen bei Protozoa	17
2.4	<i>Tetrahymena pyriformis</i> GL (<i>T. pyriformis</i>)	18
2.4.1	Einführung	18
2.4.1.1	Taxonomie	18
2.4.1.2	Morphologie	18
2.4.1.3	Vorkommen und Lebensweise	20
2.4.2	Wege in das innere Milieu	20
2.4.2.1	Zellmembranen und Pinozytose	21
2.4.2.2	Zytostom-Zytopharynx-Komplex und Phagozytose	22
2.4.3	Sekretion von Enzymen	25
2.4.3.1	Saure Phosphatase	27

Inhaltsverzeichnis

2.4.4	Modellfunktion und Einsatz als biologischer Indikator	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Produktion der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände von <i>C. botulinum</i> sowie entsprechender Kontrollüberstände	30
3.1.1	Herkunft der Clostridien-Spezies	30
3.1.2	Herstellung und Gewinnung der Kulturüberstände	30
3.1.3	Quantifizierung der BoNTs	32
3.1.4	Weitere Untersuchungen der Kulturüberstände	33
3.2	<i>T. pyriformis</i>	33
3.2.1	Herkunft	33
3.2.2	Haltung und Wachstumskinetik	33
3.2.3	Entwicklung des Phagozytostests	34
3.2.3.1	Einstellen der Bakterienzahl	34
3.2.3.1.1	Reproduzierbarkeit der <i>E. coli</i> K12-Quantifizierung	34
3.2.3.2	Einfluss des Reaktionsmediums auf <i>E. coli</i> K12 und <i>T. pyriformis</i>	35
3.2.3.3	Einfluss der Vorkultivierung von <i>T. pyriformis</i>	35
3.2.3.4	Ermittlung der optimalen Zellzahlen	36
3.2.3.5	Weitere Untersuchungen des Phagozytostests	37
3.2.3.6	Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose	38
3.2.3.7	Einfluss der Kulturüberstände auf <i>E. coli</i> K12	38
3.2.4	Entwicklung des Exozytostests	39
3.2.4.1	Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung	39
3.2.4.2	Ermittlung des Reaktionsmediums	39
3.2.4.3	Ermittlung der optimalen Zellzahl	40
3.2.4.4	Ermittlung der Inkubationsdauer	40
3.2.4.5	Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes	41
3.2.4.6	Optimierung des Exozytostests	41
3.2.4.7	Weitere Untersuchungen des Exozytostests	42
3.2.5	Untersuchungen zur Aktivität der sauren Phosphatase	42
3.2.5.1	Aktivitätsverlauf	42
3.2.5.2	Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlauf	43
3.2.6	Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs in den entwickelten Tests	43
3.3	Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände	44
3.3.1	Phagozytoseversuche	44
3.3.2	Exozytoseversuche	45
3.4	Auswertung	46
3.4.1	Phagozytoseversuche	46

3.4.2	Exozytoseversuche	46
3.4.3	Biostatistische Auswertung	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Produktion der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände von <i>C. botulinum</i> sowie entsprechender Kontrollüberstände	48
4.1.1	Weitere Untersuchungen der Kulturüberstände	48
4.2	<i>T. pyriformis</i>	48
4.2.1	Wachstumskinetik	48
4.2.2	Entwicklung des Phagozytostests	51
4.2.2.1	Einstellen der Bakterienzahl	51
4.2.2.1.1	Reproduzierbarkeit der <i>E. coli</i> K12-Quantifizierung	51
4.2.2.2	Einfluss des Reaktionsmediums auf <i>E. coli</i> K12 und <i>T. pyriformis</i>	52
4.2.2.3	Einfluss der Vorkultivierung von <i>T. pyriformis</i>	52
4.2.2.4	Ermittlung der optimalen Zellzahlen	52
4.2.2.5	Weitere Untersuchungen des Phagozytostests	54
4.2.2.6	Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose	55
4.2.2.7	Einfluss der Kulturüberstände auf <i>E. coli</i> K12	56
4.2.3	Entwicklung des Exozytostests	56
4.2.3.1	Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung	57
4.2.3.2	Ermittlung des Reaktionsmediums	57
4.2.3.3	Ermittlung der optimalen Zellzahlen	57
4.2.3.4	Ermittlung der Inkubationsdauer	58
4.2.3.5	Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes	58
4.2.3.6	Optimierung des Exozytostests	58
4.2.3.7	Weitere Untersuchungen des Exozytostests	58
4.2.4	Untersuchungen zur Aktivität der sauren Phosphatase	59
4.2.4.1	Aktivitätsverlauf	59
4.2.4.2	Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlauf	59
4.2.5	Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs in den entwickelten Tests	60
4.3	Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände	61
4.3.1	Phagozytoseversuche	61
4.3.2	Exozytoseversuche	64
5	Diskussion	68
5.1	Produktion der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände von <i>C. botulinum</i> sowie entsprechender Kontrollüberstände	68
5.1.1	Weitere Untersuchungen der Kulturüberstände	69
5.2	<i>T. pyriformis</i>	69

Inhaltsverzeichnis

5.2.1	Wachstumskinetik	70
5.2.2	Entwicklung des Phagozytostests	72
5.2.2.1	Einstellen der Bakterienzahl	73
5.2.2.1.1	Reproduzierbarkeit der <i>E. coli</i> K12-Quantifizierung	73
5.2.2.2	Einfluss des Reaktionsmediums auf <i>E. coli</i> K12 und <i>T. pyriformis</i>	73
5.2.2.3	Einfluss der Vorkultivierung von <i>T. pyriformis</i>	74
5.2.2.4	Ermittlung der optimalen Zellzahlen	74
5.2.2.5	Weitere Untersuchungen des Phagozytostests	74
5.2.2.6	Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose	75
5.2.2.7	Einfluss der Kulturüberstände auf <i>E. coli</i> K12	76
5.2.3	Entwicklung des Exozytostests	77
5.2.3.1	Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung	77
5.2.3.2	Ermittlung des Reaktionsmediums	77
5.2.3.3	Ermittlung der optimalen Zellzahlen	78
5.2.3.4	Ermittlung der Inkubationsdauer	78
5.2.3.5	Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes	78
5.2.3.6	Optimierung des Exozytostests	79
5.2.3.7	Weitere Untersuchungen des Exozytostests	79
5.2.4	Untersuchungen zur Aktivität der sauren Phosphatase	79
5.2.4.1	Aktivitätsverlauf	79
5.2.4.2	Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlauf	80
5.2.5	Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs in den entwickelten Tests	80
5.3	Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände	80
5.3.1	Phagozytoseversuche	81
5.3.2	Exozytoseversuche	84
5.4	Schlussbetrachtung	86
6	Zusammenfassung	90
7	Summary	91
8	Literaturverzeichnis	92
9	Anhang	I-LVIII

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BoNT(s)	Botulinumneurotoxin(e)
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca ²⁺	Calcium
DIN	Deutsche Industrie-Norm
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fMLP	<i>N</i> -formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
GA	Golgi-Apparat
GER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
GL	<i>Glaucoma</i> Lwoff
i. m.	Intramuskulär
i. p.	Intraperitoneal
i. v.	Intravenös
KbE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
LD ₅₀	Letale Dosis für 50% der eingesetzten Tiere
MLD	Maus letale Dosis
mOD	Optische Dichte/1000
NaOH	Natriumhydroxid
Ni	Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert
Ni ⁺	Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert, RCM addiert
NiT	Trypsinisiertes Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert
NiT ⁺	Trypsinisiertes Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert, RCM addiert
NRK	Normal rat kidney cells
NSF	<i>N</i> -Ethylmaleimid sensitive fusion protein
p. o.	Per os

Abkürzungsverzeichnis

pNPP	Di-Natrium-4-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
PPY	Proteose-Pepton-Yeast-Medium
PPYG	PPY-Glukose
RCM	Reinforced Clostridial Medium
REE	Relative ELISA-Einheiten
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RM	Reismedium
rRNS	Ribosomale Ribonukleinsäure
S.	<i>Staphylococcus</i>
SF	Sterilfiltration
SI	Säureimmobilisation
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SNAP-25	Synaptosome-associated protein of 25 kDA
SNARE	Soluble NSF acceptor protein receptor
SPP	Saure Phosphatase Puffer
spp.	Spezies
T.	<i>Tetrahymena</i>
TPGY	Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Medium
TPGYT	Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Medium, trypsinisiert
t-SNARE	Target-SNARE
U/min	Umdrehung pro Minute
VAMP	Vesikelassoziertes Membranprotein
vgl.	Vergleiche
v-SNARE	Vesikel-SNARE

1 Einleitung

Botulismus ist eine weit verbreitete Erkrankung, die durch die Neurotoxine der *Clostridium botulinum*-Toxovare A bis G hervorgerufen wird. Diese sieben verschiedenen Neurotoxine gelten als die stärksten biologischen Gifte. Als hochselektive Proteasen wirken sie an unterschiedlichen Proteinen des SNARE-Komplexes. SNARE steht als Akronym für „soluble NSF acceptor protein receptor“, wobei mit NSF die ATPase „N-Ethylmaleimid sensitive fusion protein“ abgekürzt wird. Die Proteine des SNARE-Komplexes bilden eine Gruppe von hochkonservierten, membranverankerten Proteinen und sind an Fusionsprozessen innerhalb des zellulären Membranenverkehrs beteiligt. Durch die Wirkung der Botulinumneurotoxine kommen diese Fusionsprozesse zum Erliegen. An der neuromotorischen Endplatte wird so die Exozytose von Neurotransmittern verhindert. Es resultiert die klassische Symptomatik der schlaffen Lähmung.

Der Routinenachweis der Botulinumneurotoxine gestaltet sich jedoch in Hinblick auf Sensitivität und Spezifität aufgrund der geringen toxisch wirkenden Konzentrationen als außerordentlich schwierig. Der Maus-Bioassay ist noch immer das Standardverfahren.

Wesentliche zelluläre Degradierungsstrategien z. B. gegenüber Mikroorganismen sind die Degradierung mittels der Phagozytose und durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme. Ein Zusammenhang dieser katabolen Prozesse mit den ubiquitären Proteinen des SNARE-Komplexes konnte bereits für verschiedene eukaryote Zellen belegt werden.

Tetrahymena pyriformis GL (*T. pyriformis*) als erstes axenisch etabliertes Protozoon ist ein weit verbreiteter Süßwasserziliat und gehört zu den am besten untersuchten eukaryoten Einzellern. Einfache Kultivierungsbedingungen und eine entsprechende Empfindlichkeit im Vergleich mit höheren Eukaryoten prädestinieren *T. pyriformis* als Indikatororganismus zum Nachweis und der Bewertung unterschiedlicher Störfaktoren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung von *T. pyriformis* als biologische Alternative zum Maus-Bioassay untersucht werden. Dazu wurden funktionelle Tests zur Quantifizierung der Phagozytose und Exozytose lysosomaler Enzyme bei *T. pyriformis* entwickelt und der Einfluss der *C. botulinum*-Neurotoxine A bis G auf diese Degradierungssysteme untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*)

2.1.1 Einführung

Anfang des 19. Jahrhunderts beschrieb KERNER (1820) ein Krankheitsbild beim Menschen, das im Zusammenhang mit dem Genuss geräucherter Würste auftrat und von einem nicht näher bekannten „Wurstgift“ verursacht wurde. Im Zuge weiterer Untersuchungen des „Botulismus“ (vgl. lat: botulus = Wurst) durch VAN ERMENGEM (1897) konnte ein neues anaerobes Bakterium, „Bacillus botulinus“ isoliert werden.

Die Genusbezeichnung „*Clostridium*“ (vgl. griech. = Spindelchen) fand mit der Arbeit von PRAZMOWSKI (1880) Eingang in den wissenschaftlichen Sprachgebrauch. BENGTON (1924) empfahl eine Terminologie, die sich von den aeroben Sporenbildnern absetzt, so dass der Erreger nunmehr unter *Clostridium botulinum* geführt wurde.

2.1.2 Taxonomie

PREVOT (1953) definierte die Zuordnung zur Spezies allein aufgrund der Fähigkeit zur Bildung von spezifischen Neurotoxinen, den so genannten Botulinumneurotoxinen (BoNTs). So spricht man bislang von sieben verschiedenen *C. botulinum* Toxovaren, denen gemeinsam mit ihrem Neurotoxin (BoNT) ein fortlaufender Buchstabe (entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung) zugeordnet wird (Tab. 1).

Tab. 1: Erstbeschreibung der Neurotoxintypen A bis G von *C. botulinum*

Neurotoxintyp	Autoren und Jahr der Veröffentlichung
A und B	VAN ERMENGEM (1897) bzw. LANDMANN (1904), charakterisiert durch LEUCHS (1910), durch BURKE (1919) Trennung der bis dato bekannten Stämme in die entsprechenden Buchstaben
C	BENGTON (1922) in den USA, parallel in Australien durch SEDDON (1922)
D	MEYER und GUNNISON (1928)
E	Von GUNNISON et al. (1936) als neuen Typen erkannt
F	MØLLER und SCHEIBEL (1960)
G	GIMÉNEZ und CICALLELLI (1970)

Da sich Toxovar G jedoch so sehr von den anderen unterscheidet, schlugen SUEN et al. (1988) stattdessen für diesen, *Clostridium subterminale* sowie *Clostridium hastiforme* (*C. hastiforme*) die Speziesbezeichnung „*Clostridium argentinense*“ vor. *C. hastiforme* wurde jedoch später von FARROW et al. (1995) aufgrund phylogenetischer Untersuchungen dem Genus *Tissierella* zugeordnet.

An diesem Beispiel wird deutlich, dass die Einteilung nach PREVOT (1953) nicht konsequent praktiziert wird. Trotzdem soll während der weiteren Darstellungen der Übersichtlichkeit halber weiterhin von *C. botulinum* G die Rede sein.

Das gleiche lässt sich für *Clostridium butyricum* (McCROSKEY et al. 1986) und *Clostridium baratii* (HALL et al. 1985) feststellen. Innerhalb dieser beiden Spezies sind gleichermaßen Stämme mit der Fähigkeit zur BoNT-Bildung beschrieben worden. Weiter erschwert wird die Taxonomisierung durch die Phagenkodierung der BoNTs von *C. botulinum* C und D. EKLUND und POYSKY (1974) konnten durch gezielte Behandlung phagenfreie und somit atoxische Varianten schaffen. Nach Reinfektion produzierten diese Varianten wieder das entsprechende BoNT.

Auch die Konversion eines *C. botulinum* C-Stammes in einen *Clostridium novyi* Typ A-Stamm gelang entsprechend (EKLUND et al. 1974).

Nach COLLINS und EAST (1998) existieren vier phylogenetisch verschiedene Linien innerhalb des *C. botulinum*-Komplexes (siehe Abb. 1).

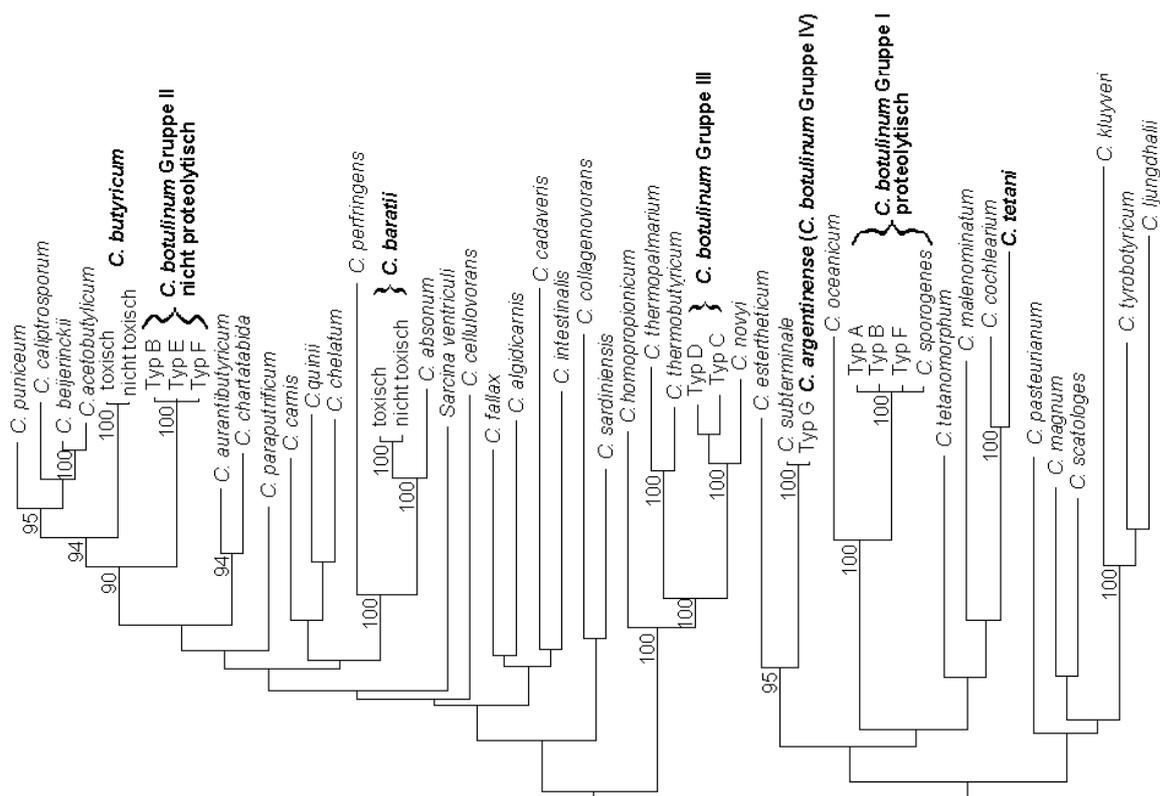


Abb. 1: Dendrogramm zu den phylogenetischen Positionen der *C. botulinum*-Gruppen I bis IV basierend auf den 16S rRNS-Sequenzen. Dafür wurde ein kontinuierlicher Strang von ca. 1340 Basen verwendet. Die Zahlen markieren die Verwandtschaftsverhältnisse in Prozent. Nach COLLINS und EAST (1998).

Die phylogenetischen Linien lassen sich auch phänotypisch in vier Gruppen (I bis IV) ordnen: Gruppe I enthält Stämme vom Typ A, proteolytische Stämme von B und F und die der dualen

Toxintypen AB, Ab, Af und Bf (siehe auch Tab. 3). Das Temperaturoptimum liegt bei 37°C. Es besteht eine starke DNS-Homologie zu *C. sporogenes*. Eine Unterscheidung einzig mittels metabolischer oder biochemischer Parameter ist nicht möglich (CATO et al. 1986). Zu Gruppe II gehören Stämme des Typs E und nicht-proteolytische/ saccharolytische Stämme von B und F. Sie werden als psychrotroph mit einem Wachstumsoptimum von 30°C und weniger beschrieben. Gruppe III-Vertreter produzieren das C (= C1, im Folgenden nur als „C“ bezeichnet) - oder D-Neurotoxin und sind nicht zur Proteolyse fähig. Allerdings beschrieben SMITH und HOBBS (1974) Ausnahmevarianten. Sie vermehren sich bestmöglich bei 40°C. Die Gruppe IV ist dadurch charakterisiert, dass das Neurotoxin G gebildet wird, darüber hinaus sind die Stämme asaccharolytisch, und das Enzym Lipase fehlt. Die optimale Temperatur beträgt 37°C (COLLINS u. EAST 1998).

Aus der Sicht der Taxonomie sind die bisherige Einteilung und Nutzung der Bezeichnung „*C. botulinum*“ sehr kritisch zu betrachten. Eine Reklassifikation, wie sie z.B. HUNTER und POXTON (2002) oder COLLINS und EAST (1998) zur Diskussion stellten, konnte sich aber bisher noch nicht durchsetzen.

2.1.3 Vorkommen

BÖHNEL (1995) unterscheidet zwei generelle Habitate: Zum einen ordnet er die Typen A, B, E, F und G hauptsächlich dem Boden zu, zum anderen benennt er C und D als obligate Darmparasiten von Säugetieren und Vögeln. Diese Einteilung ist jedoch nicht als ausschließlich zu betrachten. Es ist vielmehr so, dass der Typ E vielfach aus Proben aquatischer Herkunft zu isolieren ist, wie aus Seeböden und Wasser der Nord- und Ostsee (JOHANNSEN 1962, SKOVGAARD 1979, HIELM et al. 1998b), aus Süß- (BOTT et al. 1966, ALA-HUIKKU et al. 1977, HIELM et al. 1998a) und Salzwasserfischen (BAUMGART 1970a, CHULKOVA et al. 1976, HUSS u. PEDERSEN 1979), aus Krustentieren (BOYER et al. 2001) und aus der Umgebung Fisch verarbeitender Betriebe (EBERT 1954). Jedoch sind auch fast alle anderen Typen verschiedentlich in Untersuchungsmaterial aus Gewässern, Uferböden oder Fischen – A (LINDSTRÖM et al. 2001) B und C (SMITH u. MORYSON 1975), C und D (HAQ u. SUHADI 1981), F (WARD et al. 1967, CANN et al. 1975, CHULKOVA et al. 1976), A bis F (MORTOJUDO et al. 1973) – nachgewiesen worden. Geographische Dominanzen scheinen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Dieser Aspekt wird nicht zuletzt durch den verstärkten freien, internationalen Tier- (gleichwohl im Sinne des Vogelzugs), Reise- und Warenverkehr gefördert (BÖHNEL 1995).

2.1.4 Toxine

Neben den speziestypischen Neurotoxinen (vgl. 2.1.2) werden weitere, mitunter auch im Medium nachzuweisende Proteine beschrieben, die z. T. als Toxin bezeichnet werden können (BONVENTRE et al. 1967). Dazu gehören das von vielen C- und D-Stämmen gebildete

(OHISHI 1987) C2-Toxin (OHISHI u. TSUYAMA 1986) und das ebenfalls bei Toxovar C vorkommende C3-Toxin (AKTORIES et al. 1987). BÖHNEL (1988) fasste die sonstigen Antigenstrukturen mit Enzymcharakter (z.B. Prote(in)ase, Lipase, Desoxyribonuklease, Esterase, Thiaminase u. a.) und toxischen Eigenschaften (Autolysin, Hämolysin, Permeabilitätsfaktor u. v. m.) zusammen, wies jedoch darauf hin, dass Verallgemeinerungen als Typeneigenschaften nicht vorgenommen werden können.

2.1.4.1 Botulinumneurotoxine (BoNTs)

Die Verwendung des generellen Superlativs – laut LAMANNA (1959) gelten Botulinumneurotoxine als die stärksten toxischen biologischen Substanzen – gestaltet sich schon allein aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeiten einzelner Tierarten als nicht ganz unkritisch. Die Toxizität wird im Allgemeinen entweder als LD₅₀ (entspricht der Dosis, die für 50% der eingesetzten Tiere letal ist) oder als MLD (entspricht der Dosis, die für eine Maus im Maus-Bioassay letal ist) angegeben. In der folgenden Tabelle (Tab. 2) wird ein Überblick über die absoluten Neurotoxinmengen bekannter LD₅₀ bzw. MLD gegeben.

Tab. 2: LD₅₀ bzw. MLD (*) der einzelnen Toxintypen pro kg Körpermasse, modifiziert nach GILL (1982).

Neurotoxintyp	Maus
A	1,2 ng intraperitoneal (i. p.)* ⁽¹⁾
B ^(a)	0,5 ng i. p.* ⁽²⁾ bzw. 1,2 ng i. p. ⁽³⁾ bis 2,0 ng i. p. ⁽⁴⁾
C ^(a)	1,1 ng intravenös (i. v.) ⁽⁵⁾
D	0,4 ng i. p. ⁽⁶⁾
E	1,1 ng, Route nicht spezifiziert* ⁽⁷⁾
F ^(a)	2,5 ng i. v. ⁽⁸⁾

^(a) proteolytisch aktiviert, ⁽¹⁾ LAMANNA et al. (1946), ⁽²⁾ KOZAKI et al. (1974), ⁽³⁾ DUFF et al. (1957),

⁽⁴⁾ LAMANNA und GLASSMAN (1947), ⁽⁵⁾ SYUTO und KUBO (1977), ⁽⁶⁾ CARDELLA et al. (1960),

⁽⁷⁾ GERWING et al. (1965) ⁽⁸⁾, OHISHI und SAKAGUCHI (1974).

Der physiologische Grund ihrer Bildung ist bisher, abgesehen von der Stoffwechselbeeinflussung durch Phagen, noch unbekannt (BÖHNEL 1995). In der Regel bilden die einzelnen Toxovare ihren jeweiligen spezifischen Neurotoxintyp. Wie BÖHNEL (1995) publizierte, existieren jedoch auch Stämme, die darüber hinaus noch andere Neurotoxintypen bilden können (Tab. 3).

Die BoNTs unterscheiden sich in der Lokalisation im Genom wie folgt: Bei den Vertretern der Gruppen I und II findet sich die genetische Grundlage für das jeweilige Toxin im chromosomalen Genom (BINZ et al. 1990, THOMPSON et al. 1990), C- und D-Toxovare beherbergen entsprechende Bakteriophagen (HATHEWAY 1993), die Kodierung des Toxovars G erfolgt über ein Plasmid (EKLUND et al. 1988).

Literaturübersicht

Ihre Synthese vollzieht sich nach SAKAGUCHI (1983) in den Bakterien als nichtkovalent gebundener Enzymkomplex (Progenitortoxine). BÖHNEL (1995) nennt die davon abgespaltenen, toxischen Moleküle „Derivativtoxine“.

Tab. 3: Bildung von BoNTs (modifiziert nach Böhnel 1995)

<i>C. botulinum</i>	Neurotoxintyp						
	A	B	C	D	E	F	G
Typ A	++						
Typ A Subtyp AB ^(*)	++	++					
Typ A Subtyp Ab ^(*)	++	+					
Typ A Subtyp Af ^(*)	++					+	
Typ B		++					
Typ B Subtyp Ba ^(*)	+	++					
Typ B Subtyp Bf ^(*)		++				+	
Typ C _α ^(*)			++	+			
Typ C _β ^(*)			+	+			
Typ D			+	++			
Typ E					++	+	
Typ F					+	++	
Typ G							++

++ = in großen Mengen gebildet + = in geringen Mengen gebildet

(*) Die weiterführende Einteilung der unterschiedlichen Typen ergibt sich durch die unterschiedlichen Fähigkeiten zur Bildung der angegebenen Neurotoxine.

Der Enzymkomplex besteht aus zwei Untereinheiten, der α -Fraktion und der β -Fraktion. Die β -Fraktion ist ohne neurotoxische Eigenschaften (SUGIYAMA 1980). Allerdings bietet sie eine gewisse Schutzwirkung in Hinblick auf den Kontakt mit Verdauungsenzymen. Ihre Bedeutung ist also vor allem im Zusammenhang mit der oralen Toxizität zu sehen (KRÄMER 2002, SIMPSON 2004). Bei der α -Fraktion handelt es sich um ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa (140 bis 167 kDa, KRIEGLSTEIN 1990), dabei kommt es im Zuge der Aktivierung durch Proteasen zu einer Spaltung in eine leichte (50 kDa) und eine schwere (100 kDa) Kette (DASGUPTA u. SUGIYAMA 1972). Dieser Prozess wird auch als „nicking“ bezeichnet (OHISHI u. SAKAGUCHI 1979).

Beide Ketten sind über Disulfidbrücken (DASGUPTA 1981) bzw. beim Neurotoxin A potenziell über Fe⁺⁺-Ionen (BHATTACHARYYA et al. 1988, BHATTACHARYYA u. SUGIYAMA 1989) verbunden. Auf der H-Kette (vgl. engl. = heavy) befinden sich der Ligand zur Bindung an die Zielzelle und die transmembranäre Domäne (TURTON et al. 2002), die L-Kette (vgl. engl. = light) hingegen ist Sitz der katalytischen Einheit (HALPERN u. NEALE 1995). Zu der

β -Fraktion zählen, je nach Neurotoxintyp auch in unterschiedlichem Maße (siehe Abb. 2), Hämagglutinine und eine so genannte „nichttoxische nichthämagglutinierende Komponente“ (SAKAGUCHI 1983).

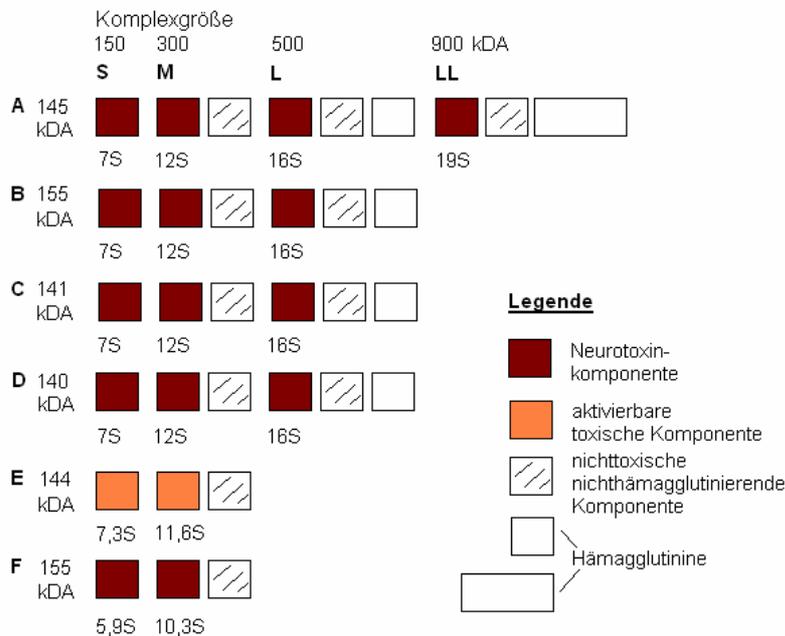


Abb. 2: Schematische Darstellung der Molekülformen von BoNTs, modif. nach SAKAGUCHI (1983), S = Derivatvtoxin, M (mittel), L (groß) und LL (sehr groß) = Progenitortoxine, xS = Sedimentationswert.

Je nach Enzymausstattung (proteolytische Stämme) kann eine Aktivierung bereits vor der Ausschleusung vonstatten gehen (HOBBS 1976, DEKLEVA u. DASGUPTA 1989) bzw. kann oder muss sich (nicht-proteolytische Stämme) mithilfe externer Enzyme (BONVENTRE u. KEMPE 1960, HOBBS 1977) vollziehen, z. B. durch Verdauungsenzyme nach oraler Aufnahme, wie es für die Typen E (OHISHI u. SAKAGUCHI 1979) und G (SONNABEND et al. 1987) beschrieben ist oder auch, obgleich mit schwächerem Ergebnis (SAKAGUCHI u. SAKAGUCHI 1959), durch proteolytische Enzyme anderer Mikroorganismen (SAKAGUCHI u. TOHYAMA 1955). Die Zugabe von Trypsin bewirkt eine Steigerung der Toxizität bei den BoNT-Typen A (KRYSSINSKI u. SUGIYAMA 1981), B (HALLIS et al. 1996), D (MIYAZAKI et al. 1977), E (DUFF et al. 1956), F (HOLDEMAN u. SMITH 1965) und G (GIMÉNEZ u. CICCARELLI 1970). EKLUND und POYSKI (1972) schließen C_{α} (vgl. Tab. 3) davon aus. BAUMGART (1970b) fand hingegen eine Abhängigkeit der trypsinbedingten Toxizitätssteigerung von der Neurotoxinmenge.

Über den Zeitpunkt der Toxinfreisetzung finden sich konträre Meinungen. So beschreiben DACK und WOOD (1928), aber auch SIEGEL und METZGER (1979) einen Anstieg des BoNTs im Medium, der vom Zelluntergang unabhängig ist. Andere Autoren (BOROFF 1955, DUDA u. SLACK 1969, ROSSETTO et al. 2001) gehen davon aus, dass die BoNTs erst

durch die bakterielle Autolyse frei werden. BÖHNEL (1995) bezeichnet die BoNTs sowie C2- und C3-Toxin als Exoenzyme, die am Ende der logarithmischen Wachstumsphase in das Medium entlassen werden und grenzt davon BoNT E insofern ab als dieses vorrangig nach der Zellyse nachzuweisen ist. Im Rahmen der Versporung kann BoNT im Sporangium lokalisiert werden, dabei kann es nach Phagozytose von Sporen durch Leukozyten wirksam werden (SUZUKI et al. 1971). CALL et al. (1995) verfolgten den Weg von BoNT A während der Kultivierung. Dabei zeigte sich, dass das BoNT während der Exfoliation der Zellwand in das Medium ausgeschleust wird.

Die BoNTs sind temperatursensibel. So werden sie z. B. durch Erhitzung auf über 85°C für 5 min inaktiviert (ARNON et al. 2001).

2.1.4.1.1 Bedeutung

BoNTs verursachen den bei Säugetieren und Vögeln beschriebenen Botulismus, dabei sind verschiedene Entstehungswege möglich. Man unterscheidet die Intoxikation, die Infektion – im Sinne des Wundbotulismus und der Sonderform des „Shaker Foal Syndromes“ (SWERCZEK 1980a, b) – die Toxikoinfektion und die Toxikation. Daneben gibt es Misch- und Übergangsformen. Neben der klassischen Symptomatik der schlaffen Lähmung (BÖHNEL 1995) sind weitere Krankheitsbilder beschrieben, wie der viszerale Botulismus beim Rind (BÖHNEL et al. 2001, SCHWAGERICK 2004), der Säuglingsbotulismus („Infant botulism“, PICKETT et al. 1976, MIDURA u. ARNON 1976) und der Erwachsenenbotulismus („Hidden botulism“, CHIA et al. 1986). BÖHNEL und GESSLER (2005) vermuten darüber hinaus eine weiterreichende Bedeutung der BoNTs, die letztlich auch durch die fehlende Routine in der Bewertung klinischer Symptome und bislang unbefriedigende diagnostische Möglichkeiten (siehe Punkt 2.1.4.1.4) unterschätzt wird.

2.1.4.1.2 Wirkungsweise

Die BoNTs führen als Zink-abhängige Metalloproteasen zur Degradierung von Proteinen des SNARE-Komplexes, jedoch nur, sofern sich dieser noch nicht formiert hat (SINGH 2000). Die Abkürzung SNARE steht für SNAP-Rezeptor (vgl. engl: Soluble NSF Aceptor Protein receptor, MARGITTAI et al. 2001). Als SNAPs (vgl. engl: Soluble NSF Attachment Protein, MARGITTAI et al. 2001) werden Proteine bezeichnet, die die ATPase NSF (vgl. engl: N-Ethylmaleimid Sensitive Fusion protein, MARGITTAI et al. 2001) binden.

Dabei ergeben sich je nach Neurotoxin verschiedene Angriffspunkte (siehe 2.2.3).

Im Zuge dessen kommt es zum Erliegen der Membranfusionsprozesse, wie es vor allem für die Exozytose in Nervenzellen der motorischen Endplatte beschrieben ist (BÖHNEL u. GESSLER 2005). Die BoNTs werden in Hinblick auf ihre Substratspezifität als die selektivsten Proteasen überhaupt betrachtet (ARNDT et al. 2006).

2.1.4.1.3 Wege in die Zelle

Der häufig beschriebene, klassische Weg führt über eine Resorption aus dem Darm (SAKAGUCHI 1983) via Körperflüssigkeiten (ROSSETTO et al. 2001) zur motorischen Nervenzelle. Für BoNT A ist die Bindung des Progenitortoxins an intestinale Epithelzellen mittels des *N*-Acetyllactosaminanteils von oberflächlichen Oligosacchariden beschrieben (KOJIMA et al. 2005). An der motorischen Nervenzelle bindet die H-Kette mit dem carboxyterminalen Ende an Polysialogangliosidrezeptoren, im Besonderen an G_{D1b} , G_{T1b} und G_{Q1b} (SCHIAVO et al. 2000) und G_{D1a} (NISHIKI et al. 1994) und andere, noch nicht identifizierte Proteine der prä-synaptischen Membran (ROSSETTO et al. 2002). Diese variieren jedoch gemäß KOZAKI (1979) den Toxovaren entsprechend (siehe Abb. 3, 1a und 1b). Die Internalisierung der BoNTs vollzieht sich anschließend über rezeptorvermittelte Endozytose (siehe Abb. 3, 2). In den Vesikeln kommt es durch ATP-abhängige Protonenpumpen zu einer Absenkung des pH-Wertes (DOLLY et al. 1984), die wiederum im aminoterminalen Bereich der H-Kette zu einer Konformitätsänderung innerhalb der Translokationsdomäne führt. Dadurch kommen hydrophobe Anteile außen zu liegen. Der Eintritt in die Lipiddoppelschicht der Vesikelmembran wird so möglich (MONTECUCCO u. SCHIAVO 1994).

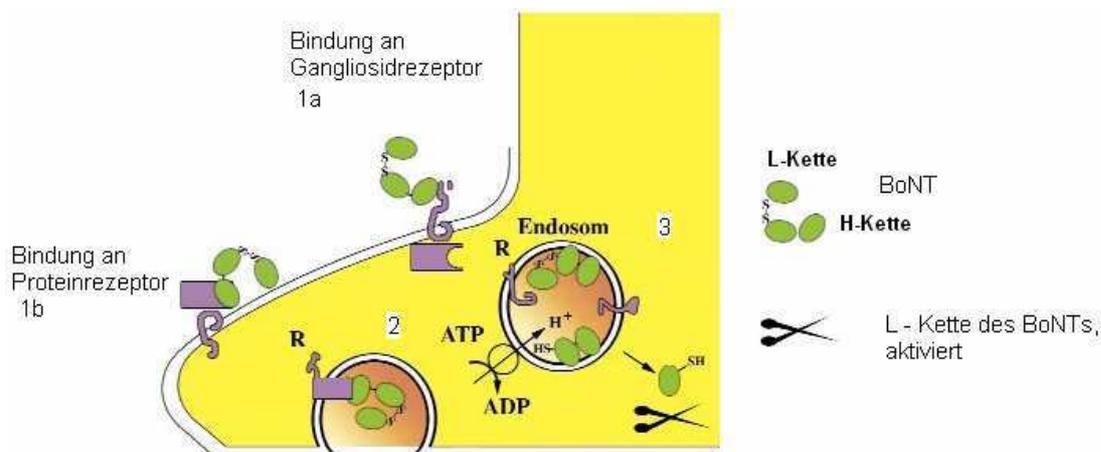


Abb. 3: Schema des Eintrittes und der Aktivierung von BoNTs in eine motorische Nervenzelle, modif. nach SINGH (2000), R = Rezeptor, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat. Erläuterungen im Text.

Die H-Kette kann daraufhin als Transmembran-Chaperon (KORIAZOVA u. MONTAL 2003) einen Kanal bilden und die L-Kette (siehe Abb. 3, 3) in das Zytosol austreten (HOCH et al. 1985). Durch den neutralen pH-Wert des Zytoplasmas nimmt die L-Kette nach Reduktion der Disulfidbrücken (siehe Abb. 3, 3) eine Rückfaltung in die wasserlösliche, neutrale Konformation vor (ROSSETTO et al. 2001).

Potentielle Angriffspunkte für BoNTs existieren indessen zugleich in anderen Zelltypen (siehe 2.1.4.1.5 und 2.2.1). Es stellt sich lediglich die Frage, ob in vivo diese Ziele durch die

BoNTs erreicht werden können. Dazu finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise. So konnten PARK und SIMPSON (2003) zeigen, dass BoNT A humane und murine pulmonale Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu passieren vermögen. SHONE und MELLING (1992) wiesen nach, dass spezifische Rezeptoren für BoNTs nicht zwingend notwendig sind, sofern ein entsprechend langer Kontaktzeitraum zur Verfügung steht. Dabei ist die Bindungsaffinität natürlich wesentlich geringer. Hohe Dosen sind jedoch gleichermaßen erfolgreich (VERDERIO et al. 1996).

BÖHNEL und GESSLER (2005) verweisen auf natürlich vorkommende, *in vivo* ihre Funktion aufrechterhaltende, Poren bildende, jedoch nicht die Zelle selbst zerstörende Substanzen, die gleichermaßen den Eintritt von Botulinumtoxinen, einschließlich der BoNTs, in Zellen ohne natürlich vorkommende Bindungsstellen bzw. die Passage in den Blutkreislauf mutmaßlich gestatten können. Dazu gehören z. B. pflanzliche Saponine und Agglutinin. Dies konnte durch CHADDOCK et al. (2000) für Weizenkeimagglutinin und ein BoNT A-Derivat nachgewiesen werden. In der Folge kam es zu einer Hemmung der Insulinexozytose bei einer pankreatischen B-Zelllinie. Darüber hinaus werden Digitonin, Streptolysin O, Lipopolysaccharide, Perfringolysin, Botulinolysin, Staphylokokken-a-Toxin, *Escherichia coli*-Hämolyse und ebenso das C2-Toxin einiger *C. botulinum*-Stämme als entsprechende Porenbildner genannt (BÖHNEL u. GESSLER 2005).

2.1.4.1.4 Nachweis von BoNTs

Der einzig gesetzlich zugelassene Test zum Nachweis und zur Typisierung von BoNTs ist der so genannte Maus-Bioassay (Anhang zum § 64 LFGB, DIN 10102). Dabei wird verdächtiges Material aufbereitet und den Mäusen in verschiedenen Verdünnungsstufen injiziert. Die Mäuse werden über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen beobachtet. Dabei wird das Augenmerk auf die typische Symptomatik – Lähmungserscheinungen in der Muskulatur, wespentailenartiges Einziehen der Bauchmuskulatur, mühsames Atmen mit finaler Atemlähmung – gelegt. Positive Proben werden weiter mittels Toxinneutralisation durch spezifische Antikörper ebenfalls im Tierversuch typisiert. Durch entsprechende Verdünnungsstufen kann die MLD/ml bestimmt werden. Der Maus-Bioassay kommt variiert auch international zur Anwendung (HOLDEMANN et al. 1977). Des Weiteren existieren andere Nachweismethoden, die jedoch in Hinblick auf die Sensitivität und Spezifität (siehe Tab. 4), Reproduzierbarkeit, Aufwand oder die verwendeten Substrate dem Maus-Bioassay unterlegen sind. Dazu zählen der Hemidiaphragma-Test (HABERMANN et al. 1980, DREYER et al. 1984), ELISAs (SHONE et al. 1985, SHONE et al. 1986, THOMAS 1991, POTTER et al. 1993, FERREIRA et al. 2003, FERREIRA et al. 2004) und die Mikrowärmekomplementbindungsreaktion (WEISS u. WEISS 1988, WEISS et al. 1990).

Tab. 4: Übersicht über Nachweisgrenzen von BoNTs mittels alternativer Methoden (Auswahl)

BoNT-Typ	Methode	Untere Nachweisgrenze	Spezifität in %*	Sensitivität in %*
C	Bioassay Fasan ⁽¹⁾	i. m. 50 MLD ₅₀ p. o. 10 MLD ₅₀	k. A.	k. A.
C	Bioassay Ente ⁽¹⁾	i. m. 500 MLD ₅₀ p. o. 1 MLD ₅₀	k. A.	k. A.
A, B, E	Passive Hämagglutination ⁽²⁾	A: 0,75 bis 43 MLD ₅₀ B: 2,3 bis 39 MLD ₅₀ E: 245 MLD ₅₀	k. A.	k. A.
A	Radio-Immunoassay ⁽³⁾	100 MLD ₅₀	k. A.	k. A.
A	ELISA ⁽⁴⁾	5 bis 10 MLD ₅₀ /ml	k. A.	k. A.
C	Mikrowärmekomplement-bindungsreaktion ⁽⁵⁾	0,025 MLD ₅₀	k. A.	k. A.
C, D	ELISA ⁽⁶⁾	0,02 bis 100 MLD ₅₀ /ml	96	70
A, B, E	ELISA ⁽⁷⁾	A: 9 MLD ₅₀ B: < 1 i. p. MLD ₅₀ E: < 1 i. p. MLD ₅₀	70,6	100
A, B	ELISA ⁽⁸⁾	A: 1,3 ng/ml B: 0,1 bis 0,6 ng/ml	k. A.	k. A.
B	ELISA ⁽⁹⁾	0,5 MLD ₅₀	k. A.	k. A.
A	Immuno-PCR ⁽¹⁰⁾	5 pg	100	100
A, B, D, F	Fluoreszenzmessung ⁽¹¹⁾	A: 0,2 ng/ml B: 0,2 ng/ml D: 0,2 ng/ml F: 0,2 ng/ml	k. A.	k. A.
B	Fluoreszenzmessung ⁽¹²⁾	3,5 pg/ml	k. A.	k. A.
A, B, E, F	Massenspektrometrie ⁽¹³⁾	A: 0,62 MLD ₅₀ /ml B: 0,62 MLD ₅₀ /ml E: 0,31 MLD ₅₀ /ml F: 6,2 MLD ₅₀ /ml	k. A.	k. A.

* = im Vergleich zum Maus-Bioassay, ⁽¹⁾ BOROFF und REILLY (1959), ⁽²⁾ JOHNSON et al. (1966),

⁽³⁾ BOROFF und SHU-CHEN (1973), ⁽⁴⁾ SHONE et al. (1985), ⁽⁵⁾ WEISS und WEISS (1988),

⁽⁶⁾ THOMAS (1991), ⁽⁷⁾ POTTER et al. (1993), ⁽⁸⁾ HALLIS et al. (1996), ⁽⁹⁾ WICTOME et al. (1999),

⁽¹⁰⁾ WU et al. (2001), ⁽¹¹⁾ SCHMIDT et al. (2001), ⁽¹²⁾ ANNE et al. (2001), ⁽¹³⁾ BARR et al. (2005).

i. m. = intramuskulär, p. o. = per os, i. p. = intraperitoneal, MLD₅₀ = LD₅₀ für Mäuse, k. A. = keine Angabe.

Des Weiteren sind der passive Hämagglutinationstest zum Nachweis von Progenitortoxinen (LOWENTHAL u. LAMANNA 1951, JOHNSON et al. 1966), die Radioimmunotechnik (BOROFF u. SHU-CHEN 1973), die Immuno-PCR (WU et al. 2001), Tests mit an Säulen gebundenen Antikörpern (GESSLER et al. 1998), Nachweise von Neurotoxin-geschnittenen Substraten mittels ELISA (HALLIS et al. 1996, WICTOME et al. 1999), Fluoreszenzmessung (SCHMIDT et al. 2001, ANNE et al. 2001) oder Massenspektrometrie (BARR et al. 2005) sowie Bioassays mit anderen Versuchstieren (Fasane und Enten, BOROFF u. REILLY 1959, Wachteln, MEHLER 1981) beschrieben worden.

2.1.4.1.5 Einsatz als molekularbiologisches Werkzeug

Aufgrund der spezifischen Ansatzpunkte der BoNTs ist es möglich, sich ihrer bei der Aufklärung von SNARE-Komplex-abhängigen Vorgängen, wie der Exozytose (LUDGER u. GALLI 1998, LINIAL 2000) oder der Phagozytose (HACKAM et al. 1998) zu bedienen.

2.2 SNARE-Komplex

2.2.1 Vorkommen und Bedeutung

Fusionen zwischen intrazellulären Vesikeln und Membranen erfordern besondere Proteine, welche die Lipiddoppelschichten so weit zusammenbringen, dass eine Verschmelzung möglich wird (JÖNS 2001). Die Spezifität wird gemäß dem SNARE-Modell dadurch erreicht, dass die SNARE-Proteine des Vesikels (v-SNAREs) mit verwandten Rezeptorproteinen der Zielmembran (t-SNAREs, vgl. engl: target = Ziel) interagieren (SÖLLNER et al. 1993, ROTHMAN u. WARREN 1994). SNARE-Proteine (SNAREs) sind in nahezu jede Art hetero- und homotypischen (NICHOLS et al. 1997) membranären Verkehrs innerhalb der Zelle involviert (PFEFFER 1999) und bilden eine neue Superfamilie kleiner, membranverankerter, hochkonservierter Proteine – „von der Hefe bis zum Menschen“ (BENNETT u. SCHELLER 1993, FERRO-NOVICK u. JAHN 1994).

In der Zelle existieren verschiedene Isoformen von SNAREs nebeneinander (BOCK u. SCHELLER 1999). So sind bei Hefen 25 SNAREs, bei Säugetieren mehr als 35 SNAREs beschrieben. Teilweise üben SNAREs verschiedene Funktionen in multiplen Schritten des Membranenverkehrs aus. Von manchen SNAREs ist bekannt, dass sie andere ersetzen können. Die Faktoren, die dafür sorgen, dass bestimmte SNAREs an einigen Fusionsprozessen teilnehmen, von anderen aber ausgeschlossen werden, sind noch nicht genau bekannt. Die Spezifität der SNARE-Paarungen ist nicht ausreichend, um die Spezifität der Organellenfusionen zu bestimmen (BRANDHORST et al. 2006).

2.2.2 Aufbau und Prinzip

Ein Großteil des Wissens um die SNAREs rührt von Studien über die Freisetzung von Neu-

rotransmittern. Die Funktion des v-SNAREs wird bei der neuronalen Exozytose vom Synaptobrevin (entspricht dem VAMP = vesikelassoziiertes Membranprotein), die der t-SNAREs durch Syntaxin und SNAP-25 wahrgenommen (RIZO 2003). „SNAP-25“ steht im Gegensatz zu dem Akronym „SNAP“ (s. o.) für (vgl. engl.) „synaptosome-associated protein of 25 kDa“ (MARGITTAI et al. 2001). ROTHMAN (1994) konnte zeigen, dass das Prinzip auch auf nichtsynaptische Fusionsereignisse zu übertragen ist.

Die Entwicklung des Modells begann mit der Entdeckung des NSF von BLOCK et al. (1988). Der NSF sorgt mittels seiner ATPase-Aktivität (SÖLLNER et al. 1993) für die Entflechtung der SNAREs nachdem die Fusionsprozesse beendet sind. Dadurch stehen die SNAREs für folgende Transportrunden zur Verfügung (ROTHMAN 2002).

Im Laufe der Zeit ist das ursprüngliche SNARE-Modell jedoch erweitert worden, so dass die Rolle der beteiligten Komponenten nun etwas klarer ist. SÜDHOF et al. (1993) konnten belegen, dass BoNTs zwar die Freisetzung von Neurotransmittern, nicht aber das Andocken der transmitterhaltigen Vesikel an der synaptischen Membran verhindern. Entgegen früheren Vermutungen liegt die Bedeutung der SNARE-Proteine also nicht in der Vermittlung des Andockprozesses, sondern vielmehr im Bereich der Membranfusion (HANSON et al. 1997).

Die Fusion wird durch eine Vielzahl verschiedener Proteine eingeleitet. An dieser Stelle sollen jedoch nur die Substrate der BoNTs besprochen werden. In der unten stehenden Abbildung (Abb. 4) wird deren Funktion schematisch gezeigt. Das VAMP ist vesikelgebunden, das Syntaxin und das SNAP-25 sind dagegen plasmamembrangebunden. Zwei α -Helices des SNAP-25 gehen Wechselwirkungen mit den entsprechenden zytoplasmatischen Domänen von VAMP und Syntaxin ein.

Bei dem Aufbau des SNARE-Komplexes wird nach PAUMET et al. (2004) eine Helix stets vom v-SNARE gestellt, die drei anderen gehören zu den t-SNAREs (ein Syntaxin und zwei leichte Ketten von einem (vgl. Abb. 4) oder zwei anderen t-SNAREs). Die Bildung dieser vierfachen Helix (POIRIER et al. 1998) vollzieht sich nach dem „Reißverschluss-Prinzip“ vom N-terminalen Ende der Domäne zum C-terminalen Ende. Dadurch werden die Membranen dicht aneinander herangebracht (HANSON et al. 1997, LIN u. SCHELLER 1997) und die Fusion ermöglicht (SUTTON et al. 1998).

Die Sequenzen, die diese Helices formen, werden „SNARE-Motive“ genannt (RIZO 2003). Dabei wird jede der vier Helices durch ein anderes SNARE-Motiv repräsentiert (GRAF et al. 2005). Unter einem Motiv versteht man die Suprasekundärstruktur eines Proteins (PETRIDES u. KALBITZER 2001). Das SNARE-Motiv ist konserviert und umfasst ca. 60 bis 70 Aminosäuren. Jedes SNARE-Protein besitzt mindestens ein Motiv. Es ist gewöhnlich nahe der C-terminalen Transmembrandomäne lokalisiert. Das SNARE-Motiv gilt als Substrat der BoNTs (ROSSETTO et al. 1994).

Im Zentrum dieses Motivs findet sich bei einigen SNAREs, wie dem Synaptobrevin, ein Argi-

nin (R), bei anderen, wie Syntaxinen, ein Glutamin (Q) an exponierter Stelle (JÖNS 2001). Diese Entdeckung zog eine Reklassifizierung in Q- und R-SNAREs anstelle der v- und t-Bezeichnungen nach sich. Diese Nomenklatur ist insofern überlegen als bei einigen Fusionsereignissen – z.B. homotypischen Fusionen – eine strikte Trennung in Vesikel- und Zielmembran nicht möglich ist (FASSHAEUER et al. 1998). Die Q-SNAREs können weiter in Qa (Syntaxine), Qb und Qc (Homologe des N- und C-terminalen SNARE-Motivs des SNAP-25 bzw. andere SNARE-Isoformen) unterteilt werden. Alle funktionalen SNARE-Komplexe bestehen aus diesen vier Motiven (JAHN et al. 2003).

Das SNARE-Motiv besitzt neun Glieder. Davon sind drei carboxyliert und alternieren mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen (ROSSETTO et al. 1994). Es ist oberflächlich exponiert und gemäß SCHIAVO et al. (2000) in zwei Kopien im VAMP, in zwei Kopien im Syntaxin und in vier Kopien im SNAP-25 präsent (siehe Abb. 5).

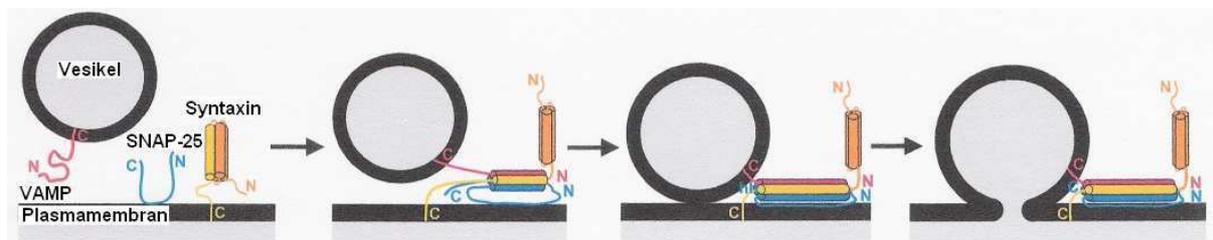


Abb. 4: Modell der SNARE-vermittelten Membranfusion am Beispiel der neuronalen Exozytose, nach RIZO (2003). Jeder zytoplasmatische Teil der SNAREs besitzt zwei Domänen: Eine N-terminale Domäne und ein SNARE-Motiv (PAUMET et al. 2004). Die Motive (α -Helices) sind als Zylinder dargestellt. In dieser Abbildung trägt SNAP-25 mit zwei Motiven zum Komplex bei. In anderen Systemen können die beiden Motive auch von zwei unterschiedlichen t-SNAREs eingebracht werden. Beim Syntaxin ist die zweite Motiv-Kopie (orange) ebenfalls dargestellt. Die weiteren Kopien der anderen Motive werden vernachlässigt. Einzelheiten im Text.

2.2.3 Der SNARE-Komplex und BoNTs

Die BoNTs erkennen eher die Tertiärstruktur ihrer Substrate als die Primärstruktur (SCHIAVO et al. 2000). Sie bedürfen mindestens eines SNARE-Motivs innerhalb der jeweiligen Proteinsegmente, um ihre Wirkung entfalten zu können (ROSSETTO et al. 2001).

In der folgenden Abbildung (Abb. 5) sind die jeweiligen Substrate der BoNTs dargestellt.

WASHBOURNE et al. (1997) untersuchten den Zusammenhang der BoNTs A und E mit den vier Motiv-Kopien am SNAP-25. Dabei fanden sie heraus, dass die Kopie, die sich nahe dem C-terminalen Ende befindet, bei beiden Toxinen für eine effiziente Spaltung notwendig ist. Im Falle einer Abwesenheit dieser Kopie sind die anderen drei in der Lage, in unterschiedlichem Ausmaß als Ersatz zu dienen. BoNT C besitzt Substrate im Bereich des Syntaxins und des SNAP-25. Am Syntaxin wird das Motiv nahe des C-terminalen Endes geschnitten (SCHIAVO et al. 1995), bei SNAP-25 ähnelt die Schnittposition derjenigen bei BoNT A (VAIDYA-

NATHAN et al. 1999). PELLIZZARI et al. (1997) konnten zeigen, dass BoNT D und F überwiegend mit der Kopie nahe des N-terminalen Endes interagieren. BoNT B und BoNT G als weitere VAMP-wirksame Proteasen erkennen wiederum die Kopie in der Nähe des C-terminalen Endes (PELLIZZARI et al. 1996).

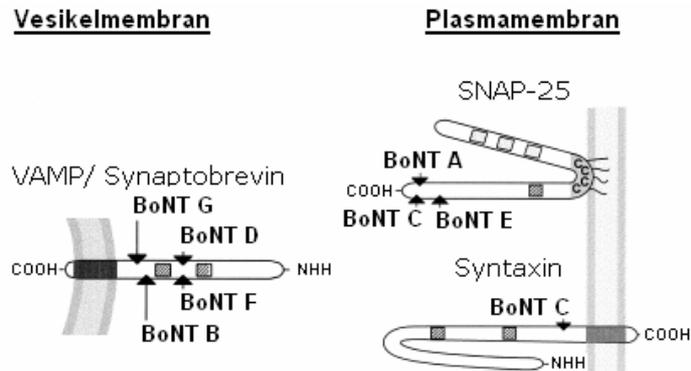


Abb. 5: Darstellung der Substrate und der Schnittstellen der BoNTs, modif. nach ROSSETTO et al. (2001). Die kleinen Kästchen innerhalb der SNAREs bezeichnen die für die Substrat-BoNT-Interaktion notwendigen SNARE-Motive. Einzelheiten im Text.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 5) wird eine Übersicht über die genauen Schnittstellen der BoNTs in den unterschiedlichen Substraten gegeben.

Tab. 5: Übersicht über die Schnittstellen der BoNTs in den verschiedenen Proteinen des SNARE-Komplexes.

Neurotoxintyp	Schnittstelle	Protein
A	Glutamin ¹⁹⁷ -Arginin ^{198(a)}	SNAP-25
B	Glutamin ⁷⁶ -Phenylalanin ^{77(b)}	VAMP
C	Lysin-Alanin ^{*(c)}	Syntaxin
C	Arginin ¹⁹⁸ -Alanin ^{199(d)}	SNAP-25
D	Lysin ⁵⁹ -Leucin ^{60(e)}	VAMP
E	Arginin ¹⁸⁰ -Isoleucin ^{181(a)}	SNAP-25
F	Glutamin ⁵⁸ -Lysin ^{59(e)}	VAMP
G	Alanin ⁸¹ -Alanin ^{82(f)}	VAMP

* Position variiert entsprechend den unterschiedlichen Isoformen.

^(a) BINZ et al. (1994), ^(b) SCHIAVO et al. (1992), ^(c) SCHIAVO et al. (1995), ^(d) VAIDYANATHAN et al. (1999), ^(e) PELLIZZARI et al. (1997), ^(f) YAMASAKI et al. (1994).

Nicht alle SNARE-Isoformen sind BoNTs gegenüber empfindlich (MARTINEZ-ARCA et al. 2000, ROSSETTO et al. 2001). Resistenzen sind durch Mutationen im Bereich der Schnitt- oder Bindungsstelle begründet (SCHIAVO et al. 2000).

2.3 SNAREs und eukaryote Degradierungssysteme

Eukaryoten sind ein- und mehrzellige Organismen, die sich u. a. durch den Besitz von Intermitosezellkernen, organisierten Mitochondrien, einem endoplasmatisches Retikulum und 80S-Ribosomen auszeichnen (WIESNER u. RIBBECK 2000).

Zwei wesentliche Degradierungssysteme verschiedener eukaryoter phagozytischer Zellen (Protozoen wie *Tetrahymena pyriformis* oder Granulozyten von Säugetieren) sind die Degradierung mittels Phagozytose und durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme. Ein Zusammenhang dieser Degradierungsstrategien und Komponenten des SNARE-Komplexes konnte bereits für verschiedene eukaryote Zellen gezeigt werden.

2.3.1 Die Rolle von SNAREs in Degradierungssystemen bei Metazoa

BRUMELL et al. (1995) fanden Hinweise, dass bei humanen neutrophilen Granulozyten die Fusion von primären Lysosomen mit Phagosomen mit dem entsprechenden Vorkommen von Isoformen der Mitglieder des SNARE-Komplexes zusammenhängen könnte. Dies wurde durch HACKAM et al. (1996) bestätigt, die die Syntaxin-Isoformen 2, 3 und 4 in der Phagosomenmembran bei humanen und murinen Makrophagen nachwies und dadurch zur Erhärtung der These beitrug. DESJARDINS et al. (1997) wiesen nach, dass auch die Synaptobrevin-Isoformen 1 und 2 in murinen Makrophagen lokalisiert sind. Schließlich konnte bei Alveolarmakrophagen (Kaninchen) die Notwendigkeit der Syntaxin-Isoform 7 und der VAMP-Isoform 7 als SNAREs für die späte Endosomen-Lysosomen-Fusion im Zuge der Endozytose belegt werden (WARD et al. 2000).

Weiterhin wiesen HACKAM et al. (1998) bei murinen Makrophagen den essentiellen Charakter der SNARE-vermittelte Exozytose von Endomembranen für den Ablauf der Phagozytose nach. Der Nachweis wurde mittels BoNT B erbracht. Anderenfalls käme es zu einer Nettoerduktion der Zelloberfläche durch Endozytose.

CHEN et al. (2000) zeigten die Beteiligung von t-SNAREs, NSF, Syntaxinen und eine SNAP-25-Isoform (SNAP-23) als wesentliche Faktoren bei der Exozytose lysosomaler Enzyme humaner Thrombozyten.

Auch für Zellen aus Nierenzelllinien von Ratten (NRK-cells, vgl. engl: normal-rat-kidney-cells) wurde der Nachweis einer notwendigen Beteiligung von SNARE-Proteinen an der Exozytose lysosomaler Enzyme gebracht. Diese war durch den Einsatz von BoNT E zu hemmen (RAO et al. 2004).

2.3.1.1 Nutzung der BoNT-beeinflussten Phagozytose als diagnostisches Verfahren

Versuche zur Beeinflussung der Phagozytose von Leukozyten mittels BoNTs wurden von MINERVIN et al. (1955) durchgeführt, wobei in vitro eine starke Reduktion der Aktivität durch BoNT A und B dokumentiert wurde. Die Autoren benutzten Leukozyten von Kaninchen und konnten mittels neutralisierendem equinen Antiserum eine Spezifität der Phagozytosehem-

mung von Staphylokokken zeigen. SAVIN (1955) wandte diese Methode zur Detektion kleiner Mengen BoNT in Lebensmitteln an. Die Depression der Phagozytose sollte sogar weit sensitiver als der klassische Maus-Bioassay reagieren. SAVIN (1955) vermerkte den wesentlich geringeren Zeitumfang für den Toxinnachweis (2 bis 3h) und bestätigte die Möglichkeit der Typisierung mittels Antiserum. Auch SHVEDOV (1959) griff während seiner Experimente auf dieses System zurück, um die Anwesenheit des Toxins zu belegen.

Angaben zu den nachgewiesenen Toxinmengen sind nur spärlich vorhanden, eine Nachweisgrenze wird nicht angegeben. Allerdings arbeitete SHVEDOV (1959) mit BoNTs, deren Anfangskonzentration bei $1,50E+00$ bis $2,50E+00$ MLD liegen sollte.

Gegen diese Ergebnisse meldete FREEMAN (1961) jedoch Zweifel an, da er mit einer Mäuse- LD_{50} von $2,00E+06/ml$ vom BoNT A keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose von Staphylokokken fand. Im Gegensatz zu den o. g. Autoren nutzte er jedoch murine polymorphkernige Leukozyten.

2.3.2 Die Rolle von SNAREs in Degradierungssystemen bei Protozoa

Untersuchungen zur Phylogenie und Evolution einzelner Komponenten innerhalb der Eukaryoten wurden von DACKS und DOOLITTLE (2001) durchgeführt. Sie diskutierten die Existenz eines primitiven Syntaxins und dessen Zusammenhang mit dem Endomembranverkehr eines frühen eukaryoten Vorfahrens. 2002 veröffentlichten dieselben Autoren eine detailliertere Studie zu dieser Problematik, in die sie Protozoen wie *Giardia intestinalis* und *Trypanosoma brucei* einbezogen. Dabei fanden sich Hinweise, dass Syntaxinvarianten wahrscheinlich bei allen Eukaryoten, einschließlich der protozoären, präsent sind und eine universelle Rolle im Membranverkehr spielen. Belegt wird dies auch durch die Arbeit von BOGDANOVIC et al. (2002), die bei *Dictyostelium discoideum*, einer Amöbenart, Syntaxine und VAMPs als für die Makropinozytose notwendige Komponenten nachwiesen. Diese leiten dabei die Fusion von Endosomen mit primären Lysosomen durch Bildung eines aktiven SNARE-Komplexes ein.

Als Vertreter der Ziliaten war *Paramecium tetraurelia* Gegenstand der Untersuchungen. KISSMEHL et al. (2002) gelang es, den NSF molekularbiologisch nachzuweisen, was die These der konservierten, universellen Strategie der Fusionsvermittlung weiter stärkt. Darüber hinaus konnten die Autoren, wie auch FROISSARD et al. (2002), die funktionelle Bedeutung bei Prozessen wie der Phagozytose und der Exozytose von Extrusionstrukturen wie Trichozysten belegen.

2.4 *Tetrahymena pyriformis* GL (*T. pyriformis*)

2.4.1 Einführung

„Das birnförmige Wimperthierchen, *Leucophrys pyriformis*, eine neue Art...“

betitelt EHNBERG (1832) die erste charakteristische Beschreibung sowie Zeichnung einer Spezies, die 1923 von LWOFF (1923) isoliert und als erstes Protozoon axenisch gehalten werden konnte. 1940 wurde der Einzeller durch FURGASON (1940) als neue Gattung und Art (*Tetrahymena geleii*) identifiziert und ist heute unter *Tetrahymena pyriformis* (*T. pyriformis*) bekannt.

2.4.1.1 Taxonomie

Die Systematisierung der „Protozoa“ (GOLDFUSS 1818), der „Protoctista“ (HOGG 1860) bzw. der „Protisten“ (HAECKEL 1866) gestaltet sich, wie schon aus den unterschiedlichen Termini ersichtlich, als außerordentlich schwierig. Dies ist der enormen Diversität dieser Mikroorganismen geschuldet. Diese übertrifft sogar diejenige der bekannten Spezies von Viren und Prokaryoten (CORLISS 2002). So umfassen diese Begriffe keineswegs eine monophyletische taxonomische Einheit. Stattdessen decken sie lediglich eine para- oder polyphyletische Gruppierung von überwiegend mikroskopisch kleinen, eukaryoten und unizellulären Organismen. Jedoch wird auch diese Definition nicht vollständig der Vielfalt gerecht (HAUSMANN et al. 2003).

Das ordnende System ist, nicht zuletzt durch die Einführung neuer Methoden, stetig im Wandel. Einen der zurzeit jüngsten Beiträge für *Tetrahymena* bis zur Subklassen-Ebene haben HAUSMANN et al. (2003) veröffentlicht:

Kingdom: Protozoa
Subkingdom: Neozoa
Infrakingdom: Alveolata
Superphylum: Heterokaryota
Phylum: Ciliophora
Subphylum: Intramacronucleata
Class: Oligohymenophorea
Subclass: Hymenostomatia
Genus: *Tetrahymena*

2.4.1.2 Morphologie

Die morphologischen Charakteristika von *T. pyriformis* (siehe Abb. 6 und Abb. 7) spiegeln sich bereits im Namen wider. So handelt es sich bei diesem Einzeller um einen birnenförmigen Organismus, der in Kulturen eine Größe von 10 bis über 90 µm (Durchschnitt 50 x 30

μm) erreicht (CORLISS 1973). Mit 40 bis 60 x 20 bis 30 μm wird in vivo eine ähnliche Variante beschrieben (FOISSNER et al. 1994). Der Einzeller besitzt im anterioren Viertel einen Zytostom-Zytopharynx-Komplex mit vier „Blättchen“, i. e. einer rechts liegenden, undulierenden Membran und drei gegenüberliegenden Membranellen. Dieser Komplex determiniert die ventrale Seite (ELLIOTT u. KENNEDY 1973).



Abb. 6

Abb. 6: *T. pyriformis*, Nativpräparat, Phasenkontrastmikroskop, der schwarze Balken entspricht einer Länge von 20 μm . Im linken Teil der Abbildung ist *T. pyriformis* in der Teilung zu sehen, a = Mundfeld, b = Nahrungsvakuolen, c = Zellkern. Einzelheiten im Text. Nach PATTERSON (1996).

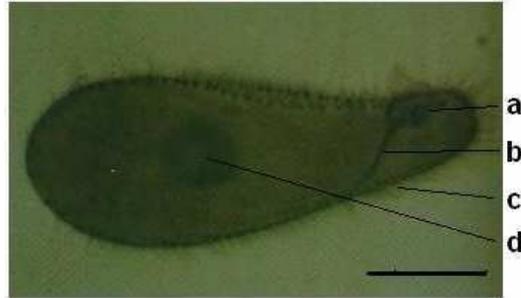


Abb. 7

Abb. 7: *T. pyriformis*, fixiert, Silberfärbung, der schwarze Balken entspricht einer Länge von 20 μm , a = bukkale Kavität, b = Zytopharynx, c = Zilien, d = Zellkern. Einzelheiten im Text. Nach PATTERSON (1996).

Der Einzeller ähnelt in seinen zytoplasmatischen Elementen (NILSSON 1981) einer typischen eukaryoten Zelle (LÖFFLER u. HASILIK 2003), jedoch um verschiedene Strukturen ergänzt, die für das singuläre Leben wichtig sind.

So dient der Abgrenzung zwischen innerem und äußerem Milieu ein Kortex, der durch seine Festigkeit dem Protozoon die Gestalt gibt (GRUNER 1993). Der Kortex umfasst per Definition jenen spezialisierten Zellanteil, der zum einen mit der Umwelt, zum anderen mit dem Endoplasma in Kontakt steht (PAULIN 1996). Strukturell lässt er sich in Pellikula und Infraziliatur gliedern. Die äußere Pellikula kann als funktionell-morphologische Einheit aus Plasmalemma und unterlagerten filamentösen Strukturen (Alveoli und Epiplasma) beschrieben werden (HAUSMANN 2003). Die sich anschließende Infraziliatur versammelt alle Kinetosomen und ihre assoziierten fibrillären Strukturen (LYNN 1996).

15 bis 25, meist 17 bis 21 meridionale Zilienreihen säumen den Körper (FOISSNER et al. 1994). Davon bleiben jedoch das extreme anteriore und das posteriore Ende ausgenommen (HILL 1972). Die Zilien dienen nicht nur der Lokomotion, sie sind ebenso durch ihre Aktivität an der Nahrungsaufnahme beteiligt (BRUSCA u. BRUSCA 1990).

Ingestion und Defäkation von partikulären Nahrungsbestandteilen werden über besondere Strukturen vollzogen, den Zytostom-Zytopharynx-Komplex innerhalb der bukkalen Kavität (NILSSON u. WILLIAMS 1966) bzw. über die Zytopyge (oder Zytoprokt), die das posteriore

Ende determiniert (ELLIOTT u. CLEMMONS 1966).

Der Stamm GL ist amikronukleär (HIGASHINAKAGAWA et al. 1975) und besitzt folglich nur den Makronukleus (ELLIOTT u. KENNEDY 1973). Damit ist ihm die Möglichkeit zur Konjugation verwehrt (ALLEN u. GIBSON 1973). Das Akronym GL steht für *Glaucoma* Lwoff, eine Zusammensetzung aus dem früheren Gattungsnamen und dem Namen des Autors, dem die Erstisolierung und Etablierung einer axenischen Kultur gelang (s. o.). CORLISS (1952) bezeichnet diesen Stamm als die „echte“ *T. pyriformis*.

Die Fähigkeit zur Bildung von Zysten ist *T. pyriformis* GL nicht gegeben (CALLEJAS u. GUTIERREZ 2003).

2.4.1.3 Vorkommen und Lebensweise

T. pyriformis hat sich laut ELLIOTT (1973) als frei schwimmender Ziliat seinen Lebensraum in nahezu allen Süßwasserhabitaten weltweit erobert.

CORLISS (1973) beschreibt die Lebensweise als mikrophag (bakteriovor), weist aber auch auf Koprophilie, Überleben unter saprophagen Bedingungen und die fakultativ parasitäre und histophage Natur des Einzellers hin. Als Besonderheit gelingt die Haltung in axenischen, per se nonpartikulären und in chemisch definierten Medien. Diese Eigenschaft trägt zu der großen Popularität bei.

Die Vermehrung von *T. pyriformis* erfolgt durch Querteilung in zwei identische Tochterzellen (RUPPERT u. BARNES 1994). Dabei können, unter Einhaltung optimaler Bedingungen (konstante Temperatur von 28°C, ausreichende Versorgung mit Luft, permanentes Schütteln der Kultur), in dem üblichen Proteose-Pepton-Yeast-Medium (PPY-Medium) Generationszeiten von ca. drei Stunden und ein Überleben der Kultur ohne Transfer bis zu einem Monat erreicht werden (NILSSON 1989).

2.4.2 Wege in das innere Milieu

Die Stoffaufnahme vollzieht sich über verschiedene Mechanismen und Routen:

Für Wasser, Ionen und kleine, unpolare Moleküle besteht die Möglichkeit der einfachen, transmembranären Passage via Diffusion über die gesamte Oberfläche (HOLZ 1973).

Kleinere Verbindungen wie Aminosäuren, Nukleoside oder Vitamine können über Carrier aufgenommen werden. Größere Verbindungen wie Proteine etc. gelangen in gelöster Form mittels Pinozytose ins Innere. Die Pinozytose vollzieht sich an bestimmten Strukturen der Pellikula (parasomale Säckchen). Partikuläre Elemente finden nur über die anatomisch besondere Eintrittspforte (Zytostom-Zytopharynx-Komplex) den Weg in die Zelle (RASMUSSEN 1976). Mit der Phagozytose von Partikeln werden immer auch Mediumbestandteile mit in die Futtervakuolen aufgenommen (RICKETTS 1972). Solche Partikel entstehen auch in dem eigentlich nonpartikulären PPY-Medium durch die Präzipitation von Metallsalzen (RASMUSSEN u. KLUDDT 1970).

2.4.2.1 Zellmembranen und Pinozytose

Drei Membranen umhüllen *T. pyriformis*. Deren Terminologie ist jedoch nicht eindeutig: Die äußere Grenzmembran oder Plasmalemma (HAUSMANN et al. 2003) entspricht der äußeren pellikulären Membran von TOKUYASU und SCHERBAUM (1965) und bedeckt die Zilien (ALLEN 1967). Unterlagert wird sie von der äußeren alveolären Membran (= innere pellikuläre Membran, nach TOKUYASU u. SCHERBAUM 1965), die wiederum kontinuierlich in die innere alveoläre Membran (= zytoplasmatische Membran, gemäß TOKUYASU u. SCHERBAUM 1965) übergeht (ELLIOTT u. KENNEDEY 1973). Durch die Verbindung der beiden letztgenannten entstehen Alveolen (ALLEN 1967), die für das Infrakingdom namensgebend sind. Ihre Funktion ist unbekannt. Es werden eine oberflächenstabilisierende Wirkung und ein Beitrag zum Wasser- und Ionenhaushalt vermutet (CAMPBELL u. REECE 2003).

Die äußere Grenzmembran (Plasmalemma) ähnelt in ihrem Aufbau sehr stark dem der Membranen von Metazoa. Sie stellt auch bei *T. pyriformis* eine Lipiddoppelschicht dar, in die periphere und integrale Proteine an- bzw. eingelagert sind. Elektronenmikroskopisch findet sich der typische dreischichtige Aufbau. Nach außen schließt sich eine dichte Glykokalyx aus mit Sialinsäureresten verbundenen Oligosaccharidanteilen der Glykoproteine und -lipide an. An ihr finden sich zahlreiche Rezeptoren (MEHLHORN u. RUTHMANN 1992).

Der Einzeller synthetisiert keine Sterole (MEHLHORN u. RUTHMANN 1992). Daher findet sich als Abweichung von der bisherigen Analogie zu höheren Organismen anstelle des Cholesterols das Tetrahymenol (NOZAWA u. THOMPSON 1971).

Phosphatidylethanolamin, 2-Aminoethylphosphonolipid und Phosphorylcholin bilden den Hauptphosphoglyceridanteil der äußeren Grenzmembran (FERGUSON et al. 1982). Darüber hinaus ist das Vorkommen von Gangliosiden (KOTSIFAKI et al. 1985) beschrieben.

Das Lipidmuster unterliegt einer gewissen Plastizität. So kann es in Abhängigkeit von Temperatur (CONNOLLY et al. 1985, RAMESHA et al. 1982, OHKI et al. 1979), Alters- (NOZAWA et al. 1980a) und Ernährungszustand einer Kultur (NOZAWA et al. 1980b) sowie der Ionenkonzentrationen im Medium (MATTOX u. THOMPSON 1980) zu Veränderungen in Bezug auf Sättigungsgrad (einhergehend mit der Fluidität) und Zusammensetzung der Fettsäuren, der Phosphoglyceride, der Phospholipide und ihrer polaren Kopfgruppen kommen.

Die äußere Grenzmembran penetriert anterior der Zilien die inneren pellikulären Schichten leicht ausbuchtend und formt dadurch die bereits genannten parasomalen Säckchen. In diesen Bereichen besteht folglich ein direkter Kontakt mit dem Zytoplasma (PITELKA 1961).

Die parasomalen Säckchen finden sich über die gesamte Oberfläche verteilt, auch die orale Ziliatur bildet keine Ausnahme. Ihre Anzahl wird mit durchschnittlich 1.000 Stück pro Zelle angegeben (NILSSON 1976). Sie bilden so genannte coated pits (NILSSON u. VAN DEURS 1983), Bereiche mit einer Clathrin-ähnlichen Beschichtung (HAUSMANN u. RADEK 1996). Die Pinozytose vollzieht sich als rezeptorabhängige Endozytose (ALLEN u. FOK 1993). Die

Aufnahmeverolumina sind im Vergleich zur Phagozytose ungleich geringer. Bis zu 6 % der Volumina von Futtervakuolen kann *T. pyriformis* über die Pinozytose aufnehmen (NILSSON u. VAN DEURS 1983).

Das endosomale System ähnelt stark dem von Mammalierzellen, was auf eine frühe evolutionäre Entstehung schließen lässt. (HAUSMANN u. RADEK 1996).

Die Membran zeigt weitere Analogien in ihrer Bedeutung für die Informationsübertragung. So sind zahlreiche membranständige Rezeptoren für verschiedene Vertebratenhormone (KÖHIDAI et al. 1995, CSABA et al. 1999, CSABA et al. 2004) und andere Signalstoffe, wie Opioide (O'Neil et al. 1988) beschrieben.

2.4.2.2 Zytostom-Zytopharynx-Komplex und Phagozytose

Der Zytostom-Zytopharynx-Komplex besitzt einen komplizierten Aufbau. An dieser Stelle sollen nur die für das Verständnis der Phagozytose notwendigen Strukturen (Abb. 8) besprochen werden.

Die bukkale Kavität entspricht einer trichterförmigen Einziehung des Kortexes, unterscheidet sich also in der äußeren Begrenzung bis auf das Zytostom nicht vom restlichen Zelleib und hat an der weitesten Ausdehnung die Ausmaße 11,5 µm x 7 µm. An ihrem Grund, der nur wenige Mikrometer tiefer liegt, befindet sich mit dem Zytostom der Eingang in das Zellinnere. Die linke Seite des Zytostoms wird von der zytostomalen Lippe gesäumt, welche mutmaßlich an der Selektion der Nahrung bzw. an der Vakuolenbildung beteiligt ist (ELLIOTT u. CLEMONS 1966). An sie schließt sich in Richtung Zytoplasma eine konische Kavität an (Zytopharynx). Der Übergang des Zytopharynx in die Futtervakuole ist fließend und nur aufgrund der unterschiedlichen Membraneigenschaften beider Organellen zu definieren (NILSSON u. WILLIAMS 1966).

Die Aufnahme größerer Stoffe setzt aufgrund der Struktur des Kortexes spezielle Anpassungen voraus. Dementsprechend fehlen der Grenzmembran auch im Bereich des Zytostoms die unterlagerten Strukturen. Es besteht folglich dieselbe Situation wie bei den parasomalen Säckchen und der Zytophyge. Dadurch wird ein Passieren von Partikeln möglich (HAUSMANN u. RADEK 1996).

Der starre, rigide Kortex bedingt weitere Besonderheiten im Phagozytoseprozess. So müssen die Membranen, die für die Inkorporation sämtlichen partikulären Materials notwendig sind (HAUSMANN 2002), dafür eigens gebildet werden.

Neue Membranen entstammen dem Recycling an der Zytophyge, der Mikropinozytose von Vesikeln während des Digestionsvorganges sowie der Synthese im Golgi-Apparat. Die letztgenannten können Verdauungsenzyme enthalten. Die Synchronisation dieser Prozesse ist zurzeit noch nicht hinreichend verstanden.

Ein besonderes Transportsystem bringt die präformierten Membranen als kleine Vesikel vom Zellinneren zum Zytostom. Zum Teil gelingt dies über Mikrotubuligerüste als Leitstrukturen.

Ein Einfluss von zytoplasmatischem Dynein wird dabei diskutiert. Anschließend fusionieren die Vesikel mit der sich bildenden Nahrungsvakuole (HAUSMANN u. RADEK 1996). Das Adressieren der Vesikel ist noch unklar.

Für den Prozess der Anbildung werden Hunderte bis Tausende Vesikel benötigt (HAUSMANN u. RADEK 1996). Doch weder die Lipid- (WEIDENBACH u. THOMPSON 1974), noch die Proteinkomponenten (RICKETTS u. RAPPITT 1975a und b) der Membranen werden während der Vakuolenbildung de novo synthetisiert. Während sich eine neue Nahrungsvakuole formiert, wird auf bereits im Zytoplasma präsente Membranvesikel zurückgegriffen. Ziliaten sind also nur in der Lage, Nahrung aufzunehmen, solange dieser Vorrat nicht erschöpft ist. (HAUSMANN u. RADEK 1996).

NILSSON (1987) beschreibt die Phagozytose von *Escherichia coli* (*E. coli*) durch *T. pyriformis* und unterteilt dabei den Zyklus (Abb. 8) in acht Stadien:

Im Stadium 1 formiert sich eine Vakuole im Bereich des Zytostoms, induziert durch die mechanischen Eigenschaften der aufgenommenen Teilchen (MUELLER et al. 1965) und löst sich ab. Dies ist der erste Schritt der Digestion, von der Vakuole wird nun als Digestions- oder Nahrungsvakuole gesprochen (HAUSMANN u. RADEK 1996). Die Bakterien liegen in zufälliger Verteilung vor. Dieser Prozess vollzieht sich relativ schnell. Zellen, die zuvor in einem nahrungspartikelfreien Diätmedium gehalten wurden, zeigen die ersten neu gebildeten Vakuolen nach Zugabe entsprechenden Materials bereits nach fünf Minuten. Innerhalb von 15 Minuten ist im Zytoplasma bereits eine große Anzahl von ihnen sichtbar (ELLIOTT u. CLEMMONS 1966).

Stadium 2 ist durch die aufkonzentrierende Dehydratation gekennzeichnet. Im Zuge dessen sowie durch beginnende Ansäuerung lysieren bereits einige Keime.

Im folgenden Stadium kommt es zur Fusion mit primären Lysosomen. Dies ist mit der Situation bei Mammalierzellen vergleichbar (DeDUVE 1963, DeDUVE 1964 und GORDON et al. 1965). Lysosomen beinhalten Hydrolasen, z. B. die saure Phosphatase, die ihr pH-Wert-Optimum im Bereich 3,4 bis 5,6 besitzen (MÜLLER 1971). Durch ihre Aktivität verstärkt sich die Lyse der Bakterien. Intakte Erreger sind noch deutlich. Die Vereinigung primärer Lysosomen mit neu gebildeten Vakuolen kommt allein durch deren Bildung zustande und ist vom Inhalt unabhängig (MUELLER et al. 1965).

Während des Stadiums 4 entsteht durch eine typische Lagesituation im Inneren der Phagosomen ca. 30 Minuten nach Beginn (ELLIOTT u. CLEMMONS 1966) ein so genannter „Halo“. Dies geschieht dadurch, dass weiterhin unversehrte Keime zentral zu liegen kommen und dabei derart von lysiertem Material umgeben werden, dass sich an der Vakuolenperipherie ein optisch weniger dichter Kranz bildet. Durch Mikropinozytose wird bereits nach weiteren 30 Minuten lysiertes Material aus dem Inneren entfernt (NILSSON 1979).

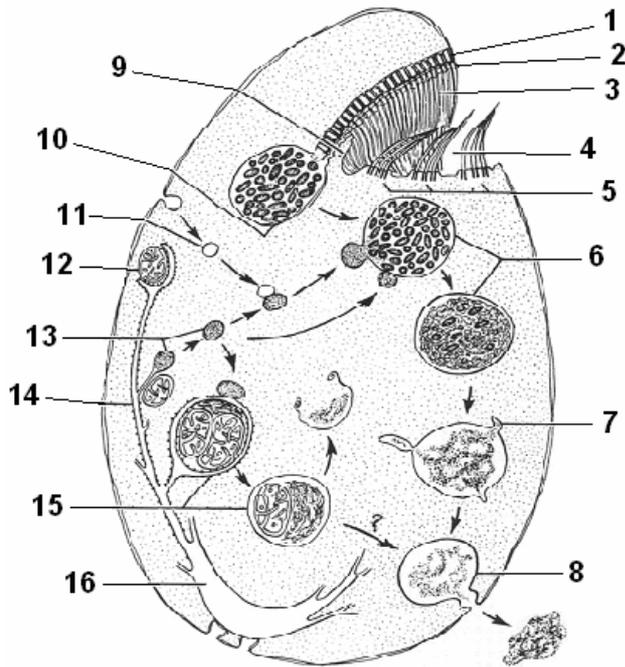


Abb. 8: *T. pyriformis*. Schema zur Illustration von möglichen Wegen der intrazellulären Digestion, Erläuterungen im Text. 1 = zilienlose Kinetosomen, 2 = Rippen, notwendig für die Statik der Membranstrukturen, 3 = undulierende Membran, 4 = bukkale Kavität, 5 = Membranellae I-III, 6 = Nahrungsvakuolen, 7 = extrudierte Nährstoffe, 8 = Residualvakuole an Zytopyge, 9 = zytostomale Lippe, 10 = sich formierende Vakuole, 11 = pinozytotisches Vesikel, 12 = Mitochondrium, 13 = primäre Lysosomen, 14 = raues endoplasmatisches Retikulum (RER), 15 = autophagische Vakuolen, 16 = kontraktile Vakuole, nach ELLIOTT und CLEMMONS (1966).

Stadium 5 repräsentiert die Auflösung der noch verbliebenen Bakterien, dabei wiederholt sich immer wieder die im vorangegangenen Stadium beschriebene Konstellation. Im Stadium 6 beinhaltet die Vakuole eine schmierig erscheinende, homogene Masse. Stadium 7 zeigt zahlreiche bakterielle, vesikuläre Membranstrukturen, die in das Zytoplasma aufgenommen werden. Mit dem Stadium 8 endet der Zyklus schließlich durch die Defäkation unverdaulichen Materials an der Zytopyge nach ca. zwei Stunden.

Während der Wanderung durch die Zelle, ändert sich der pH-Wert des Vakuoleninhaltes. Anfänglich liegt er im sauren Bereich, zum Ende hin verschiebt er sich in den basischen (Gruner 1993). Die Ansäuerung der Vakuolen vor der Fusion mit den Lysosomen kommt durch membranständige Protonenpumpen zustande (MEHLHORN u. RUTHMANN 1992).

Die Zytoproktregion ist lang und eng und wird von elektronendichtem Material begrenzt, welches auch die Ränder benachbarter Alveoli überzieht. Zahlreiche Mikrotubuli dienen als Leitstruktur (HAUSMANN u. RADEK 1996). MISLAN und SMITH-SOMERVILLE (1986) beschrieben die Fusion älterer Vakuolen vor der Egestion bei *Tetrahymena vorax*. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass bei *T. pyriformis* ähnliche Vorgänge ablaufen.

Im Laufe des Defäkationsprozesses nähert sich die Vakuole der Pellikula. Eine enzymati-

sche Aktivität ist nicht länger erkennbar. Gleichzeitig kommt es zum Einziehen der Zytopyge, so dass die Grenzmembran mit der Vakuolenmembran verschmelzen kann. Nach dem Freisetzen des Inhaltes schließt sich die Zytopyge wieder (HAUSMANN u. RADEK 1996).

Die Vakuolenmembran wird durch eine Mikrotubuli- bzw. Mikrofilament-geleitete Endozytose wieder aufgenommen (ALLEN u. WOLF 1979, SCOTT u. HUFNAGEL 1983) und zerfällt innerhalb von 10 bis 15 Sekunden in Tubuli und kleine Vesikel, die nun recycelt und zum Zytostom geschleust werden (HAUSMANN u. RADEK 1996).

Die Herkunft primärer Lysosomen aus dem Bereich des RER (Abb. 9) konnte von ELLIOTT (1965) nachgewiesen werden. Ähnlichkeiten zu Säugetierzellen sind deutlich. Bei diesen wurde der Ursprung der hydrolytischen Enzyme in den Ribosomen nachgewiesen (NOVIKOFF 1961) und ihr weiteren Weg über das raue endoplasmatische via des glatten endoplasmatischen Retikulums in den Golgi-Apparat und von dort in Golgi-Vesikel beschrieben (NOVIKOFF et al. 1964).

Die Synthese der hydrolytischen Enzyme wird durch die Digestionsvakuolen stimuliert (ELLIOTT u. CLEMMONS 1966).

Auch pinozytotische Vesikel unterliegen laut ELLIOTT und CLEMMONS (1966) auf ihrem weiteren Weg einer Fusion mit primären Lysosomen (Abb. 8).

Darüber hinaus weisen die beiden Autoren auf das Vorkommen autophagischer Vakuolen (Abb. 8) und ihre Bedeutung im Rahmen von zelleigenen Degradierungsprozessen hin.

Die Aufnahme von Teilchen ist aufgrund der Anatomie des oralen Apparates samt Filtereinrichtungen aus undulierender Membran und den Membranellen I-III (Abb. 8) am effizientesten, wenn sich ihre Größe zwischen 0,3 und 1,0 μm (FENCHEL 1980) bewegt.

Seine Nahrung selektiert *T. pyriformis* aber wahrscheinlich nicht nur nach der Größe, die der Siebapparat diktiert, sondern das Protozoon kann mutmaßlich in der Aufnahme zwischen lebenden und nicht lebenden Bakterien und Partikeln unterscheiden. Dabei sind Präferenzen für lebende Keime deutlich (WATSON et al. 1981). Für diese These sprechen die Beobachtungen von KOHIDAI et al. (2003), die eine Wirkung von fMLP (*N*-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin) als Chemoattractans nachwiesen.

T. pyriformis vermag es nicht, eine Bakterienpopulation vollständig durch Phagozytose zu eliminieren (WATSON et al. 1981).

2.4.3 Sekretion von Enzymen

T. pyriformis ist imstande, große Mengen lysosomaler Hydrolasen mittels Ca^{2+} -abhängiger Sekretion (TIEDTKE et al. 1988a) in das Medium freizusetzen. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Glykosidasen und saure Phosphatase (MEHLHORN u. RUTHMANN 1992), daneben Proteasen wie Tetrain (SUZUKI et al. 1998), Lipasen, z.B. Triacylglycerolipase oder Phospholipase A₁ (FLORIN-CHRISTENSEN et al. 1986), Nucleasen (Ribonuclease, McKEE u. PRESCOTT 1991, wie Desoxyribonuclease, MÜLLER 1972) und andere.

Dies ist als Ausdruck extrazellulärer Verdauungsschritte (TIEDTKE u. RASMUSSEN 1988, RASMUSSEN et al. 1992) sowie möglicherweise als Abwehrmechanismus gegenüber Prädatoren (FLORIN-CHRISTENSEN et al. 1989) aufzufassen.

Das Wissen über Ort und Art der Sekretion ist derzeit noch sehr unbefriedigend. In der Literatur findet man mitunter einander widersprechende Aussagen.

MÜLLER (1972) vermutete einen Beitrag der kontraktilen Vakuole (Organelle zum Ausgleich des osmotischen Ungleichgewichtes), der sich jedoch nicht bestätigte. SILBERSTEIN (1979) untersuchte die Möglichkeit der Freisetzung über die Egestion als potentiell noch aktiver Inhalt von Nahrungsvakuolen (ROTHSTEIN u. BLUM 1974) anhand einer Phagozytoseblockierten Mutante. Da diese jedoch einen ähnlich hohen Spiegel extrazellulärer Enzyme wie der Wildtyp erreichte, scheint diese Route keine prominente Rolle zu spielen.

Weitere Versuche mit Mutanten zeigten, dass einerseits die Bildung und Egestion von Nahrungsvakuolen und andererseits die Sekretionsfähigkeit lysosomaler Enzyme völlig unabhängig voneinander ablaufen können (HÜNSELER et al. 1987, TIEDTKE et al. 1988b bzw. HÜNSELER u. TIEDTKE 1992).

Diese Beobachtungen implizieren gemäß TIEDTKE et al. (1993), dass Lysosomen ihren Inhalt sowohl zu den Nahrungsvakuolen als auch zur Zelloberfläche transportieren (siehe Abb. 9).

Eingedenk derer komplexen Struktur offerieren sich die parasomalen Säckchen als mutmaßlichen Ort der Freisetzung. Der Beweis steht allerdings noch aus.

Die Autoren fanden außerdem zwei unterschiedliche Formen der extrazellulären Enzyme, eine lösliche und eine, in je nach Enzym unterschiedlichem Maße, gebundene Variante. Die löslichen Enzyme werden nach der Fusion zwischen Lysosom und Membran nach außen freigesetzt. Die gebundenen Enzyme werden zwar über die gleichen Vesikel an die Oberfläche transportiert, anschließend jedoch so inkorporiert, dass sie ihre Funktion im Medium entfalten können, ohne den Kontakt zur Zelle zu verlieren. Alternativ unterliegen sie einem Recycling (siehe Abb. 9).

LEONDARITIS et al. (2005) zeigten, dass die Sekretion lysosomaler Enzyme gesteigert werden kann, wenn die Fusion von Phagosom und Lysosom ausbleibt. Dies ist in gleicher Weise für Makrophagen beschrieben (CLAUS et al. 1998). Bislang ist unbekannt, inwieweit es sich bei diesen Lysosomen und denjenigen, die per se zur Zelloberfläche transportiert werden, um ein und dieselbe Population handelt oder doch um eigentlich zwei verschiedene, die sich je nach Situation ergänzen können. HUTTON (1997) wies auf Analogien zwischen der Freisetzung von vesikeltransportierten Stoffen bei Metazoa (z.B. Neurotransmitter und pankreatische Verdauungsenzyme) und bei Protozoa (z.B. sekretorische Lysosomen) am Beispiel von *Tetrahymena* und *Paramecium* hin. Dabei formuliert er die Frage, inwieweit die bei höheren Organismen mit diesen Vorgängen im Zusammenhang stehenden Proteine, i. e. Synta-

xin, SNAPs, Synaptobrevin und damit die SNARE-Hypothese (HAY u. SCHELLER 1997), bei diesen Einzellern von Bedeutung sind.

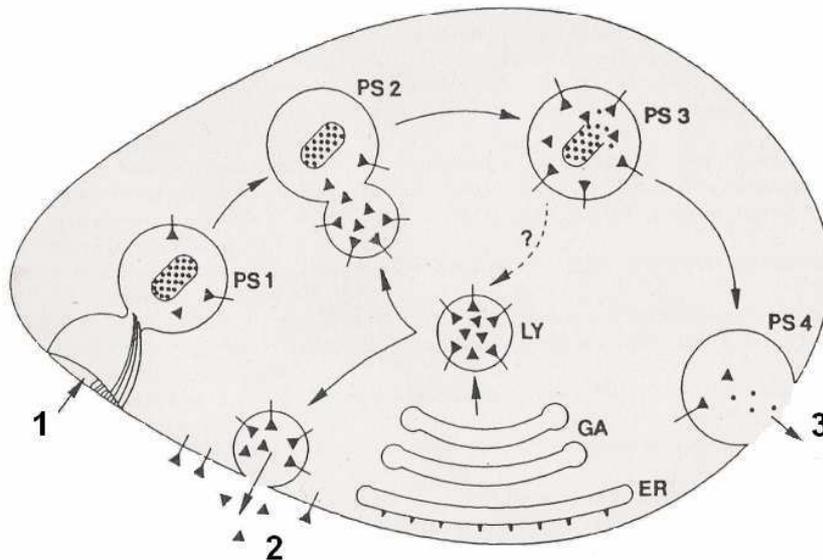


Abb. 9: Schema zu den Routen lysosomaler Enzyme. Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER), Verpackung über den Golgi-Apparat (GA) in Lysosomen (LY), die Verschmelzung mit Phagosomen zu Phagolysosomen oder der Transport an die Zelloberfläche und Freisetzung in das Medium. Näheres im Text. 1 = bukkale Kavität, 2 = sekretierte Enzyme, frei und membran-gebunden, 3 = Egestion, PS 1 = Phagosom, PS 2 bis 4 = aufeinander folgende Stadien der Phagolysosomen, nach KIY et al. (1993).

Die Aufklärung der Adressierung der Lysosomen wie auch die Art der Fusion mit der Grenzmembran als Einleitung der Exozytose stehen allerdings derzeit noch aus.

2.4.3.1 Saure Phosphatase

In Phagolysosomen liegt die saure Phosphatase zu bis zu 80% membrangebunden vor, in den Sekretionsvesikeln hingegen nur zu 42%, wobei der Rest die lösliche Form repräsentiert (KIY et al. 1993). Das Enzym wird im muren Zustand freigesetzt (BANNO u. NOZAWA 1984). ROTHSTEIN und BLUM (1974) zeigten, dass diese Freisetzung einer Kinetik erster Ordnung folgt.

In gewissem Rahmen präsentiert sich die saure Phosphatase als induzierbar. So beschreiben RASMUSSEN et al. (1992) einen Zusammenhang zwischen Phosphatmangel und Syntheseförderung mit erhöhter Freisetzung. Das Medium beeinflusst gleichermaßen die Sekretion. ROTHSTEIN und BLUM (1973) wiesen einen Anstieg in einem Diätmedium (Salzlösung) und nach Zusatz von Acetat sowie einen hemmenden Einfluss von Glukose und Pyruvat nach. Catecholaminantagonisten, wie Dichloroisoproterenol u. a., führen ebenso zu einer Erhöhung (ROTHSTEIN u. BLUM 1974).

Eine eminente Rolle ist ebenfalls dem Kulturalter zuzusprechen. So fanden LAZARUS und

SCHERBAUM (1968) eine 5 bis 7fach höhere Aktivität bei Zellen des Stammes GL in der stationären Phase verglichen mit Zellen in der logarithmischen Phase.

Aus den bisherigen Darlegungen lässt sich schließen, dass *T. pyriformis* lysosomale Enzyme konstitutiv sezerniert, es sich bei der sauren Phosphatase folglich um kein reines induzierbares Enzym handelt. Die Zellen besitzen aber eine genügende Plastizität, um auf umweltbedingte Änderungen entsprechend reagieren zu können (zusätzlich: Persönliche Mitteilung ARNO TIEDTKE, Münster, 21. 12. 2004, per E-Mail).

Die saure Phosphatase wurde von BANNO et al. (1987) in die erste von drei Klassen eingeordnet, die nach Sekretionskinetik unter Mangelbedingungen gruppiert sind. Demnach gehört sie zu den langsam sezernierten Enzymen, i. e. pro Stunde werden ca. 4% der initialen zellulären Aktivität freigesetzt. Weiterhin fanden die Autoren, dass Cycloheximid die Sekretion über einen Untersuchungszeitraum von vier Stunden in einem Salzmedium nicht zu beeinflussen vermag. Das impliziert, dass diese Hydrolase in entsprechendem Maße nicht eigens für einen Freisetzungsprozess von solcher Dauer neu gebildet werden muss. Auch zeigt sich die Exozytose der sauren Phosphatase gegenüber Änderungen im pH-Wert des Mediums unempfindlicher als andere Enzyme.

Zu beachten ist, dass bei allen oben beschriebenen Experimenten das Enzym allein über eine Aktivitätsbestimmung detektiert wurde.

Es können drei (BLUM 1976) bis fünf (NIELSEN u. ANDRONIS 1975) Isoenzyme unterschieden werden.

2.4.4 Modellfunktion und Einsatz als biologischer Indikator

T. pyriformis besitzt für viele Fragestellungen sehr günstige Eigenschaften. Dazu gehören zum einen dessen Größe und Organisation, die Vermehrung, die Haltung und der Umgang mit diesem Protozoon. Weiterhin bestehen starke Ähnlichkeiten zellulärer Prozesse mit den entsprechenden Vorgängen bei höheren Eukaryoten. Darüber hinaus zeigt *T. pyriformis* eine vergleichbare Sensibilität hinsichtlich äußerer Reize. Dies alles prädestiniert den Einzeller als Modellobjekt für die Aufklärung der Abläufe verschiedenster Mechanismen und Reaktionsschemata, die evolutionär konserviert vorzufinden sind (z.B. CSABA 1985, WHEATLEY et al. 1994, GAERTIG 2000, KOHIDAI et al. 2003, TURKEWITZ 2004). Des Weiteren bietet sich der Einzeller als Indikator für z. B. toxische Effekte zu prüfender Substanzen an.

So wurden verschiedene Testverfahren mit *Tetrahymena* spp., je nach Fragestellung mit der konjugationsunfähigen *T. pyriformis* oder der sexuell aktiven *Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*), entwickelt, um die Zellverträglichkeit und Zytotoxizität verschiedener Stoffe, wie Schwermetalle (NILSSON 1989, NICOLAU et al. 1999) sowie Labor- und Umweltchemikalien zu evaluieren (z.B. SLABBERT u. MORGAN 1982, GRÄF 1985, HUBER et al. 1990, SCHULTZ 1997, LARSEN et al. 1997, GILRON et al. 1999, SAUVANT et al. 1999, SINKS und SCHULTZ 2001, SEWARD et al. 2002, DAYEH et al. 2004, NETZEVA u. SCHULTZ

2005, ROY et al. 2005).

Daraus wurden Schlussfolgerungen für Effekte und Einsatz bei Metazoa gezogen. Zytotoxizitätstests mit *T. pyriformis* wurden auch in Kombination mit anderen Verfahren verwendet, z. B. für die Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials verschiedener Chemikalien mit herangezogen (APTULA et al. 2006).

Des Weiteren existieren Methoden, mit Hilfe des Einzellers den Nährwert von Fleischprodukten zu überprüfen (PORRINI u. TESTOLIN 1984). Auch der Einfluss biologischer Substrate wie Mykotoxine (TASHIRO et al. 1979) und bakterielle Toxine (De WAART et al. 1972, SCHLIMME et al. 1999) war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Der von SCHLIMME et al. (1999) veröffentlichte Test führt eine Begutachtung potentieller Effekte lediglich aufgrund von Zelltod und morphologisch sichtbaren Wirkungen durch.

De WAART et al. (1972) untersuchten den Einfluss von nach verschiedenen Protokollen produzierten und präparierten BoNTs der Stämme A, B (nach BOROFF 1955) und E (nach SAKAGUCHI et al. 1961 und 1964) allein auf das Wachstumsverhalten von *T. pyriformis* im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrollgruppe und konnten damit eine Nachweisgrenze von $1,00E+03$ (A und E) bzw. $1,00E+02$ MLD/ml (B) erreichen. Diese Nachweisgrenze wurde von ihnen als klinisch uninteressant bewertet. Funktionelle Parameter im Zusammenhang mit BoNTs sind in der Literatur bisher unberücksichtigt geblieben.

3 Material und Methoden

Eine alphabetisch geordnete Übersicht mit den verwendeten Mikroorganismen, Laborgeräten, Kulturmedien und Reagenzien sowie sich wiederholenden Techniken, deren Anwendung im Folgenden beschrieben wird, findet sich im Anhang.

3.1 Produktion der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände von *C. botulinum* sowie entsprechender Kontrollüberstände

3.1.1 Herkunft der Clostridien-Spezies sowie der *C. botulinum*-Toxovare

Es wurden die *C. botulinum*-Toxovare A bis G sowie *C. sporogenes* eingesetzt. *C. sporogenes* ist weder anhand metabolischer noch biochemischer Leistungen von *C. botulinum* zu trennen. Die Unterscheidung beruht nur auf dem fehlenden Neurotoxinbildungsvermögen (CATO et al. 1986). Daher bietet sich *C. sporogenes* als atoxischer Kontrollstamm an. Die *C. botulinum*-Toxovare A, B und F sowie der *C. sporogenes*-Stamm wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig, die *C. botulinum*-Toxovare C bis E und G vom Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Bereich Tierhygiene, Göttinger Clostridien Center der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Herstellung und Gewinnung der Kulturüberstände

Die sieben verschiedenen *C. botulinum*-Toxovare sowie der *C. sporogenes*-Stamm lagen in unterschiedlichen Konservierungsvarianten vor.

C. botulinum A, B und F und *C. sporogenes* waren in einer Magermilchkultur bei -80°C gelagert worden. Die Toxovare C, D und G waren lyophilisiert. *C. botulinum* E lag als Flüssigkultur im Reinforced Clostridial Medium (= RCM, 5 ml Gesamtvolumen) vor.

Die Vorbereitung zur Neurotoxinproduktion geschah in zwei Schritten. Der erste variierte gemäß den unterschiedlichen Ausgangsbedingungen, der zweite war anschließend für alle Stämme außer für E aufgrund des geringen Toxinbildungsvermögens gleich.

Die Röhrchen mit den Toxovaren A, B und F sowie *C. sporogenes* wurden in der Hand ange-taut. Mit einem sterilen Glasstab wurde Material entnommen und auf je einer Columbia-Blutplatte ausgestrichen. Diese wurden 3 d in einem Anaerobiertopf bei 37°C bebrütet. Das anaerobe Milieu wurde mittels Anaerocult® A geschaffen. Anschließend wurden die Kolonien mit 2,5 ml RCM-Bouillon abgeschwemmt. Pro Stamm wurden anschließend zehn Columbia-Blutplatten verwendet, die jeweils mit 100 µl gewonnener Bakteriensuspension beimpft wurden. Die Platten wurden anaerob (s. o.) bei 37°C 3 d lang bebrütet. Parallel wurde jeweils eine Kontrolle auf Kontaminationen mit aeroben Keimen mitgeführt (Columbia-Blutplatte, 37°C, bis zu 3 d Bebrütung).

Die gefriergetrockneten Toxovare C, D und G wurden in je 3 ml RCM-Bouillon gelöst und anschließend in Hungate-Röhrchen umgefüllt. Diese wurden begast und bei 37°C bebrütet. Das Wachstum wurde anhand der Trübung des Mediums verfolgt. Nach 3 d wurden je zehn Columbia-Blutplatten mit je 100 µl der bewachsenen Bouillon beimpft. Das weitere Vorgehen entsprach dem Arbeitsschema bei A, B und F.

Die Vorbereitung des Toxovars E erfolgte abweichend. Zunächst wurde auch hier ähnlich wie bei C, D und G verfahren. Aus der RCM-Bouillon wurden entsprechend Platten beimpft und analog weiter bearbeitet. Da diese Methode aber zu keiner im Maus-Bioassay nachweisbaren Neurotoxinproduktion führte, wurde ein anderes Verfahren verwendet. Aus einer weiteren RCM-Kultur wurden je 2 ml direkt in je 10 ml Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Medium (TPGY) bzw. in die trypsinhaltige Variante (TPGYT) inokuliert. Die Möglichkeit einer Kontamination mit aeroben Keimen wurde durch eine entsprechende Kontrolle ausgeschlossen. Dazu wurden 10 µl der RCM-Kultur auf einer Columbia-Blutplatte ausgestrichen und bei 37°C bis zu 3 d lang bebrütet.

Das Protokoll zur Produktion der neurotoxinhaltigen Überstände orientierte sich an der DIN 10102. Für die Toxinproduktion wurde das Grundmedium TPGY verwendet. Dabei wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen pro Toxovar gearbeitet, zum einen mit Trypsinzusatz (TPGYT), zum anderen ohne (TPGY). Der Trypsinzusatz wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und sterilfiltriert.

Fünf der bebrüteten Blutplatten eines Toxovars (exkl. Toxovar E) wurden für einen Ansatz mit TPGYT und fünf für einen Ansatz mit TPGY verwendet. Die Keime wurden mit 3 ml des jeweiligen Mediums pro Platte abgewaschen. Der Ertrag aller fünf Platten (15 ml) wurde zusammengeführt und in je 100 ml des entsprechenden Mediums inokuliert. Kontrollen auf Kontaminationen mit aeroben Keimen wurden von jedem Ansatz, wie bei der Vorbereitung von *C. botulinum* E beschrieben, mitgeführt. Für die Ansätze zur Neurotoxinproduktion (Tab. 6) wurden 250 ml Erlmeyerkolben verwendet.

Daneben wurden Mediumkontrollen von TPGY und TPGYT mitgeführt. Die Kontrollen enthielten kein Bakterieninokulum. In allen anderen Punkten entsprach jedoch das Bearbeitungsverfahren den Ansätzen zur Neurotoxinproduktion. In die Kontrollen für Toxovar E wurde im selben Verhältnis RCM hinzugefügt. Anschließend wurden die Medien mit 50 ml sterilisiertem Paraffin (160°C, 3 h) überschichtet und so unter Luftausschluss 7 d bei 25°C inkubiert. Währenddessen konnte eine Zunahme der Trübung beobachtet werden. Nach den 7 d wurden die bebrüteten Ansätze mit einer Pipette unter der Paraffinschicht abgesaugt, bei 8°C und 3.600 U/min 15 min lang zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Vor der Zentrifugation wurde jeweils noch mal auf eine Kontamination mit aeroben Keimen getestet, indem 10 µl der verschiedenen Ansätze auf einer Columbia-Blutplatte ausgestrichen und bei 37°C bis zu 3 d lang bebrütet wurden. Nach der Sterilfiltration erfolgte die Aliquotierung in 1,5 ml

Portionen, die bei -80 °C gelagert wurden.

3.1.3 Quantifizierung der BoNTs

Die Quantifizierung der BoNTs in den Kulturüberständen (Tab. 6) erfolgte im Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Bereich Tierhygiene, Göttinger Clostridien Center der Georg-August-Universität Göttingen über den Maus-Bioassay. Die Neurotoxinsmengen werden im Folgenden aus Gründen der Übersichtlichkeit stets als MLD/ml angegeben, da die entsprechenden absoluten Mengen je nach Neurotoxintyp unterschiedlich sind (siehe Tab. 2).

Tab. 6: Übersicht über die Kulturansätze und die erreichten Neurotoxinkonzentrationen in den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen gemäß dem Maus-Bioassay

Abkürzung	Neurotoxintyp	Medium	Bemerkungen	MLD/ml*
A	A	TPGY		1,00E+03
B	B	TPGY		1,00E+03
C	C	TPGY		1,00E+03
D	D	TPGY		1,00E+03
E	E	TPGY		_(a)
F	F	TPGY		1,00E+03
G	G	TPGY		1,00E+03
S	-	TPGY	<i>C. sporogenes</i>	-
AT	A	TPGYT		1,00E+03
BT	B	TPGYT		1,00E+03
CT	C	TPGYT		1,00E+03
DT	D	TPGYT		1,00E+03
ET	E	TPGYT		1,00E+01
FT	F	TPGYT		1,00E+03
GT	G	TPGYT		1,00E+03
ST	-	TPGYT	<i>C. sporogenes</i>	-
Ni	-	TPGY	Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert	-
NiT	-	TPGYT	Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert	-
Ni ⁺	-	TPGY + RCM	Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert	-
NiT ⁺	-	TPGYT + RCM	Medium ohne Bakterieninokulum, mitinkubiert	-

* = Die MLD/ml wurden aus ethischen Gründen nur auf die Zehnerpotenz genau bestimmt.

Diese Größenordnung war zunächst für den Überblick ausreichend und hätte bei entsprechenden Ergebnissen in den Versuchen zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände auf die Phagozytose und Exozytose weiter spezifiziert werden können.

^(a) Der Übersichtlichkeit halber wird auch dieser Kulturüberstand im Folgenden eingeschlossen, wenn von den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen die Rede ist.

3.1.4 Weitere Untersuchungen der Kulturüberstände

Der Einfluss der Auftau- und Einfrierprozesse auf die Aktivität wurde exemplarisch an den Kulturüberständen des Toxovars B (TPGY- und TPGYT-Ansatz) wie im Anhang beschrieben geprüft.

3.2 *T. pyriformis*

3.2.1 Herkunft

In den Experimenten dieser Arbeit wurde *T. pyriformis* GL verwendet. Der Stamm wurde von Herrn Dr. Pauli aus dem Institut für Biologie der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Haltung und Wachstumskinetik

Bei den Kultivierungsbedingungen von *T. pyriformis* wurde zwischen Langzeitkultivierung und der Anzucht für die Experimente unterschieden. Um optimale Resultate zu erzielen wurden Vorversuche mit dem Proteose-Pepton-Yeast-Medium (PPY), einem Glukose addierten PPY (PPYG) und dem nährstoffarmen Reismedium (RM) bei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, $21\text{C} \pm 3\text{C}$ und Brutschranktemperatur, 28C) unternommen, bei der das Wachstumsverhalten anhand der Zellzahlentwicklung bestimmt wurde. Die Zellzahlbestimmung erfolgte über die Neubauer-Zählkammer (siehe Anhang). Zunächst wurde durch sechsmalige Auszählung der Protozoen aus demselben Ansatz die Varianz dieser Zählmethode bestimmt. Dieser Versuch wurde zweimal mit Kulturen unterschiedlichen Alters wiederholt.

Zusätzlich wurde der pH-Wert der Kulturen mittels Indikatorpapier (siehe Anhang) bestimmt. Als Kultivierungsgefäße kamen zwei verschiedene Zellkulturflaschen zum Einsatz. Für die Langzeitkultivierung wurden 75 cm^2 -Flaschen verwendet. Diese wurden mit 20 ml autoklaviertem (121C , 20 min) Mineralwasser der Fa. Volvi c® (im Folgenden = Wasser) gefüllt. Dazu wurden fünf autoklavierte Reiskörner (121C , 20 min) als Nährsubstrat hinzugegeben (= RM). Die Flaschen wurden aufrecht bei Raumtemperatur abgedunkelt aufbewahrt. *T. pyriformis* wurde inokuliert, so dass zu Beginn der Lagerung eine Konzentration von \log_{10} Zellzahlen/ml 5,00 bestand.

Für die Kultivierung vor den Experimenten wurden 25 cm^2 -Zellkulturflaschen verwendet. Ent-

sprechend den Ergebnissen aus den Vorversuchen wurde PPYG als Medium verwendet. Die Flaschen wurden mit 10 ml PPYG gefüllt und liegend bei Raumtemperatur abgedunkelt gelagert. Es wurden je nach Versuchsansatz unterschiedliche Mengen von *T. pyriformis* inokuliert. Anhand der erstellten Wachstumskurve konnte die Konzentration des Inokulums ermittelt werden, die notwendig war, um am Tag des Experimentes eine entsprechend große Anzahl von Protozoen in der gewünschten Wachstumsphase zur Verfügung zu haben.

3.2.3 Entwicklung des Phagozytostests

Die Bestimmung der Phagozytoseleistung von *T. pyriformis* erfolgte durch Zählung der Kolonie bildenden Einheiten/ml (KbE/ml) der Futterbakterien nach der Inkubationszeit. Die Bakterien sollten in einer konstanten Konzentration eingesetzt werden, um die Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten.

Die Testbedingungen mussten in den Vorversuchen bestimmt werden. Dabei galt, dass ein möglichst großer und einfach zu reproduzierender Effekt sichtbar sein sollte.

Als Futterkeim wurde sich zunächst mit *E. coli* K12 für einen gut charakterisierten und a-pathogenen Stamm entschieden. Die *E. coli* K12-Kultur wurde für die Versuche stets gleich vorbereitet (Entnahme eines keimhaltigen Kügelchens aus dem CryobankTM-Medium, gelagert bei -80°C, ausgestrichen auf einer Columbia-Blutplatte, eintägige aerobe Bebrütung bei 37°C).

3.2.3.1 Einstellen der Bakterienzellzahl

Für die Einstellung der Konzentration der Futterkeime wurde auf die von SCHROEDL et al. (2003) erstellte Gleichung zurückgegriffen, die die Abhängigkeit der Extinktion einer *E. coli* K12-Suspension von der Zellzahl wiedergibt. Dabei wurde von den Autoren folgende Beziehung ermittelt:

$$KZ = E \times 24,47$$

KZ entspricht der Keimzahl ($n \times 7,00 \log_{10}$ KbE/ml), E der Extinktion, gemessen bei 620 nm. Das Gesamtvolumen der *E. coli* K12-Suspension (in Wasser) für die fotometrische Bestimmung betrug 750 µl.

3.2.3.1.1 Reproduzierbarkeit der *E. coli* K12-Quantifizierung

Es wurden die Reproduzierbarkeit der Keimzahleinstellung mittels optischer Dichte und der Ermittlung der KbE/ml untersucht. Dafür wurden von einer *E. coli* K12-Kultur jeweils dreimal Keime so in Wasser suspendiert, dass die Suspension einen Extinktionswert von 0,123 ergab. Dies entspricht rechnerisch einer Keimzahl von ca. $7,48 \log_{10}$ KbE/ml. Aus diesen Suspensionen wurden jeweils dreimal 20 µl entnommen und die KbE/ml bestimmt (siehe Anhang). Der Versuch wurde an zwei unterschiedlichen Tagen wiederholt.

3.2.3.2 Einfluss des Reaktionsmediums auf *E. coli* K12 und *T. pyriformis*

Um die Zuordnung der Experimente zu den Ergebnissen im Anhang zu erleichtern, sind die Experimente bis zu den Versuchen zum Einsatz der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände (3.3.) nummeriert.

(P1) Das Reaktionsmedium hatte einheitlich zu sein, um dessen Einfluss gering zu halten, außerdem sollte es einen möglichst geringen Einfluss auf die Vermehrung der eingesetzten Mikroorganismen im Beobachtungszeitraum haben. Dazu wurde der Einfluss von Wasser auf die Wachstumskinetik von *E. coli* K12 und *T. pyriformis* geprüft.

Eine *E. coli* K12-Kultur wurde mit Wasser abgeschwemmt. Die Zellzahl wurde fotometrisch auf $7,48 \log_{10} \text{KbE/ml}$ eingestellt. Weiterhin wurde eine PPYG-Kultur von *T. pyriformis* zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in Wasser aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels einer Zählkammer bestimmt und durch entsprechende Verdünnungen auf $5,18 \log_{10} \text{Zellzahl/ml}$ eingestellt. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 1,5 ml. Als Reaktionsgefäße kamen 15 ml-Zentrifugenröhrchen zum Einsatz. Diese wurden im Brutschrank bei 28°C inkubiert, da dieses der optimalen Temperatur für die Protozoen entspricht. Die Lagerung der Gefäße wurde in einem Neigungswinkel von ca. 30° vorgenommen. Die im Vergleich zu den eingesetzten Ansatzvolumina großen Reaktionsgefäße sowie deren geneigte Lagerung waren notwendig, um eine entsprechend große Oberfläche zur Sauerstoffversorgung für die Protozoen zu erhalten. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4 und 24 h wurden die KbE/ml bzw. die Zellzahl/ml bestimmt. Der Versuch wurde als Dreifachansatz durchgeführt. Entsprechend den Ergebnissen wurde im Folgenden Wasser als Medium für die Protozoen- bzw. Bakteriensuspensionen sowie als Verdünnungsmedium verwendet.

3.2.3.3 Einfluss der Vorkultivierung von *T. pyriformis*

(P2) *T. pyriformis* wurde in einer Endkonzentration von $5,00 \log_{10} \text{Zellzahl/ml}$ eingesetzt, da das eine Zelldichte ist, die unter den genannten Kultivierungsbedingungen relativ schnell und sicher erreicht werden kann. Die Kulturen (PPYG) wurden jeweils 3 d vor Versuchsbeginn aus Langzeitkulturen neu etabliert (Inokulationskonzentrationen von $2,00 \log_{10} \text{Zellzahl/ml}$). Für das Experiment wurden wiederum 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Lagerung in einem Winkel von ca. 30° bei 28°C im Brutschrank) verwendet. In einem Ansatz wurde *T. pyriformis* aus einer PPYG-Kultur (letztes Drittel der logarithmischen Wachstumsphase) entnommen, zentrifugiert (siehe Anhang) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in Wasser aufgenommen. In einem zweiten Ansatz wurde dieser Schritt bereits 1 d vor dem Experiment durchgeführt und *T. pyriformis* über Nacht in Wasser in einer 25 cm^2 -Zellkulturflasche bei Raumtemperatur abgedunkelt gelagert. Vor dem Beginn des Experimentes wurde jeweils die Zellzahl eingestellt (s. o.). Für das Experiment wurde ein Gesamtansatz aus drei voluminmäßig gleichen Anteilen gewählt (Protozoensuspension, Bakteriensuspension und Wasser), wobei der dritte Anteil später durch die zu testenden Kulturüberstände ersetzt werden sollte.

Die Protozoen und die Bakterien wurden als Suspensionen in Wasser eingesetzt.

Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 1,5 ml. Im ersten Vorversuch für die Bestimmung der Phagozytoseleistung wurde *E. coli* K12 in einer Endkonzentration von $7,00 \log_{10}$ KbE/ml verwendet. Ein vergleichbarer Ansatz ohne Protozoen wurde wie in der Folge stets mitgeführt. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4 und 24 h wurden jeweils 20 µl aus den Ansätzen entnommen und die KbE/ml bestimmt. Eine Kontrolle auf Kontaminationen mit aeroben Keimen der Protozoensuspensionen wurde, wie auch in den folgenden Versuchen, stets durchgeführt, indem jeweils 10 µl der Suspensionen auf Columbia-Blutplatte ausgestrichen und bis zu 3 d bei 37°C inkubiert wurden. Aufgrund der Ergebnisse dieses Experimentes wurde *T. pyriformis* in der Folge stets 1 d vor Versuchsbeginn wie beschrieben aus einer PPYG-Kultur (letztes Drittel der logarithmischen Wachstumsphase) entnommen und über Nacht in Wasser gelagert.

3.2.3.4 Ermittlung der optimalen Zellzahlen

Die anschließenden Versuche sollten das Ergebnis durch Variation der eingesetzten Zellkonzentrationen optimieren. So wurde an der Konzentrationen der Organismen und ihrem Verhältnis zueinander gearbeitet. Die angegebenen Konzentrationen verstehen sich im Folgenden als Endkonzentrationen. Der grundsätzliche Versuchsaufbau wurde beibehalten.

(P3) Zunächst wurde die Bakterienkonzentration konstant gehalten und die Protozoenzahl variiert. Unter den genannten Kultivierungsbedingungen ist zuverlässig eine maximale Protozoenzahl von $6,08 \log_{10}$ Zellzahl/ml zu erreichen. Die Bakterienzahlen sollten sich vorerst nur in Zehnerpotenzen von den Protozoen unterscheiden. Da der Ansatz wiederum aus drei volumenmäßig gleichen Teilen bestand, wurde *E. coli* K12 in einer konstanten Konzentration von $7,60 \log_{10}$ KbE/ml eingesetzt. Die jeweiligen Konzentrationen von *T. pyriformis* wurden in Zehnerverdünnungsschritten abnehmend von $5,60$ bis $3,60 \log_{10}$ Zellzahl/ml gewählt. Geprüft wurde zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 8 und 24 h wie beschrieben. Der 1-h-Wert wurde gemäß den Ergebnissen des vorhergehenden Versuches weggelassen, der 8-h-Wert noch aufgenommen, um den Verlauf differenzierter zu beobachten. Auf der Grundlage der Ergebnisse dieses Versuches wurde die Inkubationszeit nicht mehr auf über 8 h ausgedehnt.

(P4) Im Folgenden wurde die Konzentration der Bakterien in Zehnerverdünnungsschritten von $8,60$ bis $4,60 \log_{10}$ KbE/ml variiert und die Protozoenzahl mit $5,60 \log_{10}$ Zellzahl/ml konstant gehalten. Geprüft wurde zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, und 8 h.

(P5) Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich die Zellzahlen der eingesetzten Organismen noch mehr verringern lassen. Dazu wurde zunächst die in diesem Versuch konstante Bakterienkonzentration von *E. coli* K12 auf $7,00 \log_{10}$ KbE/ml verringert. *T. pyriformis* wurde in Konzentrationen von $4,60$ in Zweiverdünnungsschritten auf $4,00 \log_{10}$ Zellzahl/ml verringert. Durch die Ergebnisse der vorherigen Versuche wurde nur noch zu den Zeitpunkten 0, 2 und 4 h geprüft. Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuches wurde von weiteren Konzentrations-

modifikationen abgesehen. Damit wurden die Bakterien im Folgenden in einer Konzentration von $7,00 \log_{10} \text{KbE/ml}$ und die Protozoen in einer Konzentration von $4,60 \log_{10} \text{Zellzahl/ml}$ eingesetzt. Darüber hinaus wurden die KbE/ml nur noch zum Zeitpunkt 4 h bestimmt.

3.2.3.5 Weitere Untersuchungen des Phagozytosestests

(P6) Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob andere Futterkeime bessere Resultate erzielen könnten. Dazu wurden *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus* spp. und *Candida albicans* (*C. albicans*) getestet. Die Keimkonzentrationen wurden anhand eines Vergleichs mit der Trübung einer *E. coli* K12-Suspension der Konzentration $7,48 \log_{10} \text{KbE/ml}$ eingestellt (entspricht der Anfangskonzentration des vorhergehenden Versuches). Auch diese Keime lagen im CryobankTM-Medium bei -80 vor. Die Vorbereitung der Kultur erfolgte im Fall der grampositiven Bakterien (*S. aureus* und *Bacillus* spp.) auf Columbia-Blutagar bei 37°C und 24stündiger Inkubation, im Fall der Hefen (*C. albicans*) auf Sabouraud-Agar bei 37°C und dreitägiger Inkubation. Darüber hinaus wurde wie in den früheren Versuchen verfahren. Dieses Experiment wurde wie stets in der Folge als Dreifachansatz durchgeführt. Aufgrund ihres lediglich orientierenden Charakters und der Wiederholungen in anschließenden Versuchen waren die bisherigen Ansätze jeweils nur einmal durchgeführt worden. Da die Versuche mit *E. coli* K12 im Sinne der Anforderungen an den Phagozytosestest deutlich bessere Ergebnisse produzierten, wurde von weiteren Versuchen mit anderen Futterkeimen abgesehen und weiterhin *E. coli* K12 verwendet.

(P7) Weiterhin wurde geprüft, inwieweit der Ansatz in der *E. coli*-K12-Suspension, die während der Versuche verwendet wurde, das Wachstumsverhalten der Protozoen beeinflusst. Der Versuchsaufbau entsprach dem bisher optimierten Phagozytosestest. Da aber zugleich eine Zellzählung der Protozoen erfolgen sollte, wurde der Ansatz abweichend vom bisherigen Protokoll länger inkubiert. Für die Zellzählung konnten so nach 0, 4 und 24 h jeweils 50 µl entnommen werden.

Nachdem der grundsätzliche Versuchsaufbau feststand, galt es, weiter zu optimieren.

(P8) So wurde geprüft, wie stark der Versuchsansatz volumenmäßig verkleinert werden konnte, um vor allem den Einsatz der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände möglichst gering zu halten. Das Gesamtvolumen wurde von 1,5 ml schrittweise halbiert, wobei aus Praktikabilitätsgründen nach 750 µl mit 300 µl bis 75 µl weitergemacht wurde. Ab dem Gesamtvolumen von 300 µl wurden aufrecht stehende 1,5 ml-Reaktionsgefäße verwendet.

Aufgrund der Ergebnisse wurde im Folgenden ein Gesamtvolumen von 75 µl eingesetzt.

Da die Versuchsoptimierung soweit als abgeschlossen betrachtet wurde, sollte weiter untersucht werden, ob andere Faktoren die tatsächliche Phagozytoseleistung möglicherweise überdecken.

(P9) So wurde der potentiell degradierende Einfluss von sezernierten Produkten von *T. pyri-formis* auf *E. coli* K12 untersucht. Dazu wurde bei einem Gesamtvolumen von 75 µl anstelle

der Protozoen zentrifugierter und sterilfiltrierter Überstand aus verschiedenen *T. pyriformis*-Kulturen eingesetzt. Dies war zum einen eine 5 d alte PPYG-Kultur, zum anderen eine eintägige Wasser-Kultur, wie sie in den Phagozytoseversuchen zum Einsatz kommen würde. In den jeweiligen Kontrollen wurde statt der filtrierten Überstände nur PPYG bzw. Wasser verwendet.

3.2.3.6 Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose

(P10) Weiterhin wurde der Einfluss der Medien Ni und NiT auf die Phagozytoseaktivität (Abk. siehe Tab. 6) überprüft. Dazu wurde in Analogie zu den späteren Phagozytoseversuchen mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen eine einstündige Vorinkubation der Protozoen mit Wasser (Kontrolle) oder Ni bzw. NiT oder entsprechender 1:2 oder 1:10 Verdünnungen der Medien Ni bzw. NiT mit Wasser vorgenommen. Anschließend wurde der Phagozytostest entsprechend der bisherigen Optimierung durchgeführt. Als Folge der Ergebnisse wurden die Überstände entsprechend stets 1:2 vorverdünnt. Der Einfluss des Mediums, in dem Toxovar E kultiviert wurde, wurde separat geprüft. Da zu diesem Zeitpunkt schon Erfahrungen aus den vorherigen Ansätzen vorlagen, wurde auf die aufwändigen weiteren Untersuchungen verzichtet und nur Ansätze untersucht, die mit Wasser (Kontrolle) oder mit einer 1:2 Verdünnung von Ni⁺ bzw. NiT⁺ vorinkubiert worden waren. Die Protozoen reduzierten die KbE/ml in einer vergleichbaren Größenordnung wie bei den anderen Kulturüberständen, daher wurden Ni⁺, NiT⁺ sowie die Überstände des Toxovars E (TPGY- und TPGYT-Ansatz) ebenfalls in der 1:2 Verdünnung eingesetzt.

3.2.3.7 Einfluss der Kulturüberstände auf *E. coli* K12

(P11) Einem potentiellen Einfluss der Kulturüberstände (vgl. Tab. 6) auf das Wachstum von *E. coli* K12 wurde in folgendem Ansatz nachgegangen, der gemäß dem bisher erstellten Protokoll durchgeführt wurde mit der Ausnahme, dass die Protozoensuspension durch Wasser ersetzt worden war. Alle Kulturüberstände wurden in der gleichen Verdünnungsstufe wie auch in den Hauptversuchen eingesetzt, i. e. es wurden bis auf Toxovar E alle neurotoxinhaltigen Kulturüberstände in einer Anfangskonzentration von 1,00E+03 MLD/ml verwendet. Im Fall des trypsinisierten *C. botulinum* E-Überstandes konnte aufgrund des schwachen Toxinbildungsvermögens nur auf 1,00E+01 MLD/ml zurückgegriffen werden. Der TPGY-Ansatz wurde trotz des negativen Ergebnisses im Maus-Bioassay mitgeführt. Da die MLD/ml nicht genauer als bis auf die Zehnerpotenz bestimmt wurde, wird im Folgenden bis auf den *C. botulinum*-E-Überstand stets eine Endkonzentration von 1,50E+02 MLD/ml angegeben, was eine tatsächliche Anfangskonzentration von ca. 1,00E+03 MLD/ml (Vorverdünnung 1:2, anschließende Verdünnung durch Einsatz im Versuch von 1:3) voraussetzt. Da diese tatsächliche Anfangskonzentration jedoch nur ein Schätzwert ist und in entsprechend weiten Grenzen (von 1,00E+03 bis kleiner 1,00E+04 MLD/ml) variieren kann, ist die angegebene

Endkonzentration nur als Richtwert zu verstehen. Entsprechendes gilt für den *C. botulinum*-E-Überstand (Angabe im Folgenden von 1,50E+00 MLD/ml).

3.2.4 Entwicklung des Exozytostests

Auch in diesen Vorversuchen galt es, die Bedingungen für ein optimales und einfach zu erhaltenes Messsignal zu erstellen. Zunächst wurde überprüft, welches Kulturalter und welche Zellzahl für ein stabiles Ergebnis notwendig sind. Außerdem wurde untersucht, welcher pH-Wert für den Puffer zur Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase (SPP) am besten geeignet ist. Die angegebenen Zellkonzentrationen sind stets als Endkonzentration zu verstehen.

(E1) In einem ersten Vorversuch wurden folgende Ansätze verwendet: Eine 2 d alte PPYG-Kultur (5,45 log₁₀Zellzahl/ml), eine 8 d alte PPYG-Kultur (5,98 log₁₀Zellzahl/ml), eine 10 d alte PPYG-Kultur (Zellen abgestorben), eine 5 d alte PPYG-Kultur, die tags zuvor wie für den Phagozytostest behandelt worden war (5,70 log₁₀Zellzahl/ml) sowie zur Kontrolle der reinen Medienextinktionen PPYG und Wasser. Aus diesen Ansätzen wurden jeweils 1 ml entnommen, 5 min bei 4.000 U/min zentrifugiert und sterilfiltriert. Aus dem Filtrat wurden 50 µl 1:4 mit SPP versetzt. Der SPP wurde mit jeweils drei verschiedenen pH-Werten (4,0, 5,0 und 6,0, Überprüfung mittels Indikatorpapier) eingesetzt. Zu diesem Ansatz wurden 5 µl einer 300 mM Di-Natrium-4-Nitrophenylphosphat-Lösung (pNPP) addiert. Der Ansatz erfolgte in einer Mikrotiterplatte (96 Wells). Nach 5, 15, 30 und 60 min Inkubation auf dem Schüttler (400 U/min, bei Raumtemperatur) wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 1 N NaOH-Lösung gestoppt. Die Extinktionen wurden bei 405 nm und 620 nm als Referenzfilter gemessen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der SPP im Anschluss mit einem pH-Wert von 4,0 verwendet. Die Inkubationszeit wurde aus Praktikabilitätsgründen auf 15 min festgelegt.

3.2.4.1 Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung

(E2) Um die Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung zu bestimmen, wurde der Überstand einer 2 d alten PPYG-Kultur (5,45 log₁₀Zellzahl/ml) wie behandelt beschrieben und durch Verdünnung mit PPYG auf eine mOD (Optische Dichte/1.000) von ca. 1.500, gemessen bei 405 nm und 620 nm als Referenzfilter, eingestellt. Aus diesem Ansatz wurde sechsmal eine Probe genommen und jeweils die Extinktion gemessen.

3.2.4.2 Ermittlung des Reaktionsmediums

(E3) Weiterhin wurden Ansätze erstellt, um zu vergleichen, in welchem Medium die Sekretion der sauren Phosphatase am deutlichsten ansteigt. Es wurden Zellen verwendet, deren Kulturkinetik sich zu Beginn der stationären Wachstumsphase befand. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen (PPYG-Kultur) 5 min bei 4.000 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet zum einen in PPYG, zum anderen in Wasser aufgenommen. In dem Ver-

sich kamen Zellen mit einer Konzentration von jeweils $5,18 \log_{10}$ Zellzahl/ml zum Einsatz. Die Zellzahl wurde durch Verdünnung mit dem entsprechend verwendeten Medium eingestellt. Kontrollen, die sich von den Versuchsgruppen nur durch das Fehlen von Protozoen in dem zugesetzten Medium unterschieden, wurden wie in der Folge stets mitgeführt (= Medienleerkontrollen). Das Gesamtvolumen betrug 750 μ l. Der Ansatz erfolgte in 15 ml-Zentrifugenröhrchen, die während der Inkubationszeit im Winkel von ca. 30° im 28°C Brutschrank gelagert wurden. Da die Inkubationszeit möglichst kurz gehalten werden sollte, wurden die Messungen auch in kürzeren Intervallen vorgenommen (nach 1, 2, 4 und 6 h). Es wurden Messungen der unverdünnten und, um den maximal messbaren Bereich nicht zu überschreiten, von 1:10 bzw. 1:100 mit Wasser verdünnten Proben durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse wurde PPYG als Reaktionsmedium routinemäßig genutzt. Die Zellzahl wurde vor dem Zentrifugieren eingestellt. Nach dem Dekantieren wurde das Pellet in frischem PPYG aufgenommen.

3.2.4.3 Ermittlung der optimalen Zellzahl

(E4) Als nächstes sollte die optimale Zellzahl ermittelt werden. Der Versuch wurde in Analogie zu den Phagozytoseprotokollen so konzipiert, dass jeweils ein Drittel Zellen, Kulturüberstandsprobe und, aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Experimentes, PPYG eingesetzt wurden. Die Kulturüberstandsprobe wurde in den Vorversuchen durch Wasser ersetzt. *T. pyriformis* wurde in Konzentrationen von 3,70, 4,00, 4,70 und $5,18 \log_{10}$ Zellzahl/ml verwendet. Diese Zellzahlen wurden geprüft, um in einem Versuch ein möglichst großes Spektrum abzustecken, das bei Bedarf hätte weiter spezifiziert werden können. Aufgrund der stets ähnlichen Ergebnisse, die mit den Mediumleerkontrollen in den vorherigen Untersuchungen erzielt wurden, wurde auf die Mediumleerkontrollen bei diesem und dem folgenden Ansatz aufgrund des lediglich orientierenden Charakters der Experimente verzichtet, jedoch wurde ab diesem Versuch mit der routinemäßigen Dreifachbestimmung begonnen. Die Messung wurde aufgrund der bisherigen Ergebnisse zu den Zeitpunkten 0, 3 und 5 h durchgeführt.

3.2.4.4 Ermittlung der Inkubationsdauer

(E5) Nachdem die entsprechende, im Folgenden verwendete Zellzahl ($5,18 \log_{10}$ Zellzahl/ml) ermittelt worden war, kam es zur Überprüfung der Inkubationsdauer. Parallel wurde dabei in den jeweiligen Ansätzen das Wachstumsverhalten von *T. pyriformis* geprüft. Da aufgrund der Ergebnisse der Zeitraum zwischen 3 und 5 h interessant erschien, wurde dieser genauer untersucht, indem neben der Messung zum Zeitpunkt 0 h, Messungen nach 3, 4 und 5 h vorgenommen wurden. Zusätzlich wurde dabei jeweils eine Bestimmung der Zellzahl vorgenommen (zusätzliche Entnahme von 50 μ l). Aufgrund der Ergebnisse wurde weiterhin mit einer fünfstündigen Inkubationszeit gearbeitet.

3.2.4.5 Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes

(E6) Um die Reproduzierbarkeit der Aktivitätsmessung zu überprüfen, wurde aus derselben PPYG-Kultur *T. pyriformis* wie beschrieben vorbereitet und auf sechs Ansätze verteilt. Nach der Inkubation wurden die Extinktionen jeweils dreimal gemessen. Der Versuch wurde an zwei unterschiedlichen Tagen wiederholt.

3.2.4.6 Optimierung des Exozytostests

Die Beobachtung, dass der SPP die Protozoen immobilisiert, führte zu der Überlegung, ob sich so nicht die kostenaufwändige Sterilfiltration umgehen ließe.

(E7) Dazu wurden zwei Ansätze verwendet, von denen der erste wie bisher beschrieben behandelt wurde. Aus dem anderen wurden jeweils 100 µl entnommen, 1:4 mit Substratpuffer versetzt und bei 4.000 U/min 5 min lang zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 200 µl entnommen und mit 5 µl einer 300 mM pNPP-Lösung versetzt. Die Aktivität des Enzyms wurde weiterhin wie bisher beschrieben bestimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden für die Aktivitätsbestimmung, sofern nicht anders beschrieben, auf die Säureimmobilisation zurückgegriffen.

(E8) Weiterhin wurde auch hier die Verkleinerung des Systems angestrebt. Dazu wurden Gesamtvolumina von 750 µl, 300 µl, 150 µl und 105 µl verwendet. Das Volumen von 35 µl pro Einzelanteil (Exozytoseansatz dementsprechend 105 µl) wurde aus Gründen der Praktikabilität gewählt. Das Gesamtvolumen konnte nicht auf 75 µl verkleinert werden, da die so erreichten 300 µl (nach 1:4 Verdünnung) eine Kontamination bei der Entnahme der 200 µl Überstand aus den letzten Schritten des Assays mit Protozoen provozieren würden. Die Entnahmemenge von 200 µl sollte aber aufgrund der bisherigen positiven Erfahrungen nicht reduziert werden. Die Menge von 105 µl stellte vor diesem Hintergrund die sinnvollste Verkleinerung dar. Aus dem Gesamtansatz mit 420 µl (nach 1:4 Verdünnung) ließen sich 200 µl Überstand sicherer entnehmen. Ab dem Gesamtvolumen von 300 µl wurde der Ansatz in aufrecht stehenden 1,5 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Aus den Ansätzen mit den Volumina 750 bis 150 µl wurden nach einem kurzen Vortexen jeweils 100 µl entnommen, 1:4 mit SPP versetzt und zentrifugiert. Aus 200 µl des Überstandes wurde die Enzymaktivität bestimmt. Bei dem Ansatz mit dem Volumen von 105 µl wurde das Verfahren aufgrund der geringen Mengen modifiziert. Zum Ansatz wurden 315 µl SPP in das 1,5 ml-Reaktionsgefäß hinzugefügt (entspricht einer 1:4 Verdünnung), dann zentrifugiert und daraus 200 µl entnommen. Mit diesen wurde wie beschrieben fortgefahren.

Aufgrund der Ergebnisse wurde weiterhin mit einem Gesamtvolumen von 105 µl wie beschrieben gearbeitet.

(E9) Um eine Kontamination bei der Entnahme der 200 µl Überstand aus den letzten Schritten des Assays mit Protozoen weiter zu erschweren, wurde das Volumen des eingesetzten SPP erhöht. Die Vergleichbarkeit bisheriger Ergebnisse wurde anhand von Ansätzen über-

prüft, die analog zum vorherigen Versuch mit dem Gesamtvolumen von 105 µl durchgeführt wurden. Der erste Ansatz wurde wie bisher mit 315 µl SPP versetzt (1:4), der zweite mit 345 µl. Es wurde ein Gesamtvolumen von 450 µl angestrebt, daraus ergab sich eine Verdünnung von 1:4,29. Es wurden jeweils 200 µl entnommen und die Aktivität bestimmt. Im Folgenden wurde daraufhin, sofern nicht anders beschrieben, eine 1:4,29 Verdünnung vorgenommen.

3.2.4.7 Weitere Untersuchungen des Exozytostests

(E10) Als nächstes wurde ein Versuch entworfen, um den Einfluss der Medien anhand der Mediumkontrollen Ni und NiT auf die Sekretion der sauren Phosphatase zu eruieren. Dazu wurden Ansätze verwendet, bei denen gemäß den Phagozytoseversuchen entweder PPYG (Kontrolle) oder Ni bzw. NiT oder deren entsprechende 1:2 oder 1:10 Verdünnungen mit Wasser eingesetzt wurden.

Der Einfluss des Mediums, in dem Toxovar E kultiviert wurde, wurde separat geprüft. Da zu diesem Zeitpunkt schon Erfahrungen aus den vorherigen Ansätzen vorlagen, konnte auf die aufwändigen weiteren Untersuchungen verzichtet werden. So wurde nur getestet, ob die Schlussfolgerungen, die bei den vorherigen Experimenten gezogen werden konnten, übertragbar waren. Dazu wurden Ansätze mit PPYG oder der 1:2 Verdünnung von Ni⁺ bzw. NiT⁺ verwendet.

Die Kulturüberstände wurden im Folgenden in einer 1:2 Verdünnung eingesetzt.

3.2.5 Untersuchungen zur Aktivität der sauren Phosphatase

3.2.5.1 Aktivitätsverlauf

(A1) Zunächst wurde geprüft, wie sich die Aktivität der sauren Phosphatase bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen im Laufe der Zeit ohne weitere Beeinflussung entwickelt.

Dazu wurde eine PPYG-Kultur zentrifugiert (4.000U/min, 5 min lang), sterilfiltriert und die Extinktion dieses enzymhaltigen Filtrates durch Verdünnung auf eine mOD von ca. 1.800 (gemessen bei 405nm und 620 nm als Referenzfilter) eingestellt. Dieser Überstand wurde halbiert und jeweils eine Hälfte bei 4°C im Kühlschrank und bei 28°C im Brutschrank aufbewahrt. Das Ansatzvolumen betrug 300 µl. Der Ansatz wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Aktivitäten wurden zu den Zeitpunkten 0, 5 und 24 h bestimmt. Dazu wurden 50 µl aus dem jeweiligen Ansatz entnommen und 1:4 mit SPP versetzt. Anschließend wurden 5 µl einer 300 mM pNPP-Lösung addiert. Nach 15minütiger Inkubation auf dem Schüttler (400U/min, bei Raumtemperatur) wurde die Reaktion durch den Zusatz von 50 µl einer 1 N NaOH-Lösung gestoppt und die Extinktion bei 405 nm mit 620 nm als Referenzfilter gemessen. Entsprechende Mediumleerkontrollen mit PPYG anstelle des enzymhaltigen Filtrates wurden stets mitgeführt.

3.2.5.2 Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlauf

(A2) Es wurde geprüft, inwieweit die später eingesetzten Kulturüberstände (sowohl aus TPGY als auch aus TPGYT) die Aktivität der sezernierten sauren Phosphatase beeinflussen. Dazu wurde ein enzymhaltiger Ansatz verwendet, der wie in der Verlaufsuntersuchung des Enzyms bei unterschiedlichen Temperaturen beschrieben, gewonnen wurde. Die Kulturüberstände wurden 1:2 mit Wasser verdünnt eingesetzt. Die erreichten Endkonzentrationen der MLD/ml in den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen entsprachen somit denjenigen, die in den Phagozytostests genutzt wurden. Als Kontrolle wurden die Medien Ni bzw. Ni⁺ verwendet und mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen der *C. botulinum*-Toxovare A bis G sowie dem Überstand von *C. sporogenes* verglichen. Es wurden sowohl die Überstände aus dem TPGY-Ansatz als auch aus dem TPGYT-Ansatz verwendet.

Der Versuchsaufbau entsprach dem Aufbau, der in den Vorversuchen zur Erstellung des Exozytostests entworfen und optimiert worden war, nur dass anstelle der Protozoensuspension ein enzymhaltiges Filtrat verwendet wurde. Dessen Aktivität war durch entsprechende Verdünnungen so eingestellt worden, dass nach dem Einsatz im Versuch eine sicher detektierbare mOD von ca. 1.800 (das verwendete Gerät erfasst Extinktionen bei den angegebenen Wellenlängen bis zu einem Wert von 3.500) angenommen werden konnte.

3.2.6 Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs in den entwickelten Tests

(S1) Um zu untersuchen, inwieweit die BoNTs während der Inkubationszeit im Phagozytose- bzw. Exozytostest aufgrund degradierender Einflüsse von Enzymen im Kulturüberstand oder von *T. pyriformis* beeinflusst werden, wurde exemplarisch der neurotoxinhaltige Kulturüberstand des *C. botulinum*-Toxovars A (TPGY-Ansatz und TPGYT-Ansatz) bereits vor den eigentlichen Versuchen zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände in einem Phagozytose- und einem Exozytoseversuch eingesetzt. Beide Versuche wurden als Dreifachansatz durchgeführt.

Dazu wurde zum einen *T. pyriformis* in einer Endkonzentration von 4,78 log₁₀Zellzahl/ml bei 28°C im Brutschrank mit dem Kulturüberstand des *C. botulinum*-Toxovars A (TPGY-Ansatz und TPGYT-Ansatz) vorinkubiert. Anschließend wurde die *E. coli* K12-Suspension so addiert, dass die Endkonzentrationen von Bakterien (7,00 log₁₀KbE/ml), Protozoen (4,60 log₁₀Zellzahl/ml) und die Neurotoxinkonzentration (1,50E+02 MLD/ml) dem bisher erstellten Phagozytostestprotokoll entsprach. Nach weiteren 4 h Inkubation bei 28°C wurde der Versuch beendet. Aufgrund der Probenentnahmen wurde abweichend nochmals der 1,5 ml-Gesamtansatz in 15 ml-Reaktionsgefäßen genutzt. Zu den Zeitpunkten 0, 1 und 5 h wurden jeweils 100 µl aus dem Ansatz entnommen und für die weitere Untersuchung bei -20°C gelagert.

Zum anderen wurde *T. pyriformis* in einer Endkonzentration von 5,18 log₁₀Zellzahl/ml mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen des *C. botulinum*-Toxovars A (TPGY-Ansatz und

TPGYT-Ansatz) und PPYG (drei volumenmäßig gleiche Anteile, Gesamtvolumen abweichend 750 µl in 15 ml-Reaktionsgefäßen) 5 h lang bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Auch bei diesen Ansätzen wurden zum Zeitpunkt 0, 1 und 5 h jeweils 100 µl aus dem Ansatz entnommen und für die weitere Untersuchung bei -20°C gelagert.

Die eingefrorenen Proben wurden durch Dr. Wieland Schrödl am Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig wie bei KRÜGER (2006) beschrieben bearbeitet. Die Proben wurden in einem ELISA unter Nutzung eines Peroxidase markierten polyklonalen Antikörpers (^{POD}Schaf-anti-BotNT-A) untersucht und die Messdaten in relative ELISA-Einheiten (REE) verrechnet.

3.3 Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände

Die Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände wurden stets als Dreifachansatz durchgeführt und an zwei unterschiedlichen Tagen wiederholt.

3.3.1 Phagozytoseversuche

Aufgrund des Medieneinflusses, der in dem entsprechenden Vorversuch gezeigt werden konnte, wurden alle Überstände 1:2 mit Wasser verdünnt.

Der Phagozytoseversuch wurde wie beschrieben durchgeführt, jedoch mit zwei Modifikationen. Zum einen wurden nun anstelle des bisher verwendeten Wassers die Kulturüberstände (Abk. siehe Tab. 6) eingesetzt, zum anderen wurden diese vor Zugabe der *E. coli* K12-Suspension und Beginn der vierstündigen Inkubationszeit bereits 1 h mit den Protozoen bei 28°C im Brutschrank vorinkubiert. Die angegebenen Endkonzentrationen beziehen sich auf den Ansatz nach Zugabe der *E. coli* K12-Suspension. Als Kontrollen wurden die Medien Ni⁻ bzw. Ni⁺ verwendet und mit den Ergebnissen aus den Ansätzen mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen der *C. botulinum*-Toxovaren A bis G sowie dem Überstand von *C. sporogenes* verglichen. Die Neurotoxinkonzentrationen betragen in den Ansätzen mit den *C. botulinum*-Toxovaren A bis G bei allen Toxovaren außer E 1,50E+02 MLD/ml. Im Fall von E war keine nachweisbare MLD gefunden worden. Trotzdem wurde der Überstand mitgeführt. Analog dazu wurden die trypsinisierten neurotoxinhaltigen Überstände (= TPGYT-Ansatz) bzw. der Überstand von *C. sporogenes* im Vergleich zu Ni⁻ und Ni⁺ untersucht. Die Neurotoxinkonzentrationen betragen ebenso (bis auf Toxovar E) 1,50E+02 MLD/ml. Im Fall des TPGYT-Überstandes von *C. botulinum* E konnten nur 1,50E+00 MLD/ml eingesetzt werden. Die Vitalität der Protozoen in den Ansätzen mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen bzw. dem Überstand von *C. sporogenes* wurde lichtmikroskopisch mit den Kontrollansätzen verglichen. Gemäß den Ergebnissen und der statistischen Auswertung wurden von den Kulturüberständen des Toxovares E (TPGY und TPGYT) Wiederholungsversuche durchgeführt, bei denen im Vergleich ein detoxifizierter Überstand (15minütige Erhitzung auf 100°C, anschließende Zentrifugation bei 11.400 U/min, 10 min lang, Verwendung des Überstandes) wie folgt mitge-

führt wurde: Ein Ansatz wurde mit Ni⁺ inkubiert, ein Ansatz mit erhitztem Ni⁺ (erhitzt nach dem Detoxifikationsprotokoll der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände), ein Ansatz mit dem Überstand des Toxovares E, ein Ansatz mit dem entsprechenden detoxifizierten Überstand sowie die jeweiligen trypsinierten Varianten (TPGYT-Überstände).

Gemäß den Ergebnissen und der statistischen Auswertung wurde dieser Versuch erneut durchgeführt. Zuvor waren jedoch der Proteingehalt und der pH-Wert in den Medienkontrollen und den detoxifizierten Kulturüberständen des Toxovars E untersucht worden. Der Proteingehalt wurde spektralphotometrisch in einer Dreifachmessung bestimmt (siehe Anhang). Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier bestimmt, das Änderungen in 0,5er Schritten sichtbar macht. Anschließend wurden anstelle der detoxifizierten Varianten Kulturüberstände des Toxovares E (TPGY und TPGYT) verwendet, die zuvor mit Wasser auf den gleichen Proteingehalt wie die Medienkontrollen (ca. 22 mg/ml, TPGY-Ansatz bzw. ca. 23 mg/ml, TPGYT-Ansatz) verdünnt worden waren.

3.3.2 Exozytoseversuche

Der Versuchsaufbau entspricht dem Aufbau, der in den Vorversuchen erstellt worden war. Die Kulturüberstände wurden direkt zum Exozytoseansatz hinzugegeben (anstelle des bisher verwendeten Wassers). Als Kontrolle wurden die Medien Ni bzw. Ni⁺ verwendet und mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen der *C. botulinum*-Toxovare A bis G sowie dem Überstand von *C. sporogenes* verglichen. Es wurden sowohl die Überstände aus dem TPGY-Ansatz als auch aus dem TPGYT-Ansatz verwendet. Die Vitalität der Protozoen in den Versuchsansätzen wurde lichtmikroskopisch mit der in den Kontrollansätzen verglichen.

Gemäß den Ergebnissen und der statistischen Auswertung wurden von dem Kulturüberstand des Toxovars E (TPGYT-Ansatz) Wiederholungsversuche durchgeführt, bei denen im Vergleich ein detoxifizierter Überstand (vgl. 3.3.1) bzw. entsprechend erhitzte Medienkontrollen (NiT⁺) mitgeführt wurden.

Gemäß den Ergebnissen und der statistischen Auswertung wurde dieser Versuch wiederholt. Dabei wurden jedoch anstelle der detoxifizierten Varianten der Kulturüberstand des Toxovars E (TPGYT-Ansatz) verwendet, der zuvor mit Wasser auf den gleichen Proteingehalt wie die Medienkontrolle NiT⁺ (ca. 23 mg/ml) verdünnt worden waren.

3.4 Auswertung

In die statistische Auswertung flossen nur die Ergebnisse aus den Versuchen zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände auf die Phagozytose und die Exozytose ein.

3.4.1 Phagozytoseversuche

Die KbE/ml-Werte wurden logarithmiert (dekadischer Logarithmus). Da die Versuche als Dreifachansätze durchgeführt worden waren, gab es jeweils drei Werte für die Versuchs-

gruppen (= neurotoxinhaltige Kulturüberstände der *C. botulinum*-Toxovare A bis G sowie der Kulturüberstand von *C. sporogenes*) und die Kontrollgruppen (= Medien Ni, NiT bzw. Ni⁺ und NiT⁺). Aufgrund der Varianz bei der Einstellung und Ermittlung der KbE/ml konnten die absoluten Werte der ausgezählten KbE/ml nicht verwendet werden, sondern mussten, auch um die Varianzen der unterschiedlichen Versuchstage auszugleichen, durch Bezug auf die Kontrollgruppenwerte relativiert werden. Dabei wurden die dekadischen Logarithmen der Kontrollgruppenwerte sowohl von den dekadischen Logarithmen der Versuchsgruppenwerte als auch von den dekadischen Logarithmen der Kontrollgruppenwerte selbst subtrahiert.

Da aufgrund des Versuchdesigns eine genaue Zuordnung einer Kontrollgruppe zu einer Versuchsgruppe unmöglich ist, wurde sozusagen jeder Versuchsgruppenwert bzw. Kontrollgruppenwert mit jedem entsprechenden Kontrollgruppenwert eines Versuchstages in Beziehung gesetzt. Dadurch wurden somit pro zugesetztem Bakterienkulturüberstand und Versuchstag (entspricht einem Dreifachansatz) neun Werte ermittelt.

3.4.2 Exozytoseversuche

Aus den drei Ergebnissen der Mediumleerkontrollen wurde der Mittelwert gebildet. Dieser wurde von den entsprechenden Einzelwerten der enzymhaltigen Ansätze subtrahiert (Versuchsgruppe – Mittelwert_{Kontrollgruppen 1-3}).

Da auch diese Versuche als Dreifachansätze durchgeführt wurden, gab es auch hier jeweils drei Werte für die Versuchsgruppen (= neurotoxinhaltige Kulturüberstände der *C. botulinum*-Toxovare A bis G sowie der Kulturüberstand von *C. sporogenes*) und die Kontrollgruppen (= Medien Ni, NiT bzw. Ni⁺ und NiT⁺). Aufgrund der Varianz bei der Ermittlung der Aktivität der sauren Phosphatase konnten die absoluten Werte der Extinktionsmessungen nicht verwendet werden, sondern mussten, auch um die Varianzen der unterschiedlichen Versuchstage auszugleichen, durch Bezug auf die Kontrollgruppenwerte relativiert werden. Dabei wurden sowohl die Versuchsgruppenwerte als auch die Kontrollgruppenwerte selbst durch die Kontrollgruppenwerte dividiert.

Da aufgrund des Versuchdesigns eine genaue Zuordnung einer Kontrollgruppe zu einer Versuchsgruppe unmöglich ist, wurde sozusagen jeder Versuchsgruppenwert bzw. Kontrollgruppenwert mit jedem entsprechendem Kontrollgruppenwert eines Versuchstages in Beziehung gesetzt. Dadurch wurden somit pro zugesetztem Bakterienkulturüberstand und Versuchstag (entspricht einem Dreifachansatz) neun Werte ermittelt.

3.4.3 Biostatistische Auswertung

Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogrammpaket SPSS 11.5 (SPSS GmbH Software München) bearbeitet.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. Da die Daten normalverteilt waren, wurden für die deskriptive Statistik der Mittelwert und die Standardabweichung

berechnet.

Die Signifikanzprüfungen erfolgten mit dem Levene-Test und dem t-Test für unabhängige Stichproben.

4 Ergebnisse

Die in den Versuchen ermittelten Einzeldaten sowie die berechneten statistischen Größen sind in der Reihenfolge ihrer Besprechung (siehe Material und Methoden) im Anhang aufgeführt.

4.1 Produktion der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände von *C. botulinum* sowie entsprechender Kontrollüberstände

4.1.1 Weitere Untersuchungen der Kulturüberstände

Eine Veränderung in der mausletalen Aktivität der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände durch wiederholte Auftau- und Einfriervorgänge wurde im verwendeten Maßstab (Bestimmung auf die Zehnerpotenz genau) nicht festgestellt (siehe Tab. 7).

4.2 *T. pyriformis*

4.2.1 Wachstumskinetik

Die wiederholten Zählungen der Protozoen mit der Zählkammer ergaben Standardabweichungen der \log_{10} Zellzahlen von 0,02 bis 0,07.

Der Verlauf der Wachstumskurven verschiedener *T. pyriformis*-Kulturen ist in den Abbildungen 10 und 12 beschrieben.

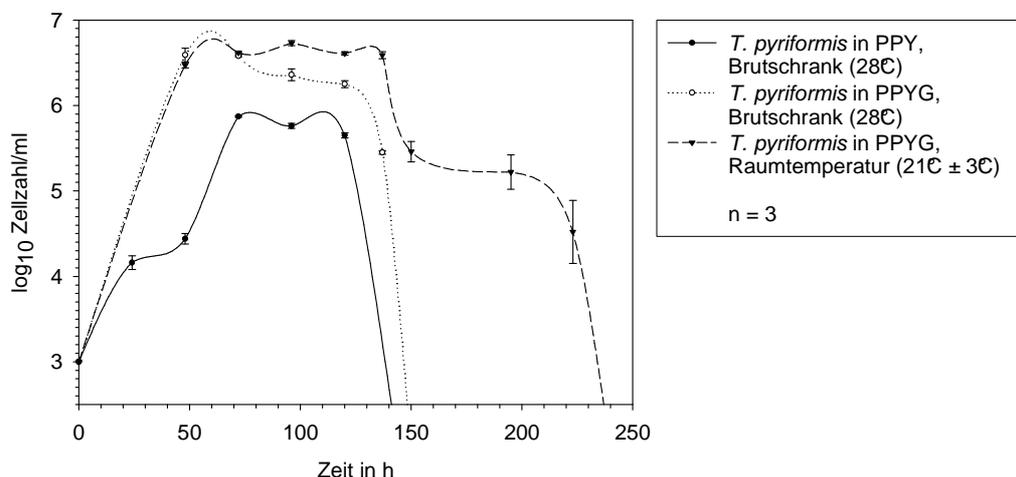


Abb. 10: Darstellung der Wachstumskinetiken von *T. pyriformis* in verschiedenen Anzuchtmedien und bei unterschiedlichen Temperaturen (siehe Legende). Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die parallele Entwicklung des pH-Wertes in den Kulturen geben die Abbildungen 11 und 12 wieder. Die Wachstumskurven in den Anzuchtmedien PPY und PPYG zeigten einen Verlauf, der sich je nach Medium mehr oder weniger deutlich in eine kurze Adaptationsphase, eine

exponentielle Wachstumsphase, eine Übergangsphase, eine stationäre Phase und eine Absterbephase untergliedern ließ.

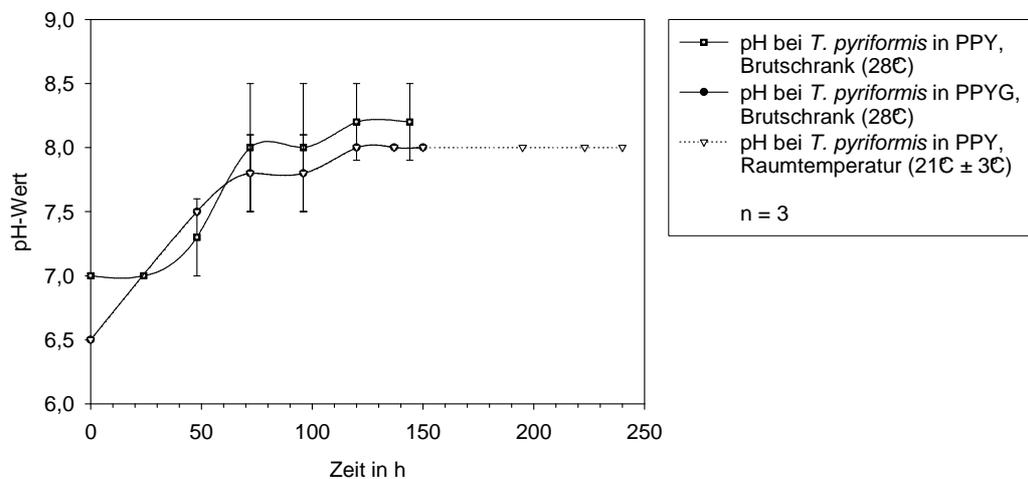


Abb. 11: Darstellung der Verläufe der pH-Werte in den Kulturen zur Untersuchung der Wachstumskinetik (siehe Abb. 10). Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Während im PPY-Medium die stationäre Phase erst nach ca. 70 h mit einem \log_{10} Zellzahl/ml von 5,80 erreicht wurde, konnten im PPYG-Medium bei beiden Temperaturbereichen bereits nach ca. 50 h die maximalen Zellkonzentrationen (jeweils etwa \log_{10} Zellen/ml von 6,50) gemessen werden. Daraus ergab sich im PPYG-Medium bei 28°C eine Generationszeit von ca. 4 h (Berechnung siehe Anhang). Auch die Dauer der stationären Phase variierte je nach Ansatz. So begann die Absterbephase im PPY-Medium nach ca. 110 h, im PPYG-Medium bei der für die Vermehrung optimalen Temperatur von 28°C nach ca. 130 h und im PPYG-Medium bei Raumtemperatur (21°C ± 3°C) nach ca. 150 h, erstreckte sich dann aber über einen deutlich längeren Zeitraum von insgesamt ca. 90 h.

Mit der Kultivierungsdauer ging ein kontinuierlicher Anstieg des pH-Wertes einher. Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier gemessen, das Änderungen in 0,5er Schritten sichtbar macht. Die Verläufe im PPYG-Medium waren identisch. Der Zusammenhang zu den Wachstumskurven war deutlich. So stieg der pH-Wert im PPY-Medium in den ersten 50 h langsamer, um dann innerhalb von ca. 24 h sein Maximum zu erreichen. Nach 50 h war auch eine deutliche Wachstumssteigerung in der entsprechenden Kultur zu verzeichnen. Im PPYG-Medium nahm er parallel zur Zellvermehrung schneller und gleichmäßiger zu. Während der stationären Phasen war nur eine jeweils geringe Erhöhung erkennbar.

Die Absterbephase schlug sich nicht in einer Änderung des pH-Wertes nieder.

Im Gegensatz zu den Anzuchtmedien erfolgte im Medium für die Langzeitkultivierung (RM) kein Kulturwachstum (Abb. 12). Jedoch blieben die Zellen deutlich länger vital. Nach ca. 10 d war ein Gleichgewichtszustand innerhalb der Kultur erreicht. Dieser wurde je nach Temperatur unterschiedlich lange aufrechterhalten. So begann die Absterbephase während der Be-

Ergebnisse

brütung bei 28°C nach ca. 50 d. Die Kultivierung bei Raumtemperatur vermochte den stationären Zustand mindestens bis zu 70 d aufrechtzuerhalten.

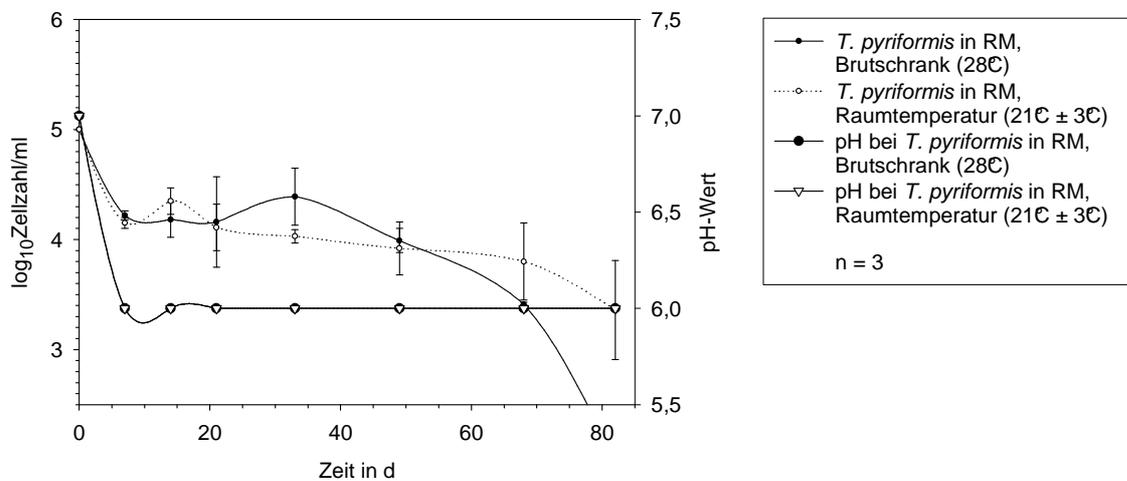


Abb. 12: Darstellung der Wachstumskinetiken und der Verläufe der pH-Werte von *T. pyriformis* in dem Medium zur Langzeitkultivierung (RM) bei unterschiedlichen Temperaturen (siehe Legende). Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Einstellung des Gleichgewichtes spiegelte der Verlauf des pH-Wertes wider, die Absterbephase blieb auch hier ohne Auswirkung.

Die Langzeitkultivierung in RM führte zu lichtmikroskopisch nachweisbaren morphologischen Veränderungen (siehe Abb. 13 und 14).



Abb. 13

Abb. 13: *T. pyriformis*, Kultivierung in PPYG, Kulturalter 4 d und 4 h, Nativpräparat, lichtmikroskopische Aufnahme.



Abb. 14

Abb. 14: *T. pyriformis*, Kultivierung in RM, Kulturalter 10 d, Nativpräparat, lichtmikroskopische Aufnahme.

Die Zellen wurden kleiner und schlanker. Nach Überführung in das Anzuchtmedium wurde innerhalb von 36 bis 48 h wieder die größere und kräftigere Form erreicht.

4.2.2 Entwicklung des Phagozytostests

Die Phagozytose von Futterkeimen durch *T. pyriformis* lässt sich lichtmikroskopisch verfolgen (siehe Abb. 15 und Abb. 16).

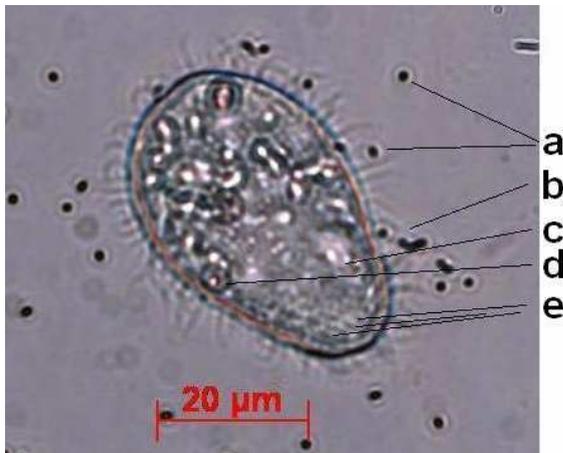


Abb. 15: *T. pyriformis* während der Phagozytose von *E. coli* K12, Präparat luftgetrocknet, hitzefixiert, nativ, lichtmikroskopische Aufnahme. a = frei liegende Bakterien, b = Bakterien im durch die Zilienaktivität entstandenen Strudel in Richtung bukkaler Kavität, c = Bakterien in sich formierender Nahrungsvakuole am Zytopharynx, d = Bakterien in einer älteren Nahrungsvakuole, e = Zilienreihen.

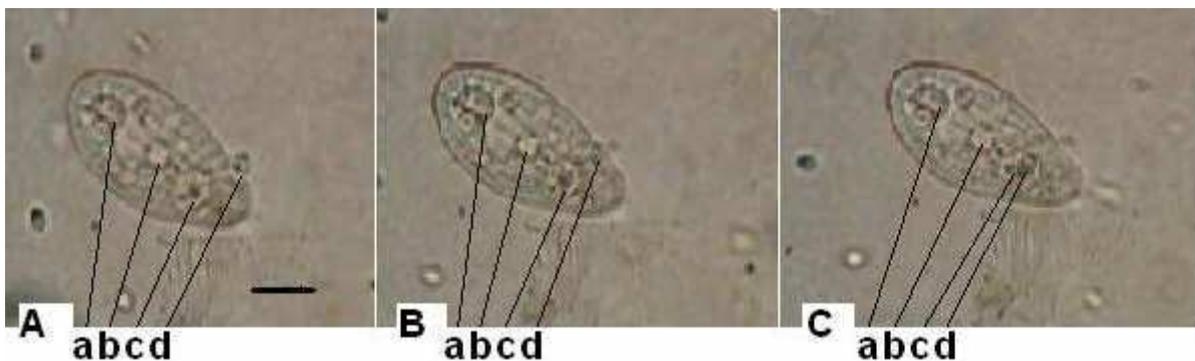


Abb. 16: *T. pyriformis* während der Phagozytose von *C. albicans*. Standbilder in chronologischer Reihenfolge aus lichtmikroskopischen Filmsequenzen, nativ. Der in Bild A dargestellte Balken entspricht einer Länge von 20 µm. a = Zellkern, b = Nahrungsvakuole mit Resten phagozytierter Hefezellen, c = sich neu formierende Nahrungsvakuole mit Hefezellen am Zytopharynx, d = Hefezelle auf dem Weg von der bukkalen Kavität in die sich neu formierende Nahrungsvakuole.

4.2.2.1 Einstellen der Bakterienzahl

4.2.2.1.1 Reproduzierbarkeit der *E. coli* K12-Quantifizierung

In den Versuchen zur Varianz der KbE/ml-Bestimmung wurde mit einer *E. coli* K12-Suspension gearbeitet, die auf einen Extinktionswert von 0,123 (bei 620 nm) eingestellt worden war. Laut der Gleichung nach SCHROEDL et al. (2003) entspricht dieser Wert einer \log_{10} KbE von

7,48/ml. Die Standardabweichungen in der Ermittlung der KbE/ml mittels des Plattenverdünnungsverfahrens (Ermittlung der KbE/ml, siehe Anhang) ergaben \log_{10} Werte zwischen 0,05 und 0,42 bei jeweils drei Ansätzen aus denselben Suspensionen. Die fotometrisch alle auf denselben Wert eingestellten Suspensionen ergaben im Plattenverdünnungsverfahren \log_{10} KbE zwischen 6,54 und 8,26.

4.2.2.2 Einfluss des Reaktionsmediums auf *E. coli* K12 und *T. pyriformis*

Das in den Versuchen eingesetzte Mineralwasser der Fa. Volvic® (Wasser) führte weder zu Veränderungen in der Anzahl der KbE/ml von *E. coli* K12 noch zu Veränderungen in der Zellzahl/ml von *T. pyriformis* während des Beobachtungszeitraumes von 24 h.

4.2.2.3 Einfluss der Vorkultivierung von *T. pyriformis*

Die Art der Vorkultivierung von *T. pyriformis* übte einen großen Einfluss auf die Phagozytoseleistung aus. Die Zellen, die in PPYG kultiviert und erst unmittelbar vor Versuchsbeginn in Wasser überführt worden waren, zeigten eine deutlich geringere Phagozytoserate als die Zellen, bei denen dieser Schritt bereits einen Tag zuvor durchgeführt worden war. Die PPYG-kultivierten Zellen reduzierten die KbE/ml von *E. coli* K12 in den ersten 4 h um eine \log_{10} KbE von 1,20. In demselben Zeitraum war eine Abnahme der KbE/ml bei den Wasserkultivierten Zellen um eine \log_{10} KbE von 3,22 zu verzeichnen. Nach 24 h war in diesem Ansatz eine \log_{10} KbE/ml von 3,00 nachzuweisen (entspricht der Nachweisgrenze). Im PPYG-Ansatz waren dagegen noch Bakterien in einer Anzahl von \log_{10} KbE 5,30/ml enthalten.

4.2.2.4 Ermittlung der optimalen Zellzahlen

Die absoluten Mengen der Protozoen und Bakterien sowie ihr Verhältnis zueinander wurden in den Folgeversuchen bestimmt. Bei dem Versuch mit der konstanten Bakterienkonzentration und den variierenden Protozoenzahlen zeigten die Ansätze mit einem Protozoen-Bakterien-Verhältnis von 1:100 und 1:1.000 in den ersten 4 h ähnliche Reduktionsraten zum einen von \log_{10} KbE 3,09 bei absoluten eingesetzten Zahlen von \log_{10} KbE/ml 7,60 (rechnerische Konzentration der *E. coli* K12-Suspension) und \log_{10} Protozoen von 5,60/ml bzw. zum anderen von \log_{10} KbE 3,06 bei derselben *E. coli* K12-Konzentration und einer \log_{10} Protozoenzahl von 4,60/ml. Nach 8 h war im ersten Fall eine Reduktion auf \log_{10} KbE von 3,90/ml, im zweiten Fall auf eine \log_{10} KbE von 4,71/ml eingetreten. Der 24-h-Wert ergab eine Zunahme der \log_{10} KbE auf 5,53/ml bzw. 5,26/ml. Da das Reaktionsmedium keinen fördernden Einfluss auf das Bakterienwachstum ausübte, war anzunehmen, dass Stoffwechselprodukte der Protozoen oder abgestorbene *T. pyriformis* das Substrat bildeten. Ein Protozoen-Bakterien-Verhältnis von 1:10.000 bei einer absoluten \log_{10} Protozoenzahl von 3,60/ml zeigte deutlich geringere Phagozytoseraten, nach 4 h waren noch \log_{10} KbE 7,68/ml, nach 8 h noch 7,13/ml *E. coli* K12 nachzuweisen. Erst nach 24 h konnte eine größere Keimreduktion auf

\log_{10} KbE 5,70/ml festgestellt werden. Der Kontrollansatz ohne Protozoen belegte erneut die Stabilität der Bakterienkonzentration in Wasser. Bei diesem Versuch wurde, wie in der Untersuchung zur Varianz der Einstellung einer bestimmten Bakterienkonzentration, die deutliche Abweichung der fotometrisch eingestellten Keimzahl (\log_{10} KbE 7,60/ml) und der im Plattenverdünnungsverfahren gefundenen \log_{10} KbE von 7,90/ml bis 8,51/ml sichtbar.

Die Ergebnisse aus dem Versuch mit der variierenden Bakterienkonzentration und den konstant gehaltenen Protozoenzahlen sind in der folgenden Abbildung (Abb. 17) dargestellt. Das Protozoen-Bakterien-Verhältnis von 1:1.000 führte bei einer absoluten eingesetzten \log_{10} KbE von 8,60/ml im Verlauf von 8 h lediglich zu einer Reduktion um 2,55 \log_{10} -Stufen. Die \log_{10} KbE/ml der Kontrollgruppe blieben wie die der anderen Kontrollgruppen über den Beobachtungszeitraum stabil. Bei einem Verhältnis von 1:100 wurde nach 8 h ein ähnlicher Wert (2,51 \log_{10} -Stufen) erreicht. Im Ansatz mit dem Verhältnis 1:10 ergab sich eine Abnahme um 2,16 \log_{10} -Stufen nach 2 h. Unter Beachtung der in vorherigen Versuchen ermittelten Standardabweichung von bis zu \log_{10} KbE 0,42 konnte keine weitere Abnahme der Bakterienkonzentration festgestellt werden. Beim Vorliegen gleicher Zellkonzentrationen (\log_{10} KbE/ml von 5,60 einer fotometrisch eingestellten Bakteriensuspension und \log_{10} Protozoenzahl/ml von 5,60) wurde nach 2 h eine Annäherung an die Nachweisgrenze (\log_{10} KbE/ml von 3,00) beobachtet.

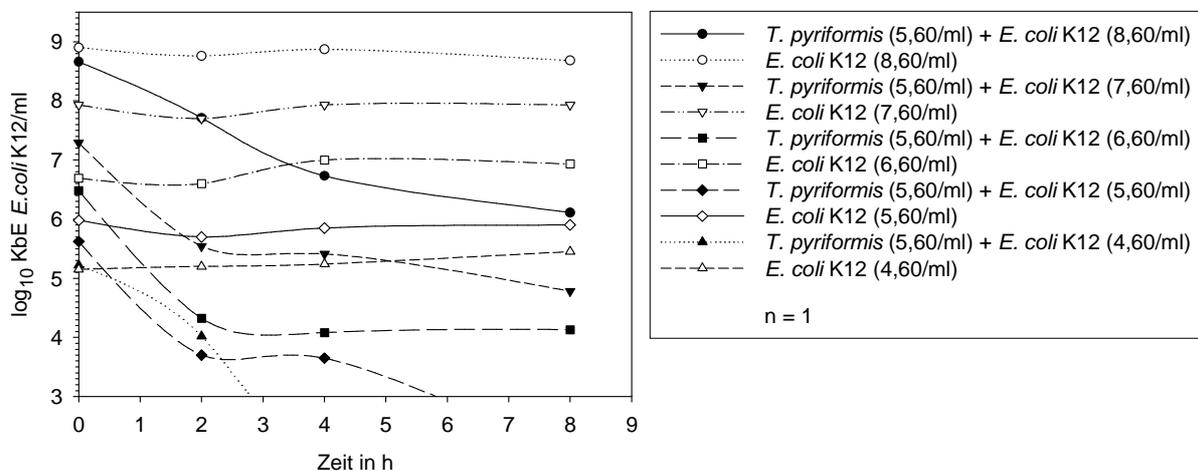


Abb. 17: Darstellung der Ergebnisse aus dem Versuch mit den variierenden Bakterienkonzentrationen bei konstant gehaltenen Protozoenzahlen. Die in der Legende angegebenen Zahlen entsprechen den \log_{10} -Werten der fotometrisch eingestellten KbE/ml (*E. coli* K12) bzw. der eingestellten Zellzahl/ml (*T. pyriformis*). Die abweichenden 0-Stunden Werte der \log_{10} KbE/ml, die in dem Diagramm eingezeichnet sind, geben die \log_{10} -Werte der tatsächlich im Plattenverdünnungsverfahren ermittelten KbE/ml wieder. Eine \log_{10} KbE/ml von 3,00 entspricht der unteren Nachweisgrenze des Verfahrens.

Dies entspricht einer Reduktion um 1,92 \log_{10} -Stufen. Nach 8 h konnte mit dem verwendeten Verfahren die Abnahme der KbE/ml nicht weiter verfolgt werden. Im Falle des Verhältnisses

Ergebnisse

von 10:1 war bereits nach 4 h kein Nachweis mehr möglich. Eine weitere Verringerung der Protozoenkonzentration unter Beibehaltung der anderen Bedingungen führte zu deutlich schlechteren Ergebnissen in der Keimreduktion (siehe Abb. 18).

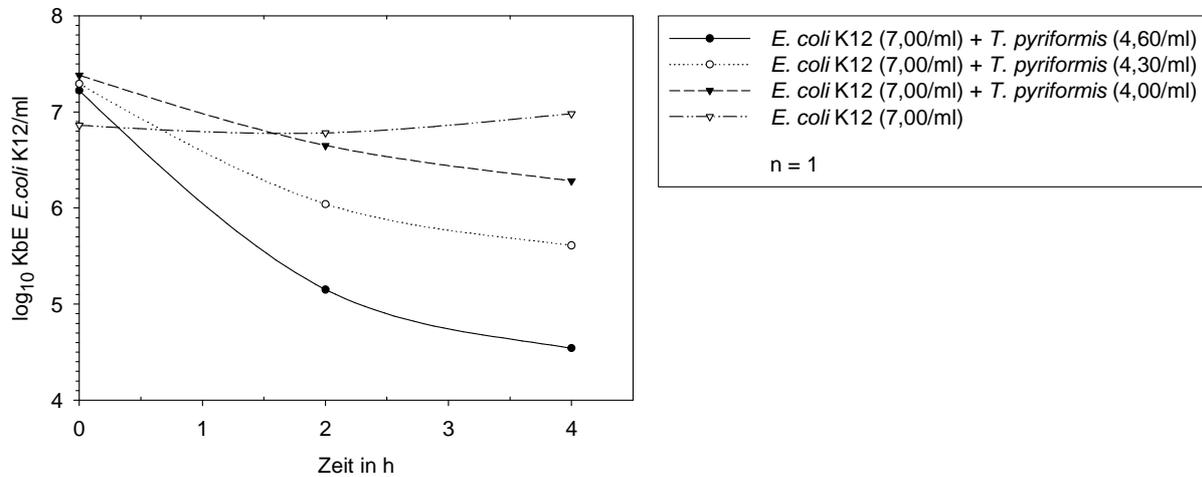


Abb. 18: Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zur weiteren Verringerung der eingesetzten Mikroorganismen. Die weiteren Erläuterungen entsprechen denen bei Abb. 17.

4.2.2.5 Weitere Untersuchungen des Phagozytostests

Der Einsatz anderer Futterkeime ergab gegenüber der Verwendung von *E. coli* K12 keinen Vorteil. Auffällig war die ungenügende Genauigkeit bei der Einstellung der Anfangskonzentrationen anhand eines Vergleiches mit der Trübung der *E. coli* K12-Suspension. Die Ansätze mit *S. aureus* führte zu deutlich stärkeren Keimreduktionen als in den Ansätzen mit *C. albicans*, allerdings bestanden große Unterschiede in der jeweiligen Ausgangssituation. Bei beiden Mikroorganismen blieb die Degradierungsrate jedoch deutlich unter den vergleichbaren Protozoen-Bakterien-Verhältnissen mit *E. coli* K12, entsprechend den Ergebnissen vorheriger Versuche. Über die Degradierungsrate von *Bacillus* spp. ließ sich aufgrund der Unterschreitung der Nachweisgrenze keine Aussage treffen. Allerdings zeigte bereits der Kontrollansatz ohne Protozoen nach der Inkubationszeit eine geringere KbE/ml.

Da dieser erste Versuch den Anforderungen an den Phagozytostest nicht gerecht wurde und *E. coli* K12 weitaus bessere Ergebnisse erbrachte, wurde auf eine Wiederholung oder Fortsetzung verzichtet.

Der Einsatz im Phagozytostest führte während einer Inkubationszeit bis zu 24 h trotz Phagozytose der Bakterien (Reduktion um 2, 63 \log_{10} -Stufen) in den ersten 4 h (entsprechen dem Prüfzeitraum) nicht zu einer Veränderung der Protozoenzahl.

Im Versuch zur Verkleinerung der Gesamtvolumina erreichte der Kontrollansatz (Gesamtvolumen 1,5 ml) eine größere Reduktion der KbE/ml als in den bisherigen Versuchen (um 3,91 \log_{10} -Stufen). Allerdings wurde aus den bisherigen (und folgenden) Versuchen der Einzelcharakter dieses Ergebnisses deutlich. Daher wurde die über die früher ermittelte Reduktion

hinausgehende Abnahme der KbE/ml als nicht typisch gewertet. Der bisher festgestellte Reduktionsbetrag von ca. 3,00 \log_{10} -Stufen wurde in diesem Experiment nur in den Ansätze mit 750 μl , 150 μl und 75 μl Gesamtvolumen erreicht. Im Ansatz mit dem Volumen von 300 μl in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen konnte diese Phagozytoserate nicht nachvollzogen werden.

Der Versuch zum potentiell degradierenden Einfluss sezernierter Stoffwechselprodukte ergab, dass die Sekretionsprodukte von *T. pyriformis* bei der Degradierung der Bakterien in mit diesen Methoden nachvollziehbarem Rahmen keine Rolle spielten.

4.2.2.6 Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Kulturüberstände Ni, Ni⁺ bzw. der trypsinisierten Varianten (Medienkontrollen) auf die Phagozytoseaktivität sind grafisch dargestellt (Abb. 19 und Abb. 20). Der Einsatz der unverdünnten Medien Ni und NiT übte einen hemmenden Einfluss auf die Degradierungsrate von *T. pyriformis* aus. Die Bakterien wurden nur um etwas mehr als eine \log_{10} KbE/ml-Stufe reduziert.

Ab der 1:2 Verdünnung war jedoch kein Unterschied zwischen diesen Medien und der Kontrollgruppe mit Wasser erkennbar. Das Wachstum von *E. coli* K12 wurde nicht beeinflusst (Abb. 20).

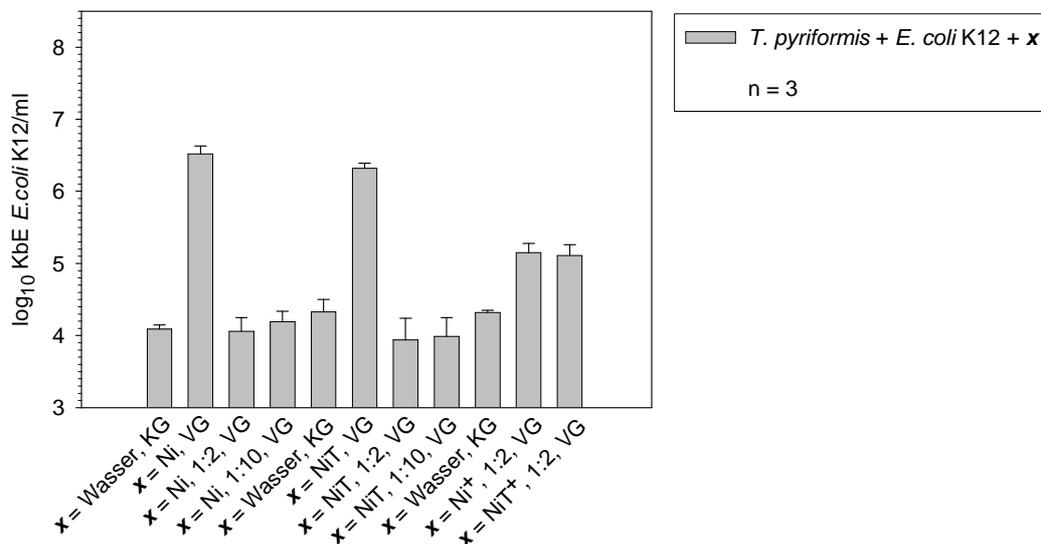


Abb. 19: Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zum Einfluss der Kulturüberstände Ni, Ni⁺ bzw. der trypsinisierten Varianten auf die Phagozytoserate von *T. pyriformis*. In der Abbildung werden die Daten der Ansätze mit Protozoen nach 4 h gezeigt. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen. KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe.

Bei den Medien Ni⁺ und NiT⁺ stellte es sich scheinbar anders dar. Die verdünnten Ansätze wichen von der Kontrollgruppe (Wasser) und den vergleichbaren 1:2 Verdünnungen von Ni bzw. NiT ab. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Versuchen zur Ermittlung der

Ergebnisse

Reproduzierbarkeit der *E. coli* K12-Quantifizierung, in denen eine Standardabweichung von bis zu 0,42 log₁₀-Stufen ermittelt worden war, relativierten sich jedoch die Ergebnisse. Erst ab einer Differenz von mehr als 0,84 log₁₀-Stufen zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe konnte von einem tatsächlichen Unterschied gesprochen werden. Diese Differenz wurde aber weder in den Ansätzen mit Protozoen noch in den entsprechenden Ansätzen ohne Protozoen erreicht.

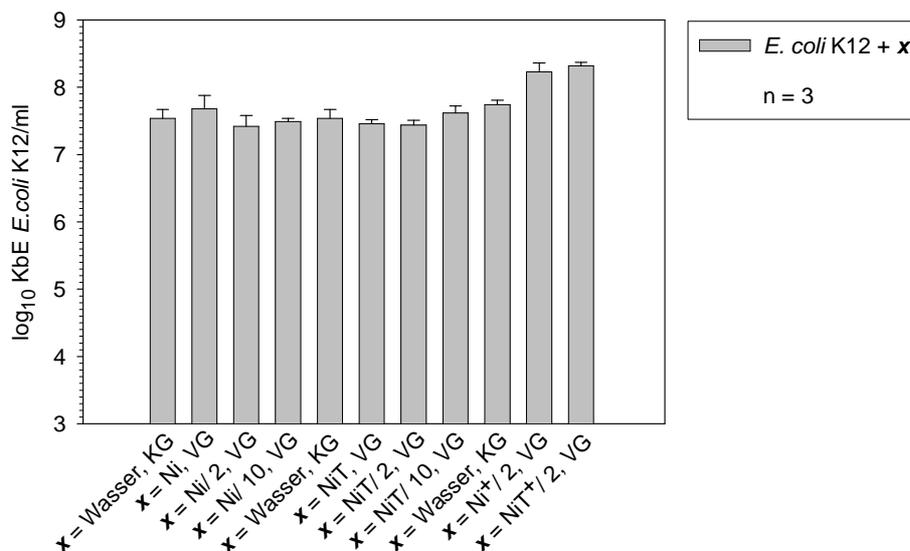


Abb. 20: Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zum Einfluss der Kulturüberstände Ni, Ni⁺ bzw. der trypsinisierten Varianten auf die Phagozytoserate von *T. pyriformis*. In der Abbildung werden die Daten der Ansätze ohne Protozoen nach 4 h gezeigt. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen. KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe.

4.2.2.7 Einfluss der Kulturüberstände auf *E. coli* K12

Die Ansätze mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen ergaben keine Abweichungen von den Ansätzen mit den entsprechenden Medienkontrollen.

4.2.3 Entwicklung des Exozytostests

In den ersten Versuchen zur Entwicklung des Exozytostests wurde der starke Einfluss des pH-Wertes des SPPs und der Reaktionszeit bis zum Stoppen deutlich. Alle eingesetzten Zellmengen waren in der Lage, ein ausreichend großes Messsignal zu produzieren. Der pH-Wert von 4,0 verursachte das stärkste Signal. Bereits nach 5 min (entspricht dem frühesten Testzeitpunkt) war die Aktivität in diesem Versuchsansatz messbar.

4.2.3.1 Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung

Die Versuche zur Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessungen ergaben eine Standardabweichung von 4,3%.

4.2.3.2 Ermittlung des Reaktionsmediums

Während der ersten Stunde kam es in beiden Ansätzen zu einem sich deutlich von der Medienleerkontrolle absetzenden Messsignal. Im Ansatz mit PPYG vollzog sich innerhalb der folgenden 5 h ein bedeutender Anstieg. Im Gegensatz dazu war eine stärkere Zunahme der Aktivität im Ansatz mit Wasser erst im Zeitraum 4 bis 6 h zu verzeichnen. Diese blieb allerdings weit unter dem vergleichbaren PPYG-Ansatz. Eine Überschreitung des maximal messbaren Wertes (mOD von 3.500) blieb bei der gewählten Zellkonzentration und dem Kulturalter aus. In beiden Versuchsansätzen fiel auf, dass lediglich jeweils beim 6 h-Wert die 1:10 Verdünnungsstufe im annähernd korrekten Verhältnis zur unverdünnten Probe stand, alle anderen Verdünnungen waren gegenüber dem Hintergrundsignal nicht mehr detektierbar.

4.2.3.3 Ermittlung der optimalen Zellzahlen

Die Daten des Versuches zur Ermittlung der optimalen Zellzahlen sind in der folgenden Abbildung (Abb. 21) dargestellt.

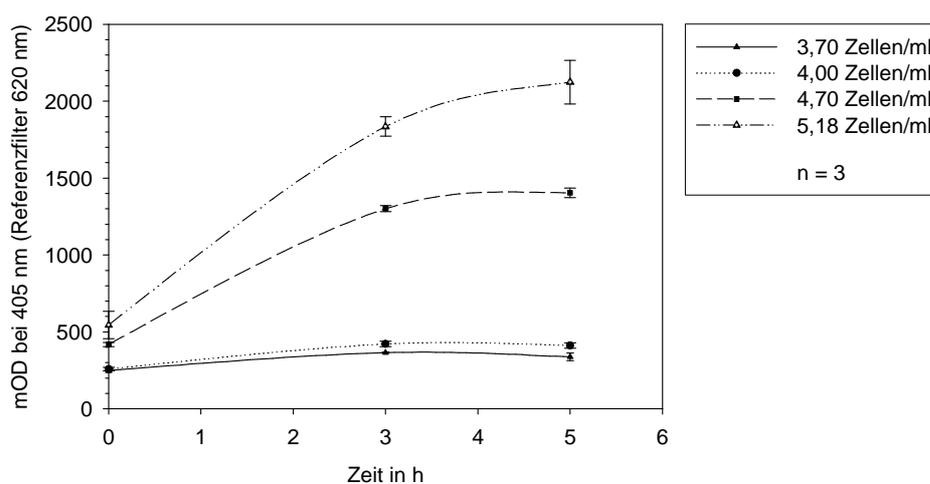


Abb. 21: Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zur Ermittlung der optimalen Zellzahlen. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen der Messsignale ohne Abzug der Hintergrundsignale (Medienleerkontrollen). In der Legende sind die Zellzahlen/ml als \log_{10} -Werte angegeben.

Die beiden Ansätze mit den höheren Zellzahlen (\log_{10} -Zellzahl/ml von 4,70 bzw. von 5,18) zeigten eine deutliche Steigerung der messbaren Aktivität trotz der notwendigen Verdünnung des PPYG mit Wasser, das in den Hauptversuchen durch die zu testende Probe ersetzt werden sollte. Die beiden Ansätze mit den geringeren Zellkonzentrationen (\log_{10} -Zellzahl/ml von 3,70 bzw. 4,00) vermochten kaum, ein deutlich über den Mediumleerwert aus den früheren Experimenten (ca. 300) hinauskommandes Signal zu produzieren. Nur eine im Lauf der Inkubationszeit geringe Steigerung war auszumachen.

4.2.3.4 Ermittlung der Inkubationsdauer

Eine Vermehrung fand innerhalb der 5 h (entspricht dem Testzeitraum) nicht statt. Die Enzymaktivität stieg kontinuierlich bis auf einen Extinktionswert von 2582 (Mittelwert, $n = 3$) an.

4.2.3.5 Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes

Wenn man alle 18 Ergebnisse eines Tages (sechs Ansätze, je drei Messungen) zusammen betrachtet, ergaben sich Standardabweichungen zwischen 3,0 und 6,1% bei den Ansätzen mit Protozoen. Die Medienleerkontrollen wiesen Standardabweichungen zwischen 2,5 und 6,3% auf. Die absoluten Werte waren in den Protozoenansätzen sehr unterschiedlich. Am Tag 1 wurden Extinktionen gemessen, die einen Mittelwert von 2015 ergeben, am Tag 2 einen von 1222 und am Tag 3 einen Mittelwert von 2192. Die entsprechenden Medienleerkontrollen lagen jeweils bei 237, 240 und 239. Die Standardabweichungen der Dreifachmessungen variierten im Gegensatz zu den früheren Sechsfachmessungen von 1,2 bis 5,5% bzw. bei den Medienleerkontrollen von 1,2 bis 9,9%.

4.2.3.6 Optimierung des Exozytostests

Es konnte gezeigt werden, dass es keine Unterschiede im Ergebnis nach sich zog, wenn anstelle der bisherigen Sterilfiltration die Säureimmobilisation zur Trennung der Protozoen vom Überstand benutzt wurde.

Eine Verkleinerung des Systems bis auf Gesamtvolumina von 105 μl führte zu gleichen Ergebnissen wie die bisher verwendeten 750 μl . Gesamtvolumina von 300 μl ergaben unter Nutzung von 1,5 ml-Reaktionsgefäßen deutlich geringere Messsignale.

Der Einsatz der etwas größeren Menge SPP, bei einem Verhältnis von SPP zum protozoenhaltigen Ansatz von 1:4,29, produzierte die gleichen Extinktionswerte wie die Kontrollgruppen.

4.2.3.7 Weitere Untersuchungen des Exozytostests

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Mediumkontrollen Ni und Ni^+ bzw. der trypsinisierten Varianten sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 22).

Die Medien blieben, ungeachtet der Verdünnungsstufe, ohne Einfluss auf die messbare Aktivität der sauren Phosphatase (Abb. 22). Erneut wurde jedoch deutlich, dass die Extinktionen trotz ähnlicher Ausgangsbedingungen nicht regelmäßig erreicht wurden. Da aber im Folgenden immer die Versuchsgruppe in Beziehung zur jeweiligen Kontrollgruppe gesetzt wurde, konnte der Versuchsaufbau bestehen bleiben. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des Phagozytostests wurden die Kulturüberstände jedoch in der gleichen Verdünnungsstufe (1:2) eingesetzt.

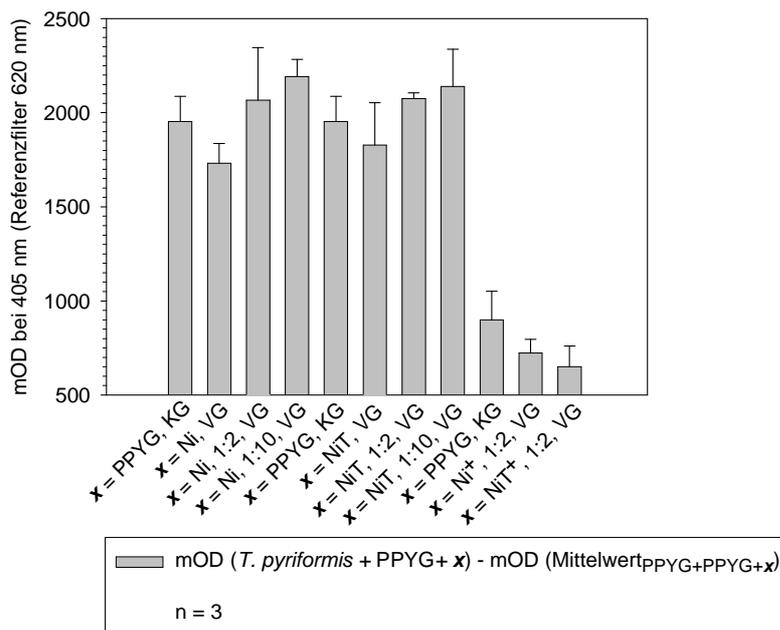


Abb. 22: Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zum Einfluss der Medienkontrollen Ni, Ni⁺ und der trypsinisierten Varianten. Darstellung der Daten aus den Protozoenansätzen. Es wurde der Mittelwert der Medienleerwerte gebildet und dieser von jeweils jedem der drei entsprechenden Ansätze mit Protozoen abgezogen. Von den so entstandenen Ergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Diese Werte werden gezeigt. KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe.

4.2.4 Untersuchungen zur Aktivität der sauren Phosphatase

4.2.4.1 Aktivitätsverlauf

Unabhängig von den getesteten Temperaturbereichen blieb die Aktivität der sauren Phosphatase innerhalb der ersten 5 h konstant. Nach 24 h war jedoch ein deutlicher Abfall nachzuweisen. Ein Temperatureinfluss konnte auch dabei nicht gezeigt werden.

4.2.4.2 Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlauf

Die Ergebnisse dieser Versuche wurden wie folgt bearbeitet. Da aufgrund des Versuchsaufbaus eine genaue Zuordnung eines einzelnen Medienleerwertes zu einer entsprechenden Probe mit Enzymaktivität nicht möglich war, wurden die drei Werte der Medienleerkontrollen zusammengefasst (Mittelwert) und dieser jeweils von jedem der drei zugehörigen Proben mit Enzymaktivität subtrahiert. Die so korrigierten Werte sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 23 und Abb. 24) wiedergegeben. Ein Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen wurde bei keinem der getesteten Kulturüberstände nachgewiesen.

Ergebnisse

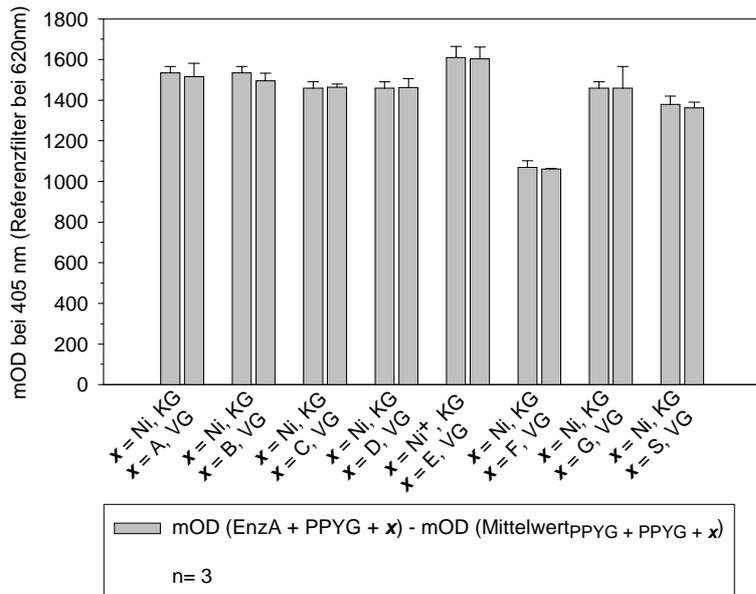


Abb. 23: Darstellung der Ergebnisse der Versuche zum Einfluss der Kulturüberstände (TPGY-Ansätze) auf den Aktivitätsverlauf. Es wurde der Mittelwert der Medienleerkontrollen gebildet und dieser von jedem entsprechenden enzymhaltigen Ansatz abgezogen. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse der leerwertkorrigierten enzymhaltigen Ansätze. EnzA = enzymhaltiger Ansatz, KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe.

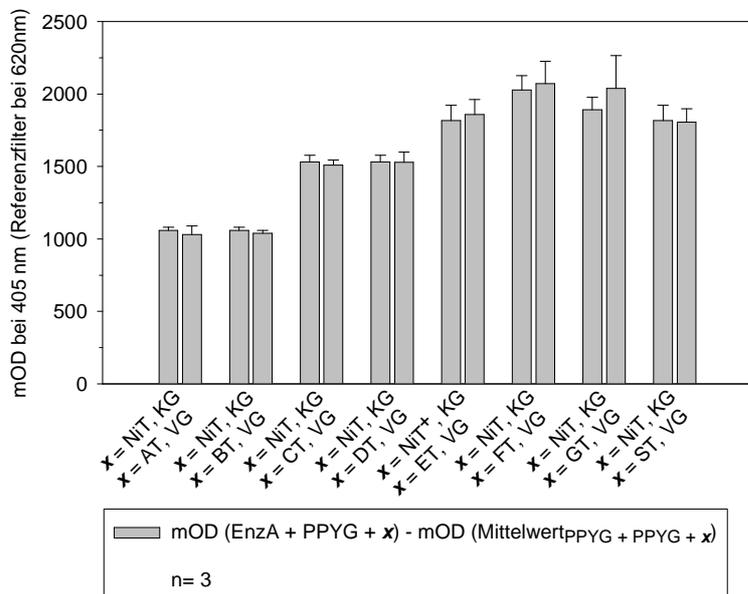


Abb. 24: Darstellung der Ergebnisse der Versuche zum Einfluss der Kulturüberstände (TPGYT-Ansätze) auf den Aktivitätsverlauf. Die Angaben entsprechen denen in der Abb. 23.

4.2.5 Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs in den entwickelten Tests

In den Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs während der Phagozytostests wurde sowohl in den TPGY- als auch in den TPGYT-Ansätzen mit *T. pyriformis* ein geringer Abfall

nach 1 h festgestellt, der aber der zusätzlichen Verdünnung mit der *E. coli* K12-Suspension entspricht. Nach insgesamt 5 h (Prüfzeitraum) wurden in beiden Ansätzen niedrigere REE gemessen. Beim Vergleich mit den entsprechenden Kontrollansätzen ohne Protozoen war jedoch ein ähnlicher Verlauf festzustellen.

Während der Exozytostests mit Protozoen wurde ebenso ein etwas niedrigerer Wert nach 5 h (Prüfzeitraum) gemessen, der aber analog zu den Phagozytoseversuchen gleichermaßen in den Kontrollen ohne Protozoen vorkam.

Damit konnte ein Einfluss der sezernierten Produkte von *T. pyriformis* auf die relativen ELISA-Einheiten (REE) ausgeschlossen werden.

4.3 Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände

Ein Unterschied zwischen der Vitalität der Protozoen in der Kontrollgruppe zur Versuchsgruppe war weder im Phagozytostest, noch im Exozytostest zu den getesteten Zeitpunkten (zu Beginn der Inkubation, nach 2 h, nach Ende der Inkubationszeit) feststellbar.

4.3.1 Phagozytoseversuche

Die Ergebnisse der ersten (von insgesamt drei) Phagozytoseversuche mit den getesteten Kulturüberständen der *C. botulinum*-Toxovare A bis G, der Kulturüberstände von *C. sporogenes* und der entsprechenden Medienkontrollen sind in den folgenden Abbildungen gezeigt (Abb. 25 und Abb. 26).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars A zeigte im ersten Versuch eine signifikant höhere Phagozytoserate ($p = 0,004$) als in den Kontrollgruppen. In den beiden Wiederholungsversuchen ließ sich dieser Effekt nicht reproduzieren.

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars B zeigte im ersten Versuch eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p = 0,013$) als in den Kontrollgruppen. In den beiden Wiederholungsversuchen ließ sich dieser Effekt nicht reproduzieren.

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars C zeigte im ersten Versuch keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose. In der ersten Wiederholung war eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p = 0,032$) als in den Kontrollgruppen nachzuweisen.

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars D zeigte im ersten Versuch keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose. In der ersten Wiederholung war eine signifikant höhere Phagozytoserate ($p = 0,042$) als in den Kontrollgruppen nachzuweisen.

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars E zeigte im ersten Versuch eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p < 0,001$) als in den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis ließ sich in den Wiederholungen reproduzieren (p jeweils $< 0,001$).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars F zeigte im ersten Versuch keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose. In der ersten Wiederholung war eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p = 0,012$) als in den Kontrollgruppen nachzuweisen.

Ergebnisse

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars G zeigte im ersten Versuch keine signifikante Beeinflussung der Phagozytose. In den beiden Wiederholungen war jeweils eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,015$) als in den Kontrollgruppen nachzuweisen.

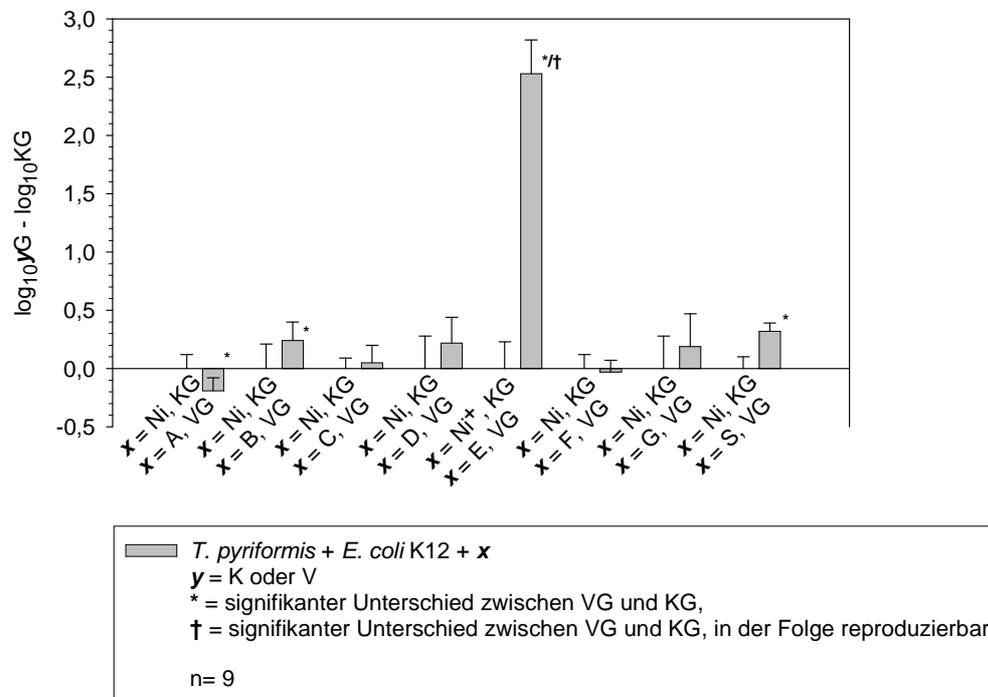


Abb. 25: Darstellung der Ergebnisse aus dem ersten (von insgesamt drei) Phagozytoseversuch zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände (TPGY-Ansatz). K = Kontroll-, V = Versuchs-, KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe. Auswertung der Ergebnisse gemäß den Angaben im Abschnitt Material und Methoden. Ein Versuchsgruppenwert, der den jeweiligen Kontrollgruppenwert überschreitet, entspricht einer vergleichbar weniger starken Reduktion der \log_{10} KbE/ml und somit einer geringeren Phagozytoserate. Ein Versuchsgruppenwert, der den entsprechenden Kontrollgruppenwert unterschreitet, ist entsprechend umgekehrt zu interpretieren.

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand von *C. sporogenes* (S) zeigte im ersten Versuch eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p < 0,001$). In der ersten Wiederholung war dieses Ergebnis reproduzierbar ($p < 0,001$).

Der Ansatz mit dem tryptinisierten Kulturüberstand des Toxovars A zeigte im ersten Versuch eine signifikant höhere Phagozytoserate ($p = 0,046$) als in den Kontrollgruppen. In den beiden Wiederholungsversuchen ließ sich dieser Effekt nicht reproduzieren. Stattdessen zeigte sich beide Male eine signifikant niedrigere Phagozytoserate ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,003$).

Der Ansatz mit dem tryptinisierten Kulturüberstand des Toxovars B zeigte im ersten Versuch keine signifikant abweichende Phagozytoserate. Dieses Ergebnis bestätigte sich in den Wiederholungsversuchen.

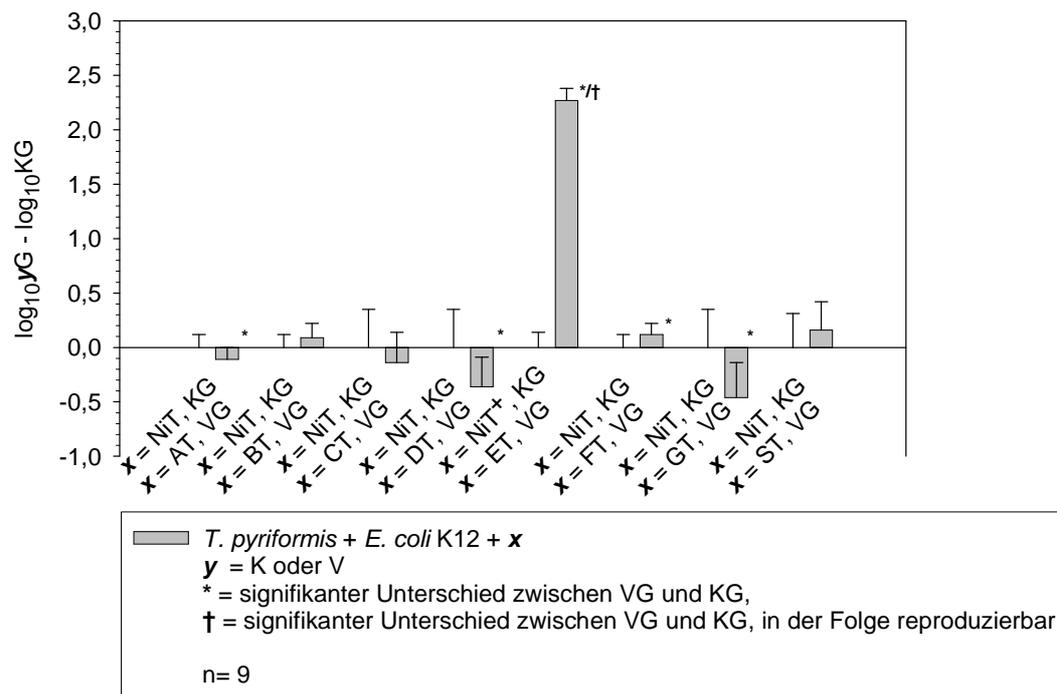


Abb. 26: Darstellung der Ergebnisse aus dem ersten (von insgesamt drei) Phagozytoseversuch zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände (TPGYT-Ansatz). K = Kontroll-, V = Versuchs-, KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe. Auswertung der Ergebnisse gemäß den Angaben im Abschnitt Material und Methoden (Interpretation siehe Abb. 25).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars C zeigte im ersten Versuch keine signifikant abweichende Phagozytoserate. Die zweite Wiederholung wich von diesem Ergebnis ab. Es wurde eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p = 0,032$) gefunden.

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars D zeigte im ersten Versuch eine signifikant höhere Phagozytoserate ($p = 0,027$) als in den Kontrollgruppen. Der Effekt ließ sich nicht reproduzieren. In der zweiten Wiederholung wurde eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p = 0,001$) nachgewiesen.

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars E zeigte im ersten Versuch eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p < 0,001$) als in den Kontrollgruppen. Dieser Effekt ließ sich in den Wiederholungen reproduzieren (p jeweils $< 0,001$).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars F zeigte im ersten Versuch eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p = 0,029$) als in den Kontrollgruppen. Der Effekt ließ sich in der ersten Wiederholung ($p = 0,008$) reproduzieren.

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars G zeigte im ersten Versuch eine signifikant höhere Phagozytoserate ($p = 0,010$) als in den Kontrollgruppen. Der Effekt ließ sich in der ersten Wiederholung ($p = 0,025$) reproduzieren. In der zweiten Wiederholung wurde eine signifikant geringere Phagozytoserate ($p = 0,006$) gefunden.

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand von *C. sporogenes* (ST) zeigte im ersten

Versuch keine signifikant abweichende Phagozytoserate. In den Wiederholungen wurde eine signifikant höhere Phagozytoserate (p jeweils = 0,027) nachgewiesen.

Da die Standardabweichung bei der Bestimmung der KbE/ml in den Vorversuchen bei bis zu 0,42 \log_{10} -Stufen lag, konnte erst eine Differenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, die 0,84 \log_{10} -Stufen überschreitet, sicher als Unterschied erfasst werden. Ein entsprechender Unterschied wurde nur beim Toxovar E (TPGY-Ansatz und TPGYT-Ansatz) gefunden (1,99 \log_{10} -Stufen bis 2,53 \log_{10} -Stufen bzw. 2,21 \log_{10} -Stufen bis 3,40 \log_{10} -Stufen). Die signifikanten Unterschiede, die sich bei den anderen Kulturüberständen rechnerisch ergaben, waren folglich nicht haltbar. Daher wurde nur mit den Kulturüberständen des Toxovars E weitergearbeitet. Der Einsatz detoxifizierter Kulturüberstände ergab keine Unterschiede zu den nicht erhitzten Kontrollgruppen (vergleichbar signifikant geringere Phagozytoseraten).

Die Messung der Proteinkonzentrationen ergab deutliche Unterschiede zwischen den Kulturüberständen. In den unverdünnten Medienkontrollen wurden Proteinmengen von ca. 43 mg/ml (Ni^+) bzw. ca. 46 mg/ml (NiT^+) gemessen. Die Kulturüberstände des Toxovars E wiesen hingegen Proteinkonzentrationen von ca. 100 mg/ml (TPGY-Ansatz) bzw. ca. 145 mg/ml (TPGYT-Ansatz) auf. Auch die pH-Werte wichen voneinander ab. So war in den Kontrollgruppen Ni^+ / NiT^+ ein pH-Wert von 6,5, in den Versuchsgruppen jedoch ein pH-Wert von 5,5 ermittelt worden. Nach Verdünnung der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände auf den Proteingehalt der Kontrollgruppen (durch die 1:2 Vorverdünnung mit Wasser ca. 22 mg/ml, Ni^+ und TPGY-Ansatz, bzw. ca. 23 mg/ml, NiT^+ und TPGYT-Ansatz) war eine signifikant geringere Phagozytoserate, die einem \log_{10} KbE/ml-Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe von größer 0,84 entspricht, nicht mehr nachzuweisen.

4.3.2 Exozytoseversuche

Die Ergebnisse der ersten (von insgesamt drei) Exozytoseversuche mit den getesteten Kulturüberständen der *C. botulinum*-Toxovare A bis G, der Kulturüberstände von *C. sporogenes* und der entsprechenden Medienkontrollen sind in den folgenden Abbildungen gezeigt (Abb. 27 und Abb. 28).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars A zeigte im ersten Versuch eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung ($p < 0,001$). Dieses Ergebnis ließ sich in den Wiederholungen reproduzieren (p jeweils $< 0,001$).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars B zeigte im ersten Versuch eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung ($p = 0,009$). Dieses Ergebnis ließ sich in den Wiederholungen reproduzieren (p jeweils $< 0,001$).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars C zeigte im ersten Versuch eine signifikant erhöhte Exozytoseleistung ($p < 0,001$). Dieses Ergebnis ließ sich in der ersten Wiederholung reproduzieren ($p < 0,001$).

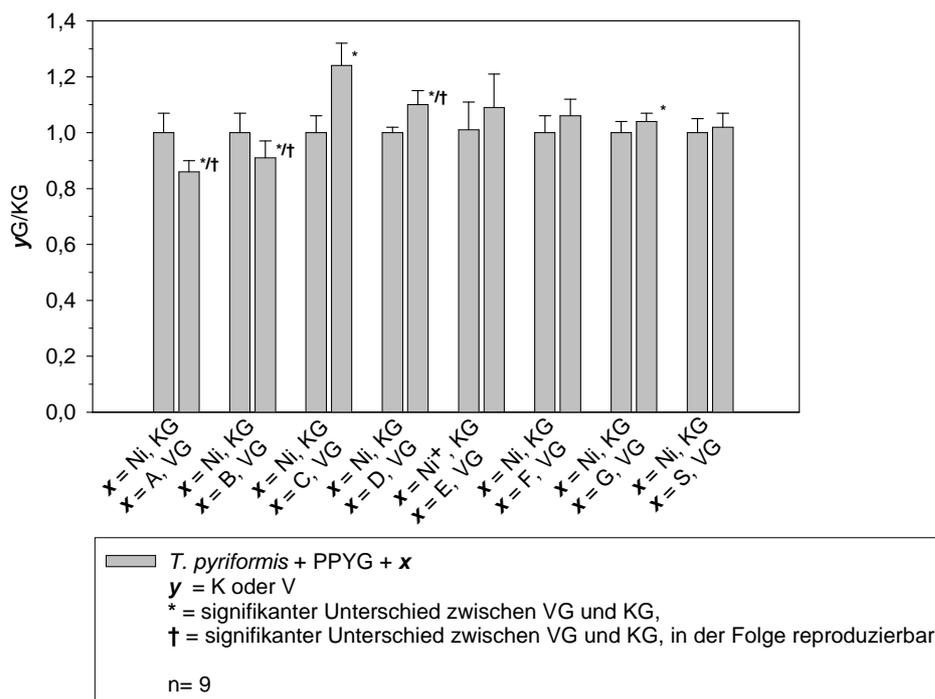


Abb. 27: Darstellung der Ergebnisse aus dem ersten (von insgesamt drei) Exozytoseversuch zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände (TPGY-Ansatz). K = Kontroll-, V = Versuchs-, KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe. Auswertung der Ergebnisse gemäß den Angaben im Abschnitt Material und Methoden. Ein Versuchsgruppenwert, der den jeweiligen Kontrollgruppenwert unterschreitet, entspricht einer vergleichbar geringeren Aktivität der sauren Phosphatase und somit einer erniedrigten Exozytoseleistung. Ein Versuchsgruppenwert, der den entsprechenden Kontrollgruppenwert überschreitet, ist entsprechend umgekehrt zu interpretieren.

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars D zeigte im ersten Versuch eine signifikant erhöhte Exozytoseleistung ($p < 0,001$). Dieses Ergebnis ließ sich in den Wiederholungen reproduzieren ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,001$).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars E zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. Dieses Ergebnis war nicht reproduzierbar. In beiden Wiederholungen wurde eine signifikant erniedrigte Exozytose (p jeweils $< 0,001$) nachweisen.

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars F zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. In den Wiederholungen war jeweils eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung nachzuweisen (p jeweils $< 0,001$).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand des Toxovars G zeigte im ersten Versuch eine signifikant erhöhte Exozytoseleistung ($p = 0,049$). In der ersten Wiederholung war eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung nachzuweisen (p jeweils $< 0,001$). In der zweiten Wiederholung zeigte sich wiederum ein signifikant höheres Ergebnis im Vergleich zur Kontrollgruppe

Ergebnisse

($p = 0,001$).

Der Ansatz mit dem Kulturüberstand von *C. sporogenes* (S) zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. In den Wiederholungen war jeweils eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung nachzuweisen ($p = 0,035$ bzw. $p < 0,001$).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars A zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. In der ersten Wiederholung konnte eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung gefunden werden ($p < 0,001$).

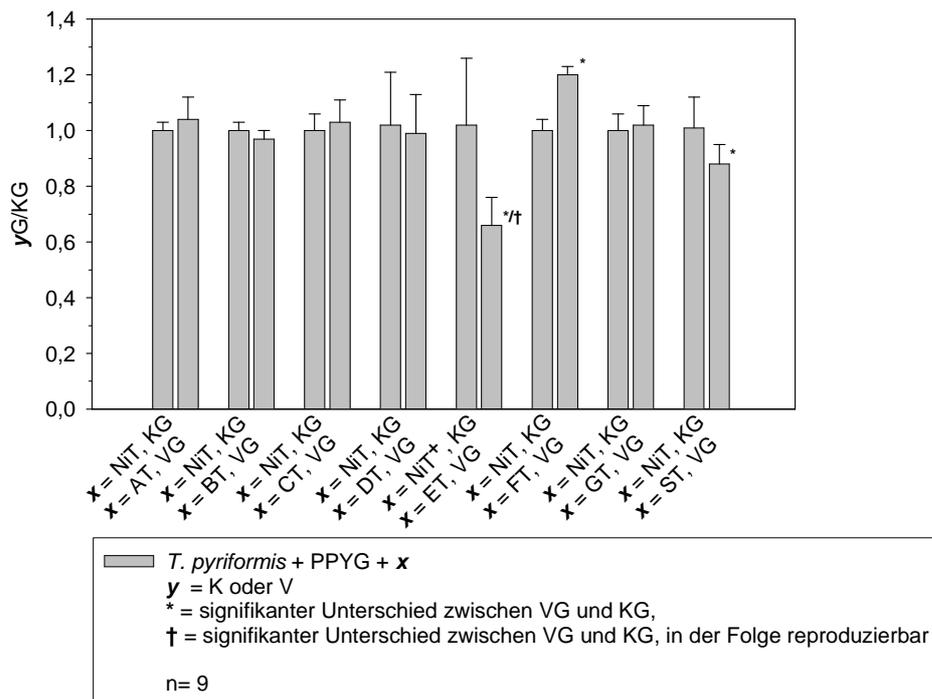


Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse aus dem ersten (von insgesamt drei) Exozytoseversuch zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände (TPGYT-Ansatz). K = Kontroll-, V = Versuchs-, KG = Kontrollgruppe, VG = Versuchsgruppe. Auswertung der Ergebnisse gemäß den Angaben im Abschnitt Material und Methoden (Interpretation siehe Abb. 27).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars B zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. Dieses Ergebnis ließ sich in den Wiederholungen reproduzieren.

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars C zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. In der zweiten Wiederholung konnte eine signifikant erhöhte Exozytoseleistung gefunden werden ($p = 0,007$).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars D zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. In der zweiten Wiederholung konnte eine signifikant erhöhte Exozytoseleistung gefunden werden ($p = 0,009$).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars E zeigte im ersten Versuch eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung ($p = 0,001$). Dieses Ergebnis ließ sich in den

Wiederholungen reproduzieren ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,008$).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars F zeigte im ersten Versuch eine signifikant erhöhte Exozytoseleistung ($p < 0,001$). Dieses Ergebnis ließ sich in den Wiederholungen jedoch nicht reproduzieren.

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars G zeigte im ersten Versuch keine signifikant veränderte Exozytoseleistung. In der ersten Wiederholung wurde die Exozytoseleistung signifikant erniedrigt ($p < 0,001$), in der zweiten Wiederholung hingegen signifikant erhöht nachgewiesen ($p = 0,006$).

Der Ansatz mit dem trypsinisierten Kulturüberstand von *C. sporogenes* (S) zeigte im ersten Versuch eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung ($p = 0,010$). In der ersten Wiederholung ließ sich dieser Effekt reproduzieren ($p < 0,001$).

Da die Standardabweichung bei der Bestimmung der Exozytoseleistung in den Vorversuchen bei bis zu 5,5% lag, konnte erst eine Differenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, die 11% überschreitet, sicher als Unterschied erfasst werden. Jedoch wurde in den Versuchen mit den neurotoxinhaltigen Überständen bei dem TPGY-Ansatz des Toxovars F und bei dem TPGYT-Ansatz des Toxovars G eine signifikante Abweichung von 29% im Vergleich mit den Kontrollgruppen gefunden. Da beim Ansatz mit dem Toxovar F (TPGY-Ansatz) nur an einem anderen Versuchstag ein signifikanter Unterschied gefunden wurde, bei Toxovar G (TPGYT-Ansatz) an einem anderen Versuchstag sogar eine signifikant erhöhte Exozytoseleistung um 14% gemessen wurde, wurde angenommen, dass ein Unterschied von bis 29% innerhalb der normalen Plastizität des Exozytoseereignisses liegt. Deshalb wurde eine Differenz von mindestens 30% gefordert. Ein entsprechender Unterschied wurde nur bei dem Toxovar E (TPGYT-Ansatz) gefunden.

Die detoxifizierten Überstände ergaben zweimal signifikant niedrigere Exozytoseleistungen, die über die geforderte Differenz von den Kontrollgruppen abwichen. In der zweiten Wiederholung wurde eine signifikant erniedrigte Exozytoserate gefunden, die einer Differenz von 24% entsprach. Nach Verdünnung des neurotoxinhaltigen Kulturüberstandes auf den Proteingehalt der Kontrollgruppe (durch die 1:2 Vorverdünnung mit Wasser ca. 23 mg/ml, NiT⁺-Ansatz) zeigte sich zunächst eine signifikant erhöhte Exozytoserate ($p = 0,009$). Dieses Ergebnis ließ sich nicht reproduzieren. In der ersten Wiederholung wurde eine signifikant erniedrigte Exozytoseleistung ($p = 0,04$) gefunden. Die Differenz zwischen den Kontrollgruppenergebnissen und den Ergebnissen des verdünnten Toxovars E war an keinem Versuchstag größer als 30%.

5 Diskussion

5.1 Produktion der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände von *C. botulinum* sowie entsprechender Kontrollüberstände

Für die Neurotoxinproduktion der sieben verschiedenen *C. botulinum*-Toxovare wurde auf das in der DIN 10102 beschriebene Protokoll zurückgegriffen. Die Toxovare lagen nicht alle in derselben Konservierungsvariante vor. Sie wurden je nach Ausgangssituation unterschiedlich vorbehandelt. Anschließend wurde der Schritt über die Columbia-Blutplatte dem DIN 10102-Protokoll vorgeschaltet. So konnten bei allen Toxovaren außer E dennoch vergleichbare Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Toxovar E wurde zwar zunächst ebenfalls aus einer RCM-Flüssigkultur auf Columbia-Blutplatten verbracht und weiterhin wie die anderen Toxovare bearbeitet. Eine im Maus-Bioassay nachweisbare Neurotoxinbildung unterblieb jedoch bei dieser Behandlung. Aus diesem Grund wurde in der Wiederholung der Plattenschritt unterlassen und die RCM-Kultur direkt in das TPGY- bzw. das TPGYT-Medium inokuliert. Somit wies das Toxinbebrütungsmedium bei Toxovar E eine leicht abgewandelte Zusammensetzung auf, und die Medienkontrollen Ni und NiT mussten durch Zusatz von RCM ohne Bakterieninokulum angepasst werden (= Ni⁺ und NiT⁺). In der DIN 10102 wird die Verwendung zweier grundsätzlich unterschiedlicher Medien vorgeschrieben. Da das andere Medium den Einsatz von Rinderherzpartikeln bzw. frischem Rindfleisch verlangt und somit eine Standardisierung durch verschiedene Fleischchargen erschwert wird (die Toxovare wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten kultiviert), fand nur das TPGY-Medium Verwendung. Im Gegensatz zum Ziel der DIN 10102 (qualitativer Toxinnachweis), sollte in dieser Arbeit eine möglichst große Neurotoxinmenge in entsprechendem Volumen gewonnen werden, daher wurden zum einen größere Mengen der Medien verwendet, zum anderen wurde die Inkubationszeit ebenso modifiziert, statt der beschriebenen 5 d wurden die Kulturen 7 d lang bebrütet.

In der Literatur ist eine Steigerung der Aktivität durch den Zusatz von Trypsin bei allen Toxovaren beschrieben (Typ A, KRYSINSKI u. SUGIYAMA 1981, Typ B, HALLIS et al. 1996, Typ D, MIYAZAKI et al. 1977, Typ E, DUFF et al. 1956, Typ F, HOLDEMAN u. SMITH 1965 und Typ G, GIMÉNEZ u. CICCARELLI 1970). Allerdings gibt es für Toxovar C unterschiedliche Angaben (Steigerung, BAUMGART 1970b und keine Steigerung, EKLUND u. POYSKI 1972). Daher wurden vergleichende Ansätze in der trypsinisierten Variante des TPGY-Mediums (= TPGYT) für alle Toxovare mitgeführt. Da die verschiedenen Stämme nicht alle zum selben Zeitpunkt angesetzt wurden, gab es unterschiedliche Medienchargen. Deshalb gibt es in der Arbeit für die unterschiedlichen Neurotoxinansätze eigene Kontrollen, die jeweils aus derselben Mediencharge produziert wurden. Eine Kontamination mit aeroben Keimen konnte an verschiedenen Schritten durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen werden.

Im Maus-Bioassay wurden außer im Fall des Typs E keine Unterschiede zwischen trypsinisierten Ansätzen (TPGYT) und den nicht trypsinisierten (TPGY) gefunden. Aufgrund des zunächst nur orientierenden Charakters der Arbeit wurden die MLD/ml nicht genauer als bis auf die Zehnerpotenz bestimmt. Für die gewählten Fragestellungen erschien diese Größenordnung hinreichend genau, so dass aus ethischen Gründen auf weitere Mäuseversuche zur exakteren Angabe der MLD verzichtet wurde. Unterschiede, die sich aus der unterschiedlichen Kultivierungsmethode ableiten, können dadurch maskiert worden sein.

Der eingesetzte Referenzstamm des Toxovars D ist durch die Fähigkeit zur zusätzlichen Produktion des C2-Toxins, einer ADP-Ribosyltransferase (AKTORIES et al. 1987) charakterisiert. Auf das potentiell gebildete C2-Toxin wurde nicht untersucht.

5.1.1 Weitere Untersuchungen der Kulturüberstände

Eine Veränderung in der MLD in einer Größenordnung von Zehnerpotenzen bei den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen durch im Zuge der Arbeit wiederholte Einfrier- und Auftauvorgänge konnte ausgeschlossen werden. Jedoch wurde auch in diesem Test aus ethischen Gründen auf weitergehende Mäuseversuche verzichtet, so dass Veränderungen innerhalb eines theoretischen Rahmens der MLD/ml von $1,00E+03$ bis kleiner als $1,00E+04$ nicht aufgedeckt werden konnten. Eine generelle Veränderung der Neurotoxinkonzentrationen z. B. durch ebenso gebildete Proteasen konnte nicht ausgeschlossen werden. Da die getesteten Zeitspannen während der Auftauvorgänge und Lagerungsprozesse (zwischen einmaligem Auftauen und 75minütiger Lagerung bei 4°C und fünfmaligem Auftauen und Einfrieren und zwischenzeitlicher Lagerung bei 4°C über Zeiträume von jeweils 30 min, siehe Anhang) im Routineumgang mit den Kulturüberständen bedeutend unterschritten wurden, zudem stets neue Aliquots eingesetzt worden waren, konnten diese potentiellen Konzentrationsschwankungen außer Acht gelassen werden. Dem orientierenden Charakter der Versuche entsprechend waren die Neurotoxinkonzentrationen in den Kulturüberständen ausreichend, selbst, wenn durch den routinemäßigen Umgang mit ihnen ein entsprechender Verlust der Aktivität zu verzeichnen gewesen wäre.

5.2 *T. pyriformis*

Obwohl bei *Tetrahymena* spp. im Gegensatz zu *Paramecium* spp. noch keine Beteiligung von Proteinen des SNARE-Komplexes an Membranfusionsvorgängen nachgewiesen worden ist, wurde sich aufgrund der einfachen Kultivierungsbedingungen und der Möglichkeit einer axenischen Haltung, was eine große Vereinfachung für die Untersuchung der hier gestellten Fragen bedeutet, für dieses Protozoon als Modellorganismus entschieden.

Darüber hinaus findet *T. pyriformis* für viele unterschiedliche Fragestellungen Anwendung als Indikatororganismus (siehe 2.4.4). In der Literatur wird von einigen Autoren bereits auf eine mögliche Eignung im Nachweis von BoNTs hingewiesen (GRÄF 1985) bzw. existieren sogar

schon Ergebnisse aus (Wachstums-) Tests unter dem Einfluss der BoNTs A, B und E einschließlich einer Empfehlung in Bezug auf die klinische Relevanz dieser Ergebnisse (De WAART et al. 1972).

Für *T. pyriformis* sprach zudem die Tatsache, dass eine sexuelle Vermehrung nicht stattfindet (ALLEN u. GIBSON 1973). Eine dadurch bedingte potentielle Veränderung während der Langzeitkultivierung konnte also ausgeschlossen werden. Ähnliches gilt für das Enzystierungsvermögen. *T. pyriformis* GL ist nicht in der Lage, Zysten zu bilden und sich so potentiell der weiteren Einflussnahme zu entziehen (CALLEJAS u. GUTIERREZ 2003).

5.2.1 Wachstumskinetik

Für die Bestimmung der Zellzahlen wurde auf die Zählung mittels einer Neubauer-Zählkammer (improved) zurückgegriffen. Da der Einsatz der Zählkammer häufig das Verdünnen der Probe voraussetzt, liegen darin zusätzliche Fehlermöglichkeiten. Jedoch ist mit diesem Verfahren eine visuelle Beurteilung der Zellen möglich, so dass intakt erscheinende Zellen von Zellfragmenten und anderen Artefakten sicher zu unterscheiden sind. Darüber hinaus ist diese Methode sehr schnell und einfach durchzuführen. Mehrfachzählungen, einschließlich jeweils neuer Verdünnungsansätze, ermöglichten eine Bestimmung der Fehlerquoten. Die gefundenen Standardabweichungen der \log_{10} -Zellzahlen von 0,02 bei Zellzahlen im \log_{10} -Bereich von 6,00 und von 0,07 bei Zellzahlen im \log_{10} -Bereich von 5,20 entsprechen unter Verwendung der natürlichen Zahlen prozentualen Abweichungen von 3,5 bis 14,9%. Aufgrund der höheren Genauigkeit bei Auszählung größerer Protozoenkonzentrationen wurden bei Versuchen, in denen die Konzentration von *T. pyriformis* eingestellt werden musste, stets aus einer Kultur mit \log_{10} -Zellzahlen von ca. 6,00 Zellen ausgezählt und dann mittels Verdünnung auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

In einem geschlossenen System verläuft das mikrobielle Wachstum nach gewissen Gesetzmäßigkeiten, wobei *T. pyriformis* keine Ausnahme darstellt (HAUPTMANN 2000).

Auf eine kurze Adaptationsphase (lag-phase), die im PPY-Medium deutlicher nachzuvollziehen ist, folgt die exponentielle (HAUPTMANN 2000) oder logarithmische (KRÜGER 2002) Phase (log-phase). Da das Inokulum bereits Zellen einer beträchtlichen Menge enthielt und diese aus einer Vorkultivierung in dem jeweiligen Medium entstammten, wurde die Phase des exponentiellen Wachstums besonders im PPYG-Medium scheinbar direkt aufgenommen. Jedoch ist zu den entsprechenden Zeitpunkten, anhand derer die lag-phase im PPY-Medium nachvollziehbar ist, keine Zellzählung vorgenommen worden, da die Fragestellung lediglich die Bestimmung des Zeitpunktes vom Eintritt in die stationäre Phase vorgab. Durch die Abnahme verwertbarer Substrate und die Zunahme von negativ beeinflussenden Stoffwechselprodukten wird mit einer kurzen Übergangsphase und dem Erreichen der maximalen Zellzahl die stationäre Phase eingeleitet. Im PPYG-Medium wurde diese bedeutend länger aufrechterhalten. Die anschließende Absterbephase vollzog sich im PPY-Medium

wesentlich schneller, wohingegen im PPYG bei Raumtemperatur nach einem anfänglichen, kurzen Abfall die Zellkonzentration über einen Zeitraum von ca. 60 h deutlich langsamer abnahm, um anschließend ebenso wie in den anderen Ansätzen schneller zu fallen. Aufgrund der besseren Kulturentwicklung im PPYG wurde ein PPY-Ansatz bei Raumtemperatur nicht mehr getestet.

Die Dynamik des pH-Wertes konnte z. T. wie in der Literatur beschrieben (NILSSON 1989) nachvollzogen werden. Im PPY-Medium blieb der anfängliche pH-Wert bis zu einer Zelldichte der \log_{10} -Zellzahl/ml von 4,90 konstant, um dann auf den Wert von ca. 8,0 anzusteigen. In den eigenen Untersuchungen war dies nach ca. 50 h der Fall. Bei Zusatz von Glukose soll nach NILSSON (1989) der pH-Wert bei Zelldichten bis zu einer \log_{10} -Zellzahl/ml von 5,50 konstant bleiben, bei größeren Zellmengen auf bis zu 5,0 absinken. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen wichen davon ab. Es wurden zwar nicht so hohe Werte erreicht wie im PPY-Medium, jedoch kam es auch im Medium mit Glukose (PPYG) zu einem sukzessiven Anstieg des pH-Wertes. LEVY (1973) weist aber darauf hin, dass die Art der Kultivierung darauf einen Einfluss ausübt. Sofern eine ausreichend große Menge Sauerstoff zur Verfügung steht, wie es in den liegend gelagerten Zellkulturflaschen der Fall war (Oberfläche von ca. 25 cm² bei einer Füllhöhe von ca. 0,8 cm), kommt es eher zu einer Alkalisierung der Kultur, da der Sauerstoff die Glukose-Abbauraten verringert und Ketosäuren, die durch Desaminierung von Aminosäuren entstehen, mutmaßlich oxidiert werden, anstatt zu weiteren Säuren degradiert zu werden.

Die Generations- und Überlebenszeiten im PPY-Medium, wie sie bei NILSSON (1989) beschrieben wurden, konnten in diesen Versuchen nicht nachvollzogen werden. Unter Verwendung von PPYG bei 28°C wurden maximale Generationszeiten von 4 h erzielt, im Gegensatz zu den 3 h, die NILSSON (1989) angibt. Da sich die Kultivierungsbedingungen jedoch unterschieden (kein permanentes Schütteln der Kultur, Ansatz in Zellkulturflaschen) und in den eigenen Untersuchungen demnach für eine Vermehrung nicht optimal waren, sind die Abweichungen der Generationszeiten zu vernachlässigen.

Der Zusatz von Glukose, wie er von einigen Autoren in wechselnden Konzentrationsangaben beschrieben wird (EVERHARDT 1972, MARTINDALE et al. 1979, KRAMHØFT u. LAMBERT 1997) führte zu besseren Resultaten im Sinne der Fragestellung.

Anstelle einer komplexen Salzlösung (MARTINDALE et al. 1979) oder Aqua dest. (NILSSON 1989) wurde natürliches Mineralwasser ohne Kohlensäure (Volvic®) verwendet, da gute Erfahrungen bei anderen Ziliaten vorlagen (persönliche Mitteilung MARTIN SCHLEGEL, Leipzig, März 2004). Aufgrund der zufrieden stellenden Ergebnisse der eigenen Untersuchungen wurde weiterhin mit diesem Mineralwasser gearbeitet.

Für die Langzeitkultivierung wird z. B. über die Verwendung von Kichererbsen in Aqua dest. oder Aqua deion. berichtet (PAULI et al. 1995). Die Verfügbarkeit der eingesetzten Reiskör-

ner und die für die Anforderungen dieser Arbeit befriedigende Wachstumskinetik der Ansätze im Medium für die Langzeitkultivierung (RM) gestatteten jedoch den weiterführenden Einsatz des RMs.

5.2.2 Entwicklung des Phagozytostests

In der Literatur sind vielfältige Möglichkeiten beschrieben worden, die Phagozytoseaktivität von *T. pyriformis* zu bestimmen. Eine sehr einfache Methode ist der Einsatz von Tuschelösungen (India Ink, KITAJIMA u. THOMPSON 1977, KOVACS et al. 1986). Kleinere korpuskuläre Elemente, wie Latexpartikel (MUELLER et al. 1965, RICKETTS 1972, BATZ u. WUNDERLICH 1976) oder *Glugea* spp.-Sporen (WEIDNER u. SIBLEY 1985) bzw. FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)-markierte *E. coli*-Partikel (KÖHIDAI et al. 2002) sind ebenso zur Visualisierung herangezogen worden.

BUKHARIN und NEMTSEVA (2001) verwendeten *E. coli* als Testkeim. Die Phagozytoseaktivität von *T. pyriformis* bestimmten die Autoren über die Abnahme von KbE/ml durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungsstufen auf Nähragarplatten. Der beobachtete Zeitraum erstreckte sich in ihrem Versuch über 40 d. Die Nutzung eines vitalen Futterkeimes bietet für die Fragestellungen dieser Arbeit Vorteile. Mittels der Degradierungsrate wird nicht nur eine Aussage über die Aufnahme von Teilchen durch *T. pyriformis* getroffen, sie erfordert obendrein das komplexere Zusammenspiel verschiedener Vorgänge im Membranenverkehr, die zum Abbau der aufgenommenen Bakterien führen (NILSSON 1987): Der Transport von Membranvesikeln aus dem Zellinneren zum Zytostom als Grundlage der Bildung einer Nahrungsvakuole, der lysosomale Verkehr, von der Entstehung der lysosomalen Vesikel im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER), der Prozessierung über das glatte endoplasmatischen Retikulum (GER) und Golgi-Apparat bis zu ihrer Verschmelzung mit der Digestionsvakuole und schließlich der Egestionsprozess. Dadurch bieten sich gleich mehrere potentielle Angriffspunkte für die BoNTs. Im Falle einer Beeinflussung ist es so natürlich nicht möglich, den Ort der Prozessstörung bestimmen zu können. Das Hauptaugenmerk der Arbeit galt jedoch den Wechselwirkungen zwischen den BoNTs und mutmaßlich SNARE-abhängigen Prozessen bei *T. pyriformis* mit dem Ziel, eine Eignung als mögliches Indikatorsystem zu überprüfen. Daher erscheint die Betrachtung der Degradierung mit einer Vielzahl möglicher Angriffspunkte geeigneter als die Betrachtung von Einzelschritten dieses Vorganges.

Weitere Anforderungen an das Testdesign waren eine möglichst geringe Laufzeit, um zusätzliche Einflüsse wie Wachstumskinetik von Protozoen und Futterkeimen, Mediumveränderungen infolge eines Substratverbrauches und einer Akkumulation von Stoffwechselprodukten sowie den Protein-Turnover beim Zielorganismus mit resultierender Abnahme eines detektierbaren Effektes gering zu halten. Außerdem wurde ein starker Reduktionseffekt angestrebt, um trotz der modellbedingten Ungenauigkeit bei der Einstellung der Organismen-

zahlen zu einem deutlichen und reproduzierbaren Ergebnis zu gelangen. Schließlich sollten kleine Protozoenzahlen eingesetzt werden, die in der Kultivierung schnell zu erreichen sind.

In der Arbeit von BURKHARIN und NEMTSEVA (2001) werden *T. pyriformis* in einer Konzentration von \log_{10} Zellzahl/ml 4,00 und *E. coli* in einer Konzentration von \log_{10} KbE/ml 7,00 eingesetzt. Innerhalb von 24 h werden die Bakterien bis auf \log_{10} KbE/ml 2,90 degradiert.

WATSON et al. (1981) untersuchen in ihrer Arbeit die Kinetik von *T. pyriformis* in *E. coli*-Kulturen. Dabei wird mit ähnlichen Zellzahlen gearbeitet (*T. pyriformis* in einer \log_{10} Zellzahl/ml von 3,66 und *E. coli* variierend \log_{10} KbE/ml 7,91 bis 8,76). *E. coli* wird innerhalb von 20 h von ca. \log_{10} KbE/ml 8,08 auf \log_{10} KbE/ml 5,00 reduziert (Plattenzählverfahren).

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass es sich bei *E. coli* K12 um einen gut charakterisierten und apathogenen Stamm handelt, wurde sich für diesen Futterkeim als erste Wahl entschieden.

5.2.2.1 Einstellen der Bakterienzahl

5.2.2.1.1 Reproduzierbarkeit der *E. coli* K12-Quantifizierung

Das Plattenverdünnungsverfahren ist trotz seiner Nachteile (Standardabweichungen bei der Ermittlung der KbE/ml) ein verbreitetes und sehr praktikables Quantifizierungsverfahren von Keimen. Die Bewertung des Reduktionserfolges stellt sich im logarithmischen Bereich (dekadischer Logarithmus) in Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit des Reaktionsansatzes weitaus günstiger dar, auch wenn dies eine längere Inkubationszeit bedingt als beispielsweise die Halbierung der KbE/ml. Da relative Ergebnisse (Versuchsgruppenergebnisse in Bezug zu den jeweiligen Kontrollgruppenergebnissen) anstelle der ausgezählten absoluten KbE/ml verwendet wurden, konnte die Quantifizierung mittels Extinktionsmessung trotz der Abweichungen zu den Ergebnissen im Plattenverdünnungsverfahren vorgenommen werden. Die Bestimmung der Standardabweichung des Plattenverdünnungsverfahrens musste bei der Bewertung der Signifikanzprüfungen Berücksichtigung finden.

5.2.2.2 Einfluss des Reaktionsmediums auf *E. coli* K12 und *T. pyriformis*

Da sowohl *E. coli* K12 als auch *T. pyriformis* im Mineralwasser der Fa. Volvic® keinen Veränderungen in ihren Wachstumskinetiken unterlagen, wurde das Mineralwasser als Reaktionsmedium verwendet. Es bietet keine Substrate, die Veränderungen in der Anzahl der eingesetzten Mikroorganismen gestatten. Durch die Langzeitkultivierung lagen bereits gute Erfahrungen in Hinblick auf die Verträglichkeit für *T. pyriformis* vor, so dass es auch in den Phagozytoseversuchen zum Einsatz kommen konnte.

5.2.2.3 Einfluss der Vorkultivierung von *T. pyriformis*

Bei Erstellung der ersten Zellkonzentrationen wurde sich an den vorliegenden Veröffentlichungen orientiert. Es wurden Protozoen genutzt, die sich im letzten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Kulturen wurden stets einige Tage zuvor aus den Langzeitmedien frisch angesetzt, um Zellen im letzten Drittel der logarithmischen Phase zu erhalten. In der Phase des logarithmischen Wachstums sind die Zellen sehr aktiv. Außerdem sollte die Akkumulation von negativ beeinflussenden Stoffwechselprodukten, wie sie sich vor allem in der stationären Phase vollzieht, gering gehalten werden. Die zunächst eingesetzte Protozoenkonzentration wurde gewählt, da sich diese Zellzahl in einer wachsenden Kultur relativ schnell erreichen lässt. Da der Einfluss der Vorkultivierung von *T. pyriformis* sehr deutlich wurde, wurde im Interesse einer möglichst geringen Inkubationszeit des Versuches, die Vorkultivierung in Wasser routinemäßig eingeführt. Eine Veränderung in der Morphologie der Protozoen ließ sich innerhalb dieser kurzen Zeit im Gegensatz zur Langzeitkultivierung lichtmikroskopisch nicht nachweisen. Die Reduktionsraten, die im Ansatz erzielt wurden, der auf PPYG vorkultiviert wurde, reproduzieren sehr gut die Ergebnisse, die WATSON et al. (1981) beschreiben. Auch hier wird *T. pyriformis* auf vergleichbare Weise gehalten (PPY-Kultur, jedoch ohne Glukosezusatz), bevor die Phagozytoserate bestimmt wird. Dabei ist nach 5 h eine Reduktion von \log_{10} KbE/ml 8,08 auf 7,90 und nach 20 h auf 5,00 zu verzeichnen.

5.2.2.4 Ermittlung der optimalen Zellzahlen

In den eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Verhältnisse zwischen Protozoen und Futterkeim relevant sind, sondern auch die Absolutwerte. Deutlich wurde auch, dass die Protozoen die Bakterien ab einer getesteten Konzentration von \log_{10} KbE/ml 6,60 innerhalb des Versuchszeitraumes nicht vollständig eliminieren. Diese Beobachtung deckt sich mit Angaben in der Literatur (BUKHARIN u. NEMTSEVA 2000: Innerhalb 24 h von \log_{10} KbE/ml = 7,00 auf 2,90 und WATSON et al. 1981: Innerhalb 20 h Reduktion von \log_{10} KbE/ml = ca. 8,08 auf 5,00. Auf diesem Level verbleibt die Bakterienzahl bis 60 h, was dem Versuchsende entspricht). WATSON et al. (1981) und HABTE und ALEXANDER (1978) beschreiben das Einstellen der Phagozytoseaktivität, wenn bestimmte Konzentrationsschwellen der Beutekeime unterschritten werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass der fehlende Nachweis einer KbE/ml, wie bei einigen getesteten Protozoen-Bakterien-Verhältnissen und Inkubationszeiten beobachtet werden konnte, lediglich der Sensitivitätsgrenze geschuldet ist und nicht einer gänzlichen Keimelimination entspricht.

5.2.2.5 Weitere Untersuchungen des Phagozytostests

Die Frage nach besseren Resultaten mit anderen Futterkeimen lässt sich nicht unmittelbar aus dem entsprechenden Versuch beantworten. Dies ist zum einen der mangelhaften Mög-

lichkeit zur Einstellung einer gewünschten KbE/ml geschuldet. Eine Abschätzung der Konzentration anhand von visuellen Trübungsvergleichen mit entsprechenden *E. coli* K12-Suspensionen ist aufgrund der unterschiedlichen Keimgröße und der unzureichenden Quantifizierung nur bedingt möglich. Aus den anderen Vorversuchen ist deutlich geworden, dass sowohl die Absolutkonzentrationen als auch die Verhältnisse der Mikroorganismen zueinander die Degradierungsrate beeinflussen. Da die gleichen Bedingungen wie im Ansatz mit *E. coli* K12 nicht erreicht wurden, erscheint es nicht angebracht, eine vergleichende Aussage zu treffen. Zum anderen stößt der Keimnachweis im Fall von *B. spp.* an die Grenzen der Sensitivität. Aufgrund der Schwierigkeiten und der wenig ermutigenden Ergebnisse, wurden diese Untersuchungen nicht verfolgt, sondern weiterhin *E. coli* K12 verwendet.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verringerung des Gesamtansatzvolumens lassen sich durch entsprechende Hinweise in der Literatur nachvollziehen. So wird in der Arbeit von NILSSON (1989) auf die Notwendigkeit einer optimalen Versorgung von *T. pyriformis* mit Sauerstoff hingewiesen. Das abweichende Ergebnis in der Degradierungsrate im Ansatz mit 300 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen ist daher vermutlich dem ungünstigen Verhältnis von Oberfläche zu Tiefe der Ansatzkultur geschuldet.

Die Ergebnisse zur Kontrolle der Protozoenwachstumskinetik während eines Phagozytosetests weichen von den Angaben in der Literatur ab. So beschreiben WATSON et al. (1981) beginnende Zellteilungen von *T. pyriformis* in einer Bakterienkultur nach 6 h mit zweimaliger Verdopplung der Anzahl nach jeweils weiteren 4 h (*T. pyriformis* in einer \log_{10} Zellzahl/ml von 3,66 und *E. coli* variierend \log_{10} KbE/ml 7,91 bis 8,76, s. o.). Dieses Ergebnis konnte nicht nachvollzogen werden. Die Protozoenkonzentration blieb in einem eigenen Phagozytoseansatz trotz Degradierung der Futterkeime um 3,00 \log_{10} -Stufen über 24 h konstant. Jedoch unterscheiden sich die beiden Versuche sowohl in der Vorkultivierung der Protozoen als auch in der eingesetzten Bakterienkonzentration und dem Reaktionsmedium, so dass die Beobachtungen nicht direkt vergleichbar sind. Darüber hinaus wurde die Protozoenzahl mit unterschiedlichen Methoden (Zählkammer bzw. Coulter Counter) festgestellt.

Da entsprechende Kulturfiltrate von *T. pyriformis* ohne Einfluss auf die KbE/ml im Versuchszeitraum blieben, konnte geschlossen werden, dass die verminderte KbE/ml allein der Phagozytoseaktivität der Protozoen geschuldet ist. TIEDTKE und RASMUSSEN (1988, Untersuchung an *T. thermophila*) sowie RASMUSSEN et al. (1992) vermuten einen Beitrag sezernierter Stoffwechselprodukte zur extrazellulären Verdauung, allerdings eher im Rahmen der Nutzung organischer Nährstoffe. Für die Degradierung vitaler Bakterien waren die erreichten Mengen, bei Protozoenzahlen wie in den Versuchen verwendet, jedoch nicht ausreichend.

5.2.2.6 Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose

Die eingesetzten Medien übten teilweise einen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* K12

aus. In den Medienkontrollen war unabhängig von der Verdünnungsstufe kein Einfluss zu beobachten. So entsprachen die KbE/ml nach Ablauf der Inkubationszeit den KbE/ml in den Kontrollansätzen mit Wasser.

Bei Betrachtung des hemmenden Einflusses der unverdünnten Medien Ni und NiT muss berücksichtigt werden, dass diese potentiell auch einen entsprechenden Nährwert für die Protozoen besitzen. Nach Vorkultivierung in PPYG kann im Gegensatz zur Vorkultivierung in Wasser ebenso wenig die dabei erreichte Phagozytoserate nachvollzogen werden.

RASMUSSEN (1973) entdeckte, dass trotz reduzierter Bildung von Digestionsvakuolen bei höherem Gehalt an Glukose und Nukleosiden im Medium eine Zellvermehrung stattfindet. HOFFMANN et al. (1974) bestätigen diese Beobachtung und RASMUSSEN (1976) fasst zusammen, dass sich Zellwachstum und -vermehrung in einem entsprechend reichen Medium durch Aufnahme von Nährstoffen auch ohne Zuhilfenahme der Phagosomenbildung ereignen. Futterbakterien können nur über den Zytostom-Zytopharynx-Komplex und anschließender Bildung einer Digestionsvakuole aufgenommen werden. Ein Zusammenhang zwischen Nährstoffangebot und Aufnahme über alternative Wege auf der einen Seite und der Bildungshäufigkeit von Digestionsvakuolen auf der anderen Seite ist nicht beschrieben. In der eigenen Arbeit wurde weder die Häufigkeit der Vakuolenbildung verfolgt, noch die in den Vakuolen enthaltenen Bakterien im Zusammenhang mit dem verwendeten Medium gezählt. Die Ergebnisse lassen sich trotzdem so interpretieren, dass in den unverdünnten Medien aufgrund des hohen Nährstoffgehaltes die Aufnahme und Degradierung der Bakterien nicht in so hohem Maß notwendig war wie in den verdünnten Medien, die außer Futterkeimen weniger nutzbares Substrat beinhalten. Das könnte die geringere Phagozytoserate erklären.

Der Proteingehalt der Kontrollmedien wurde zunächst nicht bestimmt, da die Toxizität der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände eine routinemäßige Bestimmung der Proteingehalte aller Überstände erschwerte. Ein unspezifischer Effekt durch mutmaßlich höhere Proteingehalten in den Kulturüberständen mit Bakterieninokulum wurde aber stets bedacht und sollte im Zuge weiterer Untersuchungen im Falle einer Beeinflussung der Phagozytose durch einen neurotoxinhaltigen Kulturüberstand nur für den betreffenden in detoxifizierter Form überprüft werden. Es wurde vorausgesetzt, dass durch die entsprechende Verdünnung der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände wie in den Kontrollmedien die unspezifischen Einflüsse auf die Phagozytose eliminiert oder zumindest entsprechend reduziert würden.

5.2.2.7 Einfluss der Kulturüberstände auf *E. coli* K12

Ein Einfluss der Kulturüberstände der *C. botulinum*-Toxovare sowie des Kulturüberstandes von *C. sporogenes* (TPGY- und TPGYT-Ansätze) auf die KbE/ml von *E. coli* K12 innerhalb der Dauer des Phagozytostests konnte ausgeschlossen werden, so dass Veränderungen in der KbE/ml allein auf die Phagozytoseaktivität der Protozoen zurückzuführen waren.

5.2.3 Entwicklung des Exozytostests

HUTTON (1997) wie auch TURKEWITZ et al. (1999) weisen auf grundsätzliche Analogien zwischen dem Vesikelverkehr bei *Tetrahymena* spp. und bei höheren Eukaryoten hin und diskutieren den Grad der Analogie. Da die involvierten Proteine des SNARE-Komplexes hochkonserviert sind (BENNETT u. SCHELLER 1993), stellt sich die Frage nach ihrem Vorkommen und der Beteiligung an exozytotischen Vorgängen bei Einzellern wie *Tetrahymena* spp. (HUTTON 1997).

Als Indikator für die Exozytose wurde in der eigenen Arbeit die saure Phosphatase gewählt, da sie konstitutiv sezerniert wird, was einen permanenten Vesikeltransport im Inneren voraussetzt, sich die Sekretion relativ robust gegenüber Milieuänderungen verhält und das Enzym in einer Menge vorrätig gehalten wird, die eine Neusynthese über einen Zeitraum von mindestens 4 h unnötig macht (BANNO et al. 1987). Dadurch wird eine Abnahme des Messsignals während einer entsprechenden Inkubationszeit nur durch eine verminderte Sekretion bedingt. Darüber hinaus ist die Aktivität relativ einfach zu bestimmen. Da aber die Menge an sezerniertem Enzymprotein (wie auch in dieser Arbeit) nicht gemessen wird, ist die spezifische Aktivität der sauren Phosphatase unbekannt.

Der pH-Wert von 4,0 wurde gewählt, da er die stärkste Reaktion provozierte. Die Inkubationszeit mit den Detektionsreagentien sollte aus Praktikabilitätsgründen auf 15 min angelegt werden.

5.2.3.1 Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung

Die Ergebnisse ließen sich mit einer Standardabweichung von 4,3% hinreichend genau reproduzieren.

5.2.3.2 Ermittlung des Reaktionsmediums

Der extrazelluläre Aktivitätsanstieg im Verlauf einer Inkubationszeit von einigen Stunden lässt sich mit den Ergebnissen von ROTHSTEIN und BLUM (1973) vergleichen. RASMUSSEN et al. (1992) fanden einen Anstieg der Aktivität (extra- und intrazellulär) der sauren Phosphatase unter Mangelbedingungen. Allerdings erstreckte sich deren Versuchszeitraum über mehrere Tage und die erste Messung erfolgte nach 24 h. Insofern lässt sich das Ergebnis aus den eigenen Versuchen mit Mangelmedium (Wasser) nicht vergleichen, da die längste Versuchsdauer 6 h nicht überschritt und die Testanforderungen dies auch nicht vorsahen. Im Interesse einer möglichst kurzen Inkubationszeit fiel die Entscheidung zugunsten PPYG als Reaktionsmedium.

Gemäß den Angaben der Literatur wurden für die Exozytoseversuche Zellen der stationären Phase verwendet (LAZARUS u. SCHERBAUM 1968).

Die Arbeit von ROTHSTEIN und BLUM (1973) belegt einen negativen Einfluss von Glukose auf die Sekretion der sauren Phosphatase, der sich nach 3 h auswirkt. In dem in dieser Ar-

beit verwendeten PPYG ist Glukose in einer ähnlichen Größenordnung enthalten. Ein entsprechender Effekt ist auch hier nach dieser Zeit durch einen folgenden weniger steilen Anstieg der Aktivität zu verzeichnen. Da der Effekt aber nicht sehr stark ausgeprägt ist und die Zellen auch im PPYG angezogen wurden, wurde er vernachlässigt.

5.2.3.3 Ermittlung der optimalen Zellzahlen

Die optimalen Zellzahlen wurden mit einer \log_{10} Zellzahl/ml von 5,18 ermittelt. Innerhalb des getesteten Zeitraumes wurde ein Extinktionswert von ca. 2.000 gefunden. Dieser gestattete gemäß dem Messrahmen des verwendeten Fotometers (bis zu einer Extinktion von 3.500) eine entsprechende Veränderung des Messwertes nach oben wie auch nach unten darstellen zu können.

5.2.3.4 Ermittlung der Inkubationsdauer

Es konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Aktivität durch stete Sekretion derselben Zellen produziert wird, da ein Kulturwachstum im Versuchszeitraum ausblieb. Dieses Ergebnis steht infolge der anderen Medienzusammensetzung (PPYG:Wasser, 2:3) nicht zu den Aussagen der Versuche zur Wachstumskinetik im Widerspruch.

Daraus wurde die Eignung des Testaufbaus für die gewählte Fragestellung gefolgert: Das Enzym wird gleichmäßig und kontinuierlich sezerniert, es liegt in einem ausreichenden Maß bereits in der Zelle vor und die Zellen unterliegen keiner Vermehrung. Dadurch ist unmittelbar nur das Sekretionsgeschehen selbst zu beeinflussen.

5.2.3.5 Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes

Die Messwerte der sechs verschiedenen Ansätze in Dreifachbestimmung wiesen eine tolerierbare Standardabweichung von bis zu 6,3% auf. Damit war die Exozytoserate in den sechs verschiedenen Ansätzen, die jedoch alle derselben Kultur entstammten, hinreichend genau reproduzierbar.

Die Standardabweichungen der Dreifachbestimmungen bei den Protozoenansätzen waren im Gegensatz zu der vorher ermittelten Reproduzierbarkeit (siehe 5.2.3.1) mit bis zu 5,5% geringfügig höher. Dies war der geringeren Anzahl an Messungen geschuldet und konnte toleriert werden. Die Medienleerkontrollen wiesen eine höhere Standardabweichung von bis zu 9,9% auf. Die höheren Ungenauigkeiten im unteren Messbereich wurden in Kauf genommen.

Die absoluten Werte, die in dem Exozytostest erreicht wurden, variierten sehr stark in Abhängigkeit von der verwendeten Protozoenkultur. Dies ließ sich unter Berücksichtigung der Ergebnisse von LAZARUS und SCHERBAUM (1968) interpretieren. Die Autoren wiesen nach, dass die Enzymproduktion in der Phase des logarithmischen Wachstums deutlich geringer ist und mit dem Alter und der Dauer der stationären Phase steigt. Wenn also in den

unterschiedlichen Versuchsansätzen nicht immer dieselbe Phase erreicht wurde, kommt es zu unterschiedlich hohen Messwerten. Da jedoch auch beim Exozytostest die relativen Werte der Versuchsgruppenergebnisse in Bezug auf die Kontrollgruppenergebnisse bewertet wurden, waren die absoluten Werte zu vernachlässigen.

5.2.3.6 Optimierung des Exozytostests

Die Säurebehandlung der Protozoen führte nicht zu einem Integritätsverlust und blieb ohne Effekt auf die bereits sezernierte Enzymmenge (gemäß gemessener Aktivität) im Vergleich mit der bisher eingesetzten Methode (Sterilfiltration). Da es jedoch zu einer Abnahme der Motilität kam, ließen sich so mittels anschließender Zentrifugation die Zellen deutlich sicherer abtrennen als durch alleiniges Zentrifugieren. Eine lichtmikroskopische Kontrolle des so gewonnen Überstandes bestätigte das Freisein von Protozoen.

Die Ergebnisse zur Verringerung des Gesamtvolumens ließen sich wie die entsprechenden Ansätze bei den weiteren Untersuchungen des Phagozytostests interpretieren. Im 300 µl Ansatz in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen besteht auch für die Exozytoserate ein ungünstiges Verhältnis von Oberfläche zu Fülltiefe des Reaktionsgefäßes und daraus resultierendem Sauerstoffmangel.

5.2.3.7 Weitere Untersuchungen des Exozytostests

Während der Untersuchungen zum Einfluss der Medienkontrollen (Ni, Ni⁺ bzw. der trypsinisierten Varianten) auf das Messsignal waren keine Unterschiede zwischen der Kontrolle mit PPYG und den eingesetzten Kulturüberständen mit unterschiedlichen Proteingehalten festzustellen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Kulturüberstände in den späteren Versuchen wie in den Phagozytostests 1:2 vorverdünnt.

5.2.4 Untersuchungen zur Aktivität der sauren Phosphatase

5.2.4.1 Aktivitätsverlauf

ROTHSTEIN und BLUM (1973) wiesen in ihrer Arbeit auf den Einfluss gleichzeitig sezernierter Proteasen hin, die zum Abbau anderer Enzyme wie der sauren Phosphatase führen. Innerhalb von 5 h sind ca. 15% der zunächst intrazellulär detektierten Proteaseaktivität in der Umgebung zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Ansatzes im Brutschrank bei 28°C über den Zeitraum von 5 h stabil blieb, damit waren die Voraussetzungen für die Folgeversuche (Einfluss anderer Sekretionsprodukte, wie Proteasen etc. (BÖHNEL 1988) der *C. botulinum*-Toxovare auf den Aktivitätsverlauf) gegeben. Der niedrigere Temperaturbereich (4°C) wurde untersucht, um die Aktivität der Proteasen negativ zu beeinflussen und neben dem 0 h-Wert einen weiteren Kontrollwert zu erhalten. Eine entsprechend starke Aktivität der Proteasen war nach 5 h jedoch auch bei 28°C nicht gegeben. Die Inkubations-

zeit von 24 h wurde untersucht, um sich einen Überblick über den generellen Verlauf der Aktivität zu verschaffen

5.2.4.2 Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlauf

Die Kulturüberstände hatten keinen Einfluss auf die messbare Aktivität. Die Bedingungen waren somit für die folgenden Exozytoseversuche gegeben.

5.2.5 Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs in den entwickelten Tests

Es wurde exemplarisch gezeigt, dass die Sekretionsprodukte der Protozoen keine negativen Auswirkungen auf die BoNTs hatten. Jedoch wurde ein degradierender Einfluss der Produkte, die in den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen selbst zusätzlich vorhanden waren, auf die Neurotoxine nachgewiesen.

Mit diesem ELISA kann eine biologische Wirksamkeit nicht ermittelt werden. Eine Degradierung der für die Wirksamkeit notwendigen Strukturen der Neurotoxine kann auf der Grundlage dieser Untersuchungen somit nicht völlig ausgeschlossen werden. Dazu wäre beispielsweise nochmals der Maus-Bioassay notwendig gewesen. Da für diese Fragestellung jedoch die generelle Degradierungskapazität der protozoären Sekretionsprodukte untersucht werden sollte, war der Maus-Bioassay nicht zwingend notwendig. Daher wurde aus ethischen Gründen darauf verzichtet. Da das BoNT zumindest 1 h gemäß den ELISA-Ergebnissen relativ stabil blieb, waren die Voraussetzungen für die folgenden Versuche gegeben.

5.3 Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände

Grundsätzlich könnten die BoNTs auf zwei Wegen in das Innere der Zellen gelangen. Zum einen über eine (rezeptorabhängige ?) Endozytose in Bereichen der parasomalen Säckchen, zum anderen über das Medium während der Phagozytose (RICKETTS 1972). Da es darüber in der Literatur keine Angaben gibt, ist es schwierig bis zweifelhaft die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme über (rezeptorabhängige ?) Endozytose aus Analogien in Membranaufbau und Ablauf endozytotischer Vorgänge mit höheren Eukaryoten abschätzen zu wollen. Gleichwohl kann diese Möglichkeit nicht aus den bisher erarbeiteten Daten ausgeschlossen werden.

Mit der Phagozytose partikulärer Bestandteile (Futterkeime und Präzipitate des eigentlich nonpartikulären Mediums, RASMUSSEN und KLUDT 1970) werden jedoch alle im Medium gleichmäßig verteilten Stoffe wie auch die Neurotoxine in den Kulturüberständen mit in die Futtervakuolen aufgenommen. Der Eintritt der BoNTs in das Zellinnere über Vesikel (in diesem Fall die Digestionsvakuole), die im weiteren Verlauf einer Ansäuerung unterliegen, ist durchaus gegeben. Dadurch werden prinzipiell vergleichbare Milieuvoraussetzungen wie in den Vesikeln aus dem Bereich der motorischen Nervenzelle (SINGH 2000) geschaffen.

Durch eine Inkubationszeit von 1 h mit den Kulturüberständen vor Zugabe der Bakterien-

pension, wurde eine gewisse Reaktionszeit eingeräumt.

5.3.1 Phagozytoseversuche

Aufgrund der Toxizität der eingesetzten Kulturüberstände von *C. botulinum* waren besondere Sicherheitsvorkehrungen im Umgang mit ihnen notwendig. Deshalb wurde darauf verzichtet, die Protozoen nach Inkubation mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen (einschließlich derjenigen von *C. sporogenes*) in der Zählkammer zu zählen. Die Vitalität wurde stattdessen qualitativ durch lichtmikroskopischen Vergleich der Versuchsansätze mit den entsprechenden Kontrollen bewertet. Dabei konnten keine Abweichungen hinsichtlich Motilität, Aktivität, Anzahl unbeweglicher/ abgestorbener Zellen oder größere Schwankungen in der Zellzahl festgestellt werden, so dass ein negativer Einfluss der eingesetzten Kulturüberstände auf die Vitalitätsparameter im Rahmen der Nachweismöglichkeiten ausgeschlossen wurde.

Die Verwendung der Reduktionsrate (Differenz der Anfangskonzentration der Bakterien im Vergleich zur Endkonzentration) als Parameter zur Bewertung des Einflusses der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände war aufgrund der ermittelten Standardabweichungen nicht sinnvoll. Stattdessen wurden nur die KbE/ml am Versuchsende ermittelt, der jeweilige dekadische Logarithmus gebildet und die Versuchsgruppenergebnisse mit den Kontrollgruppenergebnissen verglichen. Aufgrund der gezeigten Varianz bei der fotometrischen Einstellung der Bakteriensuspension wurden alle Versuchsgruppenergebnisse durch Bezug auf die Kontrollgruppenergebnisse relativiert, um sie dennoch gemeinsam bewerten zu können. Die Werte wurden relativiert, indem die \log_{10} Kontrollgruppenwerte von den \log_{10} Versuchsgruppenwerten subtrahiert wurden. Da in den jeweiligen Dreifachansätzen eine genaue Zuordnung einer Kontrollgruppe zu einer bestimmten Versuchsgruppe aufgrund des Testdesigns nicht vorgenommen werden konnte, wurde jeweils jeder der drei Kontrollgruppenwerte für die unterschiedlichen Bakterienkulturüberstände (*C. botulinum* Toxovare A bis G und *C. sporogenes*) mit jedem der drei entsprechenden Versuchsgruppenwerte in Beziehung gesetzt. Folglich wurden für jeden Versuchstag neun Ergebnisse pro Kulturüberstand gebildet. Um vergleichbare Zahlen für die statistische Auswertung zu erhalten, wurden auch die \log_{10} Kontrollgruppenwerte entsprechend als Minuenden eingesetzt. Bei diesem Verfahren müssten theoretisch diese neun Differenzen alle den Wert 0 ergeben, wenn in dem Dreifachansatz dreimal derselbe Wert ermittelt worden wäre. Aufgrund der Varianz bei der Ermittlung der KbE/ml war dies nicht der Fall. Die neun Tageswerte der Versuchsgruppen wurden den neun Tageswerten der Kontrollgruppen gegenübergestellt und auf signifikante Mittelwertsdifferenzen getestet. Durch das Relativieren war auch ein Vergleich der Tagesergebnisse mit den beiden Wiederholungen möglich, da die Unterschiede, die sich aus den differierenden Anfangskonzentrationen der Bakteriensuspension ergaben, nivelliert wurden. Da die verschiedenen *C. botulinum*-Toxovare im Laufe der Inkubationszeit zur Herstellung der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände auch andere Stoffwechselprodukte in das Medium

abgeben, war der Überstand von *C. sporogenes* mitgeführt worden. Beide Spezies unterscheiden sich nur im Neurotoxinbildungsvermögen (CATO et al. 1986), so dass davon ausgegangen wurde, dass ähnliche Produkte bzw. Produktmengen auch im Kulturüberstand von *C. sporogenes* zu finden sind. Durch Mitführen dieses Kulturüberstandes ergab sich somit eine erste Kontrolle des spezifischen Effektes der BoNTs.

Da die Standardabweichung bei der Bestimmung der KbE/ml in den vorherigen Versuchen mit bis zu 0,42 \log_{10} -Stufen ermittelt worden war, konnte erst eine Differenz zwischen den \log_{10} -Werten von Kontroll- und Versuchsgruppen von größer als 0,84 \log_{10} -Stufen als tatsächlicher Unterschied erfasst werden. Bei den Signifikanzprüfungen wird dies nicht berücksichtigt. Daher ergaben sich dementsprechend mehr signifikante Unterschiede. Die geforderte Differenz wurde während aller Versuche nur bei den Kulturüberständen des Toxovars E (TPGY- und TPGYT-Ansatz) ermittelt. Bei allen anderen Bakterienkulturüberständen führte die Neurotoxinmenge von 1,50E+02 MLD/ml nicht zu einem entsprechenden Effekt. Das Ergebnis mit dem Toxovar E war stets reproduzierbar. Im trypsinisierten Überstand (TPGYT-Ansatz) von *C. botulinum* E war eine MLD von 1,00E+01/ml nachgewiesen worden. Somit ergab sich eine eingesetzte Konzentration von ca. 1,50E+00 MLD/ml. Im nicht trypsinisierten Überstand (TPGY-Ansatz) konnte im Maus-Bioassay kein BoNT gefunden werden.

DUFF et al. (1956) beschreiben eine deutliche Aktivitätssteigerung beim BoNT E durch die Zugabe von Trypsin (12 bis 47fach). So war nicht auszuschließen, dass im TPGY-Ansatz des Toxovars E das entsprechende BoNT in geringen Konzentrationen vorhanden war, jedoch aufgrund der fehlenden Aktivierung unterhalb der Nachweisgrenze des Maus-Bioassays blieb. Da aber trotzdem die Möglichkeit einer spezifischen Wirkung und einer dem Maus-Bioassay möglicherweise überlegenen Sensitivität bestand, wurden beide Ansätze weiter untersucht. Für die Untersuchung einer möglichen Spezifität der nachgewiesenen Phagozytosehemmung wurden die Kulturüberstände einer Hitzebehandlung unterzogen. Mit dem gewählten Verfahren (100°C, 15 min) ist gemäß den Angaben in der Literatur (ARNON et al. 2001) sicher mit einer Inaktivierung zu rechnen.

In den Versuchen mit den detoxifizierten Kulturüberständen ergab sich jedoch kein Unterschied zwischen dem Effekt der unbehandelten Überstände des Toxovars E zu dem Effekt der erhitzten Kulturüberstände.

Um die Ursache des Hemmeffektes ermitteln zu können, wurden die Kulturüberstände der Kontroll- und Versuchsgruppen weiter untersucht. In den Vorversuchen war ein Einfluss des Mediums auf die Phagozytoseaktivität nachgewiesen worden. Dieser war auf den Proteingehalt zurückgeführt worden, und die Überstände wurden daraufhin in einer entsprechenden Verdünnung (1:2) eingesetzt. Aufgrund dessen sollte der Proteingehalt nun genauer geprüft werden. Zusätzlich wurden die jeweiligen pH-Werte gemessen.

Im Falle des Toxovars E wurden dabei aus Sicherheitsgründen die detoxifizierten Überstände untersucht. Da der Hemmeffekt in entsprechendem Umfang auch in den Versuchen mit den detoxifizierten Kulturüberständen nachweisbar war, wurde geschlussfolgert, dass der Einflussfaktor auch nach Erhitzung in vergleichbarem Maße vorhanden sei. Ein spezifischer Effekt eines bestimmten Proteins bzw. eines Botulinumtoxins (siehe 2.1.4) konnte somit gleichermaßen ausgeschlossen werden, da diese ebenfalls durch die Thermobehandlung inaktiviert worden wären. Bei den Untersuchungen der beiden Parameter wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturüberständen gefunden.

Der Einfluss des pH-Wertes wurde nicht weiter verfolgt, da in der Literatur eine Toleranz gegenüber einer weiten Spanne von 5,0 und 8,0 beschrieben wird (NILSSON 1989).

Die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen jedoch wurden, auch unter Beachtung der Ergebnisse aus den Vorversuchen zum Einfluss des Mediums auf die Phagozytoseaktivität, für den beobachteten Effekt bei Toxovar E verantwortlich gemacht. Dafür sprach außerdem, dass in beiden Ansätzen des Toxovars E bei unterschiedlichen Ergebnissen im Maus-Bioassay, aber ähnlichen Ergebnissen in der Untersuchung des Proteingehaltes vergleichbare Hemmeffekte gefunden worden waren. Dies wurde durch weitere Verdünnung der Kulturüberstände des Toxovars E auf den Proteingehalt seiner Medienkontrollen untersucht und durch die Ergebnisse belegt. Durch die Verdünnungen (ca. 1:6 zum Erreichen gleicher Proteinkonzentrationen und anschließender 1:3 Weiterverdünnung durch Einsatz im Versuch) wurde die MLD/ml in dem TPGYT-Ansatz auf ca. $0,56E+00$ /ml reduziert. Die Phagozytose durch *T. pyriformis* fand in vergleichbarem Maßstab wie bei der Kontrollgruppe statt.

Bei Zusammenfassung aller Ergebnisse ergab sich demnach, dass eine spezifische Wirkung des BoNTs E (trypsinisiert) in einer eingesetzten Konzentration von $1,50E+00$ MLD/ml nicht nachgewiesen werden konnte.

Es stellt sich die Frage, ob die erreichten Endkonzentrationen der BoNTs ausreichend waren. In dieser Arbeit waren weder Kulturüberstände mit höheren Konzentrationen noch aufgereinigte Neurotoxine verfügbar. Wenn man jedoch bedenkt, dass diese Konzentrationen je nach Neurotoxintyp Mengen zwischen ca. 500 ng und 2,50 pg (siehe Tab. 2) entsprechen und mit dem Maus-Bioassay und anderen Methoden sicher detektierbar sind (siehe Tab. 4), erscheint ein Einsatz von größeren Mengen für die Fragestellung dieser Arbeit wenig sinnvoll.

Weiterhin ergibt sich die Frage nach der Sensitivität des Testsystems. Mit der gewählten Methode werden in der Kontrollgruppe bis zu 99,9% der Keime innerhalb der Inkubationszeit degradiert. Da innerhalb der ersten Stunde bereits 90% phagozytiert werden, wäre es denkbar, dass bei einem schnellen Turnover der Zielproteine der BoNTs von weniger als einer Stunde der Vorsprung der Kontrollgruppe wieder aufgeholt werden könnte und die geringen Unterschiede (0,9%) in der Varianz untergehen. Dem kann jedoch entgegengehalten wer-

den, dass die BoNTs während der gesamten Inkubationszeit zur Aufnahme zur Verfügung standen und auch mutmaßlich (RICKETTS 1972) zusammen mit den Futterkeimen inkorporiert wurden. Im ELISA war außerdem gezeigt worden, dass die BoNTs zwar langsam degradiert werden, aber bis zum Versuchsende noch immer nachweisbar waren.

Andere Toxine oder Enzyme, die durch die Clostridien in das Medium entlassen worden waren (BÖHNEL 1988), wurden während der Auswertung nicht weiter berücksichtigt, da in den Phagozytoseversuchen, einschließlich der Folgeversuche zur Untersuchung der Hemmeffekte, keine entsprechenden Hinweise auf einen Einfluss zu finden waren.

5.3.2 Exozytoseversuche

Die sezernierten Enzymmengen konnten trotz scheinbar gleicher Ausgangsbedingungen auch in den Ansätzen der Kontrollgruppen nicht regelmäßig in der gleichen Höhe gemessen werden. In den frühen Versuchen zur Erstellung des Exozytostests zeigte sich eine unterschiedlich starke Aktivität bei Kulturen verschiedener Wachstumsphasen (vgl. auch LAZARUS u. SCHERBAUM 1968). Es wurde zwar darauf geachtet, dass stets Zellen der frühen stationären Phase verwendet wurden, jedoch waren durch verschiedene Faktoren im Routinegang (Einsetzen geringfügig unterschiedlicher Inokula aus dem Medium zur Langzeitkultivierung in das Anzuchtmedium, stundenweise Abweichungen in der Anzuchtdauer usw.) mit *T. pyriformis*-Kulturen Abweichungen möglich. Daher musste in der Auswertung der Messwerte wie in den Phagozytostests eine Relativierung in Bezug auf die Kontrollgruppen stattfinden.

Um beim Vergleich der Extinktionswerte Fremdeinflüsse in den Messungen (Hintergrundsignale der Medien) auszuschalten, wurde zunächst der Mittelwert der jeweiligen Medienleerkontrollen gebildet und von den entsprechenden Einzelwerten der enzymhaltigen Ansätze subtrahiert. Weiterhin wurde eine Relativierung der Versuchsergebnisse mittels Division durch die Kontrollgruppenergebnisse vorgenommen, um die Ergebnisse der einzelnen Versuchstage vergleichen zu können.

Wie in den Phagozytostests war eine exakte Zuordnung eines Versuchsgruppenansatzes zu einem bestimmten Kontrollgruppenansatz aufgrund des Testdesigns nicht möglich, daher wurde ebenso innerhalb eines Dreifachansatzes jeder der jeweiligen drei Kontrollwerte mit jedem der entsprechenden drei Versuchswerte in Beziehung gebracht, so dass sich pro Kulturüberstand neun relativierte Werte ergaben. Um eine entsprechende Vergleichsbasis für die statistischen Berechnungen zu erhalten, wurden auch die Werte der Kontrollgruppen als Divisor eingesetzt. Durch die Relativierung ließen sich auch alle Tagesergebnisse vergleichen.

Da die Standardabweichung bei der Bestimmung der Exozytoseleistung mit bis zu 5,5% bestimmt wurde, konnte erst eine Differenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppenwerten, die 11% überschritt sicher als Unterschied erfasst werden. Dieser geforderte Unterschied

wurde in allen nicht trypsinisierten Kulturüberständen (TPGY) mindestens an einem Versuchstag erreicht.

Nur der trypsinisierte Kulturüberstand des Toxovars E (TPGYT-Ansatz) konnte die Differenz jedoch reproduzieren. Bei der Auswertung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Toxovar F (TPGY-Ansatz) und Toxovar G (TPGYT-Ansatz) stellte sich die Frage, ob die Abweichungen, die gefunden worden waren, zu Recht als signifikant bewertet worden waren oder ob diese Daten nicht durch eine zu große Plastizität in der Exozytose der sauren Phosphatase hervorgerufen wurden, die sich erst bei Erstellen einer entsprechend großen Datenmenge offenbarte. Die größte nicht reproduzierbare Abweichung wurde in den bisherigen Versuchen zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände bei den Toxovaren F (TPGY-Ansatz) und G (TPGYT) mit 29% gefunden. Daher wurde bei erneuter Bewertung eine Differenz von mindestens 30% gefordert. Diese Bedingung wurde ebenfalls von dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars E (TPGYT-Ansatz) erfüllt. In dem Ansatz mit den detoxifizierten Kulturüberständen (TPGYT-Ansätze des Toxovars E und der Medienkontrolle Ni⁺) wurde nur zweimal die Differenz überschritten. In der zweiten Wiederholung wurde nur ein 24%iger Unterschied erreicht. Bei Berücksichtigung der anderen beiden Werte und der 30% Varianz konnte dieser Wert toleriert werden.

Nach Verdünnung auf den Proteingehalt der Kontrollgruppe wurden zweimal gegensätzliche Werte (signifikant erhöht und signifikant erniedrigt) und einmal keine signifikante Abweichung ermittelt. Die Differenz blieb an jedem der drei Versuchstage mit maximal 26% in der ersten Wiederholung unterhalb des geforderten Unterschiedes zur Kontrollgruppe. Ein Proteineinfluss war in den entsprechenden Versuchen mit den Medienkontrollen in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen nicht gefunden worden. Jedoch wich die Proteinmenge in dem trypsinisierten Kulturüberstand des Toxovars E deutlich von den getesteten, zusätzlich zum PPYG eingebrachten Proteinmengen (vgl. ca. 46 mg/ml im unverdünnten NiT⁺ und ca. 145 mg/ml im unverdünnten Überstand des TPGYT-Ansatzes) ab. Durch die Versuche mit entsprechend korrigierter Proteinmenge und die Erfahrungen aus den vergleichbaren Phagozytoseversuchen wurde geschlussfolgert, dass die gefundene Depression der Exozytoserate, die die ermittelte Differenz von 30% überstiegen, allein auf die zum PPYG zusätzlich eingetragene Proteinmenge (ca. 73 mg/ml, entspricht 1:2 Vorverdünnung des TPGYT-Ansatzes von Toxovar E) zurückzuführen waren. Allerdings zeigte sich dieser Parameter weniger empfindlich als die Phagozytose, da Proteinmengen von zusätzlich ca. 50 mg/ml (TPGY-Ansatz des Toxovars E) keinen negativen Einfluss ausübten.

Damit konnten Einflüsse der BoNTs A bis D, F und G in wirksamen Konzentrationen von 1,50E+02 MLD/ml bzw. des BoNTs E (TPGYT-Ansatz) in einer wirksamen Konzentration von 1,50E+00MLD/ml auf die Exozytose der sauren Phosphatase nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Phagozytoseversuchen hätte aufgrund der größeren Toleranz gegenüber

dem Proteingehalt mit höheren Neurotoxinkonzentrationen gearbeitet werden können, da eine Verdünnung nicht zwingend notwendig war. Jedoch wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit eine Verdünnung wie bei den Phagozytoseversuchen gewählt. Für die Relevanz der Ergebnisse mit höheren Neurotoxinkonzentrationen in Bezug auf die Eignung dieses Systems für den Nachweis von BoNTs gilt das, was bereits bei den Besprechungen der Phagozytoseversuche konstatiert wurde.

In den Vorversuchen waren jedoch die ermittelten Standardabweichungen deutlich geringer als in den Versuchen mit den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen. Offensichtlich war die Plastizität der Exozytose größer als ursprünglich eingeschätzt. Unterschiede in den eingesetzten Kulturüberständen waren durch Verwendung jeweils frischer Aliquots ausgeschlossen worden. Die Verdünnungen wurden bei allen Kulturüberständen auf dieselbe Art und Weise hergestellt. Alternative Gründe für die großen Unterschiede zwischen den Versuchen könnten Wechselwirkungen zwischen degradierenden Strukturen in den Kulturüberständen und den sezernierten Stoffen der Protozoen darstellen, da die Inkubationszeit mit 5 h relativ lang war und das Vorhandensein von degradierenden Strukturen in den Kulturüberständen nachgewiesen worden war. Da je nach Wachstumsphase (in Bezug auf ein Sekretionsprodukt) unterschiedlich stark Exozytosevorgänge ablaufen und die Reproduktion exakt derselben Wachstumsphase nicht möglich war (s. o.), sondern nur ungefähr erreicht wurde, ist per se von verschiedenen starken Exozytosevorgängen in den unterschiedlichen Tagesansätzen auszugehen. Dies wurde sowohl in den Vorversuchen als auch in den Hauptversuchen sichtbar. Da die Werte der Extinktionsmessungen in Bezug zu den Kontrollgruppen relativiert wurden, fielen die Unterschiede der absolut sezernierten Mengen nicht ins Gewicht. Jedoch könnten diese in Hinblick auf Interaktionen mit den Stoffwechselprodukten, die sich in den Kulturüberständen finden lassen, eine entsprechende Relevanz erlangt haben.

Schließlich stellt sich die Frage, inwieweit sich von der Aktivität, wie sie in den Versuchen gemessen wurde, auf die sezernierte Enzymmenge schließen lässt. Da die spezifische Aktivität nicht bekannt ist und die saure Phosphatase in der Literatur sehr häufig über die Aktivität quantifiziert wird, wurde auch in den eigenen Untersuchungen damit gearbeitet.

5.4 Schlussbetrachtung

Eine Grundvoraussetzung für eine mögliche Eignung der untersuchten Degradierungssysteme als potentiell alternatives Nachweissystem ist die entsprechende Beteiligung von Proteinen des SNARE-Komplexes an diesen Vorgängen. Innerhalb der Literatur sind keine Untersuchungen zu dieser Thematik bekannt. Bei *Paramecium tetraurelia*, einem verwandten Ziliaten (Subklasse Peniculia, Klasse Oligohymenophorea, HAUSMANN et al. 2003), wurden Komponenten des SNARE-Komplexes (NSF) molekularbiologisch nachgewiesen (KISSMEHL et al. 2002). Bei Metazoa gelang der Beleg zur Beteiligung von SNARE-Proteinen an der Phagozytose und deren Beeinflussung durch BoNT B (HACKAM et al.

1998). Dabei wurde das BoNT (Konzentrationsangabe 1 $\mu\text{mol/l}$) direkt in die Zelle injiziert. MINERVIN et al. (1955) beschreiben eine verringerte Phagozytose von Leukozyten nach Inkubation von *C. botulinum* A- bzw. B-Kulturfiltrat mit Vollblut.

HUTTON (1997) und TURKEWITZ et al. (1999) verweisen auf Ähnlichkeiten in den Exozytosesystemen zwischen *T. pyriformis* und höheren Eukaryoten.

Analogieschlüsse und Arbeiten zur Konservierung der SNARE-Proteine (BENNETT u. SCHELLER 1993, FERRO-NOVICK u. JAHN 1994) lassen vermuten, dass diese Proteine auch entsprechende Funktionen bei *Tetrahymena* spp. erfüllen. Was unklar ist und auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen unklar blieb, ist die Frage, ob die mutmaßlich vorhandenen SNARE-Proteine gegenüber den BoNTs empfindlich sind, da nicht alle Isoformen über entsprechende Bindungs- und Schnittstellen verfügen (SCHIAVO et al. 2000). Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Untersuchungen ebenso wenig geklärt werden, ob die BoNTs in einer aktiven Form Zugang zum Zytosol bekommen bzw. ihre mutmaßlichen Substrate erreichen können. Zwar weisen SHONE und MELLING (1992) darauf hin, dass eine Aufnahme auch ohne Rezeptoren unter bestimmten Bedingungen erfolgreich ist. Durch die Phagozytose von Medium ist außerdem ein Einlass in das Zellinnere gegeben. Ob die Vorgänge in der Digestionsvakuole jedoch den Eintritt der katalytischen Einheit entsprechend den Vorgängen an den motorischen Nervenzelle (SINGH 2000) gestatten, bleibt fraglich.

In der Literatur finden sich bei einigen Autoren Hinweise zur Eignung von *T. pyriformis* für den Nachweis von BoNTs. So empfiehlt GRÄF (1985) den von ihm entwickelten Test als Grundlage zur Entwicklung eines Detektionssystems von *C. botulinum*-Exotoxinen. Allerdings beruht dieses Verfahren auf der Beurteilung der Wachstumskinetik einer *T. pyriformis*-Kultur mittels Messung der optischen Dichte. In den eigenen Untersuchungen konnte ein Effekt auf das Wachstumsverhalten nicht bemerkt werden. Die Beobachtung erstreckte sich zwar nur über einen geringen Zeitraum, außerdem wurden Vitalität und Vermehrung nur durch lichtmikroskopische Begutachtung und Vergleich mit entsprechenden Kontrollgruppen eingeschätzt, jedoch ist auch im Rahmen der Literaturrecherche ein Einfluss auf die Wachstumskinetik wesentlich unwahrscheinlicher als eine Beeinflussung der in dieser Arbeit gewählten Parameter.

De WAART et al. (1972) versuchten ebenfalls, *T. pyriformis* für die Detektion von BoNTs zu nutzen. Dabei setzten sie die Neurotoxine A, B und E ein und bewerteten die Toxizität, wie auch später erneut durch GRÄF (1985) angeregt, anhand fotometrischer Messungen der optischen Dichte von Protozoenkulturen, die mit den BoNTs inkubiert worden waren. Mittels des Einflusses auf die Wachstumskinetik fanden die Autoren Nachweisgrenzen von $1,00\text{E}+03$ (A und E) bzw. $1,00\text{E}+02$ (B) MLD/ml. Angaben zur Inkubationszeit fehlen. Vor dem Hintergrund der eigenen Untersuchungen und der Literaturangaben erscheinen diese Ergebnisse als sehr zweifelhaft.

Die Arbeit von OZUTSUMI et al. (2005) bietet Hinweise auf Wechselwirkungen von Pansenprotozoen und *C. botulinum*-Keimen. So wiesen die Autoren in unfauzierten Rindern *C. botulinum* und Verwandte als wesentliche Keimgruppe nach, wohingegen in faunierten Tieren *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp. die beiden Hauptgruppen darstellen.

Die Beteiligung von Proteinen des SNARE-Komplexes an Vorgängen wie der Phagozytose (BRUMELL et al. 1995, HACKAM et al. 1996, HACKAM et al. 1998, WARD et al. 2000) sowie ihre hochkonservierte Natur (BENNETT u. SCHELLER 1993, FERRO-NOVICK u. JAHN 1994) bilden die Grundlage für eine dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothesen. So ist es denkbar, dass *C. botulinum* mit Hilfe der so genannten Neurotoxine durch Wechselwirkungen mit an der Phagozytose beteiligten SNARE-Proteinen einer Aufnahme bzw. folgenden Degradierung entgehen. Die Ergebnisse der Arbeit von OZUTSUMI et al. (2005) könnten im Sinne eines weiteren Hinweises für diese Hypothese interpretiert werden. Natürlich können auch andere Einflüsse wie Dynamik der übrigen Flora etc. zu entsprechenden Ergebnissen führen. Die Pansenprotozoen sind an der Regulierung der bakteriellen Flora beteiligt und phagozytieren ebenso *C. botulinum*. Es kann also prinzipiell ein gewisser Selektionsdruck hinsichtlich der Umgehung der Phagozytose bestehen. Auch wenn der Pansen nicht das Primärhabitat von *C. botulinum* darstellt, könnten in den eigentlichen Habitaten (siehe 2.1.3) ähnliche Vorgänge ablaufen.

Die Protozoen bilden eine außerordentlich vielfältige taxonomische Einheit (CORLISS 2002). *T. pyriformis* wurde für diese Versuche als Modellorganismus ausgewählt. Gleichwohl stellt sich die Frage, ob *T. pyriformis* der richtige Indikator ist. BÖHNEL (1995) benennt je nach Typ den Boden bzw. den Darm als Habitat. Zwar sind auch fast alle Typen in Proben aus Süß- und Salzwässern bzw. deren direkter Umgebung nachgewiesen worden, ein direkter Kontakt zwischen *C. botulinum* und *T. pyriformis* scheint unter natürlichen Bedingungen jedoch nicht zwangsläufig gegeben.

Da durch Mutationen im Bereich von Schnitt- oder Bindungsstellen der SNARE-Proteine Resistenzen in Bezug auf BoNTs entstehen (SCHIAVO et al. 2000), ist es durchaus möglich, dass die grundlegende Beteiligung von Proteinen des SNARE-Komplexes an Vorgängen wie der Phagozytose oder Exozytose tatsächlich bei *T. pyriformis* gegeben ist, ohne dass sie mit den hier erarbeiteten Verfahren zu detektieren oder beeinflussen sind.

Der starke Medieneinfluss, der sich in allen Versuchen zeigte, empfiehlt eher die Verwendung aufgereinigter BoNTs anstelle eines „Cocktails“ verschiedener Stoffwechselprodukte und Medienbestandteile, jedoch standen diese nicht zur Verfügung. In den Vorüberlegungen wurde davon ausgegangen, dass sich die gewählten Parameter, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Tests quantifizierbar gemacht wurden, sehr spezifisch beeinflussen lassen, so dass die Verwendung der als Summensignal einwirkenden neurotoxinhaltigen Kulturüberstände als nicht problematisch eingeschätzt wurde.

BoNTs in den entsprechenden Größenordnungen blieben bei Verabreichung in einer komplexen Matrix ohne nachzuweisenden spezifischen Effekt. Eine Aufreinigung der Neurotoxine aus etwaigen Proben ist somit unumgänglich. Für aufbereitete BoNTs bestehen jedoch bereits z. T. sehr sensitive Alternativmethoden, auch in Hinblick einer biologischen Aktivität und nicht nur durch Detektion antigen wirkender Komponenten. Daher muss die Verwendung von den Tests, wie sie im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, kritisch hinterfragt werden. Die Sensitivitätsgrenze für BoNTs in komplexen Matrices liegt unter Annahme der Grundhypothesen (das Vorhandensein von Proteinen des SNARE-Komplexes mit entsprechendem Einfluss auf Phagozytose und Exozytose, die Möglichkeit, dass die BoNTs in katalytisch aktiver Form Zugang zu den potentiellen Substraten erhalten und das Vorkommen entsprechender Bindungs- und Schnittstellen in den Substraten) bei einer effektiven Endkonzentration über $1,50E+02$ MLD/ml, was einer Anfangskonzentration von ca. $1,00E+03$ MLD/ml im Testüberstand entspricht.

Aufgrund dessen wird die eingangs gestellte Frage nach der Eignung dieser Parameter und somit *T. pyriformis* als biologische Alternative als nicht ausreichend beantwortet.

6 Zusammenfassung

Norman Martin Ständer

Untersuchungen zum Einfluss von neurotoxinhaltigen Kulturüberständen der *Clostridium botulinum* Toxovare A bis G auf eukaryote Degradierungssysteme am Modellorganismus *Tetrahymena pyriformis* GL.

Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Eingereicht im August 2006

122 S., 28 Abb., 89 Tab., 338 Lit., Anhang

Schlüsselwörter: Botulinumneurotoxine, *Tetrahymena pyriformis* GL, SNARE-Komplex, eukaryote Degradierungsstrategien, Phagozytose, Exozytose

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung von *T. pyriformis* GL für den Nachweis von Botulinumneurotoxinen als biologische Alternative zum Maus-Bioassay untersucht werden.

Dazu wurden funktionelle Tests für die Quantifizierung der mutmaßlich SNARE-abhängigen Prozesse Phagozytose und Exozytose entwickelt.

Die Botulinumneurotoxine wurden durch Kultivierung der *C. botulinum*-Toxovare A bis G in einem Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Medium mit und ohne Zusatz von Trypsin hergestellt. Die Neurotoxinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Maus-Bioassays bestimmt.

Für den Phagozytostest wurde *E. coli* K12 als Beutekeim gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass die KbE/ml von *E. coli* K12 allein durch die Phagozytoseaktivität von *T. pyriformis* reduziert wurde.

Für den Exozytostest wurde die saure Phosphatase als Leitenzym gewählt.

Die neurotoxinhaltigen Kulturüberstände wurden mit Neurotoxinendkonzentrationen von $1,50E+02$ MLD/ml (Maus letale Dosis/ml) bei den trypsinisierten und nicht trypsinisierten Ansätzen der Toxovare A bis D, G und F bzw. von $1,50E+00$ MLD/ml bei dem trypsinisierten Ansatz des Toxovars E in den entwickelten Tests eingesetzt und auf ihren Einfluss untersucht.

Die eingesetzten Neurotoxinkonzentrationen erwiesen sich als nicht ausreichend.

Zudem wurde eine erhebliche Anfälligkeit der Phagozytose- und Exozytoseleistung von *T. pyriformis* gegen die Proteinkonzentrationen der eingesetzten Kulturüberstände nachgewiesen.

Aufgrund dessen ist die Eignung von *T. pyriformis* im Rahmen der entwickelten Tests für den Nachweis von Botulinumneurotoxinen aus Proben wie biologischen Substraten oder mit ähnlichen, komplexen Matrices nicht gegeben.

7 Summary

Norman Martin Ständer

Studies of the influence of neurotoxin-containing culture supernatants of the *Clostridium botulinum* toxovars A to G on eukaryotic degradation systems using the model organism *Tetrahymena pyriformis* GL

Institute of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in August 2006

122 pages, 28 figures, 89 tables, 338 references, appendix

Key words: Botulinum neurotoxins, *Tetrahymena pyriformis* GL, SNARE-complex, eukaryotic degradation strategies, phagocytosis, exocytosis

In the present study the suitability of *T. pyriformis* GL for the detection of botulinum neurotoxins as a biological alternative to the mouse bioassay was to be investigated. For this purpose functional tests for the quantification of the presumably SNARE-dependent processes phagocytosis and exocytosis were developed.

The botulinum neurotoxins were produced by cultivation of the *C. botulinum* toxovars A to G in a Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast-Extract-Broth with and without supplementation of trypsin. The concentrations of the neurotoxins were determined by the mouse bioassay.

For testing the phagocytosis *E. coli* K12 was chosen as prey germ. It could be proved that the cfu/ml of *E. coli* K12 were reduced by the phagocytotic activity of *T. pyriformis* GL alone.

The acid phosphatase was chosen as the indicator enzyme for testing the exocytosis.

The neurotoxin-containing culture supernatants were used in final concentrations of the neurotoxins of 1,50E+02 MLD/ml (mouse lethal dose/ml) in the trypsinized and non-trypsinized supernatants of the Toxovars A to D, G and F and 1,50E+00 MLD/ml in the trypsinized supernatant of Toxovar E respectively in the developed tests and were tested with regards to their influence.

The used concentrations of the neurotoxins were proved to be insufficient.

In addition a considerable sensitivity of the phagocytotic and exocytotic activity of *T. pyriformis* GL in relation to the protein concentrations in the used supernatants was shown.

As a result *T. pyriformis* GL is not suitable in line with the developed tests for the detection of botulinum neurotoxins from samples like biological substrates or with similar complex matrices.

8 Literaturverzeichnis

Aktorics K, Weller U, Chatwal GS. *Clostridium botulinum* type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. FEBS Letters. 1987;212(1):109-13.

Ala-Huikka K, Nurmi E, Pajulahi H, Raevuori M. The occurrence of *Clostridium botulinum* Type E in Finnish trout farms and the prevention of toxin formation in fresh-salted vacuum-packed trout fillets. Nord Vet Med. 1977;29:386-91.

Allen RD. Fine structure, reconstruction and possible functions of components of the cortex of *Tetrahymena pyriformis*. J Protozool. 1967;14(4):553-65.

Allen RD, Fok AK. Endosomal membrane traffic of ciliates. In: Plattner H, editor. Advances in cell and molecular biology of membranes Vol. 2A: Membrane Traffic in Protozoa, Part A. Greenwich, (Ct), USA; London, England, UK: JAI Press Inc.; 1993. p. 57-83.

Allen S, Gibson I. Genetics of *Tetrahymena*. In: Elliott AM, editor. Biology of *Tetrahymena*. Stroudsburg (Pa): Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.; 1973. p. 307-73.

Allen RD, Wolf RW. Membrane recycling at the cytoproct of *Tetrahymena*. J Cell Sci. 1979;35:217-27.

Anne C, Cornille F, Lenoir C, Roques BP. High-throughput fluorogenic assay for determination of botulinum type B neurotoxin protease activity. Anal Biochem. 2001;291(2):253-61.

Aptula AO, Patlewicz G, Roberts DW, Schultz TW. Non-enzymatic glutathione reactivity and in vitro toxicity: A non-animal approach to skin sensitization. Tox in vitro. 2006;20(2):239-47.

Arndt JW, Chai Q, Christian T, Stevens RC. Structure of botulinum neurotoxin type D light chain at 1.65 Å resolution: Repercussions for VAMP-2 substrate specificity. Biochem. 2006;45:3255-62.

Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS et al. Botulinum toxin as a biological weapon. JAMA. 2001;285(8):1059-70.

Banno Y, Nozawa Y. Purification and characterization of extracellular acid Phosphatase of *Tetrahymena pyriformis*. Biochim Biophys Acta. 1984;799:20-8.

- Banno Y, Sasaki N, Nozawa Y. Secretion heterogeneity of lysosomal enzymes in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp Cell Res*. 1987;170(2):259-68.
- Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A et al. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Em Inf Dis*. 2005;11(10):1578-83.
- Baumgart J. Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ E. 1. Mitteilung: Toxinnachweis bei Plattfischen. *Arch Leb Mitt Hyg*. 1970a;21(5):102-4.
- Baumgart J. Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ E bei handelsfertigen Forellen. *Fleischw*. 1970b;50:1545-6.
- Batz W, Wunderlich F. Structural transformation of the phagosomal membrane in *Tetrahymena* cells endocytosing latex beads. *Arch Microbiol*. 1976;109(3):215-20.
- Bengtson IA. Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilla caesar*. *Public Health Rep*. 1922;37:493-6.
- Bengtson IA. Studies on organisms concerned as causative factors in botulism. *Bull US Hyg Lab*. 1924;136:1-101.
- Bennett MK, Scheller RH. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:2559-63.
- Bhattacharyya SD, Sugiyama H. Inactivation of botulinum and tetanus toxins by chelators. *Inf Immun*. 1989;57:3053-7.
- Bhattacharyya SD, Sugiyama H, Rust P, Lacey D. Evidence that subunits of type A botulinum toxin need not to be linked by disulfide. *Toxicon*. 1988;26:817-25.
- Binz T, Blasi J, Yamasaki S, Baumeister A, Link E, Südhof T et al. Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J Biol Chem*. 1994;269(3):1617-20.
- Binz T, Kurazono H, Wille M, Frevert J, Wernars K, Niemann H. The complete sequence of botulinum neurotoxin type A and comparison with other clostridial neurotoxins. *J Biol Chem*. 1990;265(16):9153-8.

Block M, Glick B, Wilcox C, Wieland F, Rothman JE. Purification of an *N*-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85:7852-6.

Blum JJ. Lysosomal hydrolase secretion by *Tetrahymena*: A comparison of several intralysosomal enzymes with the isoenzymes released into the medium. *J Cell Physiol.* 1976;89(3):457-72.

Bock JB, Scheller RH. SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:12227-29.

Böhnel H. Botulismus. In: Blobel H, Schließer T, editors. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.* Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1995. p. 89-153.

Böhnel H. Die Toxine der Clostridien. *J Vet Med.* 1988;35:29-47.

Böhnel H, Gessler F. Botulinum toxins – cause of botulism and systemic diseases? *Vet Res Comm.* 2005;29(4):315-45.

Böhnel H, Schwagerick B, Gessler F. Visceral botulism – a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J Vet Med.* 2001;48:373-83.

Bogdanovic A, Bennett N, Kiefer S, Louwagie M, Morio T, Garin J et al. Syntaxin 7, syntaxin 8, Vti1 and VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) form an active SNARE complex for early macropinocytic compartment fusion in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J.* 2002;368:29-39.

Bonventre PF, Kempe LL. Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B IV: Activation of the toxin. *J Bact.* 1960;79:24-32.

Bonventre PF, Lincoln RE, Lamanna C. Status of bacterial toxins and their nomenclature: need for discipline and clarity of expression. *Bact Rev.* 1967;31:95-109.

Boroff DA. Study of toxins of *Clostridium botulinum* III: Relation of autolysis to toxin production. *J Bact.* 1955;70:363-7.

Boroff DA, Reilly JR. Studies on the toxin of *Clostridium botulinum*. V: Prophylactic immunization of pheasants and ducks against avian botulism. *J Bacteriol.* 1959;77:142-6.

Boroff DA, Shu-Chen G. Radioimmunoassay for type A toxin of *Clostridium botulinum*. J Appl Microbiol. 1973;25:545-9.

Bott TL, Deffner JS, McCoy E, Foster EM. *Clostridium botulinum* type E in fish from the Great Lakes. J Bact. 1966;91(3):919-24.

Boyer A, Girault C, Bauer F, Korach JM, Salomon J, Moiret E, Leroy J, Bonmarchand G. Two cases of foodborne botulism type E and review of epidemiology in France. Eur J Clin Microbiol. 2001;20:192-5.

Brandhorst D, Zwilling D, Rizzoli SO, Lippert U, Lang T, Jahn R. Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. PNAS. 2006;103(8):2701-6.

Brumell JH, Volchuk A, Sengelov H, Borregaard N, Cieutat AM, Bainton DF et al. Subcellular distribution of docking/ fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytotic compartments. J Immunol. 1995;155:5750-9.

Brusca RC, Brusca GJ. Invertebrates. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; 1990.

Bukharin OV, Nemtseva NV. Investigation of lysozyme-antilysozyme interactions in a model *Tetrahymena-Escherichia* community. Microbiol. 2001;70(5):564-9.

Burke GS. Notes on *Bacillus botulinus*. J Bacteriol. 1919; 4: 555-6.

Call JE, Cooke PH, Miller AJ. In situ characterization of *Clostridium botulinum* neurotoxin synthesis and export. J Appl Bacteriol. 1995;79(3):257-63.

Callejas S, Gutierrez JC. Isolation and characterization of a cDNA encoding a putative high mobility group (HMG)-box protein from stored mRNA in resting cysts of the ciliate *Oxytricha (Sterkiella) nova*: ciliate macronuclear gene encoding a putative HMG-box protein. Mol Biol Rep. 2003;30(4):215-22.

Campbell NA, Reece JB. Biologie. 6th ed. Heidelberg und Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2003.

Cann DC, Taylor LY, Hobbs G. The incidence of *Clostridium botulinum* in Farmed Trout Raised in Great Britain. J Appl Bacteriol. 1975;39:331-6.

Cardella MA, Duff JT, Wingfield BH, Gottfried C. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*: purification and detoxification of type D toxin. J Bacteriol. 1960;79:372-8.

Cato EP, George WL, Finegold SM. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880. In: Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2. Baltimore (MD): Williams & Wilkins; 1986. p. 1141-1200.

Chaddock JA, Purkiss JR, Friis LM, Broadbridge JD, Duggan MJ, Fooks SJ et al. Inhibition of vesicular secretion in both neuronal and nonneuronal cells by a retargeted endopeptidase derivative of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. Inf Immun. 2000;68(5):2587-93.

Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. Blood. 2000;96(5):1782-8.

Chia JK, Clark JB, Ryan CA, Pollack M. Botulism in an adult associated with food-borne intestinal infection with *C. botulinum*. N Eng J Med. 1986;315(4):239-40.

Chulkova IE, Bulatova TJ, Anisimova LI. Contamination of fish with the causative agents of botulinum type F, and its differentiation with type E. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1976;53:74-6.

Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, Griffiths G. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes and lysosomes in J774 macrophages. J. Biol. Chem. 1998; 273:9842-51.

Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. J Appl Microbiol. 1998;84:5-17.

Connolly JG, Brown ID, Lee AG, Kerkut GA. Changes in lipid fluidity and fatty acid composition with altered culture temperature in *Tetrahymena pyriformis*-NT1. Comp Biochem Physiol A. 1985;81(2):287-92.

Corliss JO. Biodiversity and biocomplexity of the protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. Acta Protozool. 2002;41:199-219.

Corliss JO. Comparative studies on holotrichous ciliates in the *Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group. I. General Consideration and History of the Strains in Pure Culture. *Trans Amer Micro Soc.* 1952;71:159-84.

Corliss JO. History, taxonomy, ecology, and evolution of species of *Tetrahymena*. In: Elliott AM, editor. *Biology of Tetrahymena*. Stroudsburg (Pa): Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.; 1973. p. 1-55.

Csaba G. The unicellular *Tetrahymena* as a model cell for receptor research. *Int Rev Cytol.* 1985;95:327-77.

Csaba G, Gaál A, Kovács P, Simon G, Köhidai L. Prolonged elevation of insulin content in the unicellular *Tetrahymena* after insulin treatment: Induction of insulin production or storage? *Cell Biochem Funct.* 1999;17:165-73.

Csaba G, Kovács P, Pállinger É. Presence and localization of epidermal growth factor (EGF)- and EGF-receptor-like immunoreactivity in *Tetrahymena*. *Cell Biol Int.* 2004;28:491-6.

Dack GM, Wood WL. The mechanism of toxin production by *Clostridium botulinum*. *J Infect Dis.* 1928;42:213-7.

Dacks JB, Doolittle WF. Novel syntaxin gene sequences from *Giardia*, *Trypanosoma* and algae: implications for the ancient evolution of the eukaryotic endomembrane system. *J Cell Sci.* 2002;115:1635-42.

Dacks JB, Doolittle WF. Reconstructing/ deconstructing the earliest eukaryotes. How comparative genomics can help. *Cell.* 2001;107:419-25.

DasGupta BR. Structure and structure function relation of botulinum neurotoxins. In: Lewis GE, Angel PS, editors. *Biomedical aspects of botulism*. London: Academic Press; 1981. p. 1-19.

DasGupta BR, Sugiyama H. A common subunit structure in *Clostridium botulinum* type A, B and E toxins. *Biochem Biophys Res Comm.* 1972;48(1):108-12.

Dayeh VR, Chow SL, Schirmer K, Lynn DH, Bols NC. Evaluating the toxicity of Triton X-100 to protozoan, fish, and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability. *Ecotox Environ Saf.* 2004;57:375-82.

DeDuve C. From cytasas to lysosomes. *Fed Proc.* 1964;23:1045-9.

DeDuve C. The lysosome concept. In: de Reuck AVS, Cameron MP, editors. *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*. London: J. A. Churchill, Ltd.; 1963. p. 1-35.

Dekleva ML, DasGupta BR. Nicking of single chain *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by an endogenous protease. *Biochem Biophys Res Comm.* 1989;162(2):767-72.

Desjardins M, Nzala NN, Corsini R, Rondeau C. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci.* 1997;110:2303-14.

Deutsches Institut für Normung e. V. DIN 10102 Mikrobiologische Untersuchungen von Fleisch und Fleischerzeugnissen; Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin. Vom 01.06.1988. Beuth Verlag GmbH: Berlin.

De Waart J, van Aken F, Pouw H. Detection of orally toxic microbial metabolites in foods with bioassay systems. *Zbl Bakt Hyg.* 1972;222:96-114.

Dolly JO, Halliwell J, Black J, Williams R, Pelchen-Matthews A, Breeze A, et al. Botulinum neurotoxin and dendrotoxin as probes for studies on transmitter release. *J Physiol Paris.* 1984;79(4):280-303.

Dreyer F, Becker C, Bigalke H, Funk J, Penner R, Rosenberg F, et al. Action of botulinum A toxin and tetanus toxin on synaptic transmission. *J Physiol (Paris).* 1984;79(4):252-8.

Duda JJ, Slack JM. Toxin production in *Clostridium botulinum* as demonstrated by electron microscopy. *J Bact.* 1969;97:900-4.

Duff JT, Klerer J, Bibler RH, Moore DE, Gottfried C, Wright G. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. II. Production and purification of type B toxin for toxoid. *J Bacteriol.* 1957;73:597-601.

Duff JT, Wright GG, Yarinski A. Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. J Bact. 1956;72:455-60.

Ebert H. Über das Vorkommen anaerober Bazillen in der Umgebung fischverarbeitender Betriebe unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium botulinum* [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 1954.

Ehrenberg CG. Beiträge zur Kenntniß der Organisation der Infusorien und ihrer geographischen Verbreitung, besonders in Sibirien. In: Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin aus dem Jahre 1830. Berlin; 1832. p. 1-89.

Eklund MW, Poyski FT. Activation of a toxic component of *Clostridium botulinum* types C and D by trypsin. Appl Microbiol. 1972;24(1):108-13.

Eklund MW, Poyski FT. Interconversion of type C and D strains of *Clostridium botulinum* by specific bacteriophages. J Appl Microbiol. 1974;27(1):251-8.

Eklund MW, Poyski FT, Meyers JA, Pelroy GA. Interspecies conversion of *Clostridium botulinum* type C to *Clostridium novyi* type A by bacteriophage. Science. 1974;186(4162):456-8.

Eklund MW, Poyski FT, Mseitif LM, Strom MS. Evidence for plasmid mediated toxin and bacteriocin production in *Clostridium botulinum* type G. Appl Env Microbiol. 1988;54(6):1405-8.

Elliott AM. Life cycle and distribution of *Tetrahymena*. In: Elliott AM, editor. Biology of *Tetrahymena*. Stroudsburg (Pa): Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.; 1973. p. 259-86.

Elliott AM. Primary lysosomes in *Tetrahymena pyriformis*. Science. 1965;149:640-1.

Elliott AM, Clemmons GL. An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*. J Protozool. 1966;13(2):311-23.

Elliott AM, Kennedy JR. Morphology of *Tetrahymena*. In: Elliott AM, editor. Biology of *Tetrahymena*. Stroudsburg (Pa): Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.; 1973. p. 57-88.

Everhardt LP Jr. Methods with *Tetrahymena*. In: Prescott DM, editor. Methods in cell physiology, vol. 5. New York-London: Academic Press; 1972. p. 219-88.

Farrow JAE, Lawson PA, Hippe H, Gauglitz U, Collins MD. Phylogenetic evidence that the Gram-negative nonsporulating bacterium *Tissierella* (*Bacteroides*) is a member of the *Clostridium* subphylum of the gram-positive bacteria and description of *Tissierella creatinini* sp. nov. Int J Sys Bacteriol. 1995;45:436-40.

Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:15781-6.

Fenchel T. Suspension feeding in ciliated protozoa: Functional response and particle size selection. Microb Ecol. 1980;6:1-11.

Ferguson KA, Hui SW, Stewart TP, Yeagle PL. Phase behaviour of the major lipids of *Tetrahymena* ciliary membranes. Biochem Biophys Acta. 1982;684(2):179-86.

Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. J Food Prot. 2004;67(1):203-6.

Ferreira JL, Maslanka S, Johnson E, Goodnough M. Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. J AOAC Int. 2003;86(2):314-31.

Ferro-Novick S, Jahn R. Vesicle fusion from yeast to man. Nature. 1994;370:191-3.

Florin-Christensen J, Florin-Christensen M, Rasmussen L, Knudsen J, Hansen HO. Phospholipase A₁ and triacylglycerol lipase: two novel enzymes from *Tetrahymena* extracellular medium. Comp Biochem Physiol. 1986;85B:149-55.

Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Tiedtke A, Rasmussen L. New aspects of extracellular hydrolytic enzymes in lower eukaryotes. Eur J Cell Biol. 1989;48:1-4.

Foissner W, Berger H, Kohmann F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiersystems – Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft. 1st ed. Bayer. Landesamt für Wasserwirtschaft, editor. München: Bartels & Wernitz; 1994.

Freeman NL. Phagocytosis of staphylococci by mouse leukocytes in the presence of botulinum toxin. *J Bacteriol.* 1961;81:156-7.

Froissard M, Kissmehl R, Dedieu JC, Gulik-Krzywicki T, Plattner H, Cohen J. *N*-ethylmaleimide-sensitive factor is required to organize functional exocytotic microdomains in *Paramecium*. *Genetics.* 2002;161:643-50.

Furgason WH. The significant cytostomal pattern of the “*Glaucoma-Colpidium* group”, and a proposed new genus and species, *Tetrahymena geleii*. *Arch Protistenk.* 1940;94:224-66.

Gaertig J. Molecular mechanisms of microtubular organelle assembly in *Tetrahymena*. *J Eukaryot Microbiol.* 2000;47(3):185-90.

Gerwing J, Dolman CE, Ko A. Mechanisms of tryptic activation of *Clostridium botulinum* type E toxin. *J Bacteriol.* 1965;89:1176-9.

Gessler F, Behrens S, Loch P, Böhnel H. Entwicklung eines in vitro Tests zum Botulinum-Toxinnachweis – erste Ergebnisse. *Altex.* 1998;15:62-3.

Gill DM. Bacterial toxins: A table of lethal amounts. *Microbiol Rev.* 1982;46(1):86-94.

Gilron G, Gransden SG, Lynn DH, Broadfoot J, Scroggins R. A behavioural toxicity test using the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. I. Method description. *Environ Toxicol Chem.* 1999;18:1813-16.

Giménez DF, Ciccarelli AS. Another type of *Clostridium botulinum*. *Zentralbl Bakteriol.* 1970;215(2):221-4.

Goldfuß GA. Über die Classification der Zoophyten. *Isis oder Encyclopädische Zeitung von Oken.* 1818;6:1008-13.

Gordon GB, Miller LR, Bensch KG. Studies on the intracellular digestive process in mammalian tissue culture cells. *J Cell Biol.* 1965;25(2):41-55.

Graf CT, Riedel D, Schmitt HD, Jahn R. Identification of functionally interacting SNAREs by using complementary substitutions in the conserved ‘0’ layer. *Mol Biol Cell.* 2005;16(5):2263-74.

Gräf W. Der Erlanger Ciliatentest. GIT Fachz Lab. 1985;29:601-14.

Gruner HE, editor. Lehrbuch der Speziellen Zoologie. 5th ed. Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 1993.

Gunnison JB, Cummings JR, Meyer KF. *Clostridium botulinum* type E. Proc Soc Exp Biol Med. 1936-1937;35:278-80.

Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. Tetanus toxin blocks the neurotransmitter transmission in vitro like botulinum A toxin. Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol. 1980;311(1):33-40.

Habte M, Alexander M. Protozoan density and the coexistence of protozoan predators and bacterial prey. Ecology. 1978;59:140-6.

Hackam DJ, Rotstein OD, Bennett MK, Klip A, Grinstein S, Manolson MF. Characterization and subcellular localization of target membrane soluble NSF attachment protein receptors (t-SNAREs) in macrophages. J Immunol. 1996;156:4377-83.

Hackam DJ, Rotstein OD, Sjolín C, Schreiber AD, Trimble WS, Grinstein S. v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:11691-6.

Haeckel E. Generelle Morphologie der Organismen Vol. II. Nachdruck der 1. Auflage von 1866. Reimer G, editor. Berlin: de Gruyter; 1988.

Hall JD, McCroskey LM, Pincomb BJ, Hatheway CL. Isolation of an organism resembling *Clostridium baratii* which produces type F botulinum toxin from an infant with botulism. J Clin Microbiol. 1985;21(4):654-5.

Hallis B, James BAF, Shone CC. Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. J Clin Microbiol. 1996;34(8):1934-8.

Halpern JL, Neale EA. Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. In: Montecucco C, editor. Clostridial Neurotoxins. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1995. p. 221-36.

Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*. 1997;90(3):523-35.

Haq I, Suhadi F. Incidence of *Clostridium botulinum* in coastal and inland areas of West Java. *Jap J Med Sci Biol*. 1981;34:231-5.

Hatheway CL. *Clostridium botulinum* and other Clostridia that produce botulinum neurotoxin. *Food, Science and Technol*. 1993;0:3-20.

Hauptmann U. Kontinuierliche Co-Kultur von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* in einem Bioreaktor. [Dissertation rer. nat.]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2000.

Hausmann K. Food acquisition, food ingestion and food digestion by protists. *Jpn J Protozool*. 2002;35(2):85-95.

Hausmann K, Hülsmann N, Radek R. *Protistology*. 3rd ed. Berlin und Stuttgart: E. Schweizerbart; 2003.

Hausmann K, Radek R. Phagotrophy in ciliates. In: Hausmann K, Bradbury PC, editors. *Ciliates: Cells as organisms*. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag; 1996. p. 197-219.

Hay JC, Scheller RH. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(4):505-12.

Hielm S, Björkroth J, Hyytiä E, Korkeala H. Prevalence of *Clostridium botulinum* in finnish trout farms: Pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl Env Microbiol* 1998a;64(11):4161-7.

Hielm S, Hyytiä E, Andersin AB, Korkeala H. A high prevalence of *Clostridium botulinum* type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples. *J Appl Microbiol*. 1998b;84:133-7.

Higashinakagawa T, Tashiro F, Mita T. DNA-dependent RNA polymerase from a protozoa, *Tetrahymena pyriformis*. Extraction and partial characterization. *J Biochem (Tokyo)*. 1975;77(4):783-93.

Hill DL. The biochemistry and physiology of *Tetrahymena*. 1st ed. New York and London: Academic Press, Inc.; 1972.

Hobbs G. *Clostridium botulinum* and its importance in fishery products. Adv Food Res. 1976;22:135-85.

Hobbs G. *Clostridium botulinum* in irradiated fish. Food Irr Inf. 1977;7:39-54.

Hoch DH, Romero Mira M, Ehrlich BE. Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82(6):1692-6.

Hoffmann EK, Rasmussen L, Zeuthen E. Cytochalasin B: aspects of phagocytosis in nutrient uptake in *Tetrahymena*. J Cell Sci. 1974;15:403-6.

Hogg J. On the distinctions of a plant and an animal and on a Fourth Kingdom of Nature. Edinburgh New Phil J. 1860;12:216-225.

Holdemann LV, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed. Blacksburg: VPI Anaerobe Laboratory; 1977.

Holdeman LV, Smith LD. A study of the nutritional requirements and toxin production of *Clostridium botulinum* type F. Can J Microbiol. 1965;11:1009-13.

Holz GG, Jr. The Nutrition of *Tetrahymena*: Essential nutrients, feeding, and digestion. In: Elliott AM, editor. Biology of *Tetrahymena*. Stroudsburg (Pa): Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.; 1973. p. 89-98.

Huber HC, Huber W, Ritter U. Einfache *in vitro* Prüfsysteme zur Toxizitätsbestimmung von Umweltchemikalien; Mikrokulturen menschlicher Lymphozyten und monoxenische Ciliatenkulturen. Zbl Hyg. 1990;189:511-26.

Hünseler P, Scheidgen-Kleyboldt G, Tiedtke A. Isolation and characterization of a mutant of *Tetrahymena thermophila* blocked in secretion of Lysosomal enzymes. J Cell Sci. 1987;88:47-55.

Hünseler P, Tiedtke A. Genetic characterization of the secretory mutant MS-1 of *Tetrahymena thermophila*: Vacuolarization and block in secretion of lysosomal hydrolases are caused by a single gene mutation. *Dev Genet.* 1992;13:167-73.

Hunter LC, Poxton IR. *Clostridium botulinum* types C and D and the closely related *Clostridium novyi*. *Rev Med Microbiol.* 2002;13:75-90.

Huss HH, Pedersen A. *Clostridium botulinum* in fish. *Nord Vet Med.* 1979;31:214-21.

Hutton JC. *Tetrahymena*: The key to the genetic analysis of the regulated pathway of polypeptide secretion? *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:10490-2.

Jahn R, Lang T, Südhof TC. Membrane fusion. *Cell.* 2003;112:519-33.

Johannsen A. Presence and distribution of *Clostridium botulinum*, type E, with special reference to the Öresund region. *Nord Vet Med.* 1962;14:441-74.

Johnson HM, Brenner K, Angelotti R, Hall HE. Serological studies of types A, B, and E botulin toxins by passive hemagglutination and bentonite flocculation. *J Bact.* 1966;91:967-74.

Jöns T. Zur Bedeutung von Zytoskelett-Membran-Verbindungen für die gerichtete HCl-Sekretion von Parietalzellen [Habilitation med.]. Berlin: Humboldt-Universität; 2001.

Kerner J. Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden tödlichen Vergiftungen durch den Genuß geräucherter Würste. Stuttgart, Tübingen: Verlag Cotta; 1820.

Kissmehl R, Froissard M, Plattner H, Momayezi M, Cohen J. NSF regulates membrane traffic along multiple pathways in *Paramecium*. *J Cell Sci.* 2002;115:3935-46.

Kitajima Y, Thompson GA. Differentiation of food vacuolar membranes during endocytosis in *Tetrahymena*. *J Cell Biol.* 1977;75:436-45.

Kiy T, Vosskühler C, Rasmussen L, Tiedtke A. Three pools of lysosomal enzymes in *Tetrahymena thermophila*. *Exp Cell Res.* 1993;205:286-92.

Köhidai L, Csaba G, Karsa J. Effects of atrial natriuretic peptide on the unicellular *Tetrahymena pyriformis* model. *Microbios*. 1995;82(330):27-40.

Köhidai L, Vakkuri O, Keresztesi M, Pallinger E, Leppäluoto J, Csaba G. Impact of melatonin on the cell division, phagocytosis and chemotaxis of *Tetrahymena pyriformis*. *Acta Protozool*. 2002;41:85-9.

Kohidai L, Török K, Illyés E, Tamási J, Sebestyén F, Láng O, Csaba G, Hudecz F. Characterization of chemotactic ability of peptides containing *N*-formyl-methionyl residues in *Tetrahymena* fMLP as a targeting ligand. *Cell Biol Int*. 2003;27:695-700.

Kojima S, Eguchi H, Ookawara T, Fujiwara N, Yasuda J, Nakagawa K et al. *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin binds to Intestine-407 cells via *N*-acetylactosamine moiety. *Biochem Biophys Res Comm*. 2005;331:571-6.

Koriazova L, Montal M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol*. 2003;10(1):13-8.

Kotsifaki H, Kapoulas V, Deliconstantinos G. Targeting of liposomes containing methotrexate towards *Tetrahymena pyriformis* cells. *Gen Pharmacol*. 1985;16(6):573-7.

Kovacs G, Nagy SU, Csaba G. The effect of bacterial endotoxin on phagocytosis of *Tetrahymena* and serotonin induced imprinting. *Acta Microbiol Hung*. 1986;33(4):301-4.

Kozaki S. Interaction of botulinum type A, B and E derivate toxins with synaptosomes of rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv*. 1979;308:67-70.

Kozaki S, Sakaguchi S, Sakaguchi G. Purification and some properties of progenitor toxins of *Clostridium botulinum* type B. *Infect Immun*. 1974;10:750-6.

Kramhøft B, Lambert H. Taurine transport systems in the ciliate protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Amino Acids*. 1997;12(1):57-74.

Krämer J. *Clostridium botulinum*. In: Krämer J. *Lebensmittel-Mikrobiologie*. 4th ed. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 2002. p. 54-60.

Krieglstein K. Über die Struktur von Tetanustoxin und Botulinum A Toxin: Lokalisation der Disulfidbrücken, der Sulfhydrylgruppen und limitierte Proteolyse. [Dissertation phar.]. Marburg: Universität Marburg; 1990.

Krüger M. Allgemeine Bakteriologie. In: Mayr A, editor. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart: Enke Verlag; 2002. p. 377-415.

Krüger M. Untersuchungen zum Einfluss von Bodenbelastungen durch sporenbildende Bakterien und ihren Toxinen auf ausgewählte mikrobiologische Parameter von Silagen und die mikrobielle Homöostase des Magen-Darm-Traktes (MDT) von Hochleistungsrindern und Möglichkeiten der Reökologisierung. Final report. Leipzig: Institut für Bakteriologie und Mykologie der Universität Leipzig; 2006 Mar. Report No.: 72-4331.00/2-018/04.

Krysinski EP, Sugiyama H. Nature of intracellular type A botulinum neurotoxin. Appl Env Microbiol. 1981;41(3):675-8.

Lamanna C. The most poisonous poison. Science. 1959;130:763-72.

Lamanna C, Glassman HN. The isolation of type B botulinum toxin. J Bacteriol. 1947;54:575-84.

Lamanna C, McElroy OE, Eklund HW. The purification and crystallization of *Clostridium botulinum* Type A toxin. Science. 1946;103:613-4.

Landmann G. Über die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung. Hyg Rundsch. 1904;10:449-52.

Larsen J, Schultz TW, Rasmussen L, Hooftman R, Pauli W. Progress in an ecotoxicological standard protocol with protozoa: results from a pilot ringtest with *Tetrahymena pyriformis*. Chemosphere. 1997; 35:1023-41.

Lazarus LH, Scherbaum OH. Activity of ribonuclease, acid phosphatase and phosphodiesterase in *Tetrahymena pyriformis* during growth. J Cell Biol. 1968;36:415-8.

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 01. September 2005 (BGBl I 2005, 2618, 3007).

Leondaritis G, Tiedtke A, Galanopoulou D. D-3 phosphoinositides of the ciliate *Tetrahymena*: Characterization and study of their regulatory role in lysosomal enzyme secretion. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1745:330-41.

Leuchs J. Beiträge zur Kenntnis des Toxins und Antitoxins des *Bacillus Botulinus*. *Z Hyg Infektionskr*. 1910;65:55-84.

Levy MR. Effects of some environmental factors on the biochemistry, physiology, and metabolism of *Tetrahymena*. In: Elliott AM, editor. *Biology of Tetrahymena*. Stroudsburg (Pa): Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.; 1973. p. 227-57.

Lin RC, Scheller RH. Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron*. 1997;19:1087-94.

Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Env Microbiol*. 2001;67(12):5694-9.

Linial M. Neurotoxins as tools in dissecting the exocytotic machinery. In Hilderson H, Fuller S, editors. *Biological Membranes and Related Problems*, vol. 34. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 2000. p. 39-72.

Löffler G, Hasilik A. Zelluläre Organellen und Strukturen: Ein Überblick über die Zellbiologie. In: Löffler G, Petrides PE, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7th ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2003. p. 169-205.

Lowenthal JP, Lamanna C. Factors affecting botulinal hemagglutination reaction, and relationship between hemagglutinating activity and toxicity of toxin preparations. *Amer J Hyg*. 1951;54:342-53.

Ludger J, Galli T. Exocytosis, SNAREs drum up! *Europ J Neurosci*. 1998;10 :415-22.

Lwoff A. Sur la nutrition des Infusoires. *Compt Rend Acad Sci*. 1923;176:928-30.

Lynn DH. Systematics of Ciliates. In: Hausmann K, Bradbury PC, editors. *Ciliates: Cells as Organisms*. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag; 1996. p. 51-72.

Margittai M, Fasshauer D, Pabst S, Jahn R, Langen R. Homo- and heterooligomeric SNARE complexes studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem.* 2001;276(16):13169-77.

Martindale DW, Gardonio EC, Pearlman RE. Use of 8-hydroxyquinoline to enrich for temperature-sensitive mutants of *Tetrahymena*. *J Bacteriol.* 1979;138(3):903-8.

Martinez-Arca S, Alberts P, Galli T. Clostridial neurotoxin-insensitive vesicular SNAREs in exocytosis and endocytosis. *Biol Cell.* 2000;92(6):449-53.

Mattox SM, Thompson GA Jr. The effect of high concentrations of sodium or calcium ions on the lipid composition and properties of *Tetrahymena* membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1980;559(1):24-31.

McCroskey LM, Hatheway CL, Fenicia L, Pasolini B, Aureli P. Characterization of an organism that produces type E botulinal toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J Clin Microbiol.* 1986;23(1):201-2.

McKee T, Prescott DJ. Characterization of extracellular ribonuclease of *Tetrahymena pyriformis*. *J Protozool.* 1991;38:465-71.

Mehler M. Untersuchungen über die Empfindlichkeit japanischer Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) gegenüber *Clostridium botulinum* Toxinen. [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen; 1981.

Mehlhorn H, Ruthmann A. Allgemeine Protozoologie. 1st ed. Jena und Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1992.

Meyer KF, Gunnison JB. *C botulinum* Type D. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1928;26:88-9.

Midura TF, Arnon S. Infant botulism; Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces. *Lancet.* 1976;2(7992):934-6.

Minervin SM, Zhak SP, Cherviakova KI. Observations on the sensitizing action of botulinum toxin. *Z Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1955;5:48-53.

Mislan TW, Smith-Somerville HE. Food vacuole morphology and membrane retrieval in the microstomal form of *Tetrahymena vorax*. *J Protozool.* 1986;33:172-9.

Miyazaki S, Iwasaki M, Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* type D toxin: purification, molecular structure, and some immunological properties. *Infect Imm.* 1977;17(2):395-401.

Montecucco C, Schiavo G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol.* 1994;13(1):1-8.

Mortojudo JW, Siagian EG, Suhadi F, Ward BQ, Ward WMS. The presence of *Clostridium botulinum* in Indonesian waters. *J Appl Bacteriol.* 1973;36:437-40.

Müller M. Lysosomes in *Tetrahymena*. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 1971;22:179-86.

Müller M. Secretion of acid hydrolases and its intracellular source in *Tetrahymena pyriformis*. *J Cell Biol.* 1972;52:478-87.

Mueller M, Röhlich P, Törö I. Studies on feeding and digestion in protozoa. VII. Ingestion of polystyrene latex particles and its early effect on acid phosphatase in *Paramecium multimicronucleatum* and *Tetrahymena pyriformis*. *J Protozool.* 1965;12(1):27-34.

Møller V, Scheibel I. Preliminary report on the isolation of apparently new type of *Clostridium botulinum*. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1960;48:80.

Netzeva TI, Schultz TW. QSARs for the aquatic toxicity of aromatic aldehydes from *Tetrahymena* data. *Chemosph.* 2005;61:1632-43.

Nichols BJ, Ungermann C, Pelham HR, Wickner WT, Haas A. Homo-typic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature.* 1997;387:199-202.

Nicolau A, Mota M, Lima N. Physiological responses of *Tetrahymena pyriformis* to copper, zinc, cycloheximide and Triton X-100. *FEMS Microbiol Ecol.* 1999;30:209-16.

Nielsen PJ, Andronis PT. Further electrophoretic characterization of strains of *Tetrahymena pyriformis*. *J Protozool.* 1975;22:185-7.

Nilsson JR. On cell organelles in *Tetrahymena*. With special reference to mitochondria and peroxisomes. *Carlsberg Res Commun.* 1981;46:279-304.

Nilsson JR. Phagotrophy in *Tetrahymena*. In: Levandowsky M, Hutner SH, editors. Biochemistry and physiology of protozoa, vol. 2. New York: Academic Press; 1979. p. 339-79.

Nilsson JR. Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis* GL. With special reference to endocytosis and o structural changes during the cell cycle and in response to alterations in the cellular environment. C R Trav Lab Carlsberg. 1976;40:215-355.

Nilsson JR. Structural aspects of digestion of *Escherichia coli* in *Tetrahymena*. J Protozool. 1987;34(1):1-6.

Nilsson JR. *Tetrahymena* in cytotoxicology: With special reference to effects of heavy metals and selected drugs. Europ J Protistol 1989;25:2-25.

Nilsson JR, van Deurs B. Coated pits and pinocytosis in *Tetrahymena*. J Cell Sci. 1983;63:209-22.

Nilsson JR, Williams NE. An electron microscope study of the oral apparatus of *Tetrahymena pyriformis*. Compt Rend Trav Lab Carlsberg. 1966;35:119-41.

Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M et al. Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. J Biol Chem. 1994;269:10498-503.

Novikoff AB. Lysosomes and related particles. In: Brachet J and Mirsky AE, editors. The Cell. Vol. II. Cells and their component parts. New York: Academic Press; 1961. p. 423-488.

Novikoff AB, Essner E, Quintana N. The Golgi apparatus and lysosomes. Fed Proc. 1964;23:1010-22.

Nozawa Y, Kasai R, Kameyama Y, Ohki K. Age-dependent modifications in membrane lipids: lipid composition, fluidity and palmitoyl-CoA desaturase in *Tetrahymena* membranes. Biochim Biophys Acta. 1980b;599(1):232-45.

Nozawa Y, Kasai R, Sekiya T. Modification of membrane lipid composition following the nutritional shift-up of starved cells. A comparison with membrane biogenesis in *Tetrahymena*. Biochim Biophys Acta. 1980a;603(2):347-65.

- Nozawa Y, Thompson Jr. GA. Studies of membrane formation in *Tetrahymena pyriformis* II. Isolation and lipid analysis of cell fractions. J Cell Biol. 1971;49:712-21.
- Ohishi I. Activation of botulinum C₂ toxin by trypsin. Inf Imm. 1987;55(6):1461-5.
- Ohishi I, Sakaguchi G. Divergency of nicking of the toxin from the proteolytic activity of *Clostridium botulinum* of different types. Jap J Med Sci Biol. 1979;32:130-2.
- Ohishi I, Sakaguchi G. Purification of *Clostridium botulinum* type F progenitor toxin. Appl Microbiol. 1974;28:923-8.
- Ohishi I, Tsuyama S. ADP-ribosylation of nonmuscle actin with component I of C2 toxin. Biochem Biophys Res Commun. 1986;136:802-6.
- Ohki K, Kasai R, Nozawa Y. Correlations between fluidity and fatty acid composition of phospholipids species in *Tetrahymena pyriformis* during temperature acclimation. Biochim Biophys Acta. 1979;558(3):273-81.
- O'Neil JB, Pert CB, Smith CC, Higgins WJ, Zipser B. Identification and characterization of the opiate receptor in the ciliated protozoan *Tetrahymena*. Brain Res. 1988;450:303-15.
- Ozutsumi A, Tajima K, Takenaka A, Itabashi H. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. Biosci Biotechnol Biochem. 2005;69(3):499-506.
- Park JB, Simpson LL. Inhalation poisoning of botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component. Inf Immun. 2003;71(3):1147-54.
- Patterson DJ. Free-living freshwater protozoa. A colour guide. 2nd ed. London: Manson Publishing Ltd; 1996.
- Pauli W, Berger S, Kühnel S, Schmitz S, Lehmann V, Kuznierz C et al. Indikationen ökotoxischer Wirkungen von Umweltchemikalien durch *Tetrahymena* im Rahmen eines Ringtests. Final report. Berlin: Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Freien Universität Berlin; 1995 Sep. Forschungsbericht 106 02 080. Berichtsnummer UBA-FB 96-015. Sponsored by Umweltbundesamt.

Paulin JJ. Morphology and cytology of ciliates. In: Hausmann K, Bradbury PC, editors. Ciliates: Cells as organisms. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag; 1996. p. 1-40.

Paumet F, Rahimian V, Rothman JE. The specificity of SNARE-dependent fusion is encoded in the SNARE motif. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(10):3376-80.

Pellizzari R, Mason S, Shone CC, Montecucco C. The interaction of synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin with botulinum neurotoxins D and F. *FEBS Lett*. 1997;409:339-42.

Pellizzari R, Rossetto O, Lozzi L, Giovedi S, Johnson E, Shone CC, Montecucco C. Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. *J Biol Chem*. 1996;271:20353-8.

Petrides PE, Kalbitzer HR. Proteine (Polyaminosäuren). In: Löffler G, Petrides PE, editors. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7th ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer – Verlag; 2003. p. 57-101.

Pfeffer SR. Transport-vesicle targeting: tethers before Snares. *Nat Cell Biol*. 1999;1:17-22.

Pickett J, Berg B, Chaplin E, Brunstetter-Shafer M. Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study. *N Engl J Med*. 1976;295:770-2.

Pitelka DR. Fine structure of the silverline and fibrillar systems of three tetrahymenid ciliates. *J Protozool*. 1961;8:75-89.

Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin YK, Bennett MK. The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol*. 1998;5(9):765-9.

Porrini M, Testolin G. Comparison of enzymatic, microbiological and biological assays for the determination of food protein quality. *Nutr Rep Int*. 1984;30:1165-72.

Potter MD, Meng J, Kimsey P. An ELISA for detection of botulinum toxin types A, B, and E in inoculated food samples. *J Food Prot*. 1993;56(10):856-61.

Prazmowski A. Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten [Inaugural-Dissertation]. Leipzig: Hugo Voigt; 1880.

Prevot AR. Rapport d'introduction du président du Sous-Comité *Clostridium* pour l'unification de la nomenclature des types toxigéniques de *C. botulinum*. Int Bull Bacteriol Nomencl. 1953;3:120-3.

Ramesha CS, Dickens BF, Thompson GA Jr. Phospholipid molecular species alterations in *Tetrahymena* ciliary membranes following low-temperature acclimation. Biochemistry. 1982;21(15):3618-22.

Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. J Biol Chem. 2004;279(19):20471-9.

Rasmussen L. Nutrient uptake in *Tetrahymena pyriformis*. Carlsberg Res Commun. 1976; 41(3):143-69.

Rasmussen L. On the role of food vacuole formation in the uptake of dissolved nutrients by *Tetrahymena*. Exp Cell Res. 1973;82:192-6.

Rasmussen L, Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Kiy T, Tiedtke A. Differential increase in activity of acid phosphatase induced by phosphate starvation in *Tetrahymena*. Exp Cell Res. 1992;201:522-5.

Rasmussen L, Kludt T. Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication in *Tetrahymena* cultures. Exp Cell Res. 1970;59(3):457-63.

Ricketts TR. The interaction of particulate material and dissolved foodstuffs in food uptake by *Tetrahymena pyriformis*. Arch Microbiol. 1972;8(4):344-9.

Ricketts TR, Rappitt AF. A radioisotopic and morphological study of the uptake of materials into food vacuoles by *Tetrahymena pyriformis* GL-9. Protoplasma. 1975a;86:321-37.

Ricketts TR, Rappitt AF. The effect of puromycin and cycloheximide on vacuole formation and exocytosis in *Tetrahymena pyriformis* GL-9. Arch Microbiol. 1975b;102:1-8.

Rizo J. SNARE function revisited. *Nat Struct Biol.* 2003;10(6):417-9.

Rossetto O, Caccin P, Rigoni M, Seveso M, Tonello F, Montecucco C. The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. In: Brin, MF, Jankovic, J, Hallet, M, editors. *Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. p. 3-10.

Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C, Poulain B, Deloye F, Lozzi L et al. SNARE motif and neurotoxins. *Nature.* 1994;372:415-6.

Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon.* 2001;39:27-41.

Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 1994; 372(6501):55-63.

Rothman JE. The machinery and principles of vesicle transport in the cell. *Nat Med.* 2002; 8(19);1059-62.

Rothman JE, Warren G. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol.* 1994;4(3):220-33.

Rothstein TL, Blum JJ. Lysosomal physiology in *Tetrahymena* I. Effect of glucose, acetate, pyruvate, and carmine on intracellular content and extracellular release of three acid hydrolases. *J Cell Biol.* 1973;57:630-41.

Rothstein TL, Blum JJ. Lysosomal physiology in *Tetrahymena*. III. Pharmacological studies on acid hydrolase release and the ingestion and egestion of dimethylbenzanthracene particles. *J Cell Biol.* 1974;62:844-59.

Roy DR, Parthasarati R, Maiti B, Subramanian V, Chattaraj PK. Electrophilicity as a possible descriptor for toxicity prediction. *Bio Med Chem.* 2005;13:3405-12.

Ruppert EE, Barnes RD. *Invertebrate Zoology*. 6th ed. Fort Worth, Philadelphia, San Diego, New York, Orlando, San Antonio, Toronto, Montreal, London, Sydney und Tokyo: Saunders College Publishing; 1994.

Sakaguchi G. *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacol Ther.* 1983;19:165-94.

Sakaguchi G, Sakaguchi S. A simple method for purification of type E botulin toxin from the precursor extract of the bacterial cells. Jap J Med Sci Biol. 1961;14:243-8.

Sakaguchi G, Sakaguchi S. Studies on toxin production of *Clostridium botulinum* type E III: Characterization of toxin precursor. J Bact. 1959;78:1-9.

Sakaguchi G, Sakaguchi S, Imai N. Comparative cell filtration of toxin precursor and trypsin-activated toxin of *Clostridium botulinum* type E. J Bact. 1964;87:401-7.

Sakaguchi G, Tohyama Y. Studies on the toxin production of *Clostridium botulinum* type E I: A strain of genus *Clostridium* having the action to promote type E botulin toxin production in a mixed culture. Jap J Med Sci Biol. 1955;8:247-53.

Sauvant MP, Pepin D, Piccinni E. *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review. Chemosphere 1999;38:1631-69.

Savin VR. Detection of botulinum toxin artificially introduced into food products with the aid of determination of phagocytic index. Z Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1955;8:44-50.

Schiavo GG, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Poverino de Laureto P et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature. 1992;359:832-5.

Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Phys Rev. 2000;80(2):717-66.

Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C. Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. J Biol Chem. 1995;270(18):10566-70.

Schlimme W, Marchiani M, Hanselmann K, Jenni B. BACTOX, a rapid bioassay that uses protozoa to assess the toxicity of bacteria. Appl Env Microbiol. 1999;65(6):2754-7.

Schmidt JJ, Stafford RG, Millard CB. High-throughput assays for botulinum neurotoxin proteolytic activity: serotypes A, B, D, and F. Anal Biochem. 2001;296(1):130-7.

- Schroedl W, Jaekel L, Krueger M. C-reactive protein and antibacterial activity in blood plasma of colostrum-fed calves and the effect of lactulose. *J Dairy Sci.* 2003;86:3313-20.
- Schultz TW. Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint-a surrogate for fish lethality. *Toxicol Methods.* 1997;7:289-309.
- Schwagerick B. Klinische Fälle von Viszeralem Botulismus bei Milchrindern in Mecklenburg-Vorpommern. *TU.* 2004;1:25-9.
- Scott SM, Hufnagel LA. The effect of concanavalin A on egestion of food vacuoles in *Tetrahymena*. *Exp Cell Res.* 1983;144:429-41.
- Seddon HR. Bulbar paralysis in cattle due to the action of a toxigenic bacillus with a discussion of the relationship of the condition to forage poisoning (botulism). *J Comp Pathol Ther.* 1922;35:147-90.
- Seward JR, Hamblen EL, Schultz TW. Regression comparisons of *Tetrahymena pyriformis* and *Poecilia reticulata* toxicity. *Chemosphere.* 2002;47:93-101.
- Shone C, Appleton N, Wilton-Smith P, Hambleton P, Modi N, Gatley S, Melling J. In Vitro assays for botulinum toxin and antitoxins. *Dev Biol Standard.* 1986;64:141-5.
- Shone CC, Melling J. Inhibition of calcium-dependent release of noradrenaline from PC12 cells by botulinum type-A neurotoxin. Long-term effects of the neurotoxin on intact cells. *Eur J Biochem.* 1992;207:1009-16.
- Shone C, Wilton-Smith P, Appleton N, Hambleton P, Modi N, Gatley S, Melling J. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay *Appl Env Microbiol.* 1985;50,63-7.
- Shvedov LM. Neutralization of toxin introduced with antiserum by enteral route and formed in the gastrointestinal tract during experimental *Clostridium botulinum* A toxin intoxication. *Z Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1959;30(1):72-7.
- Siegel LS, Metzger JF. Toxin Production by *Clostridium botulinum* Type A Under Various Fermentation Conditions. *Appl Env Microbiol.* 1979;38(4):606-11.

Silberstein GB. Acid hydrolases and their release in food vacuole-less mutants of *Tetrahymena thermophila*. J Protozool. 1979;26:519-24.

Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:167-93.

Singh BR. Intimate details of the most poisonous poison. Nat Struct Biol. 2000;7(8):617-9.

Sinks GD, Schultz TW. Correlation of *Tetrahymena* and *Pimephales* toxicity: evaluation of 100 additional compounds. Environ Toxicol Chem. 2001;20:917-21.

Skovgaard N. Bacterial association of and metabolic activity in fish in North Western Europe. Arch Leb Mitt Hyg. 1979;30(3):106-9.

Slabbert JL, Morgan WSG. A bioassay technique using *Tetrahymena pyriformis* for the rapid assessment of toxicants in water. Water Res. 1982;16:517-23.

Smith LDs, Hobbs G. Genus III *Clostridium Prazmowski* 1880. In: Buchanan RE und Gibbons NE, editors. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. Baltimore (MD): Williams & Wilkens; 1974. p. 551-72.

Smith GR, Moryson CJ. *Clostridium botulinum* in the lakes and waterways of London. J Hyg. 1975;75:371-9.

Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. Cell. 1993;75(3):409-18.

Sonnabend WF, Sonnabend UP, Krech T. Isolation of *Clostridium botulinum* type G from Swiss soil specimens by using sequential steps in an identification scheme. Appl Env Microbiol. 1987;53:1880-4.

Südhof TC, De Camilli P, Niemann H, Jahn R. Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. Cell. 1993;75(1):1-4.

Suen JC, Hatheway CL, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Clostridium argentinense* sp. nov.: a genetically homogenous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type G and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* and *Clostridium hastiforme*. Int J Syst Bacteriol. 1988;38:375-81.

Sugiyama H. *Clostridium botulinum* neurotoxin. Microbiol Rev. 1980;44(3):419-48.

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

Suzuki JB, Booth R, Benedik A, Grecz N. Pathogenesis of *Clostridium botulinum* type A: Study of in vivo toxin release by implantation of diffusion chambers containing spores, vegetative cells, and free toxin. Inf Immun. 1971;3:659-63.

Suzuki KM, Hayashi N, Hosoya N, Takahashi T, Kosaka T, Hosoya H. Secretion of tetraim, a *Tetrahymena* cysteine protease, as a mature enzyme and its identification as a member of the cathepsin L subfamily. Eur J Biochem. 1998;254:6-13.

Swerczek TW. Experimentally induced toxicoinfectious botulism in horses and foals. Am J Vet Res. 1980b;41(3):348-50.

Swerczek TW. Toxicoinfectious botulism in foals and adult horses. J Am Vet Med Ass. 1980a;176(3):217-20.

Syuto B, Kubo S. Isolation and molecular size of *Clostridium botulinum* type C toxin. Appl Env Microbiol. 1977;33:400-5.

Tashiro F, Hirai K, Ueno Y. Inhibitory effects of carcinogenic mycotoxins on deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase and ribonuclease H. Appl Env Microbiol. 1979;38(2):191-6.

Thomas RJ. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. Austr Vet J. 1991;68:111-3.

Thompson DE, Brehm JK, Oultram JD, Swinfield TJ, Shone CC, Atkinson T, et al. The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene. Eur J Biochem. 1990;189(1):73-81.

Tiedtke A, Hünseler P, Florin-Christensen J, Florin-Christensen M. Exocytosis, endocytosis and membrane recycling in *Tetrahymena thermophila*. J Cell Sci. 1988b;89:515-20.

Tiedtke A, Kiy T, Vosskübler C, Rasmussen L. Pathways of Lysosomal Enzyme Secretion in *Tetrahymena*. . In: Plattner H, editor. Advances in cell and molecular biology of membranes Vol. 2A: Membrane Traffic in Protozoa, Part A. Greenwich, (Ct), USA; London, England, UK: JAI Press Inc.; 1993. p. 99-122.

Tiedtke A, Rasmussen L. Lysosomal enzymes in extracellular digestion in the unicellular eukaryote *Tetrahymena*. J Cell Phys. 1988;136:554-6.

Tiedtke A, Rasmussen L, Florin-Christensen J, Florin-Christensen M. Release of lysosomal enzymes in *Tetrahymena*: a Ca^{++} -dependent secretory process. J Cell Sci. 1988a;89:167-71.

Tokuyasu K, Scherbaum OH. Ultrastructure of mucocysts and pellicle of *Tetrahymena pyriformis*. J Cell Biol. 1965;27(1):67-81.

Turkewitz AP. Out with a bang! *Tetrahymena* as a model system to study secretory granule biogenesis. Traffic. 2004;5:63-8.

Turkewitz AP, Chilcoat ND, Haddad A, Verbsky JW. Regulated protein secretion in *Tetrahymena thermophila*. Meth Cell Biol. 1999;62:347-62.

Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and the therapeutic utility. Trends Biochem Sci. 2002;27(11):552-8.

Van Ermengem E. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. Z Hyg Infektionsk. 1897;26:1-56.

Vaidyanathan VV, Yoshino K, Jahnz M, Dörries C, Bade S, Nauenburg S et al. Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: Domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. J Neurochem. 1999;72(1):327-37.

Verderio C, Coco S, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M. Internalization and proteolytic action of botulinum toxins in CNS neurons and astrocytes. J Neurochem. 1999;73:372-9.

Ward BQ, Garrett ES, Reese GB. Further Indications of *Clostridium botulinum* in Latin american waters. *Appl Microbiol.* 1967;15(6):1509.

Ward DM, Pevsner J, Scullion MA, Vaughn M, Kaplan J. Syntaxin 7 and VAMP-7 are soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required for late endosome-lysosome and homotypic lysosome fusion in alveolar macrophages. *Mol Biol Cell.* 2000;11(7):2327-33.

Washbourne P, Pellizzari R, Baldini G, Wilson MC, Montecucco C. Botulinum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS Letters.* 1997;418:1-5.

Watson PJ, Ohtaguchi K, Fredrickson AG. Kinetics of growth of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* on *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* 1981;122:323-33.

Weidenbach AL, Thompson GA Jr. Studies on membrane formation in *Tetrahymena pyriformis*. VIII On the origin of membranes surrounding food vacuoles. *J Protozool.* 1974;21:745-51.

Weidner E, Sibley LD. Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion. *J Protozool.* 1985;32(2):311-7.

Weiss HE, Rademacher G, Doll K, Dirksen G. Schnelldiagnose des Botulismus beim Rind mittels Mikro-Wärmekomplementbindungsreaktion. *Dtsch Tierärztl Wschr.* 1990;97(10):398-400.

Weiss HE, Weiss H. Nachweis von *Clostridium-botulinum*-Toxin mittels Mikro-Wärmekomplementbindungsreaktion. *TU.* 1988;43:117-26.

Wheatley DN, Rasmussen L, Tiedtke A. *Tetrahymena*: A model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential. *BioEssays.* 1994;16(5):367-72.

Wictome M, Newton K, Jameson K, Hallis B, Dunnigan P, Mackay E, et al. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl Env Microbiol.* 1999;65(9):3787-92.

Literaturverzeichnis

Wiesner E, Ribbeck R, editors. Lexikon der Veterinärmedizin. 4th ed. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH; 2000.

Wu HC, Huang YL, Lai SC, Huang YY, Shaio MF. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR. Appl Microbiol. 2001;32(5):321-5.

Yamasaki S, Binz T, Hayashi T, Szabo E, Yamasaki N, Eklund M. Botulinum neurotoxin type G proteolyzes the Ala⁸¹-Ala⁸² bond of rat synaptobrevin 2. Biochem Biophys Res Comm. 1994;200(2):829-35.

9 Anhang

Aktivitätstest der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände nach mehrmaligen Auftau- und Einfrierprozessen

Der potentielle Einfluss der Auftau- und Einfriervorgänge auf die Aktivität der BoNTs, wurde anhand von unterschiedlich behandelten *C. botulinum*-Toxovar B-Kulturüberständen getestet. Folgende Ansätze wurden geprüft:

1. Kulturüberstand, nach Gewinnung eingefroren und gelagert bei -80°C.
2. Kulturüberstand, nach Gewinnung eingefroren und gelagert bei -80°C, einmal bei Raumtemperatur aufgetaut, 75 min im Kühlschrank bei 4°C gelagert und wieder bei -80°C eingefroren.
3. Kulturüberstand, nach Gewinnung eingefroren und gelagert bei -80°C, fünfmal bei Raumtemperatur aufgetaut, jeweils 30 min lang im Kühlschrank bei 4°C gelagert und wieder bei -80°C eingefroren.

Die Untersuchung wurde sowohl für die trypsinisierte als auch für die nicht trypsinisierte Variante durchgeführt. Nach dem letzten Einfrieren wurde die biologische Aktivität der Proben im Maus-Bioassay getestet.

Anaerocult® A

Merck KgaA, Darmstadt.

Begasen der Hungate-Röhrchen

Die Hungate-Röhrchen wurden fünfmal alternierend evakuiert und mit Spezialmischgas für Anaerobier (10 Vol% CO₂, 90 Vol% N₂) begast.

Bestimmung der Generationszeit

Die Generationszeit von *T. pyriformis* lässt sich mit der bei KRÜGER (2002) für Bakterien angegebenen Formel berechnen:

$$g = \frac{\log_{10} 2 \times (t - t_0)}{\log_{10} N - \log_{10} N_0}$$

Dabei gilt: g = Generationszeit, t = Zeit in h am Berechnungsende, t₀ = Zeit in h am Berechnungsanfang, N = Endkonzentration, N₀ = Anfangskonzentration.

Bestimmung des Proteingehaltes in den Kulturüberständen

Für die spektralphotometrische Bestimmung des Proteingehaltes wurden 1,5 ml Einmal-Küvetten aus PMMA der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, verwendet. Als Blankwert und Verdünnungsmittel wurde Wasser (Volvic®) genutzt. Zur Messung wurde der MBA 2.000 (Perkin

Anhang

Elmer Applied Biosystems, Norwalk CT, USA) genutzt. Das Gerät misst den Proteingehalt bei 280 nm und subtrahiert davon den Blankwert bei 320 nm. Der Proteingehalt wird als so korrigierte Konzentration in mg/ml angegeben.

Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Medium (TPGY)

Zutat	Menge
Caseinpepton, pankreatisch verdaut	50 g
Mischpepton (Universalpepton)	5 g
Glukose (Monohydrat)	4 g
Natriumthioglykolat	1 g
Hefeextraktpulver	20 g
Aqua dest.	Ad 1 l

Die Bestandteile werden gelöst und der pH-Wert so eingestellt, dass er nach dem Autoklavieren (121°C 15 min) bei 7,0 liegt.

Caseinpepton-Glukose-Hefeextrakt-Trypsin-Medium (TPGYT)

Zutat	Menge
Caseinpepton, pankreatisch verdaut	50 g
Mischpepton (Universalpepton)	5 g
Glukose (Monohydrat)	4 g
Natriumthioglykolat	1 g
Hefeextraktpulver	20 g
Aqua dest.	Ad 1 l

Die Bestandteile werden gelöst und der pH-Wert so eingestellt, dass er nach dem Autoklavieren (121°C 15 min) bei 7,0 liegt.

Vor dem Gebrauch wird eine Trypsinlösung hergestellt und nach Sterilfiltration im Verhältnis 1:15 zum Grundmedium zugefügt

Zutat	Menge
Porcines Trypsin (Aktivität 1:250), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	0,15 g
Aqua dest.	10 ml

Columbia-Blutagar

Columbia-Blutagar mit 5% Schafblut von Biomérieux, Nürtingen.

Cryobank™

MAST DIAGNOSTICA, Reinfeld.

Detoxifizierung der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände

Die Kulturüberstände wurden 15 min lang bei 100°C erhitzt. Die Proben wurden anschließend bei 11.400 U/min 10 lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verwendet.

Einfachagar

Zutat	Menge
Nähragar I von SIFIN, Berlin	20 g
Aqua dest.	500 ml

Die Bestandteile werden im Dampftopf bei 100°C 45 min lang gelöst und anschließend 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung wird der Agar in Platten gegossen.

Ermittlung der KbE/ml für *E. coli* K12 (Plattenverdünnungsverfahren)

20 µl wurden nach dem Vortexen der Probe entnommen und in einer Mikrotiterplatte (96 Wells) 1:10 mit 180 µl Wasser verdünnt. Diese Suspension wurde in 10er Schritten bis zur Stufe 6 weiter mit Wasser verdünnt. Aus den 6 Stufen wurden jeweils 10 µl auf eine Platte mit Einfachagar aufgetropft und so ausgestrichen, dass alle 6 Verdünnungen auf einer Platte Platz fanden. Die beimpfte Agarplatte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der letzten beiden, noch bewachsenen Verdünnungsstufen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde das arithmetische Mittel bestimmt. Da 10 µl aufgetragen worden waren, wurde das Ergebnis mit 100 multipliziert, um die Anzahl der KbE/ml zu ermitteln.

Ermittlung der KbE/ml für grampositive Bakterien und Hefen (Plattenverdünnungsverfahren)

Das Verfahren weicht insofern von der Bestimmung der KbE/ml bei *E. coli* K12 ab als dass im Fall der grampositiven Bakterien statt des Einfachagars Columbia-Blutagar bei denselben Bebrütungsbedingungen und im Fall der Hefen Saboraudagar (37°C, zweitägige Bebrütung) verwendet wurde.

Exozytostest, allgemeines Protokoll

Aus einer PPYG-Kultur (Zellen zu Beginn der stationären Wachstumsphase) wurde eine Probe entnommen und durch Verdünnung mit PPYG auf eine Zellzahl von 4,50E+05/ml (Anfangskonzentration) eingestellt. Die Probe wurde bei 4.000 U/min 5 min lang zentrifugiert,

Anhang

der Überstand dekantiert und das Pellet in frischem PPYG-Medium resuspendiert.

Als Reaktionsgefäße wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße verwendet. Je 35 µl Protozoensuspension, Probe (als Kontrolle Wasser bzw. die entsprechende Kontrollmedien der Probe) und PPYG wurden für einen Ansatz verwendet. Parallel wurde eine entsprechende Kontrolle mitgeführt, bei der die Protozoenlösung durch Wasser bzw. das entsprechende LeermEDIUM der Probe ersetzt wurde.

Der Ansatz wurde 5 Stunden lang im 28°C-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der sauren Phosphatase bestimmt.

Hungate-Röhrchen

Kulturröhrchen für anaerobes Arbeiten, Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden-Lenglern.

Magermilchkultur

Zutat	Menge
Magermilchpulver, SIFIN, Berlin)	20 g
Aqua dest.	180 ml

Das Medium wird in Röhrchen abgefüllt und autoklaviert (Autoklaven auf 116°C hochheizen und ausschalten).

Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, Säureimmobilisation (SI)

Zu 105 µl Probe wurde Saure Phosphatase Puffer im Verhältnis 1:4,29 hinzugefügt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4.000 U/min wurden aus dem Überstand 200 µl entnommen und in einer Mikrotiterplatte (96 Wells) mit 5 µl einer 300 mM pNPP-Stammlösung gemischt. Nach 15 min Inkubation auf dem Schüttler (400 U/min) bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 1 N NaOH-Lösung gestoppt. Die Extinktion wurde bei 405 nm und 620 nm als Referenzfilter gemessen. Von den Ergebnissen der Proben mit Enzym wurden die Ergebnisse der Mediumleerkontrollen (Proben ohne Enzym) subtrahiert.

Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, Sterilfiltration (SF)

50 µl zentrifugierter (5 min bei 4.000 U/min) sterilfiltrierter Protozoenkulturüberstand bzw. 50 µl einer enzymhaltigen, protozoenfreien Probe wurden zu Saure Phosphatase Puffer im Verhältnis 1:4 hinzugefügt. Dazu wurden 5 µL einer 300 mM pNPP-Stammlösung gegeben. Nach 15 min Inkubation auf dem Schüttler (400 U/min) bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 1 N NaOH-Lösung gestoppt. Die Extinktion wurde bei 405 nm und 620 nm als Referenzfilter gemessen. Von den Ergebnissen der Proben mit Enzym wurden die Ergebnisse der Mediumleerkontrollen (Proben ohne Enzym) subtrahiert.

Mikrotiterplatte (96 Wells), SPSA

F- Form, PS, 400 µL, maschinensteril, Meus SRL, Piove di Sacco, Italien.

Neubauer-Zählkammer, improved

Die Neubauer-Zählkammer, improved, besteht aus zwei Kammern, die durch jeweils vier periphere Großquadrate (mit je 16 Feldern) und ein zentrales Kleinquadrat (mit je 25 Feldern) untergliedert werden.

Das Deckgläschen wurde so aufgebracht, dass an den Auflageflächen die Newton' Ringe sichtbar waren. Beide Kammern wurden mit je 10 µl Protozoensuspension (1:2 Verdünnung mit 96% Ethanol zur Immobilisierung) gefüllt. Alle acht Großquadrate wurden ausgezählt. Protozoen, die den Rand eines Großquadrates berührten, wurden nur berücksichtigt, sofern der linke oder untere Rand berührt wurde. Die Gesamtprotozoenzahl wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{Z \times KF \times VF}{8}$$

Dabei gilt: Z = Anzahl aller gezählten Zellen, KF = Kammerfaktor, VF = Verdünnungsfaktor.

Der Kammerfaktor errechnet sich aus dem Volumen eines Großquadrates. Dieses hat die Abmessungen 1 mm x 1 mm x 0,1 mm und somit ein Volumen von 10⁻⁴ ml. Dadurch ergibt sich ein Kammerfaktor von 10⁴. Da stets eine Verdünnung von 1:2 verwendet wurde, ergibt sich in der Formel der Wert 2 für die Verdünnung.

Paraffin

Dickflüssig, Merck KgaA, Darmstadt.

Phagozytostest, allgemeines Protokoll

Aus einer PPYG-Kultur (Zellen in letztem Drittel der logarithmischen Wachstumsphase) wurde eine Probe entnommen und bei 4.000 U/min 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in Wasser resuspendiert. Die Protozoenlösung wurde in einer 25 cm²-Zellkulturflasche über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Am folgenden Tag wurde die Zellzahl mittels Verdünnung mit Wasser auf eine Anfangskonzentration von 1,20E+05/ml eingestellt.

E. coli K12 wurde aus der Lagerung bei -80°C einen Tag bei 37°C auf Columbia-Blutagar aerob bebrütet. Am folgenden Tag wurden die Keime mit Wasser abgewaschen und die Zellzahl entsprechend der Formel nach SCHROEDL et al. (2003) auf eine Anfangskonzentration von 3,00E+07/ml eingestellt. Die optische Dichte wurde bei 620 nm gegen Wasser als Blankwert gemessen.

Als Reaktionsgefäße wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße verwendet. Je 25 µl Protozoensuspension, Probe (als Kontrolle Wasser bzw. die entsprechende Kontrollmedien der

Anhang

Probe) und *E. coli* K12-Suspension wurden für einen Ansatz verwendet. Parallel wurde eine entsprechende Kontrolle mitgeführt, bei der die Protozoenlösung durch Wasser ersetzt wurde. Die Protozoenlösung wurde mit der Probe eine Stunde bei 28°C vorinkubiert (Reaktionsgefäße aufrecht stehend). Danach wurde die *E. coli* K12-Lösung hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 4 Stunden lang im 28°C-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die KbE/ml von *E. coli* K12 bestimmt.

pH-Papier

Der pH-Wert wurde mit dem Indikatorpapier Neutralit®, Merck KgaA (Darmstadt) bestimmt. Der Messbereich bewegt sich bei diesem Test zwischen 5,5 und 9,0. Änderungen sind in 0,5er Schritten sichtbar.

pNPP-Stammlösung

300 mM Di-Natrium-4-Nitrophenylphosphat, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz/ Sigma-Aldrich, Steinheim.

PPY

Zutat	Menge
Proteosepepton	20 g
Hefeextrakt	2,5 g
Aqua dest.	Ad 1 l

Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt, das Medium 10 min im Dampftopf bei 100°C gelöst und 20 min bei 121°C autoklaviert.

PPYG

Zutat	Menge
Proteosepepton	20 g
Hefeextrakt	1 g
Glukose	10 g
Wasser	Ad 1 l

Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt, das Medium 10 min im Dampftopf bei 100°C gelöst und 20 min bei 121°C autoklaviert.

RCM-Bouillon

Zutat	Menge
Clostridien-Nährboden nach EP (RCM), Medium P (SIFIN, Berlin)	38 g
Aqua dest.	Ad 1 l

Die Bouillon wird bis zum vollständigen Lösen der Bestandteile in den Dampftopf bei 100°C verbracht. Anschließend wird 15 min lang bei 121°C autoklaviert.

Reaktionsgefäße, 1,5 ml

1,5 ml, mit Deckel, autoklavierbar, zentrifugierbar bis 13.000 g, Simport Plastics Ltd, Beloeil, Kanada.

Reis

Handelsüblicher Duftbruchreis der Fa. Royal Thai, Lim & Asia Express, Düsseldorf.

Sabouraud – Agar

Zutat	Menge
Sabouraud-4% Glucose-Agar, SIFIN, Berlin	65 g
Aqua dest.	Ad 1 l
Benzylpenicillin in Aqua dest., 20 IE/ml	1 ml
Streptomycinsulfat, in Aqua dest., 40 mg/ml	1 ml

Der Ansatz wird 45 min lang bei 100°C im Dampftopf gelöst, anschließend im Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Nach Erreichen der Temperatur erreicht hat, werden die Antibiotikallösungen zugefügt. Anschließend wird der Agar in Platten gegossen.

Saure Phosphatase Puffer (SPP)

100 mM Natrium-Azetat-Trihydrat von Merck KGaA, Darmstadt. Der pH-Wert wurde auf 4,0 eingestellt.

Stämme

Mikroorganismus	Stammbezeichnung	Herkunft
<i>C. botulinum</i> A	REB 1750	Deutschland
<i>C. botulinum</i> B	REB 89	Deutschland
<i>C. botulinum</i> C	REB 1455	Deutschland
<i>C. botulinum</i> D*	1873 D	Frankreich
<i>C. botulinum</i> E	NCTC 8266	Großbritannien

Anhang

<i>C. botulinum</i> F	REB 1072	Deutschland
<i>C. botulinum</i> G	ATCC 27322	USA
<i>C. sporogenes</i>	ATCC 10000	USA
<i>T. pyriformis</i> GL	ATCC 30327	USA
<i>E. coli</i> K12	DSZM 423	Deutschland
<i>S. aureus</i>	-	klinisches Isolat**
<i>Bacillus</i> spp.	-	klinisches Isolat**
<i>C. albicans</i>	-	klinisches Isolat**

* produziert D- und C2- Toxin

** Aus dem Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Sterilfilter

Spritzenvorsatzfilter, PES-Membran, Luer/ Lock, 0,2 µm, gammasteril, nicht zytotoxisch, pyrogenfrei, TPP AG, Trasadingen, Schweiz.

Wasser

Es wurde handelsübliches natürliches Mineralwasser ohne Kohlensäure (Volvic®) der Quelle Clairvic, Frankreich, verwendet. Nach Aliquotierung wurde das Mineralwasser bei 121°C 20 min lang autoklaviert

Mineralien gemäß Angaben des Herstellers:

Mineral	Menge (mg/l)
Calcium	11,5
Magnesium	8,0
Natrium	11,6
Kalium	6,2
Chlorid	13,5
Silizium (SiO ₂)	31,7
Sulfat	8,1
Hydrogencarbonat	71,0

Zellkulturflasche, 25 cm²

Zellkulturflasche mit Filter-Schraubkappe, 60 ml, gammasteril, pyrogenfrei, TPP AG, Trasadingen, Schweiz.

Zellkulturflasche, 75 cm²

Zellkulturflasche mit Filter-Schraubkappe, 270 ml, gammasteril, pyrogenfrei, TPP AG, Trasadingen, Schweiz.

VIII

Zentrifugation der Protozoen

Die Protozoen wurden stets, sofern nicht anders angegeben, 5 min lang bei 4.000 U/min zentrifugiert.

Zentrifugenröhrchen, 15 ml

Gammasterilisiert, pyrogenfrei, DNA- / RNA- frei, Dnase- / Rnase- frei, TPP AG, Trasadingen, Schweiz.

Zentrifugenröhrchen, 50 ml

Gammasterilisiert, pyrogenfrei, DNA- / RNA- frei, Dnase- / Rnase- frei, TPP AG, Trasadingen, Schweiz.

Im Folgenden sind die jeweiligen Rohwerte aus den Versuchen sowie die Angaben der statistischen Auswertung dargestellt. Die Abkürzungen der jeweiligen Kulturüberstände entsprechen den Angaben im Abschnitt Material und Methoden (Tab. 6). Der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SA) sind farblich hervorgehoben. Weitere Abkürzungen sind den Tabellenüberschriften zu entnehmen. Die Zellkonzentrationen der Protozoen und der Bakterien sind aus Gründen der Übersichtlichkeit alle als \log_{10} -Werte dargestellt.

Tab. 7: Ergebnisse der Aktivitätstests von trypsinierten (BT) und nicht trypsinierten (B) *C. botulinum* B-Kulturüberständen nach unterschiedlicher Vorbehandlung, Angabe der Neurotoxinkonzentrationen gemäß dem Maus-Bioassay in MLD/ml.

Vorbehandlung	B	BT
Unbehandelt (kein Auftauen vor Einsatz im Maus-Bioassay)	1,00E+03	1,00E+03
Einfach behandelt (einmaliges Auftauen und Einfrieren vor Einsatz im Maus-Bioassay)	1,00E+03	1,00E+03
Mehrfach behandelt (mehrmaliges Auftauen und Einfrieren vor Einsatz im Maus-Bioassay)	1,00E+03	1,00E+03

Tab. 8: Daten aus den Versuchen zur Reproduzierbarkeit der *T. pyriformis*-Quantifizierung, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Tage	Zellzahl/ml ^(a)						MW, I bis VI	SA, I bis VI
	I	II	III	IV	V	VI		
1	5,88	5,83	5,91	5,92	5,84	5,88	5,88	0,04
2	6,26	6,24	6,24	6,26	6,26	6,28	6,26	0,02
3	5,21	5,28	5,13	5,15	5,31	5,24	5,22	0,07

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

Tab. 9: Wachstumskinetik von *T. pyriformis* in PPY-Medium, Lagerung der Zellkulturflaschen bei 28°C im Brutschrank, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen der Zellzahl, Angabe des dekadischen Logarithmus^(c)

Zeit in h	Zellzahl/ml ^(a)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0 ^(b)	3,00	3,00	3,00	3,00	0,00
24	4,18	4,08	4,24	4,16	0,08
48	4,46	4,38	4,49	4,44	0,06
72	5,87	5,85	5,88	5,87	0,01
96	5,73	5,78	5,77	5,76	0,03
120	5,65	5,62	5,68	5,65	0,03
144	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

^(b) Die Konzentration wurde durch Verdünnung eingestellt.

^(c) Die Angabe eines dekadischen Logarithmus von 2,00 entspricht dem Unterschreiten der Nachweisgrenze.

Tab. 10: *T. pyriformis* in PPY-Medium, Lagerung der Zellkulturflaschen bei 28°C im Brutschrank, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen des pH-Wertes.

Zeit in h	pH-Wert			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	7,0	7,0	7,0	7,0	0,0
24	7,0	7,0	7,0	7,0	0,0
48	7,5	7,0	7,5	7,3	0,3
72	8,0	7,5	8,5	8,0	0,5
96	8,0	7,5	8,5	8,0	0,5
120	8,0	8,0	8,5	8,2	0,3
144	8,0	8,0	8,5	8,2	0,3

Tab. 11: Wachstumskinetik von *T. pyriformis* in PPYG-Medium, Lagerung der Zellkulturflaschen bei 28°C im Brutschrank, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen der Zellzahl, Angabe des dekadischen Logarithmus^(c).

Zeit in h	Zellzahl/ml ^(a)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0 ^(b)	3,00	3,00	3,00	3,00	0,00
48	6,51	6,58	6,67	6,59	0,08
72	6,57	6,57	6,59	6,58	0,01
96	6,30	6,44	6,34	6,36	0,07
120	6,29	6,20	6,24	6,25	0,04
137	5,48	5,44	5,44	5,45	0,02
150	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

^(b) Die Konzentration wurde durch Verdünnung eingestellt.

^(c) Die Angabe eines dekadischen Logarithmus von 2,00 entspricht dem Unterschreiten der Nachweisgrenze.

Tab. 12: *T. pyriformis* in PPYG-Medium, Lagerung der Zellkulturflaschen bei 28°C im Brutschrank, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen des pH-Wertes.

Zeit in h	pH-Wert			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	6,5	6,5	6,5	6,5	0,0
48	7,5	7,5	7,5	7,5	0,0
72	7,5	8,0	8,0	7,8	0,3
96	7,5	8,0	8,0	7,8	0,3
120	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0
137	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0
150	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0

Tab. 13: Wachstumskinetik von *T. pyriformis* in PPYG-Medium, Lagerung der Zellkulturflaschen bei Raumtemperatur, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen der Zellzahl, Angabe des dekadischen Logarithmus^(c).

Zeit in h	Zellzahl/ml ^(a)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0 ^(b)	3,00	3,00	3,00	3,00	0,00
48	6,44	6,46	6,50	6,47	0,03
72	6,61	6,63	6,60	6,62	0,01
96	6,69	6,76	6,73	6,73	0,03
120	6,60	6,61	6,63	6,61	0,02
137	6,56	6,64	6,57	6,59	0,04
150	5,60	5,36	5,41	5,46	0,12
195	5,01	5,24	5,40	5,22	0,20
223	4,65	4,10	4,80	4,52	0,37
240	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

^(b) Die Konzentration wurde durch Verdünnung eingestellt.

^(c) Die Angabe eines dekadischen Logarithmus von 2,00 entspricht dem Unterschreiten der Nachweisgrenze.

Tab. 14: *T. pyriformis* in PPYG-Medium, Lagerung der Zellkulturflaschen bei Raumtemperatur, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen des pH-Wertes.

Zeit in h	pH-Wert			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	6,5	6,5	6,5	6,5	0,0
48	7,5	7,5	7,5	7,5	0,0
72	7,5	8,0	8,0	7,8	0,3
96	7,5	8,0	8,0	7,8	0,3
120	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0
137	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0
150	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0
195	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0
223	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0
240	8,0	8,0	8,0	8,0	0,0

Tab. 15: Wachstumskinetik von *T. pyriformis* in RM, Lagerung der Zellkulturflaschen bei 28°C im Brutschrank, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen der Zellzahl, Angabe des dekadischen Logarithmus^(c).

Zeit in d	Zellzahl/ml ^(a)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0 ^(b)	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00
7	4,24	4,24	4,18	4,22	0,04
14	4,00	4,30	4,24	4,18	0,16
21	3,70	4,30	4,48	4,16	0,41
33	4,10	4,48	4,60	4,39	0,26
49	4,10	4,00	3,88	3,99	0,11
68	3,40	3,40	3,44	3,41	0,02
82	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

^(b) Die Konzentration wurde durch Verdünnung eingestellt.

^(c) Die Angabe eines dekadischen Logarithmus von 2,00 entspricht dem Unterschreiten der Nachweisgrenze.

Tab. 16: *T. pyriformis* in RM, Lagerung der Zellkulturflaschen bei 28°C im Brutschrank, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen des pH-Wertes.

Zeit in d	pH-Wert			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	7,0	7,0	7,0	7,0	0,0
7	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
14	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
21	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
33	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
49	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
68	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
82	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0

Tab. 17: Wachstumskinetik von *T. pyriformis* in RM, Lagerung der Zellkulturflaschen bei Raumtemperatur, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen der Zellzahl, Angabe des dekadischen Logarithmus^(c).

Zeit in d	Zellzahl/ml ^(a)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0 ^(b)	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00
7	4,18	4,10	4,18	4,15	0,05
14	4,24	4,33	4,48	4,35	0,12
21	4,27	4,18	3,88	4,11	0,21
33	4,10	4,00	4,00	4,03	0,06
49	4,18	3,88	3,70	3,92	0,24
68	3,40	4,00	4,00	3,80	0,35
82	3,10	3,88	3,10	3,36	0,45

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

^(b) Die Konzentration wurde durch Verdünnung eingestellt.

^(c) Die Angabe eines dekadischen Logarithmus von 2,00 entspricht dem Unterschreiten der Nachweisgrenze.

Tab. 18: *T. pyriformis* in RM, Lagerung der Zellkulturflaschen bei Raumtemperatur, drei zeitlich unabhängige Bestimmungen des pH-Wertes.

Zeit in d	pH-Wert			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	7,0	7,0	7,0	7,0	0,0
7	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
14	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
21	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
33	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
49	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
68	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0
82	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0

Tab. 19: Daten aus den Versuchen zur Reproduzierbarkeit der *E. coli* K12 (K12)-Quantifizierung, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Ansatz	KbE K12/ml ^(a)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
Tag 1					
1	7,56	7,08	7,01	7,21	0,30
2	7,78	7,66	7,87	7,77	0,10
3	7,73	7,01	6,98	7,24	0,42
Tag 2					
1	8,08	7,99	7,88	7,98	0,10
2	8,26	7,93	7,91	8,03	0,19
3	7,90	7,99	8,00	7,96	0,06
Tag 3					
1	6,98	6,66	6,54	6,73	0,23
2	7,31	6,89	7,01	7,07	0,22
3	6,90	7,00	6,95	6,95	0,05

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 20: Daten des Versuchsansatzes P1, Einfluss des Reaktionsmediums (a) – Wachstumskinetik von *E. coli* K12 (K12), Angabe des dekadischen Logarithmus.

Zeit in h	KbE K12/ml ^(a)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	7,48	7,48	7,45	7,47	0,02
1	7,54	7,56	7,48	7,52	0,04
2	7,46	7,48	7,51	7,48	0,02
4	7,50	7,52	7,51	7,51	0,01
24	7,50	7,49	7,48	7,49	0,01

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 21: Daten des Versuchsansatzes P1, Einfluss des Reaktionsmediums (b) – Wachstumskinetik von *T. pyriformis* (Tp), Angabe des dekadischen Logarithmus.

Zeit in h	Tp/ml ^(a)				
	I	II	III	MW, I – III	SA, I – III
0	5,18	5,18	5,18	5,18	0,00
1	5,14	5,21	5,08	5,14	0,07
2	5,22	5,10	5,16	5,16	0,06
4	5,20	5,12	5,06	5,13	0,07
24	5,22	5,13	5,04	5,13	0,09

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

Tab. 22: Daten des Versuchsansatzes P2, Einfluss der Vorkultivierung von *T. pyriformis* (a) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp). Vorkultivierung der Protozoen in PPYG und in Wasser, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Zeit in h	K12	K12	K12
	(7,00/ml)* + Tp in PPYG (5,00/ml)	(7,00/ml)* + Tp in Wasser (5,00/ml)	(7,00/ml)* + Wasser
0	7,35	7,40	7,49
1	7,65	6,93	7,48
2	6,31	5,16	7,47
4	6,15	4,18	7,51
24	5,30	3,00	7,68

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

* Die Angabe entspricht den rechnerisch vorhandenen KbE/ml, nach SCHROEDL et al. (2003).

Tab. 23: Daten des Versuchsansatzes P3, Ermittlung der optimalen Zellzahlen (a) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp) in unterschiedlichen Konzentrationen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Zeit in h	K12 (7,60/ml)* + Tp (5,60/ml)	K12 (7,60/ml)* + Tp (4,60/ml)	K12 (7,60/ml)* + Tp (3,60/ml)	K12 (7,60/ml)* + Wasser
0	7,90	8,08	8,51	8,10
2	6,16	7,00	8,23	7,83
4	4,81	5,02	7,68	8,18
8	3,90	4,71	7,13	8,00
24	5,53	5,26	5,70	7,85

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

* Die Angabe entspricht den rechnerisch vorhandenen KbE/ml, nach SCHROEDL et al. (2003).

Tab. 24: Daten des Versuchsansatzes P4, Ermittlung der optimalen Zellzahlen (b₁) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) in unterschiedlichen Konzentrationen nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp), Angabe des dekadischen Logarithmus^(b).

Zeit in h	Tp (5,60/ml) + K12 (8,60/ml)*	Tp (5,60/ml) + K12 (7,60/ml)*	Tp (5,60/ml) + K12 (6,60/ml)*	Tp (5,60/ml) + K12 (5,60/ml)*	Tp (5,60/ml) + K12 (4,60/ml)*
0	8,66	7,29	6,48	5,62	5,22
2	7,71	5,54	4,32	3,70	4,02
4	6,73	5,41	4,08	3,65	2,00
8	6,11	4,78	4,13	2,00	2,00

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

^(b) Die Angabe eines dekadischen Logarithmus von 2,00 entspricht dem Unterschreiten der Nachweisgrenze.

* Die Angabe entspricht den rechnerisch vorhandenen KbE/ml, nach SCHROEDL et al. (2003).

Tab. 25: Daten des Versuchsansatzes P4, Ermittlung der optimalen Zellzahlen (b_2) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) in unterschiedlichen Konzentrationen ohne Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp), Kontrollgruppen zu b_1 , Angabe des dekadischen Logarithmus.

Zeit in h	Wasser + K12 (8,60/ml)*	Wasser + K12 (7,60/ml)*	Wasser + K12 (6,60/ml)*	Wasser + K12 (5,60/ml)*	Wasser + K12 (4,60/ml)*
0	8,90	7,93	6,69	5,98	5,15
2	8,76	7,70	6,60	5,70	5,20
4	8,87	7,93	7,00	5,85	5,24
8	8,68	7,93	6,93	5,90	5,45

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

* Die Angabe entspricht den rechnerisch vorhandenen KbE/ml, nach SCHROEDL et al. (2003).

Tab. 26: Daten des Versuchsansatzes P5, Ermittlung der optimalen Zellzahlen (c) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp) in unterschiedlichen Konzentrationen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Zeit in h	K12 (7,00/ml)* + Tp (4,60/ml)	K12 (7,00/ml)* + Tp (4,30/ml)	K12 (7,00/ml)* + Tp (4,00/ml)	K12 (7,00/ml)* + Wasser
0	7,22	7,29	7,38	6,86
2	5,15	6,04	6,65	6,78
4	4,54	5,61	6,28	6,98

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

* Die Angabe entspricht den rechnerisch vorhandenen KbE/ml, nach SCHROEDL et al. (2003).

Anhang

Tab. 27: Daten des Versuchsansatzes P6, weitere Untersuchungen des Phagozytostests (a_1) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12), *S. aureus*, *B. spp.*, *C. albicans* nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp) zum Zeitpunkt 0 h, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen	Zeit in h: 0			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
<i>Tp</i> + K12	7,11	6,46	6,68	6,75	0,33
Wasser + K12	7,11	6,46	6,68	6,75	0,33
<i>Tp</i> + <i>S. aureus</i>	7,79	7,89	7,52	7,73	0,19
Wasser + <i>S. aureus</i>	7,79	7,89	7,52	7,73	0,19
<i>Tp</i> + <i>B. spp.</i>	4,98	5,26	5,06	5,10	0,14
Wasser + <i>B. spp.</i>	4,98	5,26	5,06	5,10	0,14
<i>Tp</i> + <i>C. albicans</i>	4,98	5,06	4,95	5,00	0,06
Wasser + <i>C. albicans</i>	4,98	5,06	4,95	5,00	0,06

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. $1,00E+03$ KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 28: Daten des Versuchsansatzes P6, weitere Untersuchungen des Phagozytostests (a_2) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12), *S. aureus*, *B. spp.*, *C. albicans* nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp) zum Zeitpunkt 4 h, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen	Zeit in h: 4			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
<i>Tp</i> + K12	3,78	3,30	3,70	3,59	0,26
Wasser + K12	6,70	6,71	7,29	6,90	0,34
<i>Tp</i> + <i>S. aureus</i>	5,88	5,70	6,28	5,95	0,30
Wasser + <i>S. aureus</i>	7,42	7,45	7,41	7,43	0,02
<i>Tp</i> + <i>B. spp.</i>	3,00	3,00	3,00	3,00	0,00
Wasser + <i>B. spp.</i>	4,19	4,18	4,57	4,31	0,23
<i>Tp</i> + <i>C. albicans</i>	4,44	4,26	4,57	4,42	0,16
Wasser + <i>C. albicans</i>	4,88	4,58	4,59	4,68	0,17

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. $1,00E+03$ KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 29: Daten des Versuchsansatzes P7, weitere Untersuchungen des Phagozytostests (b₁) – Wachstumskinetik *T. pyriformis* (Tp)^(a) während eines Phagozytostests, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Zeit in h	Tp			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	4,54	4,60	4,44	4,53	0,08
4	4,60	4,35	4,40	4,45	0,13
24	4,57	4,24	4,57	4,46	0,19

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

Tab. 30: Daten des Versuchsansatzes P7, weitere Untersuchungen des Phagozytostests (b₂) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp), Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen	Zeit in h: 4			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
<i>Tp</i> + K12	4,99	4,79	5,00	4,93	0,12
Wasser + K12	7,45	7,61	7,62	7,56	0,10

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 31: Daten des Versuchsansatzes P8, weitere Untersuchungen des Phagozytostests (c) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp), unterschiedliche Ansatzvolumina zum Zeitpunkt 4 h, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen (Gesamtvolumina)	Zeit in h: 4			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
<i>Tp</i> + K12 (1,5 ml)	3,00	3,70	3,90	3,53	0,47
<i>Tp</i> + K12 (750 µl)	5,02	4,52	5,27	4,94	0,38
<i>Tp</i> + K12 (300 µl)	5,26	5,31	5,22	5,26	0,05
<i>Tp</i> + K12 (150 µl)	3,70	4,86	4,47	4,34	0,59
<i>Tp</i> + K12 (75 µl)	4,90	4,42	4,38	4,57	0,29
Wasser + K12 (1,5 ml)	7,53	7,24	7,54	7,44	0,17
Wasser + K12 (750 µl)	7,54	7,61	7,69	7,62	0,08
Wasser + K12 (300 µl)	7,68	7,69	7,50	7,62	0,11
Wasser + K12 (150 µl)	7,36	7,50	7,66	7,51	0,15
Wasser + K12 (75 µl)	7,37	7,31	7,43	7,37	0,06

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 32: Daten des Versuchsansatzes P9, weitere Untersuchungen des Phagozytostests (d) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit verschiedenen sterilfiltrierten *T. pyriformis* (Tp) - Kulturüberständen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen	Zeit in h: 4			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
K12 +					
SN 1 ^(b)	6,78	6,85	6,78	6,80	0,04
SN 2 ^(c)	6,60	6,35	6,79	6,58	0,22
PPYG	6,90	6,85	7,20	6,98	0,19
Wasser	7,00	6,75	6,61	6,79	0,20

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

^(b) SN 1 = sterilfiltrierter Kulturüberstand aus einer PPYG-Kultur

^(c) SN 2 = sterilfiltrierter Kulturüberstand aus einer Wasser-Kultur

Tab. 33: Daten des Versuchsansatzes P10, Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose (a₁) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp). Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von *T. pyriformis* mit Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

<i>Tp</i> + <i>K12</i> +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
Wasser	4,08	4,04	4,15	4,09	0,06
<i>Ni</i>	6,62	6,54	6,40	6,52	0,11
<i>Ni</i> / 2	3,85	4,10	4,22	4,06	0,19
<i>Ni</i> / 10	4,06	4,35	4,15	4,19	0,15
Wasser	4,35	4,15	4,49	4,33	0,17
<i>NiT</i>	6,28	6,28	6,40	6,32	0,07
<i>NiT</i> / 2	4,06	4,15	3,60	3,94	0,30
<i>NiT</i> / 10	4,08	3,70	4,20	3,99	0,26

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 34: Daten des Versuchsansatzes P10, Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose (a₂) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp). Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von *T. pyriformis* mit Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

<i>Tp</i> + <i>K12</i> +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
Wasser	4,34	4,29	4,32	4,32	0,03
<i>Ni</i> ⁺ / 2	5,00	5,18	5,26	5,15	0,13
<i>NiT</i> ⁺ / 2	5,28	4,99	5,07	5,11	0,15

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 35: Daten des Versuchsansatzes P10, Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose (a₃) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit Wasser ohne Inkubation mit *T. pyri-formis* (Tp), Kontrollgruppen zu a₁. Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von Wasser mit Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Wasser + K12 +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
Wasser	7,54	7,67	7,42	7,54	0,13
Ni	7,45	7,78	7,82	7,68	0,20
Ni/2	7,38	7,28	7,60	7,42	0,16
Ni/10	7,48	7,54	7,44	7,49	0,05
Wasser	7,54	7,67	7,42	7,54	0,13
NiT	7,51	7,48	7,40	7,46	0,06
NiT/2	7,48	7,49	7,36	7,44	0,07
NiT/10	7,74	7,56	7,57	7,62	0,10

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 36: Daten des Versuchsansatzes P10, Einfluss der Kontrollmedien auf die Phagozytose (a₄) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit Wasser ohne Inkubation mit *T. pyri-formis* (Tp), Kontrollgruppen zu a₂. Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von Wasser mit Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Wasser + K12 +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
Wasser	7,81	7,68	7,73	7,74	0,07
Ni ⁺ /2	8,11	8,36	8,23	8,23	0,13
Ni ⁺ /2	8,36	8,27	8,32	8,32	0,05

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 37: Daten des Versuchsansatzes P11, Einfluss der Kulturüberstände auf *E. coli* K12 (a) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit Wasser und den Kulturüberständen (Ansatz TPGY). Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von Wasser mit den Kulturüberständen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Wasser + K12 +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
Ni	6,86	6,78	7,05	6,90	0,14
A	7,00	7,03	7,48	7,17	0,27
Ni	7,66	7,66	7,19	7,50	0,27
B	7,66	7,66	7,19	7,50	0,27
Ni	6,95	6,98	7,16	7,03	0,11
C	7,19	6,98	7,02	7,06	0,11
Ni	7,63	7,88	7,92	7,81	0,16
D	7,22	7,78	7,73	7,58	0,31
Ni ⁺	8,27	8,16	8,04	8,16	0,12
E	8,16	7,81	7,71	7,89	0,24
Ni	6,86	6,78	7,05	6,90	0,14
F	7,35	7,38	7,00	7,24	0,21
Ni	7,63	7,88	7,92	7,81	0,16
G	8,02	7,76	7,46	7,75	0,28
Ni	7,41	7,34	7,51	7,42	0,09
S	7,28	7,44	7,36	7,36	0,08

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 38: Daten des Versuchsansatzes P11, Einfluss der Kulturüberstände auf *E. coli* K12 (b) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit Wasser und den Kulturüberständen (Ansatz TPGYT). Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von Wasser mit den tryptisierten Kulturüberständen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Wasser + K12 +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
NiT	7,80	7,86	7,67	7,78	0,10
AT	7,86	7,80	8,01	7,89	0,11
NiT	7,80	7,86	7,67	7,78	0,10
BT	7,38	7,64	7,76	7,59	0,19
NiT	7,48	7,95	8,33	7,92	0,43
CT	7,72	8,04	7,95	7,90	0,17
NiT	7,48	7,95	8,33	7,92	0,43
DT	7,79	7,70	7,93	7,81	0,12
NiT ⁺	8,27	8,15	8,29	8,24	0,08
ET	8,04	7,59	8,17	7,93	0,30
NiT	7,80	7,86	7,67	7,78	0,10
FT	7,84	8,04	7,84	7,91	0,12
NiT	7,48	7,95	8,33	7,92	0,43
GT	8,00	7,95	7,85	7,93	0,08
NiT	7,34	7,35	7,41	7,37	0,04
ST	7,13	7,22	7,33	7,23	0,10

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 39: Daten des Versuchsansatzes E1, Entwicklung des Exozytostests (a) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase bei pH 4,0. Reaktionsstopp zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyri-formis*.

Zeit in min	pH 4,0				Wasser	PPYG
	Tp + PPYG, 2 d	Tp + PPYG, 8 d	Tp + PPYG, 10 d	Tp + Wasser, 5d		
5	2084	3500	3500	3500	207	302
15	3500	3500	3500	3500	228	312
30	3500	3500	3500	3500	258	343
60	3500	3500	3500	3500	257	428

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 40: Daten des Versuchsansatzes E1, Entwicklung des Exozytostests (b) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase bei pH 5,0. Reaktionsstopp zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyri-formis*.

pH 5,0						
Zeit in min	Tp + PPYG, 2 d	Tp + PPYG, 8 d	Tp + PPYG, 10 d	Tp + Wasser, 5d	Wasser	PPYG
5	1130	3500	3500	3500	200	337
15	2333	3500	3500	3500	225	415
30	3500	3500	3500	3500	211	282
60	3500	3500	3500	3500	291	336

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 41: Daten des Versuchsansatzes E1, Entwicklung des Exozytostests (c) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase bei pH 6,0. Reaktionsstopp zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyri-formis*.

pH 6,0						
Zeit in min	Tp + PPYG, 2 d	Tp + PPYG, 8 d	Tp + PPYG, 10 d	Tp + Wasser, 5d	Wasser	PPYG
5	403	1199	468	2438	201	274
15	611	1136	802	3500	136	220
30	897	1826	1433	3500	213	337
60	1348	2555	1912	3500	239	288

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 42: Daten des Versuchsansatzes E2, Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessung, Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Ansatz	mOD
I	1550
II	1585
III	1479
IV	1451
V	1602
VI	1463
MW, I-VI	1522
SA, I-VI	66

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 43: Daten des Versuchsansatzes E3, Ermittlung des Reaktionsmediums (a₁) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase. Verdünnungen mit dem jeweiligen Medium, Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Zeit in h	Tp + PPYG	Verd.1:10	Verd.1:100	PPYG	Verd.1:10	Verd.1:100
1	573	214	203	184	192	185
2	841	251	217	196	202	193
4	1388	302	215	206	195	180
6	2526	419	245	215	221	219

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 44: Daten des Versuchsansatzes E3, Ermittlung des Reaktionsmediums (a₂) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase. Verdünnungen mit dem jeweiligen Medium, Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Zeit in h	Tp + Wasser	Verd.1:10	Verd.1:100	Wasser	Verd.1:10	Verd.1:100
1	635	173	152	134	130	144
2	699	200	160	155	148	143
4	786	213	151	165	142	160
6	1027	230	173	176	166	178

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 45: Daten des Versuchsansatzes E4, Ermittlung der optimalen Zellzahl (a_1) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, unterschiedliche *T. pyriformis*-Konzentrationen (T_p). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Tp (3,70/ml)					
Zeit in h	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
0	258	236	253	249	12
3	367	365	362	365	3
5	364	331	316	337	25

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 46: Daten des Versuchsansatzes E4, Ermittlung der optimalen Zellzahl (a_2) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, unterschiedliche *T. pyriformis*-Konzentrationen (T_p). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Tp (4,00/ml)					
Zeit in h	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
0	266	262	246	258	11
3	416	440	407	421	17
5	398	430	406	411	17

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 47: Daten des Versuchsansatzes E4, Ermittlung der optimalen Zellzahl (a_3) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, unterschiedliche *T. pyriformis*-Konzentrationen (T_p). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Tp (4,70/ml)					
Zeit in h	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
0	404	420	430	418	13
3	1292	1324	1286	1301	20
5	1439	1388	1384	1404	31

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 48: Daten des Versuchsansatzes E4, Ermittlung der optimalen Zellzahl (a_4) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, unterschiedliche *T. pyriformis*-Konzentrationen (T_p). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Zeit in h	Tp (5,18/ml)			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	646	476	513	545	89
3	1860	1882	1764	1835	63
5	2137	2260	1976	2124	142

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 49: Daten des Versuchsansatzes E5, Ermittlung der Inkubationsdauer (a_1) – Bestimmung des Wachstumsverhaltens^(a) während des Versuchsansatzes, Angabe des dekadischen Logarithmus. ZZ = Zellzahl.

Zeit in h	ZZ/ml			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	5,19	5,22	5,24	5,22	0,02
3	5,22	5,12	5,19	5,18	0,05
4	5,23	5,18	5,36	5,26	0,09
5	5,20	5,26	5,27	5,24	0,03

^(a) Die untere Nachweisgrenze mit der Zählkammer beträgt ca. 2,50E+03 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus = 3,40).

Tab. 50: Daten des Versuchsansatzes E5, Ermittlung der Inkubationsdauer (a_b) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase während des Versuchsansatzes. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Zeit in h	mOD			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
0	879	823	978	893	78
3	2051	2157	2247	2152	98
4	2310	2348	2345	2334	21
5	2564	2591	2592	2582	16

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 51: Daten des Versuchsansatzes E6, Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes (a_1). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Ansatz	mOD			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
Tag 1					
1	2025	1969	2185	2060	112
2	2048	1892	2063	2001	95
3	2100	1923	2066	2030	94
4	1941	1942	2019	1967	45
5	2093	2050	2050	2064	25
6	1923	1944	2038	1968	61
Tag 2					
1	1145	1221	1272	1213	64
2	1172	1119	1142	1144	27
3	1211	1243	1291	1248	40
4	1289	1343	1204	1279	70
5	1134	1165	1154	1151	16
6	1280	1363	1248	1297	59
Tag 3					
1	2139	2242	2134	2172	61
2	2097	2136	2187	2140	45
3	2238	2287	2140	2222	75
4	2214	2205	2159	2193	30
5	2185	2268	2138	2197	66
6	2240	2334	2118	2231	108

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 52: Daten des Versuchsansatzes E6, Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Messwertes (a_2). Medienleerkontrollen zu a_1 . Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Ansatz	mOD			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
Tag 1					
1	223	210	244	226	17
2	256	234	240	243	11
3	255	210	232	232	23
4	243	252	239	245	7
5	241	250	255	249	7
6	225	241	219	228	11
Tag 2					
1	255	234	251	247	11
2	227	229	219	225	5
3	241	254	248	248	7
4	247	239	217	234	16
5	244	231	242	239	7
6	251	252	246	250	3
Tag 3					
1	238	231	245	238	7
2	241	234	242	239	4
3	239	231	242	237	6
4	236	240	249	242	7
5	251	239	241	244	6
6	241	236	230	236	6

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 53: Daten des Versuchsansatzes E7, Optimierung des Exozytostests (a_1) – Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase mittels Sterilfiltration (SF). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Gruppe	SF			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
<i>Tp + Medium</i>	1997	1853	2003	1951	85
<i>Medium</i>	208	210	225	214	9

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 54: Daten des Versuchsansatzes E7, Optimierung des Exozytostests (a₁) – Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase mittels Säureimmobilisation (SI). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Gruppe	SI			MW, I bis III	SA, I bis III
	I	II	III		
<i>Tp + Medium</i>	1945	1826	1542	1771	207
<i>Medium</i>	242	227	251	240	12

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 55: Daten des Versuchsansatzes E8, Optimierung des Exozytostests (b) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, unterschiedliche Ansatzvolumina. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Gruppe (Gesamtvolumen)	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
<i>Tp + Medium (750 µl)</i>	2192	2500	2235	2309	167
<i>Tp + Medium (300 µl)</i>	1303	1523	1272	1366	137
<i>Tp + Medium (150 µl)</i>	2255	2340	2086	2227	129
<i>Tp + Medium (105 µl)</i>	2438	2322	2275	2345	84
<i>Medium (750 µl)</i>	223	234	236	231	7
<i>Medium (300 µl)</i>	245	217	232	231	14
<i>Medium (150 µl)</i>	232	224	241	232	9
<i>Medium (105 µl)</i>	226	231	239	232	7

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 56: Daten des Versuchsansatzes E9, Optimierung des Exozytostests (c) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase, unterschiedliche Verhältnisse der Ansätze zum SPP. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Gruppe	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
<i>Tp + Medium, 1:4</i>	2125	2111	1927	2054	110
<i>Tp + Medium, 1:4,29</i>	2142	2042	2006	2063	70
<i>Medium, 1:4</i>	221	230	233	228	6
<i>Medium, 1:4,29</i>	227	219	215	220	6

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 57: Daten des Versuchsansatzes E10, weitere Untersuchungen des Exozytostests (a₁) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe von Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

<i>Tp</i> + PPYG +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
PPYG	2310	2054	2245	2203	133
Ni	2447	2384	2181	2337	139
Ni/ 2	2213	2523	2772	2503	280
Ni/ 10	2558	2384	2524	2489	92
PPYG	2310	2054	2245	2203	133
NiT	2092	2534	2382	2336	225
NiT/ 2	2436	2453	2493	2461	29
NiT/ 10	2270	2349	2644	2421	197

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 58: Daten des Versuchsansatzes E10, weitere Untersuchungen des Exozytostests (a₂) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe von Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

<i>Tp</i> + PPYG +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
PPYG	1118	1233	930	1094	153
Ni ⁺ / 2	989	1030	889	969	73
NiT ⁺ / 2	821	1014	831	889	109

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 59: Daten des Versuchsansatzes E10, weitere Untersuchungen des Exozytostests (a_3) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe von Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen, Mediumleerkontrollen zu E10 (a_1). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

<i>PPYG + PPyG +</i>	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
<i>PPYG</i>	247	248	255	250	4
<i>Ni</i>	536	554	526	539	14
<i>Ni/2</i>	442	451	417	437	18
<i>Ni/10</i>	281	287	323	297	23
<i>PPYG</i>	247	248	255	250	4
<i>NiT</i>	452	555	516	508	52
<i>NiT/2</i>	418	366	372	385	28
<i>NiT/10</i>	252	304	287	281	27

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 60: Daten des Versuchsansatzes E10, weitere Untersuchungen des Exozytostests (a_4) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe von Medien in verschiedenen Verdünnungsstufen, Mediumleerkontrollen zu E10 (a_2). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

<i>PPYG + PPyG +</i>	I	II	III	MW, I - III	SA, I - III
<i>PPYG</i>	185	191	208	195	12
<i>Ni⁺/2</i>	247	255	236	246	10
<i>NiT⁺/2</i>	236	240	238	238	2

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 61: Daten des Versuchsansatzes A1, Untersuchungen der Aktivität der sauren Phosphatase, Aktivitätsverlauf (a₁) – Messung des Verlaufs der Aktivität der sauren Phosphatase in einem enzymhaltigen Ansatz (EnzA) bei 4°C (Lagerung im Kühlschrank). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

EnzA + Medium					
Zeit in h	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
0	1847	1965	1892	1901	60
5	1936	1913	1807	1885	69
24	1637	1707	1689	1678	36

Medium					
Zeit in h	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
0	234	231	227	231	4
5	240	218	213	224	14
24	220	230	227	226	5

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 62: Daten des Versuchsansatzes A1, Untersuchungen der Aktivität der sauren Phosphatase, Aktivitätsverlauf (a₂) – Messung des Verlaufs der Aktivität der sauren Phosphatase in einem enzymhaltigen Ansatz (EnzA) bei 28°C. (Lagerung im Brutschrank). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

EnzA + Medium					
Zeit in h	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
0	1845	1965	1892	1901	60
5	1910	1910	1914	1911	2
24	1424	1655	1645	1575	131

Medium					
Zeit in h	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
0	234	231	227	231	4
5	231	224	218	224	7
24	225	234	210	223	12

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich

Tab. 63: Daten des Versuchsansatzes A2, Untersuchungen der Aktivität der sauren Phosphatase, Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlaufes (b_1) – Einfluss der Kulturüberstände (TPGY-Ansatz) auf die Aktivität der sauren Phosphatase in einem enzymhaltigen Ansatz (EnzA). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

<i>EnzA</i> +					
<i>PPYG</i> +	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
<i>Ni</i>	1901	1911	1853	1888	31
<i>A</i>	1701	1832	1760	1764	66
<i>Ni</i>	1901	1911	1853	1888	31
<i>B</i>	1817	1741	1776	1778	38
<i>Ni</i>	1751	1774	1812	1779	31
<i>C</i>	1744	1775	1765	1761	16
<i>Ni</i>	1751	1774	1812	1779	31
<i>D</i>	1766	1775	1845	1795	43
<i>Ni</i> ⁺	1842	1925	1948	1905	56
<i>E</i>	1894	1845	1958	1899	57
<i>Ni</i>	1490	1487	1431	1469	33
<i>F</i>	1343	1347	1349	1346	3
<i>Ni</i>	1751	1774	1812	1779	31
<i>G</i>	1920	1737	1735	1797	106
<i>Ni</i>	1638	1706	1636	1660	40
<i>S</i>	1635	1643	1590	1623	29

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 64: Daten des Versuchsansatzes A2, Untersuchungen der Aktivität der sauren Phosphatase, Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlaufes (b_2) – Einfluss der Kulturüberstände (TPGY-Ansatz) auf die Aktivität der sauren Phosphatase in einem enzymhaltigen Ansatz (EnzA), Mediumleerkontrollen zu b_1 . Angabe der $mOD^{(a)}$, gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

<i>PPYG +</i>					
<i>PPYG +</i>	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
<i>Ni</i>	339	344	378	354	21
<i>A</i>	242	252	253	249	6
<i>Ni</i>	339	344	378	354	21
<i>B</i>	262	268	318	283	31
<i>Ni</i>	331	325	305	320	14
<i>C</i>	288	288	317	298	17
<i>Ni</i>	331	325	305	320	14
<i>D</i>	310	346	341	332	20
<i>Ni⁺</i>	295	297	305	299	5
<i>E</i>	295	303	306	301	6
<i>Ni</i>	392	406	404	401	8
<i>F</i>	277	281	295	284	9
<i>Ni</i>	331	325	305	320	14
<i>G</i>	326	334	356	339	16
<i>Ni</i>	270	290	279	280	10
<i>S</i>	247	263	273	261	13

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 65: Daten des Versuchsansatzes A2, Untersuchungen der Aktivität der sauren Phosphatase, Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlaufes (b_3) – Einfluss der Kulturüberstände (TPGYT-Ansatz) auf die Aktivität der sauren Phosphatase in einem enzymhaltigen Ansatz (EnzA). Angabe der $mOD^{(a)}$, gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

<i>EnzA +</i>					
<i>PPYG +</i>	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
<i>NiT</i>	1312	1280	1268	1287	23
<i>AT</i>	1439	1390	1324	1384	58
<i>NiT</i>	1312	1280	1268	1287	23
<i>BT</i>	1375	1340	1350	1355	18
<i>NiT</i>	1917	1867	1824	1869	47
<i>CT</i>	1861	1808	1879	1849	37
<i>NiT</i>	1917	1867	1824	1869	47
<i>DT</i>	1758	1896	1828	1827	69
<i>NiT⁺</i>	2039	2179	1974	2064	105
<i>ET</i>	2052	2041	2223	2105	102
<i>NiT</i>	2124	2282	2310	2239	100
<i>FT</i>	2510	2385	2204	2366	154
<i>NiT</i>	2315	2168	2169	2217	85
<i>GT</i>	2160	2283	2597	2347	225
<i>NiT</i>	2039	2179	1974	2064	105
<i>ST</i>	2110	2088	1938	2045	94

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 66: Daten des Versuchsansatzes A2, Untersuchungen der Aktivität der sauren Phosphatase, Einfluss der Kulturüberstände auf den Aktivitätsverlaufes (b_4) – Einfluss der Kulturüberstände (TPGYT-Ansatz) auf die Aktivität der sauren Phosphatase in einem enzymhaltigen Ansatz (EnzA), Mediumleerkontrollen zu b_3 . Angabe der $mOD^{(a)}$, gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

<i>PPYG +</i>					
<i>PPYG +</i>	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
<i>NiT</i>	228	246	208	227	19
<i>AT</i>	348	363	348	353	9
<i>NiT</i>	228	246	208	227	19
<i>BT</i>	321	315	308	315	7
<i>NiT</i>	335	357	324	339	17
<i>CT</i>	325	359	340	341	17
<i>NiT</i>	335	357	324	339	17
<i>DT</i>	308	304	281	298	15
<i>NiT⁺</i>	249	250	245	248	3
<i>ET</i>	246	245	248	246	2
<i>NiT</i>	211	222	201	211	11
<i>FT</i>	294	300	290	295	5
<i>NiT</i>	321	334	325	327	7
<i>GT</i>	319	301	304	308	10
<i>NiT</i>	249	250	245	248	3
<i>ST</i>	243	240	238	240	3

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 67: Daten des Versuchsansatzes S1, Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs während eines Phagozytoseversuches. Angabe der relativen ELISA-Einheiten (REE). Die Verdünnungen im Laufe des Einsatzes im ELISA wurden bereits berücksichtigt. Die Daten entsprechen somit den Konzentrationen im Phagozytoseversuch.

Ansatz	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
Überstand A + <i>T.pyriformis</i> , 0 h	5,35	5,84	6,97	6,05	0,83
Überstand A + <i>T.pyriformis</i> , 1 h	4,40	5,35	5,06	4,94	0,49
Überstand A + <i>T.pyriformis</i> , 5 h	2,27	2,68	2,73	2,56	0,25
Überstand A, 0 h	5,06	6,03	5,39	5,49	0,49
Überstand A, 1 h	4,72	4,68	3,72	4,37	0,57
Überstand A, 5 h	2,68	2,59	2,40	2,56	0,14
Überstand AT + <i>T.pyriformis</i> , 0 h	6,03	5,39	7,16	6,19	0,90
Überstand AT + <i>T.pyriformis</i> , 1 h	4,36	3,72	3,41	3,83	0,48
Überstand AT + <i>T.pyriformis</i> , 5 h	3,73	2,15	2,54	2,81	0,82
Überstand AT, 0 h	6,39	5,93	6,71	6,34	0,39
Überstand AT, 1 h	4,72	4,86	3,24	4,27	0,90
Überstand AT, 5 h	2,15	2,04	2,67	2,29	0,34

Tab. 68: Daten des Versuchsansatzes S1, Untersuchungen zur Stabilität der BoNTs während eines Exozytoseversuches. Angabe der relativen ELISA-Einheiten (REE). Die Verdünnungen im Laufe des Einsatzes im ELISA wurden bereits berücksichtigt. Die Daten entsprechen somit den Konzentrationen im Exozytoseversuch.

Ansatz	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III
Überstand A + <i>T.pyriformis</i> , 0 h	3,76	3,28	3,50	3,51	0,24
Überstand A + <i>T.pyriformis</i> , 1 h	3,72	3,29	3,54	3,52	0,22
Überstand A + <i>T.pyriformis</i> , 5 h	3,24	2,87	3,73	3,28	0,42
Überstand A, 0 h	3,48	3,39	4,03	3,63	0,35
Überstand A, 1 h	3,74	3,35	2,76	3,28	0,49
Überstand A, 5 h	2,68	2,59	3,24	2,84	0,35
Überstand AT + <i>T.pyriformis</i> , 0 h	4,36	3,67	3,04	3,69	0,66
Überstand AT + <i>T.pyriformis</i> , 1 h	2,67	3,72	3,41	3,27	0,54
Überstand AT + <i>T.pyriformis</i> , 5 h	3,73	2,15	2,54	2,81	0,82
Überstand AT, 0 h	3,28	3,72	4,39	3,80	0,56
Überstand AT, 1 h	3,41	4,36	2,54	3,44	0,91
Überstand AT, 5 h	2,15	2,04	2,67	2,29	0,34

Tab. 69: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuch (a) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp). Zugabe von *E. coli* K12 (K12) nach einstündiger Vorinkubation von *T. pyriformis* mit den Kulturüberständen (TPGY-Ansatz), Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen <i>Tp</i> + <i>K12</i> +	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>Ni</i>	4,51	4,68	4,50	4,37	4,08	4,08	4,24	4,61	4,47
<i>A</i>	4,30	4,36	4,46	4,08	4,37	4,29	4,77	4,40	4,34
<i>Ni</i>	4,56	4,23	4,32	4,37	4,08	4,08	4,24	4,61	4,47
<i>B</i>	4,56	4,67	4,61	4,38	4,35	4,27	4,36	4,50	4,55
<i>Ni</i>	4,63	4,51	4,49	4,61	4,56	4,80	5,26	4,64	5,06
<i>C</i>	4,70	4,68	4,41	5,08	5,15	4,56	4,68	4,89	4,70
<i>Ni</i>	4,44	4,00	4,13	4,61	4,56	4,80	5,26	4,64	5,06
<i>D</i>	4,50	4,43	4,29	4,59	4,54	4,36	5,11	5,22	4,56
<i>Ni</i> ⁺	5,04	5,35	5,37	5,38	4,56	4,90	5,18	5,69	5,64
<i>E</i>	7,47	7,91	7,98	7,20	7,20	7,39	7,56	7,31	7,61
<i>Ni</i>	4,51	4,68	4,50	4,56	4,23	4,32	4,24	4,61	4,47
<i>F</i>	4,55	4,48	4,57	4,49	4,62	4,84	4,33	4,68	4,51
<i>Ni</i>	4,44	4,00	4,13	4,61	4,56	4,80	5,26	4,64	5,06
<i>G</i>	4,63	4,30	4,20	5,00	5,56	5,34	5,78	5,35	5,27
<i>Ni</i>	4,49	4,62	4,64	4,45	4,71	4,54	5,28	4,55	5,08
<i>S</i>	4,93	4,91	4,88	4,90	5,20	5,62	5,24	5,28	5,19

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 70: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuch (b) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp). Zugabe von *E. coli* K12 (K12) nach einstündiger Vorinkubation von *T. pyriformis* mit den Kulturüberständen (TPGYT-Ansatz), Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3			
	<i>Ip</i> + K12 +	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>NiT</i>		4,54	4,36	4,40	4,39	4,38	4,22	4,63	4,63	4,77
<i>AT</i>		4,27	4,28	4,41	5,26	4,54	4,85	5,24	5,30	4,70
<i>NiT</i>		4,54	4,36	4,40	4,39	4,38	4,22	4,63	4,63	4,77
<i>BT</i>		4,39	4,57	4,61	4,53	4,28	4,57	4,85	4,86	4,65
<i>NiT</i>		4,56	4,34	4,91	4,85	4,74	4,60	4,45	4,30	4,71
<i>CT</i>		4,30	4,49	4,59	4,71	4,83	4,60	4,98	5,06	4,43
<i>NiT</i>		4,56	4,34	4,91	4,85	4,74	4,60	4,45	4,30	4,71
<i>DT</i>		4,11	4,27	4,35	4,30	5,16	4,71	4,82	5,20	4,86
<i>NiT</i> ⁺		4,81	4,72	4,59	4,08	3,50	3,95	4,89	4,72	4,38
<i>ET</i>		6,90	7,04	7,00	7,26	7,23	7,23	6,72	6,85	7,04
<i>NiT</i>		4,54	4,36	4,40	4,39	4,38	4,22	4,63	4,63	4,77
<i>FT</i>		4,51	4,62	4,53	4,51	4,56	4,40	4,38	4,85	4,56
<i>NiT</i>		4,56	4,34	4,91	4,85	4,74	4,60	4,45	4,30	4,71
<i>GT</i>		4,04	4,40	3,98	4,51	4,73	4,27	4,86	5,09	4,66
<i>NiT</i>		4,48	4,57	4,96	4,52	4,93	5,51	5,55	5,48	4,91
<i>ST</i>		4,66	4,84	4,98	4,36	4,16	4,57	4,90	4,69	5,02

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 71: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuch mit den detoxifizierten Kulturüberständen (c) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp). Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von *T. pyriformis* mit den unbehandelten (u) und erhitzten bzw. detoxifizierten (e) Kulturüberständen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen <i>Tp</i> + K12 +	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>Ni</i> ⁺ (u)	5,04	5,35	5,37	5,38	4,56	4,90	5,18	5,69	5,64
<i>E</i> (u)	7,47	7,91	7,98	7,20	7,20	7,39	7,56	7,31	7,61
<i>Ni</i> ⁺ (e)	4,83	5,62	5,15	4,82	4,42	4,38	5,11	5,67	5,80
<i>E</i> (e)	7,40	7,47	7,24	7,41	7,26	7,11	7,66	7,83	7,76
<i>NiT</i> ⁺ (u)	4,81	4,72	4,59	4,08	3,95	3,95	4,89	4,72	4,38
<i>ET</i> (u)	6,90	7,04	7,00	7,26	7,23	7,23	6,72	6,85	7,04
<i>NiT</i> ⁺ (e)	4,62	4,41	4,16	4,40	4,41	4,34	4,30	4,27	4,18
<i>ET</i> (e)	7,46	7,19	7,15	6,16	6,33	6,66	7,20	7,46	7,43

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 72: Ergebnisse der Proteinmessungen (Angabe der vom Messgerät ermittelten Werte) und pH-Werte in den Kulturansätzen.

Abkürzung	Proteingehalt in mg/ml					pH-Wert
	I	II	III	MW, I bis III	SA, I bis III	
<i>Ni</i> ⁺	44,3	35,4	50,3	43,3	7,5	6,5
<i>NiT</i> ⁺	49,9	48,2	39,3	45,8	5,7	6,5
<i>E</i>	109,5	105,8	85,5	100,3	12,9	5,5
<i>E T</i>	152,3	135,0	148,5	145,3	9,1	5,5

Tab. 73: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuch mit den verdünnten Kulturüberständen (d) – KbE/ml^(a) von *E. coli* K12 (K12) nach Inkubation mit *T. pyriformis* (Tp). Zugabe von *E. coli* K12 nach einstündiger Vorinkubation von *T. pyriformis* mit den unbehandelten (u) und verdünnten neurotoxinhaltigen (v) Kulturüberständen, Angabe des dekadischen Logarithmus.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>Ni</i> ⁺	5,04	5,35	5,37	5,38	4,56	4,90	5,18	5,69	5,64
<i>E(u)</i>	7,47	7,91	7,98	7,20	7,20	7,39	7,56	7,31	7,61
<i>Ni</i> ⁺	4,04	3,85	4,18	4,98	4,52	4,75	5,65	5,51	5,66
<i>E(v)</i>	5,00	4,31	4,78	5,16	5,04	4,36	5,52	5,36	5,24
<i>NiT</i> ⁺	4,81	4,72	4,59	4,08	3,95	3,95	4,89	4,72	4,38
<i>ET(u)</i>	6,90	7,04	7,00	7,26	7,23	7,23	6,72	6,85	7,04
<i>NiT</i> ⁺	4,48	4,81	4,85	4,29	4,31	4,11	5,52	4,45	5,29
<i>ET(v)</i>	4,00	4,30	4,89	4,36	4,79	4,88	4,53	4,96	4,39

^(a) Die untere Nachweisgrenze bei der Bestimmung der KbE/ml beträgt ca. 1,00E+03 KbE/ml (dekadischer Logarithmus = 3,00).

Tab. 74: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche (a₁) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der Kulturüberstände (TPGY-Ansatz). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>Tp</i> +									
PPYG +									
<i>Ni</i>	2461	2330	2554	2726	2753	2606	813	809	796
<i>A</i>	2114	2070	2124	2103	2139	2165	735	759	797
<i>Ni</i>	2461	2330	2554	2726	2753	2606	813	809	796
<i>B</i>	2153	2324	2148	2473	2418	2356	727	738	750
<i>Ni</i>	873	854	824	2412	2468	2491	2546	2340	2606
<i>C</i>	961	1012	964	2664	2601	2544	2174	2813	2748
<i>Ni</i>	2412	2468	2491	2692	2812	2622	873	854	824
<i>D</i>	2503	2725	2671	3198	3324	3394	849	896	889
<i>Ni</i> ⁺	1200	1277	1121	1326	1233	1190	949	934	1011
<i>E</i>	1192	1383	1342	1024	1040	1098	855	806	737
<i>Ni</i>	2567	2779	2705	2726	2753	2606	813	809	796
<i>F</i>	2850	2822	2683	2135	1970	1991	840	825	835
<i>Ni</i>	2468	2513	2622	2692	2812	2622	873	854	824
<i>G</i>	2619	2592	2652	2456	2494	2569	912	928	982
<i>Ni</i>	2438	2305	2477	2673	2857	2859	853	885	834
<i>S</i>	2529	2368	2447	2674	2743	2666	769	762	778

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 75: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche (a₂) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der Kulturüberstände (TPGY-Ansatz), Mediumleerkontrollen zu a₁. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>PPYG +</i>									
<i>PPYG +</i>									
<i>Ni</i>	416	425	402	307	296	269	290	283	285
<i>A</i>	344	354	346	183	293	305	301	304	302
<i>Ni</i>	416	425	402	307	296	269	290	283	285
<i>B</i>	353	377	344	275	279	293	294	308	295
<i>Ni</i>	380	386	375	367	353	331	329	343	323
<i>C</i>	400	396	399	363	333	324	367	361	373
<i>Ni</i>	367	353	331	361	331	378	380	386	375
<i>D</i>	322	321	313	450	346	384	345	350	340
<i>Ni</i> ⁺	253	252	240	265	269	250	276	284	265
<i>E</i>	261	282	280	262	260	257	275	272	267
<i>Ni</i>	416	425	402	307	296	269	290	283	285
<i>F</i>	422	379	357	304	322	324	341	299	367
<i>Ni</i>	346	387	365	361	331	378	380	386	375
<i>G</i>	345	387	366	370	351	423	403	386	409
<i>Ni</i>	257	283	281	175	269	281	308	298	320
<i>S</i>	271	281	266	273	260	264	309	312	302

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 76: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche (a₃) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der Kulturüberstände (TPGYT-Ansatz). Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Gruppen <i>Tp</i> + <i>PPYG</i> +	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>NiT</i>	2680	2609	2727	2829	2448	2372	1280	1175	1072
<i>AT</i>	2883	2580	2504	1870	1881	2107	1047	1041	1058
<i>NiT</i>	2680	2609	2727	2829	2448	2372	1280	1175	1072
<i>BT</i>	2510	2430	2522	2240	2429	2392	1137	1124	1082
<i>NiT</i>	2763	2753	2562	2557	2377	2099	1139	1167	1069
<i>CT</i>	2887	2570	2849	1980	1867	2415	1255	1255	1243
<i>NiT</i>	1633	1864	2095	2393	2401	2271	1139	1167	1069
<i>DT</i>	1914	1716	1826	2463	2087	2291	1150	1228	1191
<i>NiT</i> ⁺	880	866	1132	891	859	819	1013	834	738
<i>ET</i>	716	711	688	653	657	669	719	714	559
<i>NiT</i>	2674	2555	2661	2829	2448	2372	1280	1175	1072
<i>FT</i>	2855	2856	2860	2395	2244	2368	1141	1072	1135
<i>NiT</i>	2763	2753	2562	2557	2377	2099	1139	1167	1069
<i>GT</i>	2808	2590	2826	1596	1688	1805	1274	1270	1157
<i>NiT</i>	2810	3308	3094	2759	2763	2861	1091	1148	1049
<i>ST</i>	2672	2672	2764	2118	2237	2501	1063	1132	1025

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 77: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche (a₄) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der Kulturüberstände (TPGYT-Ansatz), Mediumleerkontrollen zu a₃. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
<i>PPYG +</i>	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>NiT</i>	464	512	516	327	391	367	380	378	390
<i>AT</i>	422	369	388	303	309	319	336	337	356
<i>NiT</i>	464	512	516	327	391	367	380	378	390
<i>BT</i>	371	375	384	384	384	367	388	390	372
<i>NiT</i>	344	341	333	422	357	376	355	342	328
<i>CT</i>	313	358	347	411	360	371	379	378	400
<i>NiT</i>	359	350	349	337	339	318	355	342	328
<i>DT</i>	319	351	376	323	309	321	316	321	325
<i>NiT⁺</i>	205	213	218	225	224	218	258	264	259
<i>ET</i>	221	228	215	221	242	235	258	274	271
<i>NiT</i>	464	512	516	327	391	367	380	378	390
<i>FT</i>	296	303	323	330	338	316	338	337	336
<i>NiT</i>	344	341	333	422	357	376	355	342	328
<i>GT</i>	351	325	334	283	319	341	343	355	335
<i>NiT</i>	306	302	336	265	254	248	284	295	264
<i>ST</i>	330	314	263	258	269	265	308	305	293

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Anhang

Tab. 78: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche mit den detoxifizierten Kulturüberständen (b₁) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der unbehandelten (u) und der erhitzten bzw. detoxifizierten (e) Kulturüberstände. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. Tp = *T. pyriformis*.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
<i>Tp</i> +									
<i>PPYG</i> +	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>NiT</i> ⁺ (u)	880	866	1132	891	859	819	1013	834	738
<i>ET</i> (u)	716	711	688	653	657	669	719	714	559
<i>NiT</i> ⁺ (e)	1369	1233	912	887	906	942	1261	1229	1213
<i>ET</i> (e)	811	758	727	698	612	635	1085	942	1044

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 79: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche mit den detoxifizierten Kulturüberständen (b₂) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der unbehandelten (u) und der erhitzten bzw. detoxifizierten (e) Kulturüberstände, Mediumleerkontrollen zu b₁. Angabe der mOD^(a), gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
<i>PPYG</i> +									
<i>PPYG</i> +	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>NiT</i> ⁺ (u)	205	213	218	225	224	218	258	264	259
<i>ET</i> (u)	221	228	215	221	242	235	258	274	271
<i>NiT</i> ⁺ (e)	199	205	206	233	250	240	229	243	237
<i>ET</i> (e)	209	203	206	260	236	234	257	274	265

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 80: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche mit den verdünnten Kulturüberständen (c_1) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der unbehandelten (u) und verdünnten neurotoxinhaltigen (v) Kulturüberstände. Angabe der $mOD^{(a)}$, gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm. $T_p = T. pyriformis$.

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
<i>Tp</i> +									
<i>PPYG</i> +	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>NiT</i> ⁺	880	866	1132	891	859	819	1013	834	738
<i>ET</i> (u)	716	711	688	653	657	669	719	714	559
<i>NiT</i> ⁺	1141	1019	1221	1326	1233	1190	1149	1242	1344
<i>ET</i> (v)	1175	1238	1380	729	945	1183	1362	1158	1077

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 81: Daten des Versuchsansatzes zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche mit den verdünnten Kulturüberständen (c_2) – Messung der Aktivität der sauren Phosphatase nach Zugabe der unbehandelten (u) und verdünnten neurotoxinhaltigen (v) Kulturüberständen. Angabe der $mOD^{(a)}$, Mediumleerkontrollen zu c_1 , gemessen bei 405 nm und einem Referenzfilter bei 620 nm).

Gruppen	Tag 1			Tag 2			Tag 3		
<i>PPYG</i> +									
<i>PPYG</i> +	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<i>NiT</i> ⁺	205	213	218	225	224	218	258	264	259
<i>ET</i> (u)	221	228	215	221	242	235	258	274	271
<i>NiT</i> ⁺	251	258	291	265	269	250	233	252	234
<i>ET</i> (v)	201	213	227	225	222	234	242	204	204

^(a) Die Messung der mOD ist bis zu einem Maximalwert von 3.500 möglich.

Tab. 82: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuche (a), TPGY-Ansatz, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>Ni</i>	1	9	0,00	0,12	A	1	9	- 0,19	0,11	0,004*
	2	9	0,00	0,21		2	9	0,07	0,19	0,468
	3	9	0,00	0,23		3	9	0,06	0,26	0,590
<i>Ni</i>	1	9	0,00	0,21	B	1	9	0,24	0,16	0,013*
	2	9	0,00	0,21		2	9	0,16	0,15	0,085
	3	9	0,00	0,23		3	9	0,03	0,18	0,763
<i>Ni</i>	1	9	0,00	0,09	C	1	9	0,05	0,15	0,388
	2	9	0,00	0,16		2	9	0,27	0,30	0,032*
	3	9	0,00	0,39		3	9	- 0,23	0,29	0,174
<i>Ni</i>	1	9	0,00	0,28	D	1	9	0,22	0,22	0,083
	2	9	0,00	0,16		2	9	- 0,16	0,15	0,042*
	3	9	0,00	0,39		3	9	- 0,02	0,41	0,903
<i>Ni</i> ⁺	1	9	0,00	0,23	E	1	9	2,53	0,29	< 0,001*
	2	9	0,00	0,50		2	9	2,32	0,37	< 0,001*
	3	9	0,00	0,34		3	9	1,99	0,28	< 0,001*
<i>Ni</i>	1	9	0,00	0,12	F	1	9	- 0,03	0,10	0,575
	2	9	0,00	0,21		2	9	0,28	0,21	0,012*
	3	9	0,00	0,23		3	9	0,07	0,22	0,539
<i>Ni</i>	1	9	0,00	0,28	G	1	9	0,19	0,28	0,171
	2	9	0,00	0,16		2	9	0,64	0,27	< 0,001*
	3	9	0,00	0,39		3	9	0,48	0,36	0,015*
<i>Ni</i>	1	9	0,00	0,10	S	1	9	0,32	0,07	< 0,001*
	2	9	0,00	0,16		2	9	0,67	0,33	< 0,001*
	3	9	0,00	0,46		3	9	0,27	0,33	0,178

^(a) signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Tab. 83: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuche (b), TPGYT-Ansatz, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>NiT</i>	1	9	0,00	0,12	<i>AT</i>	1	9	- 0,11	0,11	0,046*
	2	9	0,00	0,12		2	9	0,55	0,32	0,001*
	3	9	0,00	0,10		3	9	0,40	0,29	0,003*
<i>NiT</i>	1	9	0,00	0,12	<i>BT</i>	1	9	0,09	0,13	0,141
	2	9	0,00	0,12		2	9	0,13	0,16	0,066
	3	9	0,00	0,10		3	9	0,11	0,12	0,054
<i>NiT</i>	1	9	0,00	0,35	<i>CT</i>	1	9	- 0,14	0,28	0,353
	2	9	0,00	0,15		2	9	- 0,02	0,15	0,817
	3	9	0,00	0,25		3	9	0,34	0,35	0,032*
<i>NiT</i>	1	9	0,00	0,35	<i>DT</i>	1	9	- 0,36	0,27	0,027*
	2	9	0,00	0,15		2	9	- 0,01	0,39	0,963
	3	9	0,00	0,25		3	9	0,47	0,25	0,001*
<i>NiT⁺</i>	1	9	0,00	0,14	<i>ET</i>	1	9	2,27	0,11	< 0,001*
	2	9	0,00	0,37		2	9	3,40	0,26	< 0,001*
	3	9	0,00	0,32		3	9	2,21	0,26	< 0,001*
<i>NiT</i>	1	9	0,00	0,12	<i>FT</i>	1	9	0,12	0,10	0,029*
	2	9	0,00	0,12		2	9	0,16	0,11	0,008*
	3	9	0,00	0,10		3	9	- 0,08	0,22	0,336
<i>NiT</i>	1	9	0,00	0,35	<i>GT</i>	1	9	- 0,46	0,32	0,010*
	2	9	0,00	0,15		2	9	- 0,23	0,23	0,025*
	3	9	0,00	0,25		3	9	0,38	0,26	0,006*
<i>NiT</i>	1	9	0,00	0,31	<i>ST</i>	1	9	0,16	0,26	0,265
	2	9	0,00	0,61		2	9	- 0,62	0,47	0,027*
	3	9	0,00	0,43		3	9	- 0,44	0,34	0,027*

^(a) signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Tab. 84: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuche mit den detoxifizierten Kulturüberständen (c). (u) = unbehandelte und (e) = erhitzte bzw. detoxifizierte Kulturüberstände, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>Ni⁺</i> (u)	1	9	0,00	0,23	<i>E</i> (u)	1	9	2,53	0,29	< 0,001*
	2	9	0,00	0,50		2	9	2,32	0,37	< 0,001*
	3	9	0,00	0,34		3	9	1,99	0,28	< 0,001*
<i>Ni⁺</i> (e)	1	9	0,00	0,23	<i>E</i> (e)	1	9	2,12	0,19	< 0,001*
	2	9	0,00	0,30		2	9	2,72	0,25	< 0,001*
	3	9	0,00	0,45		3	9	2,22	0,33	< 0,001*
<i>NiT⁺</i> (u)	1	9	0,00	0,14	<i>ET</i> (u)	1	9	2,27	0,11	< 0,001*
	2	9	0,00	0,09		2	9	3,25	0,07	< 0,001*
	3	9	0,00	0,32		3	9	2,21	0,26	< 0,001*
<i>NiT⁺</i> (e)	1	9	0,00	0,28	<i>ET</i> (e)	1	9	2,87	0,25	< 0,001*
	2	9	0,00	0,05		2	9	2,00	0,22	< 0,001*
	3	9	0,00	0,08		3	9	3,11	0,13	< 0,001*

^(a) signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Tab. 85: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Phagozytoseversuch mit den verdünnten Kulturüberständen (d). (u) = unverdünnte und (v) = verdünnte Kulturüberstände, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>Ni⁺ (u)</i>	1	9	0,00	0,23	<i>E (u)</i>	1	9	2,53	0,29	< 0,001*
	2	9	0,00	0,50		2	9	2,32	0,37	< 0,001*
	3	9	0,00	0,34		3	9	1,99	0,28	< 0,001*
<i>Ni⁺ (v)</i>	1	9	0,00	0,20	<i>E (v)</i>	1	9	0,67	0,34	< 0,001*
	2	9	0,00	0,28		2	9	0,10	0,42	0,551
	3	9	0,00	0,10		3	9	- 0,23	0,14	0,001*
<i>NiT⁺ (u)</i>	1	9	0,00	0,14	<i>ET (u)</i>	1	9	2,27	0,11	< 0,001*
	2	9	0,00	0,09		2	9	3,25	0,07	< 0,001*
	3	9	0,00	0,32		3	9	2,21	0,26	< 0,001*
<i>NiT⁺ (v)</i>	1	9	0,00	0,25	<i>ET (v)</i>	1	9	- 0,32	0,43	0,078
	2	9	0,00	0,13		2	9	0,44	0,26	0,001*
	3	9	0,00	0,69		3	9	- 0,46	0,55	0,138

^(a) signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Anhang

Tab. 86: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche (a₁), TPGY-Ansatz, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>Ni</i>	1	9	1,00	0,07	A	1	9	0,86	0,04	< 0,001*
	2	9	1,00	0,04		2	9	0,78	0,03	< 0,001*
	3	9	1,00	0,02		3	9	0,89	0,05	< 0,001*
<i>Ni</i>	1	9	1,00	0,07	B	1	9	0,91	0,06	0,009*
	2	9	1,00	0,04		2	9	0,89	0,03	< 0,001*
	3	9	1,00	0,02		3	9	0,85	0,02	< 0,001*
<i>Ni</i>	1	9	1,00	0,02	C	1	9	1,24	0,08	< 0,001*
	2	9	1,00	0,08		2	9	1,07	0,03	< 0,001*
	3	9	1,00	0,06		3	9	1,02	0,15	0,720
<i>Ni</i>	1	9	1,00	0,02	D	1	9	1,10	0,05	< 0,001*
	2	9	1,00	0,05		2	9	1,24	0,06	< 0,001*
	3	9	1,00	0,06		3	9	1,14	0,07	0,001*
<i>Ni</i> ⁺	1	9	1,01	0,10	E	1	9	1,09	0,12	0,125
	2	9	1,00	0,09		2	9	0,81	0,06	< 0,001*
	3	9	1,00	0,72		3	9	0,77	0,08	< 0,001*
<i>Ni</i>	1	9	1,00	0,06	F	1	9	1,06	0,06	0,050
	2	9	1,00	0,04		2	9	0,71	0,04	< 0,001*
	3	9	1,00	0,02		3	9	0,96	0,02	< 0,001*
<i>Ni</i>	1	9	1,00	0,04	G	1	9	1,04	0,03	0,049*
	2	9	1,00	0,05		2	9	0,90	0,04	< 0,001*
	3	9	1,00	0,06		3	9	1,15	0,09	0,001*
<i>Ni</i>	1	9	1,00	0,05	S	1	9	1,02	0,05	0,424
	2	9	1,00	0,05		2	9	0,95	0,04	0,035*
	3	9	1,00	0,06		3	9	0,84	0,04	< 0,001*

^(a) signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Tab. 87: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche (a_3), TPGYT-Ansatz, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>NiT</i>	1	9	1,00	0,03	<i>AT</i>	1	9	1,04	0,08	0,206
	2	9	1,01	0,13		2	9	0,76	0,09	< 0,001*
	3	9	1,01	0,16		3	9	0,90	0,10	0,103
<i>NiT</i>	1	9	1,00	0,03	<i>BT</i>	1	9	0,97	0,03	0,069
	2	9	1,01	0,13		2	9	0,91	0,09	0,091
	3	9	1,01	0,17		3	9	0,93	0,11	0,248
<i>NiT</i>	1	9	1,00	0,06	<i>CT</i>	1	9	1,03	0,08	0,337
	2	9	1,01	0,15		2	9	0,88	0,16	0,092
	3	9	1,00	0,08		3	9	1,11	0,06	0,007*
<i>NiT</i>	1	9	1,02	0,19	<i>DT</i>	1	9	0,99	0,14	0,733
	2	9	1,00	0,04		2	9	0,97	0,09	0,366
	3	9	1,00	0,08		3	9	1,11	0,07	0,009*
<i>NiT⁺</i>	1	9	1,03	0,24	<i>ET</i>	1	9	0,66	0,10	0,001*
	2	9	1,00	0,07		2	9	0,68	0,04	< 0,001*
	3	9	1,04	0,29		3	9	0,68	0,19	0,008*
<i>NiT</i>	1	9	1,00	0,04	<i>FT</i>	1	9	1,20	0,03	< 0,001*
	2	9	1,01	0,13		2	9	0,93	0,09	0,145
	3	9	1,01	0,16		3	9	1,00	0,12	0,796
<i>NiT</i>	1	9	1,00	0,06	<i>GT</i>	1	9	1,02	0,07	0,470
	2	9	1,01	0,15		2	9	0,71	0,09	< 0,001*
	3	9	1,00	0,08		3	9	1,14	0,09	0,006*
<i>NiT</i>	1	9	1,01	0,11	<i>ST</i>	1	9	0,88	0,07	0,010*
	2	9	1,00	0,03		2	9	0,80	0,07	< 0,001*
	3	9	1,00	0,07		3	9	0,95	0,08	0,151

^(a) signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Tab. 88: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche mit den detoxifizierten Kulturüberständen (b₁). (u) = unbehandelte und (e) = erhitzte bzw. detoxifizierte Kulturüberstände, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>NiT⁺</i> (u)	1	9	1,03	0,24	<i>ET</i> (u)	1	9	0,66	0,10	0,001*
	2	9	1,00	0,07		2	9	0,68	0,04	< 0,001*
	3	9	1,04	0,29		3	9	0,68	0,19	0,008*
<i>NiT⁺</i> (e)	1	9	1,05	0,33	<i>ET</i> (e)	1	9	0,60	0,15	0,002*
	2	9	1,00	0,05		2	9	0,61	0,06	< 0,001*
	3	9	1,00	0,03		3	9	0,76	0,07	< 0,001*

^(a)signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Tab. 89: Angaben zur Statistik, Versuche zum Einfluss der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände, Exozytoseversuche mit den verdünnten Kulturüberständen (c₁). (u) = unverdünnte und (v) = verdünnte Kulturüberstände, Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe^(a).

KG	Tag	n	MW	SA	VG	Tag	n	MW	SA	p
<i>NiT⁺</i> (u)	1	9	1,03	0,24	<i>ET</i> (u)	1	9	0,66	0,10	0,001*
	2	9	1,00	0,07		2	9	0,68	0,04	< 0,001*
	3	9	1,04	0,29		3	9	0,68	0,19	0,008*
<i>NiT⁺</i> (v)	1	9	1,01	0,15	<i>ET</i> (v)	1	9	1,23	0,17	0,009*
	2	9	1,00	0,09		2	9	0,74	0,20	0,004*
	3	9	1,01	0,12		3	9	0,98	0,15	0,726

^(a)signifikante Mittelwertsdifferenzen, t-Test

* = signifikante Mittelwertsdifferenzen

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. M. Krüger für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Darüber hinaus bin ich ihr außerordentlich für ihre stete, begeisternde Unterstützung sowie für die fortwährende Bereitschaft zur offenen und kritischen Diskussion zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. W. Schrödl danke ich für seine Bereitwilligkeit zu zahl- und hilfreichen praktischen Ratschlägen und Hinweisen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei den anderen Mitarbeitern des Institutes für Bakteriologie und Mykologie.

Mein Dank geht weiterhin an Herrn Prof. Dr. A. Rodloff vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die Bereitstellung von Bakterienstämmen sowie Arbeitsmöglichkeiten in den Laborräumen des Institutes. Bei seinen Mitarbeitern bedanke ich mich herzlich für ihre Unterstützung. Besonders sei Herr Dr. J. Beer hervorgehoben für seine fortwährende und unkomplizierte Hilfsbereitschaft bei der Produktion der neurotoxinhaltigen Kulturüberstände sowie sich daraus ergebender Probleme. Weiterhin danke ich Frau A. Albrecht für ihre freundliche und zuverlässige Bereitschaft, benötigte Medien und Sterilisiergut in ausreichender Menge für mich auch kurzfristig und außerplanmäßig vorzubereiten.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Böhnel sowie Herrn Dr. F. Gessler vom Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion in den Tropen und Subtropen, Göttingen, danke ich für die Bereitstellung von Bakterienstämmen sowie die Durchführung der Maus-Bioassays zur Bestimmung der MLD in den neurotoxinhaltigen Kulturüberständen.

Herrn Dr. W. Pauli aus dem Institut für Biologie der Freien Universität Berlin bin ich für die Bereitstellung der Protozoenstämmen sowie die Hilfe bei „Protozoenfragen“ zu Dank verpflichtet. In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn Prof. Dr. M. Schlegel vom Institut für Biologie II der Universität Leipzig, Herrn Prof. Dr. A. Tiedtke vom Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Münster und Herrn Prof. Dr. K. Hausmann vom Institut für Biologie/ Zoologie der Freien Universität Berlin. Bei Herrn Prof. Dr. K. Hausmann bedanke ich mich weiterhin für die freundliche Hilfe bei der Suche nach Originalliteratur zur Erstbeschreibung von *T. pyriformis*.

Herrn A. Richter von der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig danke ich sehr für die stete freundliche und schnelle Unterstützung bei der biostatistischen Auswertung meiner Daten.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meiner Mutter und meinem Vater dafür, dass sie mir den gewählten Weg ermöglichten, mich darin bestärkten und unterstützten. Ausdrücklich sei nochmals meiner Mutter für ihre Hilfe bei der Übersetzung der russischen Originalliteratur sowie für die Durchsicht des Gesamtwerkes gedankt.