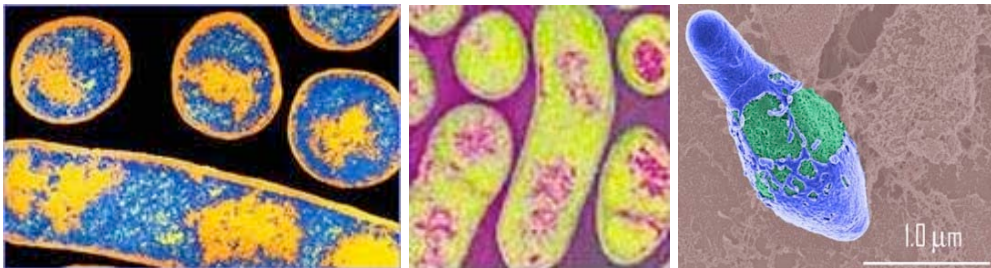


Gruppe 06:
Mikroorganismen für die Produktion von Nahrungsmittel, pharmazeutischen
Erzeugnissen und anderen biotechnologischen Produkten:

Clostridium botulinum:
Botulinum-Toxin Typ A: Synthese im
Bakterium und industrielle Herstellung



Eine Fallstudie von:
Nadine Schmid

Wahlmodul Bio 126: Diversität der Mikroorganismen, Sommersemester 2006
Universität Zürich Irchel

ABSTRACT

Clostridium botulinum ist ein grampositives, obligat anaerobes Bakterium, das ein hoch potentes Neurotoxin herstellt. In dieser Arbeit wird die Synthese des Botulinumtoxins im Bakterium und dessen industrielle Gewinnung untersucht. Botulinum-Toxin Typ A besteht aus zwei Polypeptidketten, die mit weiteren Proteinen einen Komplex bilden. Durch Blockierung der Acetylcholinausschüttung bewirkt es eine Lähmung der Muskulatur. Diesen Effekt macht man sich in der Medizin für verschiedene Anwendungen zu nutze.

Das Toxin, welches bemerkenswerterweise wahrscheinlich nicht im Bakteriengenom selbst, sondern in Phagen genom codiert ist, wird in der Bakterie zuerst als inaktiver Vorläufer produziert und dann durch proteolytische Enzyme aktiviert. Die Sekretion des Neurotoxins ins Kulturmedium ist noch nicht verstanden. Die lange Zeit vorherrschende Hypothese, dass die Autolyse der Zelle das Gift freisetzt, kann nach neueren Studien nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Die pharmazeutische Industrie, die Botulinum-Toxin-Zubereitungen für medizinische Anwendungen herstellt, muss sich vor allem mit Problemen der Reinheit und Stabilität des Produktes auseinandersetzen. Für beide Herausforderungen wurden aber Lösungen gefunden.

EINLEITUNG

"Botox" ist heute im Zusammenhang mit Anti-Falten-Behandlungen in aller Munde. Kaum jemand aber weiss, dass hinter diesem Markennamen das stärkste bekannte Gift, Botulinum-Toxin Typ A, steckt, welches von einem Bakterium namens *Clostridium botulinum* produziert wird. Dieses Neurotoxin war früher verantwortlich für viele fatale Lebensmittelvergiftungen. Ebenfalls wenig bekannt ist, dass es u.a. bereits ab ca. 1980 als wirksames Mittel in der Ophthalmologie eingesetzt wird, um Blepharospasmen (Lidkrämpfe) zu behandeln oder um bei Augenmuskelparesen die Doppelbildproblematik zu bekämpfen. Aus diesem Anwendungsgebiet geht denn auch meine Motivation hervor, die Fallstudie diesem Bakterium und seinem Produkt zu widmen: als ausgebildete Orthoptistin bin ich häufig mit der therapeutischen Wirkung des Neurotoxins in der Strabologie in Berührung gekommen.

Aber ungeachtet dessen ist es faszinierend zu wissen, dass das stärkste Gift überhaupt von einem Mikroorganismus synthetisiert wird und nicht, wie man vermuten könnte, künstlich erzeugt wird. Deshalb soll hier nebst einer kurzen Vorstellung des Bakteriums und des Toxins vor allem untersucht werden, wie *Clostridium botulinum* das Botulinum-Toxin A produziert und wie die pharmazeutische Industrie diese Erkenntnisse nutzt, um ihre Produkte aus dem Neurotoxin herzustellen.

DAS BAKTERIUM *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Systematik:

Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium; *Clostridium botulinum*

C. botulinum ist ein grampositives, Sporen bildendes, obligat anaerobes Bakterium mit niedrigem GC-Gehalt. Clostridien sind weltweit verbreitet. Das wichtigste Habitat

ist der Boden, sie kommen aber ebenso in marinen Sedimenten und im Verdauungstrakt von Säugetieren vor.

Clostridium botulinum wird als einzelne Art klassifiziert, besteht jedoch aus mindestens drei genetisch unterscheidbaren Gruppen von Organismen. Alle diese Gruppen haben die Fähigkeit, Neurotoxine zu produzieren. Die sieben verschiedenen Toxintypen werden mit A bis G bezeichnet, wovon A, B und E für den Menschen toxisch sind.

BOTULINUMTOXIN TYP A

Summenformel: $C_{31}H_{42}N_2O_6$

CAS-Nummer: 23509-16-2

Toxizität: LD₅₀-Wert: intravenös oder subkutan 1 ng/kg Körpermasse,
Inhalation 3 ng/kg Körpermasse

Struktur:

Das aktive Botulinumtoxin Typ A besteht aus zwei Polypeptidketten mit einer Molekülmasse von ca. 150 kDA. Die beiden Untereinheiten sind durch Disulfid-Brücken verbunden. Die grosse Untereinheit (ca. 100 kDA) bewirkt eine hohe Spezifität gegenüber Cholinrezeptoren und fördert die Translokation der kleineren Kette durch die Axonenmembran, während die kleine Untereinheit (ca. 50 kDA) als Zink-Endopeptidase mit proteolytischen Fähigkeiten wirkt.

Das Toxin bildet Komplexe mit verschiedenen, assoziierten nichttoxischen Proteinen und bildet so ein heteromeres bioaktives Makromolekül von ca. 900kDA, das neben der Toxizität noch andere Eigenschaften wie zum Beispiel Hämagglutinations-Aktivität aufweist.



Abbildung 1: Proteinstruktur des Botulinum Toxins Typ A

Wirkungsweise

Botulinumtoxin hemmt die Acetylcholinausschüttung und bewirkt so eine Lähmung der Muskulatur.

Dazu bindet das Neurotoxin an die präsynaptische Membran des Motoneurons an der motorischen Endplatte. Es durchdringt die Membran und dringt in das Cytoplasma des Axons ein. Dort wird die Disulfid-Bindung zwischen der schweren und der leichten Peptidkette aufgebrochen. Durch die Zink-Endopeptidase-Funktion der kleinen Untereinheit wird die Sekretion von Acetylcholin blockiert. Normalerweise überträgt dieser Neurotransmitter das elektrische Signal der Nerven auf den Muskel und stimuliert diesen zur Kontraktion. Bei einer Blockierung dieses Mechanismus können folglich keine Signale mehr übertragen werden, was zu einer schlaffen Parese bis Paralyse des Muskels führt.

Vergiftungen / medizinische Anwendungsgebiete

Da *C. botulinum* natürlicherweise im Boden vorkommt, können durch unsorgfältige Handhabung Lebensmittel damit kontaminiert werden. Unter anoxischen Bedingungen, wie sie vor allem in Konserven, selbst eingemachtem Gemüse, vakuumverpackten Lebensmittel oder im Innern von grossvolumigen Nahrungsmitteln herrschen, können sich die Bakterien vermehren und beim Verzehr Vergiftungserscheinungen hervorrufen. Bei Säuglingen stellt der Verzehr von nicht erhitztem Honig eine zusätzliche Quelle von Botulismus dar: nach Aufnahme von Clostridien-Sporen können diese in der noch nicht voll entwickelten Darmflora von Kleinkindern keimen und ihre Toxine freisetzen.

Unbehandelt schreiten die Symptome einer Intoxikation von leichter muskulärer Schwäche der inneren und äusseren Augenmuskeln über Schluckstörungen bis zu generalisierter Muskellähmung der inneren Organe fort. Dies kann unbehandelt zum Tod durch Atemmuskulaturlähmung oder Herzstillstand führen. Die Behandlung umfasst die Injektion eines Antitoxins und frühzeitige Massnahmen zur Unterstützung der Atmung.

Die muskellähmende Wirkung des Neurotoxins wird aber auch für verschiedene medizinische Anwendungen ausgenutzt. Es gibt heute drei grössere Anwendungsgebiete: in der Neurologie zur Behandlung von Dystonien (unwillkürliche Muskelkrämpfe), in der Strabologie zum Erzeugen einer Gegenparese bei einer Augenmuskellähmung (und damit Linderung bei Doppelbildern) und in der kosmetischen Medizin zur Glättung von Mimikfalten.

TOXINSYNTHESE IM BAKTERIUM

Die Neurotoxine, die von *Clostridium botulinum* hergestellt werden, spielen im Metabolismus des Bakteriums keine Rolle. Der beste Beweis hierfür ist die Entdeckung von *C. botulinum*-Stämmen, die kein Toxin produzieren. Ausserdem kann das bakterielle Wachstum durch bestimmte Inhibitoren von der Toxinproduktion losgekoppelt werden. Und nicht zuletzt kann das Bakterium nur in Anwesenheit von Glucose das Toxin synthetisieren, während das Wachstum des Bakteriums davon unabhängig ist.

All diese Resultate führten zur Annahme, das etwas anderes als das Bakterium selbst die Synthese des Toxins lenkt. Zur Zeit gibt es für die Botulinum-Toxine der Typen C und D den Beweis, das sie auf lysogenen Bakteriophagen, die spezifisch sind für *C. botulinum*, codiert sind. Mit anderen Worten: eine Infektion des *C. botulinum* mit Bakteriophagen ist für die Toxinproduktion ausschlaggebend. Für die anderen Stämme wurde ein solcher Beweis noch nicht erbracht, allerdings wurden auch hier im Bakteriengenom Phagenpartikel nachgewiesen und es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der selbe Mechanismus zur Toxinsynthese führt.

Das Botulinum Toxin Typ A wird innerhalb des Bakteriums zuerst in einer inaktiven Form synthetisiert. Dabei besteht das Toxin aus einer einzelnen Polypeptidkette von ca. 150'000 DA. Um das Toxin zu aktivieren, ist eine Modifikation der Tertiärstruktur notwendig. Dazu wird die Polypeptidkette durch Trypsin oder durch andere proteolytische Enzyme in eine grosse und eine kleine Untereinheit im Verhältnis 2:1 gespalten ("Nicking"). Nur so erlangt das Protein seine volle Wirkkraft. Die beiden Polypeptidketten werden anschliessend durch mindestens eine Disulfid-Brücke verbunden, was ebenfalls ein essentieller Schritt darstellt. Ohne Disulfid-Bindungen verlieren die Proteine ihre Toxizität.

Der Mechanismus und die Signalkaskaden, welche die Neurotoxinsynthese kontrollieren, sind noch kaum verstanden, ebenso wenig wie der Export ins Kulturmedium.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass das Toxin während der Autolyse der Bakterien freigesetzt wird. Einzelne ältere Untersuchungen und neueste Studien zeigen aber, dass die Toxinkonzentration im Medium unabhängig von der Zellyse ist.

Das Wachstum von *C. botulinum* zeigt eine typische Kurve mit kurzer lag-Phase, gefolgt von einer Phase mit exponentiellem Wachstum und einer anschließenden stationären Phase, die ca. 10 h nach Beginn des Wachstums einsetzt.

Die Toxinkonzentration hingegen beginnt mit dem Einsetzen des exponentiellen Wachstums zu steigen und erreicht ihr Maximum nach ca. 24 h. Diese Konzentration bleibt dann bei weiterer Inkubation noch für einige Tage (72h bis 5 Tage) erhalten. Wenn man die Wachstumskurve und die Toxinkurve miteinander vergleicht, geht daraus klar hervor, dass die Toxinkonzentration im Medium den Maximalwert erreicht, noch bevor die Autolyse ein nennenswertes Ausmass angenommen hat. (Abbildung 2). Es muss also von einem anderen, zur Zeit noch unklaren Mechanismus ausgegangen werden.

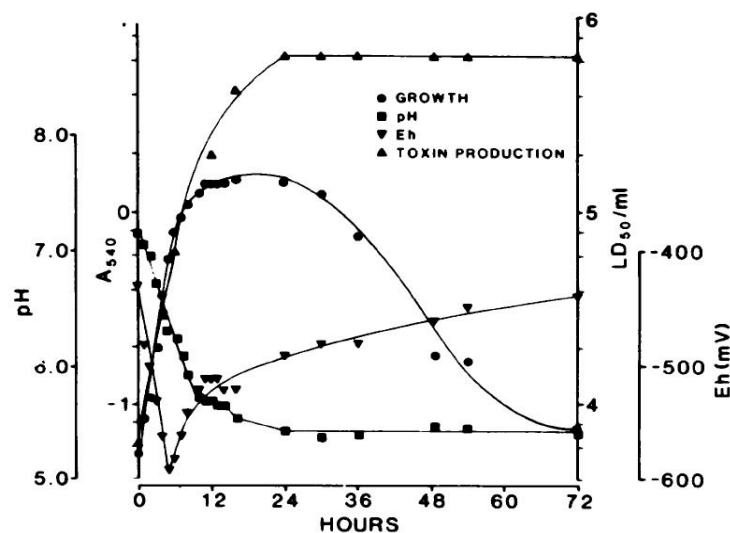


Abbildung 2: Wachstumskurve von *C. botulinum* (●, Messung der Optischen Dichte) und Toxinkonzentration im Medium (▲, in Maus-Lethal-Dosis pro ml)

INDUSTRIELLE HERSTELLUNG VON BOTULINUM-TOXIN

Botulinumtoxin war das erste mikrobielle Protein, das zur Injektion am Menschen von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zugelassen wurde. Entsprechend gross waren (und sind noch immer) die Herausforderungen. Das wichtigste Kriterium, um eine solche Substanz anwenden zu können, ist deren Reinheit. Das heisst, die Fermentation und die Aufbereitung des Toxins müssen so durchgeführt werden, dass es keinen kontaminierenden Substanzen ausgesetzt wird. Diese Einschränkung erfordert zum Beispiel die Kultivierung in einem klar definierten Medium ohne tierische Zusätze und Reinigungsprozesse ohne Gebrauch von synthetischen Lösungsmitteln. Eine andere Herausforderung ist die Stabilisierung des Toxins über längere Zeitperioden und unter grosser Verdünnung.

Fermentationsbedingungen

Die wichtigste Bedingung zur Kultivierung von *C. botulinum* in Fermentoren stellt natürlich der vollständige Ausschluss von Sauerstoff dar, da Clostridien obligat anaerob sind. Die anderen bedeutsamsten Komponenten, pH-Wert, Kohlenhydratquelle, Temperatur und Inkubationszeit, sollen hier kurz beschrieben werden:

pH-Wert:

Der optimale pH-Wert des Kulturmediums für das Wachstum von *Clostridium botulinum* beträgt zwischen 5.5 und 7.0. Werte bis 8.3 ermöglichen zwar das Wachstum noch, jedoch in geringerem Ausmass. Unter 5.5 ist der Organismus nicht in der Lage zu wachsen. Die Toxinsynthese wird durch den pH-Wert nicht beeinflusst, solange er der Bandbreite des optimalen Wachstums entspricht.

Kohlenhydrat-Quelle:

Glucose ist für die Toxinsynthese essentiell. In einem Medium mit Glucose beträgt die Toxinkonzentration ca. das 1000-fache verglichen mit einem Medium ohne zusätzliche Kohlenhydratquelle. Andere Kohlenhydrate wie Maltose, Ribose oder Lactose erhöhen die Toxinproduktion nur wenig.

Das Wachstum der *C. botulinum*-Kultur ist ebenfalls optimal mit zusätzlicher Glucose; andere Kohlenhydrate wie Maltose oder Glycerol erzielen jedoch annähernd die selben Resultate.

Temperatur

Temperaturen zwischen 28°C und 40°C unterstützen sowohl das Wachstum wie auch die Toxinproduktion optimal.

Inkubationszeit

Nach 24 Stunden ist die maximale Toxinkonzentration erreicht. Längere Inkubationszeiten erhöhen den Toxingehalt im Medium nicht.

DISKUSSION

Unter welchen effektiven Bedingungen findet die industrielle Herstellung von Botulinum-Toxin-Präparaten also statt und wie sieht deren Aufbereitung aus?

Medium

Gemäss den vorliegenden Quellen ist die Zusammensetzung eines optimalen Mediums immer in etwa die selbe: Es wird 2% Kasein-Hydrolysate, 1% Hefeextrakte und 0.5% bis 1% Glucose verwendet. Dies ist ein relativ schlecht definiertes Medium, weil es Extrakte aus anderen Organismen enthält.

Fermentoren-Einstellungen

Die "Umweltbedingungen" variieren je nach Quelle; eine Möglichkeit wäre beispielsweise:

Temperatur: ca. 35°C,

pH-Wert: 7.0

Rührgeschwindigkeit: 50 Umdrehungen/Minute

Stickstoffdurchfluss: 5 Liter/Minute

Aufbereitung/Downstream processing

Die genauen Aufbereitungsmethoden, wie sie heute in der pharmazeutischen Branche angewendet werden, sind nicht öffentlich bekannt. Im Groben bestehen sie aus Dialyse und verschiedenen Aufarbeitungsschritten mit Säure.

Die Dialyse dient dabei der groben (Vor-)Reinigung. Mit Hilfe einer semipermeablen Membran, die nur Moleküle von geringer Grösse durchlässt (bis ca. 6000 DA), und einer Lösung mit niedrigem Ionengehalt können die Toxine von unerwünschten kleinen Molekülen gereinigt werden.

Die anschliessende tiefgehende Reinigung kann dann zum Beispiel wie folgt stattfinden: Mit Säure wird ein pH-Wert von 3.5 eingestellt, dabei fallen ca. 90% des Toxins aus. Der Niederschlag wird mit Wasser gewaschen und das Neurotoxin mit 1M Salzlösung bei pH 6.5 extrahiert. Anschliessend wird wiederum mit Säure bei einem pH von 3.7 das Toxin ausgefällt, mit 0.05M Natrium-Phosphat-Puffer extrahiert und nochmals in 15% Ethanol ausgefällt. Dann wird der Niederschlag in Phosphat-Puffer aufgelöst und schliesslich in 0.9M Ammoniumsulfat auskristallisiert.

Auf diese Art und Weise kann von einer 12-Liter-Kultur 60 bis 70 mg hochreines, kristallines Botulinum-Toxin Typ A gewonnen werden.

Da das Toxin in dieser reinen Form, ohne assoziierte Proteine, ziemlich instabil ist, wird zur Stabilisierung humanes Albumin in NaCl-Lösung dazugegeben. Es bildet sich ein Toxin-Komplex, der wesentlich stabiler ist und damit besser geeignet zur Aufbewahrung. Für die medizinische Nutzung muss der Toxin-Komplex noch mittels Membranfilter steril abgefiltert werden. Dann kann er in Ampullen abgefüllt und zur Fertigstellung vakuumgetrocknet werden.

QUELLEN

Text:

Simpson L.L.; 1981; The Origin, Structure, and Pharmacological Activity of Botulinum Toxin; Pharmacological Reviews, Vol. 33, No. 3, p. 155-188

Couesnon A., Raffestin S., Popoff M.R.; 2006; Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcriptase-PCR; Microbiology (2006) 152, p. 759-770

Schantz E.J., Johnson E.A.; 1992; Properties and Use of Botulinum Toxin and Other Microbial Neurotoxins in Medicine; Microbiological Reviews, Vol. 56, No. 1, p. 80-99

Siegel L.S., Metzger J.F.; 1979; Toxin Production by Clostridium botulinum Type A under Various Fermentation Conditions; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 38, No. 4, p. 606-611

Bonventre P.F., Kempe L.L.; 1959; Physiology of Toxin Production by Clostridium botulinum Types A and B, II. Effect of Carbohydrate Source on Growth, Autolysis and Toxin Production; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 7, p. 372-374

Bonventre P.F., Kempe L.L.; 1959; Physiology of Toxin Production by Clostridium botulinum Types A and B, III. Effect of pH and Temperature During Incubation on Growth, Autolysis and Toxin Production; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 7, p. 374-377

Nantel A.J.; 1999; International Programme on Chemical Safety, Poisons Information Monograph 858; World Health Organization; <http://www.who.int/csr/deliberatedemics/clostridiumbotulism.pdf>

Allergan Inc.; Botox Prescribing Information; <http://www.allergan.com/download/BotoxPI.pdf>

Internet:

Systematik von C. botulinum:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=36826&lvl=6&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Wikipedia, Begriff Botulinumtoxin:

<http://de.wikipedia.org/wiki/Botulinumtoxin>

Abbildungen:

Titelbild (von links nach rechts)

http://www.stern.de/wissenschaft/gesund_leben/aktuell/246579.html?eid=501075

<http://www.who.int/csr/deliberatedemics/botulism/en/>

<http://www.kennislink.nl/web/show?id=127426>

Abbildung 1:

RCSB Protein Data Banc; <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3BTA>

Abbildung 2:

Siegel L.S., Metzger J.F.; 1979; Toxin Production by Clostridium botulinum Type A under Various Fermentation Conditions; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 38, No. 4, p. 606-611