

Entwicklung hochsensitiver Biosensoren für neurotoxische Insektizide in Lebensmitteln:

Enzymatische *in-vitro* Aktivierung von Phosphorthionaten mit der Monooxygenase P450-BM3 und Sensitivitätssteigerung durch Proteindesign von Acetylcholinesterase.

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Holger Schulze
aus Waiblingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Vorsitzender: Prof. Dr. Helmut Bertagnolli
Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2003

In memoriam
Ernst Schulze

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Bereitstellung des Themas, die dabei überlassenen Freiheiten und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Technische Biochemie.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Dr. Till T. Bachmann danke ich sehr für die Betreuung dieser Arbeit, verbunden mit unzähligen, fruchtbaren Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit erheblich beitrugen.

Dr. Francois Villatte danke ich für die Unterstützung bei den gentechnischen Arbeiten mit Acetylcholinesterase und bei der Auswahl der Acetylcholinesterase-Mutanten.

Susanne Münch, Michael Waibel und Norbert Huber danke ich sehr für ihre Hilfe und Mitarbeit an diesem Projekt im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Lars Lauterbach, Karin Richter, Anja Henn, Marco Hofmann und Antje Elsner danke für die engagierte Mitarbeit.

Daniel Appel, Dr. Vlada Urlacher, Oliver Lenz und Steffen Maurer danke ich für die Hilfe bei der Arbeit mit Cytochrom P450.

Ich danke allen Mitgliedern der Biosensorgruppe für die Unterstützung und für das sehr gute Arbeitsklima und auch allen anderen Mitgliedern des Institutes, die mir in unzähligen Situationen in unterschiedlichster Form geholfen haben.

Ellen Scherbaum und Dr. Michelangelo Anastassiades vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart danke ich für die Bereitstellung von Realproben und die GC/LC-MS-Untersuchungen der Säuglingsnahrungs-Proben.

Ich danke der Europäischen Union für die finanzielle Unterstützung des ACHEB-Projektes (QLK3-2000-00650) und den beteiligten Partnergruppen, insbesondere Prof. Dr. Frieder Scheller und Dr. Alexander Makower von der Universität Potsdam.

Mein ganz besondere Dank gilt meinen Eltern, meinem Vater Ernst Schulze, der das Ende dieser Arbeit leider nicht mehr erleben durfte und meiner Mutter Käthe Schulze, sowie meinem Bruder Bodo Schulze.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
2	ENGLISH SUMMARY	8
3	EINLEITUNG	14
3.1	ORGANOPHOSPHAT UND CARBAMAT-INSEKTIZIDE	15
3.2	PHOSPHORTHIONATE	19
3.3	ACETYLCHOLINESTERASE	21
3.3.1	<i>Die funktionale Architektur des aktiven Zentrums</i>	22
3.3.2	<i>Nippostrongylus brasiliensis AChE</i>	23
3.3.3	<i>Strukturelle Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber kovalenten Inhibitoren</i>	24
3.3.4	<i>Auswahl der Positionen für die ortsspezifische Mutagenese</i>	29
3.4	ACHE-BIOSENSOREN	33
3.5	ZIELSETZUNG	37
4	MATERIAL UND METHODEN	38
4.1	CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN	38
4.2	VERWENDETE MIKROORGANISMEN UND PLASMIDE	40
4.3	KULTURMEDIE	41
4.4	PUFFER UND ANTIBIOTIKA	41
4.5	BIOSENSORTEST FÜR LEBENSMITTEL	42
4.5.1	<i>Spektrophotometrischer Enzymaktivitätstest</i>	42
4.5.2	<i>Berechnung der Enzymaktivität</i>	43
4.5.3	<i>Produktion von Dickschichtelektroden</i>	43
4.5.4	<i>Biosensor-Messung</i>	44
4.6	ENZYMATISCHE PROBENVORBEHANDLUNG	46
4.6.1	<i>30 L Batch-Fermentation</i>	46
4.6.2	<i>Zellaufschluß</i>	46
4.6.3	<i>GC-MS/MS Untersuchung der Reaktionsprodukte</i>	46
4.6.4	<i>P450 BM-3 Aktivierung von Phosphorthionaten in Puffer</i>	46
4.6.5	<i>Optischer AChE Aktivitätstest</i>	47
4.6.6	<i>P450 BM-3 Aktivierung von Phosphorthionaten in Lebensmittelproben</i>	47
4.6.7	<i>Chemische Aktivierung von Phosphorthionaten mit NBS</i>	47
4.6.8	<i>Bestimmung der P450-Konzentration durch CO-Differenzspektroskopie</i>	47
4.6.9	<i>Aktivitätstest von P450 BM-3 mittels 10-pNCA-Assay</i>	48
4.7	SENSITIVITÄTSSTEIGERUNG DURCH ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE	49
4.7.1	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	49
4.7.2	<i>Allgemeine molekularbiologische Methoden</i>	51
4.7.3	<i>Bestimmung der Hemmkonstante k_i</i>	55
4.7.4	<i>Multienzymsensor-Herstellung</i>	56
4.7.5	<i>Strukturmodell von Nippostrongylus brasiliensis AChE</i>	57
5	ERGEBNISSE	58
5.1	BIOSENSORTEST FÜR LEBENSMITTEL	58
5.1.1	<i>Vermeidung von Matrixeffekten</i>	58
5.1.2	<i>Sensor-Charakterisierung</i>	59
5.1.3	<i>Validierung mit Standardverfahren</i>	61
5.1.4	<i>Untersuchung von Babynahrung</i>	63
5.2	ENZYMATISCHE PROBENVORBEHANDLUNG	69
5.2.1	<i>GC-MS/MS Analyse der Reaktionsprodukte der P450-Aktivierung</i>	69
5.2.2	<i>AChE-Hemmtest mit enzymatisch aktivierten Phosphorthionaten</i>	72
5.2.3	<i>Phosphorthionat-Aktivierung in Lebensmittelproben</i>	74
5.3	SENSITIVITÄTSSTEIGERUNG DURCH ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE	75
5.3.1	<i>Klonierung von Nippostrongylus brasiliensis AChE in pPICZαB</i>	75
5.3.2	<i>Expression in Pichia pastoris</i>	80
5.3.3	<i>Proteinreinigung</i>	84
5.3.4	<i>Bestimmung der Hemmkonstanten</i>	85
5.3.5	<i>Biosensortests mit ausgewählten NbAChE-Mutanten</i>	103
6	DISKUSSION	105

6.1	ACHÉ-BIOSENSORTTEST FÜR LEBENSMITTEL	106
6.2	NOTWENDIGKEIT DER ENZYMATISCHEN PHOSPHORTHIONATAKTIVIERUNG	109
6.3	P450 BM-3 KATALYSIERTE AKTIVIERUNG VON PHOSPHORTHIONATEN	109
6.4	SENSITIVITÄTSSTEIGERUNG DURCH PROTEIN-DESIGN	112
6.5	AUSBLICK	118
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	134
8	LEBENS LAUF	136
9	ERKLÄRUNG	137

Abkürzungen

Å	Ångström
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
BCh	Butyrylcholin
BChE	Butyrylcholinesterase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
CVUA	Chemisches- und Veterinäruntersuchungsamt
Da	Dalton
DEFP	Diethyl-Phosphorfluoridat
DEFP	Diethyl-Phosphorfluoridat
DFP	Diisopropyl-Phosphorfluoridat
DFP	Diisopropyl-Phosphorfluoridat
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ee	<i>Electrophorus electricus</i> (Zitteraal)
EU	Europäische Union
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
Hu	Human
kb	Kilobase
ki	bimolekulare Geschwindigkeitskonstante (Hemmkonstante)
L	Liter
LB	Luria Bertani (Flüssigmedium)
MS	Massenspektrometrie
m/v	Masse pro Volumen
n.d.	nichts detektiert
n.u.	nicht untersucht
Nb	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
NBS	N-Bromsuccinimid
OD	Optische Dichte
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Rb	Rattenhirn
Re	Rindererythrozyten
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Temperatur
t	Tonne
Tc	<i>Torpedo californica</i>
TEMED	N,N,N',N'' tetramethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro min
V	Volumen
v/v	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m s ⁻²)

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines sensitiven AChE-Biosensors für den quantitativen summarischen Nachweis neurotoxischer Organophosphate und Carbamate in Lebensmitteln und Säuglingsnahrung.

Für die Untersuchung von Lebensmittelproben musste ein Verfahren entwickelt werden, welches unspezifische Matrixeinflüsse verhindert. Dies gelang durch Eingliederung einer Elektrodenbehandlung mit dem Tensid Tween 20 in das Testprotokoll. Dieser Schritt reduzierte die Probenvorbehandlung auf ein Minimum und lieferte ausgezeichnete Wiederfindungsraten von durchschnittlich 85% in den getesteten Lebensmittelproben. Der Biosortest wurde mit Realproben vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart erfolgreich validiert. Die Anwendbarkeit konnte im Rahmen einer gemeinsamen Studie mit dem CVUA Stuttgart gezeigt werden, in der Babybrei-Proben aus vier Ländern untersucht wurden. Hierbei wurden drei Überschreitungen des EU-Grenzwertes für Säuglingsnahrung festgestellt.

Für Phosphorthionate konnte eine neuartige Aktivierungsmethode entwickelt werden. Phosphorthionate stellen den Hauptanteil der als Insektizide eingesetzten Organophosphate dar, sind in ihrer ursprünglichen Form dem AChE-Hemmtest aber nicht zugänglich. Die Dreifachmutante F87V, L188Q, A74G war im Gegensatz zum Wildtyp Cytochrom P450 BM-3 in der Lage, die Oxidation von Phosphorthionaten in die korrespondierenden starken AChE-Inhibitoren zu katalysieren. Die Analyse der Reaktionsprodukte mittels GC-MS/MS ergab eine quasi quantitative Umsetzung von Parathion und Chlorpyrifos zu Paraoxon bzw. Chlorpyrifos-oxon. Der indirekte Nachweis der enzymatisch aktivierten Phosphorthionate über die AChE-Hemmwirkung lieferte eine Transformationseffizienz von 85% für Parathion und 99% für Chlorpyrifos. Dieses Verfahren wurde erfolgreich in Lebensmittelproben getestet. Dies bedeutet eine deutliche Steigerung des Analytspektrums von AChE-Biosensoren.

Die Sensitivität des AChE-Biosensors konnte durch Protein-Design von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE gesteigert werden. Es wurden zehn Einfachmutanten und eine Mutante mit zusätzlicher Insertion von 26 Aminosäuren mittels ortsspezifischer Mutagenese hergestellt und in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. Die Ausbeute des Wildtyps konnte durch optimierte Kultivierungsbedingungen in einem 5L Fermenter auf 0,6 g/L gesteigert werden. Dieser Wert liegt deutlich über allen bislang erreichten Expressionsraten rekombinanter AChEn. Die AChE-Mutanten wurden im Hinblick auf ihre Sensitivität gegenüber den 11 wichtigsten Organophosphaten und Carbamaten getestet. Die Mutation M301(288)A in der Acyltasche des aktiven Zentrums der AChE lieferte die insgesamt sensitivste Mutante. Gegenüber Omethoat ergab sich eine 108-fache Sensitivitätssteigerung. Die Sensitivität gegenüber Pirimiphos-methyl konnte ebenfalls um zwei Größenordnungen gesteigert werden. Insgesamt konnte die Sensitivität gegen 10 von 11 getesteten Insektizide erhöht werden. Damit konnte das Ziel, Konzentrationen im Bereich des Pestizidgrenzwertes von Säuglingsnahrung von 10 µg/kg zu detektieren, für acht 8 der 11 getesteten Insektizide erreicht werden.

2 English summary

Pesticides are widely used in agriculture to increase yield, control microorganisms, which might produce toxic or carcinogenic metabolites, and reduce the costs of food production. The majority of applied insecticides are acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, namely organophosphates and carbamates. These pesticides are intended to kill living organisms, and a potential dose-related acute and chronic toxicity exists in humans. Of particular concern is the exposure of infants and children to food contaminants because of their possible increased susceptibility to adverse effects. Considering the multitude of risks associated with pesticide intake by infants, the European Union has set a very low limit for pesticides in infant food. According to this regulation infant formulae must not contain residues of individual pesticides at levels exceeding 10 µg/kg. This threshold has been set close to the value that can be analytically determined with traditional methods. Consequently, there is a growing interest in fast and more sensitive detection systems. Traditional methods for insecticide detection are based on gas chromatography (GC) or high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass selective detectors (MSD). The disadvantage of these methods is the relatively long assay time and their inherent restriction to a limited number of pesticides, which can be identified by the multiresidue methods. Hence, the possibility of detecting false negatives in unknown samples exists if not all pesticides are covered by the applied multiresidue method. As an alternative, acetylcholinesterase (AChE) inhibition tests, and the AChE-biosensors in particular, have been repeatedly described for the detection of insecticides in aqueous solutions. The few reports on cholinesterase-based biosensors applied to food testing either rely on laborious multi-step sample preparations or prove problematic because of the matrix effects which reduced the accuracy of the results. A general problem concerning AChE biosensors is the fact that most of the applied organophosphates, namely those with a P=S moiety, e.g. the phosphorothionates, show very low inhibitory potential towards AChE in their pure nonmetabolized condition. However, under *in-vivo* conditions, their anticholinesterase potency can be greatly increased. Previously used chemical methods to oxidize phosphorothionates could not be adapted for use in food analysis.

The objective of this work was to develop a sensitive AChE-biosensor for the detection of organophosphates and carbamates in food samples, which is suitable for monitoring infant food and covers the detection of phosphorothionates in food.

AChE biosensor test for direct detection of insecticide residues in food

Matrix effects could be eliminated with a special electrode treatment. An additional incubation in tween-20 solved problems concerning a prolonged equilibration time of the electrodes and reduced recoveries which appear without the tween-20 treatment.

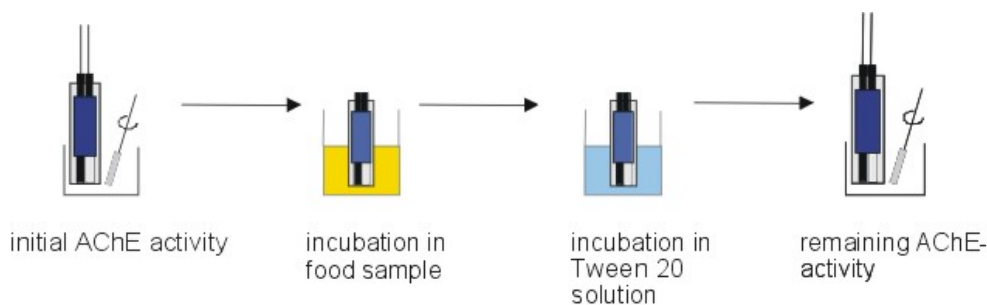


Figure 1: Schematic view of the biosensor test for the direct detection of insecticides in food

The proper performance of the test was verified by analyzing several food samples to which different amounts of paraoxon in the concentration range between 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were added. The inhibition values correlated well with the standard inhibition curve of electric eel AChE (eeAChE) in buffer solution. The recovery rate for paraoxon in peach infant food was 83%. Experiments with apple-based infant food yielded a recovery rate of 87% (Fig. 2). All recovery rates met the legal requirements of a value between 70 and 110%. The analysis of spiked food samples showed an acceptable reproducibility even at very low inhibitor concentrations. The coefficient of variation was on average 8% and 9% in the case of peach and apple infant food, respectively. The determination limit in food was less than 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ paraoxon with eeAChE. The signal-to-noise ratio at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ paraoxon ($1,8 \times 10^{-8}$ mol/L) in apple and peach-based infant food was well above 3 : 1 (e.g. 8 : 1 in the case of peach-based infant food).

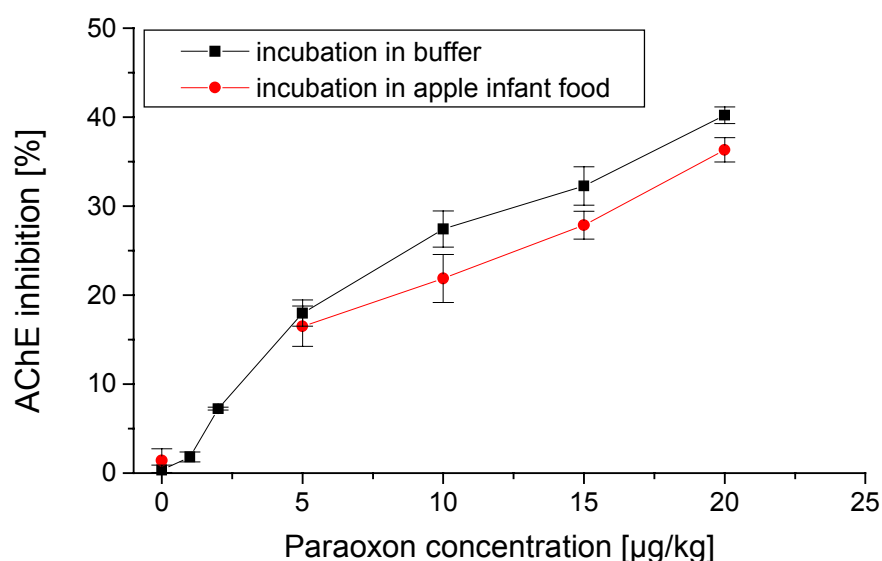


Figure 2: Electric eel AChE inhibition caused by different paraoxon concentrations; direct incubation in apple infant food (red) compared with the incubation in buffer solution (black); n=6

The test was successfully validated with 26 fruit and vegetable samples from the Chemical and Veterinary Official Laboratory (CVUA) Stuttgart, Germany ("Chemisches und Veterinär-Untersuchungsamt Stuttgart"), which were previously analyzed with traditional chromatographic methods. The developed biosensor method proved sensitive enough to be applied in the analysis of infant food samples. An analysis of 23 infant food samples were performed together with the CVUA Stuttgart. Three violations of the maximum residue limit of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ valid in the EU for infant food were observed.

Novel enzymatic activation method for phosphorothionates

A novel enzymatic activation method for phosphorothionates has been developed to allow for their detection with AChE biosensors. A genetically engineered triple mutant of cytochrome P450 BM-3 could convert phosphorothionates into their oxo-variants whereas the wild-type protein was unable to do so.

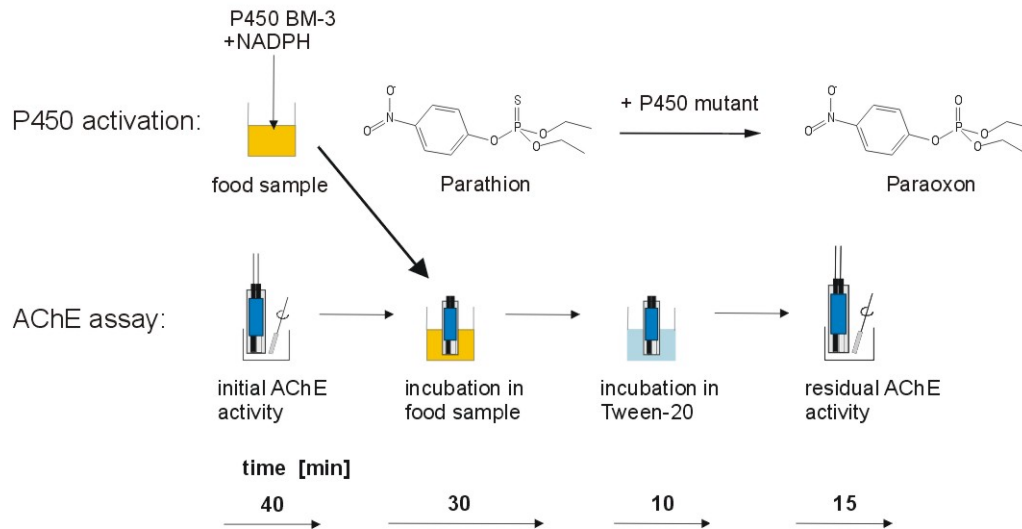


Figure 3: Principle of the biosensor test for the detection of phosphorothionates. The required time for each step is indicated. Initial and remaining AChE activity were recorded amperometrically.

Analysis of the transformation products by GC-MS/MS showed a quasi quantitative transformation of parathion and chlorpyrifos to paraoxon and chlorpyrifos oxon, respectively (see Fig. 4 for the case of parathion).

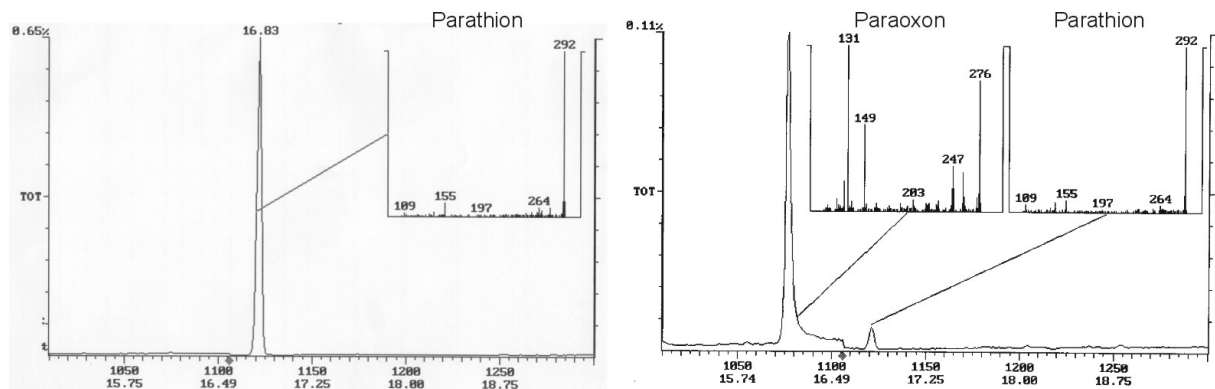


Figure 4: GC-MS/MS spectra of the reaction products of the conversion of parathion (MW=291 g/mol) to paraoxon (MW=276 g/mol) by the cytochrome P450 BM-3 mutant (right). The left spectra shows the product of the reaction with WT P450 BM-3. In this case only parathion could be detected.

Additionally the activation of phosphorothionates in aqueous solutions by the P450 BM-3 mutant was investigated with a subsequent optical AChE assay according to Ellman et al. Chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl, methidathion and parathion were chosen because they are often found in fruit and vegetables. The results of the AChE assay are depicted in Fig. 5. Phosphorothionate concentrations in the range between 1 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ led to the inhibition of AChE after activation with the P450 BM-3 mutant. Non-activated parathion did virtually not lead to any inhibition of AChE.

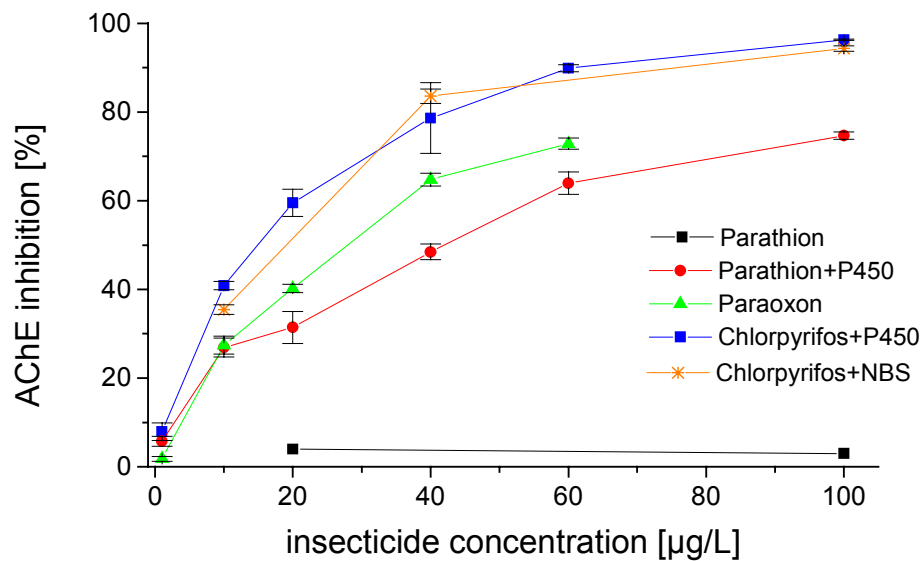


Figure 5: AChE inhibition caused by different organophosphate concentrations in phosphate buffer using the optical AChE activity assay. Chlorpyrifos and parathion were activated either with the P450 BM-3 mutant or chemically by NBS. AChE inhibition of parathion and paraoxon in buffer is depicted for comparison. AChE incubation time: 30 min at RT.

The applicability of the novel enzymatic activation method for the analysis of food samples was examined. For this purpose, P450 BM-3 activation was implemented into the above described biosensor test for neurotoxic compounds in food (see Fig. 3). The P450 BM-3 mutant activation of phosphorothionates was carried out in solution in the neutralized food sample. The molarity of the buffer (1 M PBS) which was required for the neutralization of the sample did obviously not disturb the activity of the enzyme. The transformation efficiency of parathion was as high in food samples as in buffer (see Fig. 6).

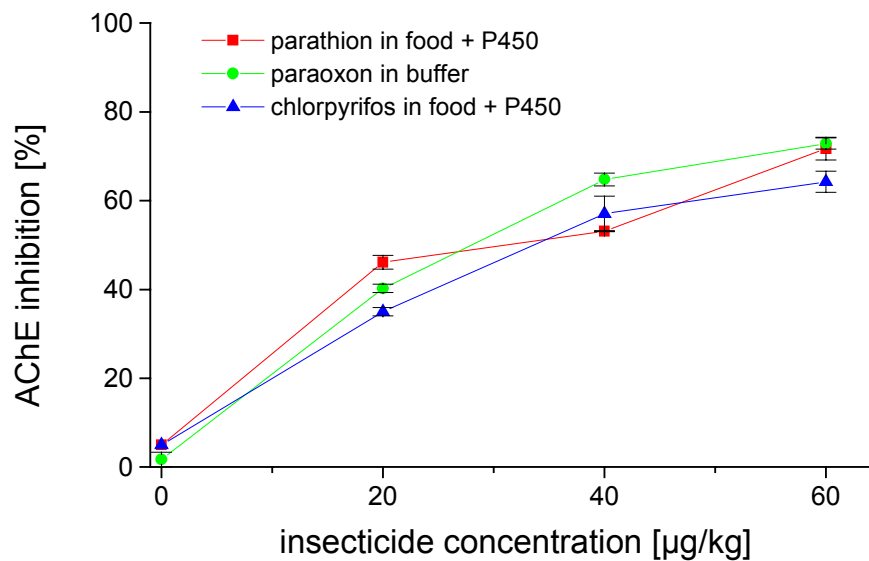


Figure 6: AChE inhibition caused by different organophosphate concentrations in food samples after activation with P450 BM-3 mutant using amperometric measurement with immobilized AChE. AChE inhibition of paraoxon in buffer is depicted for comparison. AChE incubation time: 30 min at RT.

The developed enzymatic activation of phosphorothionates along with an AChE inhibition assay increases the spectrum of analytes that can be detected by biosensors. This work represents the first biosensor method that is capable of screening food for all particularly hazardous carbamate and organophosphate pesticides. All previous AChE assays that target insecticides in food samples are restricted to carbamates and the very rare organophosphates which are applied directly as oxo-variants. The screening test can substantially increase consumer safety.

Protein-design of *Nippostrongylus brasiliensis* AChE

The sensitivity of the AChE-biosensor could be increased by site-directed mutagenesis of *Nippostrongylus brasiliensis* AChE. Ten single mutants and one mutant consisting of a single mutation in combination with an insertion of 26 amino acids were created and functionally expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Optimized expression conditions in a 5L fermenter yielded in an expression rate of 0,6 g/L. This is by far the highest expression rate which was achieved so far for an AChE. The mutations were introduced in four different parts of the active site, namely in the acyl pocket, the choline binding site, the peripheral anionic site and at the narrow substrate access gorge. The 11 mutants were analyzed according to their sensitivity towards the 11 most relevant organophosphates and carbamates. A replacement of methionine by alanine in the acyl pocket of the active center (M301(288)A) resulted in the overall most sensitive mutant (see Fig. 7). M301(288)A showed a 100-fold increased sensitivity towards omethoate.

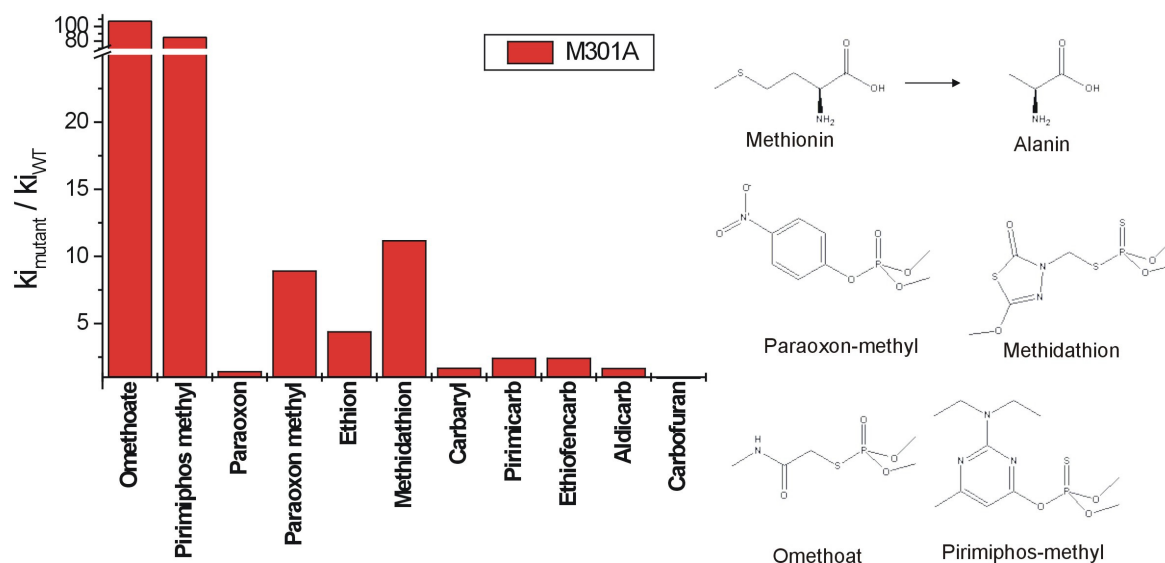


Figure 7: Sensitivity profile of the AChE mutant M301(288)A. Depicted are the ratios of the mutant and wild-type AChE towards tested insecticides.

Altogether the sensitivity could be increased towards 10 out of 11 insecticides as can be seen in Figure 8. The inhibition constants (k_i) of two organophosphates and two carbamates could be increased over a value of $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ by a single mutation in the AChE structure. A k_i -value of at least 10^5 is necessary to control the maximum residue limit of $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ valid in the EU for infant food. This goal was achieved for 11 out of 15 organophosphates or carbamates.

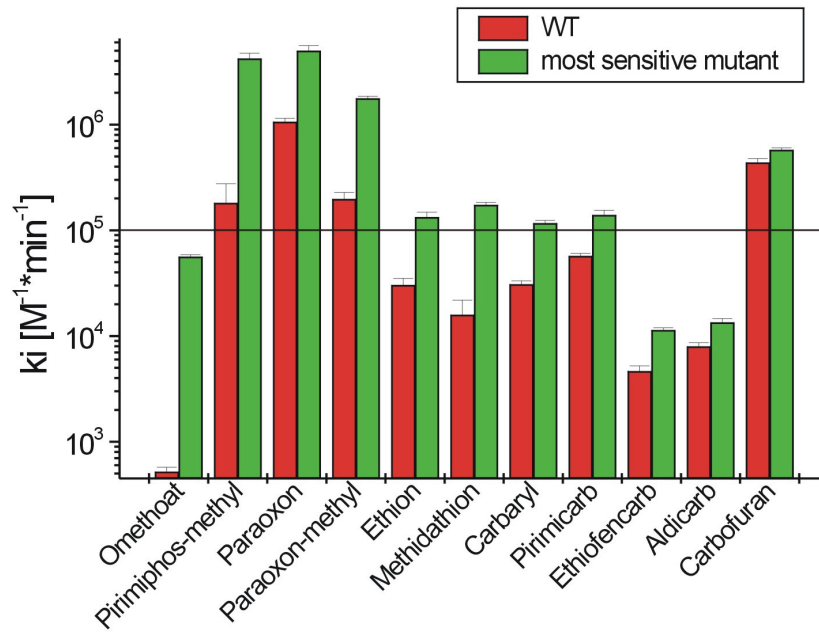


Figure 8: Inhibition constant (k_i) of the wild type *Nippostrongylus brasiliensis* AChE and the most sensitive mutant towards the corresponding insecticide.

3 Einleitung

Biosensoren zeichnen sich durch eine hohe Selektivität und Sensitivität gepaart mit einem niedrigen apparativen und zeitlichen Aufwand für ihren Einsatz aus. Unter einem Biosensor versteht man die direkte räumliche Verbindung eines biologischen Erkennungselementes mit einem physikalischen Signalwandler (Transducer). Die biologische Komponente kann beispielsweise ein Enzym, Antikörper, DNA oder ganze Zellen sein. Als Transducer stehen vorzugsweise elektrochemische, piezoelektrische und optische Sensoren zur Verfügung (Kress-Rogers 1997; Ligler 2002; Scheller und Schubert 1989; Turner et al. 1987).

Das Weltmarktvolumen von Biosensoren liegt bei ca. 300 Mio. US-\$ (Schmid 2002). Den größten Anteil daran haben Glukose-Biosensoren für die medizinische Diagnostik des Blutzuckergehaltes bei Diabetikern (siehe Abbildung 1). Diese machten 1996 90 % des Biosensor Weltmarktes aus (Quelle: Cranfield Biotechnology Centre; <http://www.cranfield.ac.uk/biotech/biomark.htm>).



Abbildung 1: Glukose-Biosensor der Firma Allmedicus (An Yang, Korea; <http://www.allmedicus.com>)

Als Folge der Terroranschläge in New York vom 11. September 2001 wurde die Biosensor-Forschung stark ausgeweitet. So wurde beispielsweise das Budget des amerikanischen Verteidigungsministeriums in diesem Bereich im Jahr 2003 um 7 % auf 34,3 Millionen US-Dollar erhöht (Bunk 2002).

Gerade auch im Nahrungsmittelbereich liegen große Potentiale für den Einsatz von Biosensoren sowohl in der Prozeßkontrolle bei der Herstellung von Lebensmitteln, als auch in der Überwachung von Lebensmitteln und von Wasser hinsichtlich der Belastung mit pathogenen Keimen und Toxinen. Von besonderer Bedeutung sind dabei neurotoxische Insektizide (Organophosphate und Carbamate), wie im folgenden Kapitel erläutert wird.

3.1 Organophosphat und Carbamat-Insektizide

Pflanzenschutzmittel werden seit vielen Jahren in der Landwirtschaft in großem Umfang eingesetzt, um die Ernteerträge zu steigern. Ein Viertel der insgesamt eingesetzten Pflanzenschutzmittel waren im Jahr 1999 Insektizide (siehe Abbildung 2). Dies entsprach einem Marktvolumen von 9,1 Milliarden US-\$, bei einem Gesamtvolumen von 33,6 Milliarden US-\$ für Pestizide.

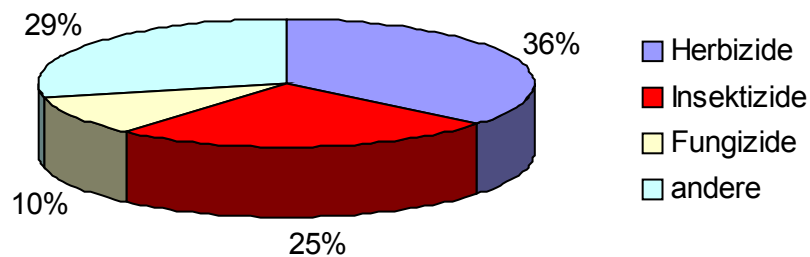


Abbildung 2: Weltweiter Pflanzenschutzmittelverbrauch im Jahr 1999, aufgeteilt in einzelne Pestizidarten. Insgesamt eingesetzt wurden 2,54 Millionen Tonnen an aktiven Bestandteilen [US EPA (Donaldson et al. 2002)].

Der Einsatz des Insektizids DDT reduzierte die Anzahl der Malaria-Erkrankungen in Italien innerhalb von vier Jahren von knapp 400 000 Fällen auf quasi null im Jahre 1949 (Casida und Quistad 1998). Die Notwendigkeit des Einsatzes von Insektiziden zeigt sich auch darin, dass weltweit jährlich schätzungsweise bis zu 50% der Ernte durch Insektenbefall verloren geht (Shani 1998). Die ersten synthetischen Insektizide waren chlorierte Kohlenwasserstoffe wie DDT oder Endosulfan. Viele dieser chlorhaltigen Insektizide wurden wegen ihrer hohen Persistenz und den daraus resultierenden Folgen für das Ökosystem in den siebziger Jahren in den USA und Europa verboten. Organophosphate und Carbamate ersetzen die chlorierten Kohlenwasserstoffe weitgehend und stellen heute zusammen mit Pyrethroiden den Hauptbestandteil der eingesetzten Insektizide dar.

Im Jahr 1999 waren 72% aller in den USA eingesetzten Insektizide Organophosphate, wie Daten der „Environmental Protection Agency“ (EPA) belegen (Donaldson et al. 2002). Statistiken der Vereinten Nationen belegen diesen hohen Anteil an Organophosphaten. Tabelle 1 zeigt jeweils den prozentualen Anteil der Organophosphate und Carbamate an den im Jahr 2000 eingesetzten Insektiziden (FAOSTAT 2003). Informationen über den weltweiten Anteil an Organophosphaten und Carbamaten stehen nicht zur Verfügung, da nicht alle Länder detaillierte Informationen an die UNO weiterleiten (DeSantis 2003).

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Organophosphate und Carbamate an den im Jahr 2000 eingesetzten Insektiziden. In Spalte 2 ist die in den einzelnen Ländern eingesetzte Wirkstoffmenge aufgeführt.

	Insektizid- Verbrauch [t]	Organophosphat- Anteil [%]	Carbamat- Anteil [%]
Äthiopien	38	58	5
Bangladesch	1909	67	27
Costa Rica	2359	57	9
Dänemark	53	64	8
Deutschland	1288	35	5
Dom. Republik	309	81	5
Ecuador	1842	71	10
Finnland	51	67	16
Haiti	7	86	14
Irak	190	71	17
Jordanien	61	77	2
Kamerun	86	27	19
Kolumbien	12743	69	9
Malta	47	21	13
Niger	62	94	5
Norwegen	10	50	10
Oman	91	11	0
Pakistan	13741	32	15
Paraguay	765	47	4
Schweden	22	41	18
Senegal	346	83	3
Slowakei	131	58	3
Sudan	252	40	60
Surinam	58	86	9
Syrien	1219	23	7
Thailand	5278	65	7
Tschechien	147	74	7
Uruguay	182	47	6
Yemen	933	88	3

Die Bedeutung der Organophosphate und Carbamate zeigt sich auch in deren Nachweishäufigkeit bei Lebensmittelkontrollen. Daten des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes (CVUA) Stuttgart belegen, dass Organophosphate und Carbamate Jahr für Jahr zu den zehn am häufigsten detektierten Pestiziden gehören (siehe Abbildung 3).

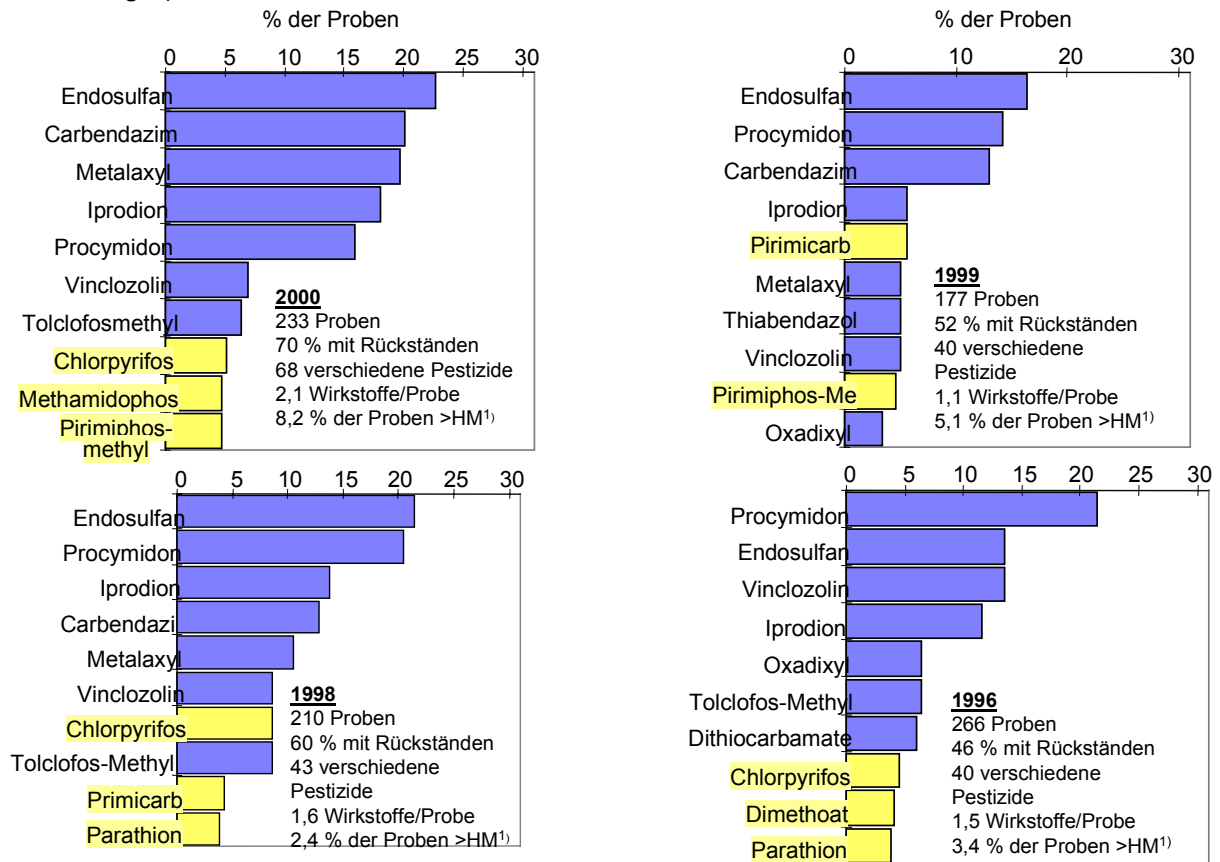


Abbildung 3: Häufigkeit der vom CVUA Stuttgart in den Jahren 1995 bzw. 1998-2000 in Gemüse gefundenen Wirkstoffe (Roth und Weisser 2000). Gelb hervorgehoben sind Organophosphate und Carbamate.

Organophosphate und Carbamate wirken durch ihre Fähigkeit Acetylcholinesterase (AChE), ein zentrales Enzym der Nervenreizleitung, zu hemmen (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5). Durch Hemmung der AChE kommt es zu einer Anreicherung des Neurotransmitters Acetylcholin im Gehirn, an cholinergen Synapsen des autonomen Nervensystems und an motorischen Endplatten (Chambers 1992a). Dabei kommt es zu einem Dauerreizzustand, der als endogene Acetylvergiftung bezeichnet wird. Dieser Zustand äußert sich im allgemeinen in Krampfständen, Atemlähmung und einer Verlangsamung der Herztätigkeit.

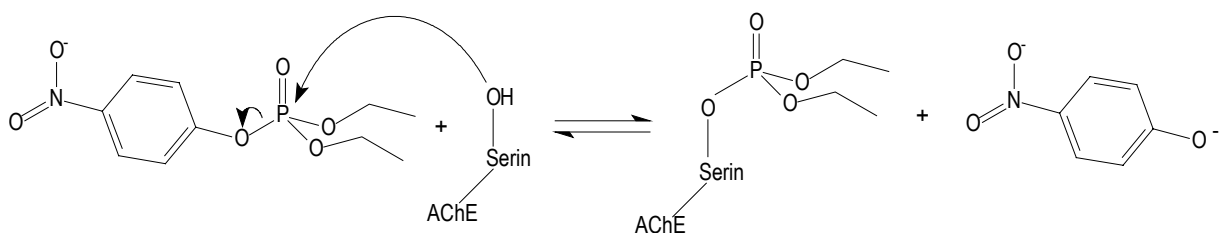


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hemmung von AChE durch Paraoxon

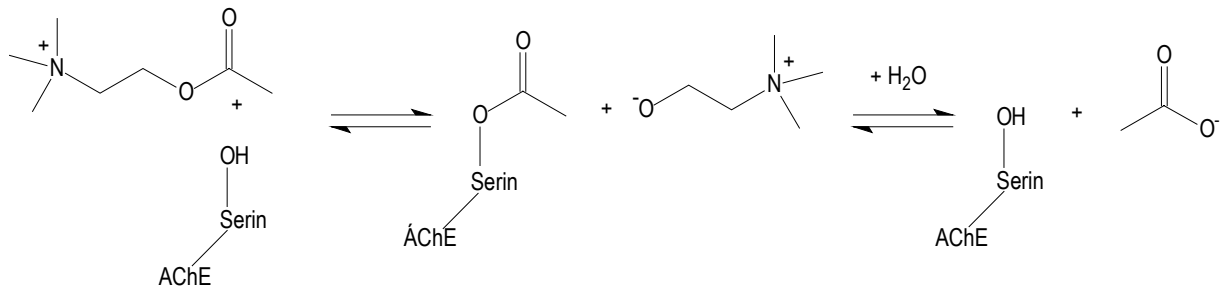


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Umsetzung des Neurotransmitters Acetylcholin durch AChE.

Phosphorylierte AChE kann durch bestimmte Nucleophile wieder reaktiviert werden. Die wirksamsten Reaktivierungs-Agentien sind Pyridin-2-aldoxim methochlorid (2-PAM) und 1,1'-Trimethylenbis(pyridin-4-aldoxim) bromid (TMB₄) (Gulla et al. 2002; Hobbiger und Sadler 1958). Bei der phosphorylierten AChE kann es zu einer spontanen Abspaltung eines der beiden an das Serin gebundenen Alkylrestes kommen. Dieser als „Alterung“ bezeichnete Effekt hat zur Folge, dass gehemmte AChE nicht mehr reaktiviert werden kann (Kennedy 1991) (siehe Abbildung 6).

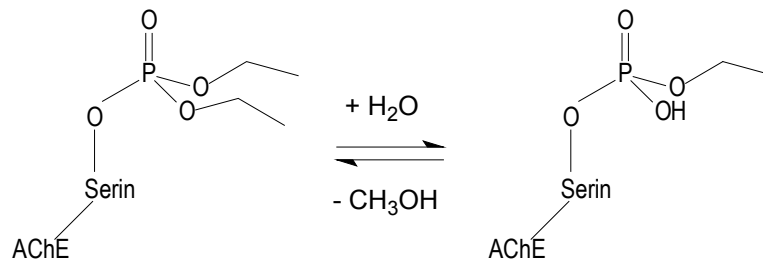


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Alterung phosphorylierter AChE.

Diese Eigenschaften führte neben dem Haupteinsatzgebiet von Organophosphaten und Carbamaten als Insektizide zur Entwicklung wichtiger Pharmaka im Bereich der Alzheimer-Therapie (Bar-On et al. 2002; Rampa et al. 2001) und auch zu chemischen Kampfstoffen, wie Sarin und Tabun (siehe Abbildung 7).

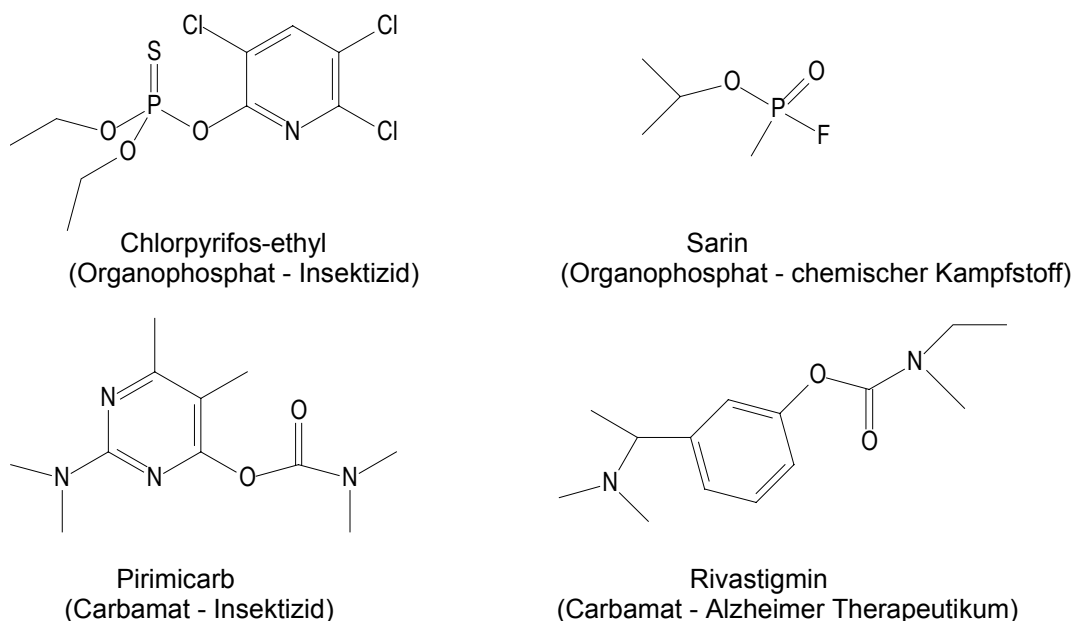


Abbildung 7: Strukturen und Einsatzgebiete von Organophosphaten und Carbamaten

Organophosphate und Carbamate hemmen nicht nur Insekten-AChE, sondern wechselwirken auch mit der AChE anderer Organismen, einschließlich der menschlichen. Sie zeigen eine konzentrationsabhängige akute und chronische Toxizität gegenüber Menschen. Dies führt zu weltweit geschätzten 800000 Vergiftungsfällen, einschließlich 3000 Todesfällen (Koletzko et al. 1999; Schilter und Huggett 1998). Organophosphate stellen damit die Gruppe an Pestiziden dar, die für die meisten Krankheitsfälle verantwortlich ist (Jeyaratnam 1990). Von besonderer Bedeutung ist die Exposition von Säuglingen und Kleinkindern mit belasteten Lebensmitteln, da sie möglicherweise eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber den durch diese Neurotoxine verursachten Gesundheitsgefahren zeigen (Larsen und Pascal 1998). Die toxische Wirkung von Pestiziden kann sich sowohl quantitativ als auch qualitativ von der Wirkung auf Erwachsene unterscheiden (Dencker und Ericsson 1998; Karalliedde 1999; Ostergard und Knudsen 1998; Schilter und Huggett 1998).

Aufgrund dieser vielfältigen Risiken bezüglich der Aufnahme von Pestiziden durch Säuglinge und Kleinkinder hat die Europäische Union einen einheitlichen, sehr niedrigen Grenzwert für Pestizide in Säuglingsnahrung festgesetzt. Die Konzentration jedes einzelnen Pflanzenschutzmittels darf demnach 10 µg/kg nicht überschreiten (EC 1999). Dieser Wert liegt nahe an dem mit chromatographischen Methoden nachweisbaren Konzentrationen. Berichte über Funde von Pestiziden in Säuglingsnahrung (Wiles et al. 1998; Yess et al. 1993) waren unter anderem der Auslöser für das Inkrafttreten des „Food Quality Protection Act“ von 1996 in dessen Rahmen die amerikanische Umweltschutzbehörde (US EPA) 1996 damit begann die Grenzwerte für Pestizide neu festzulegen (FQPA 1996). Eine Gruppe von 40 Organophosphaten hatten dabei die höchste Priorität. Aufgrund der speziellen Risikofaktoren für Kleinkinder wurde ein 10-facher Sicherheitsfaktor für alle Pestizide, mit denen Kleinkinder in Berührung kommen können, festgelegt. Dieser wurde erst wieder aufgehoben, als die EPA sicherstellen konnte, dass auch ohne diesen Sicherheitsfaktor keine Gesundheitsgefahr besteht (Scheuplein 2000).

Aus dieser Situation resultiert ein wachsendes Interesse an schnellen und noch sensitiveren Nachweisverfahren für einen verbesserten Verbraucherschutz.

3.2 Phosphorthionate

Die meisten der als Insektizide eingesetzten Organophosphate sind Phosphorthionate. Diese Verbindungen wirken erst nach Bioaktivierung durch P450-Monooxygenasen als starke AChE-Inhibitoren (Chambers 1992b; Fukuto 1990).

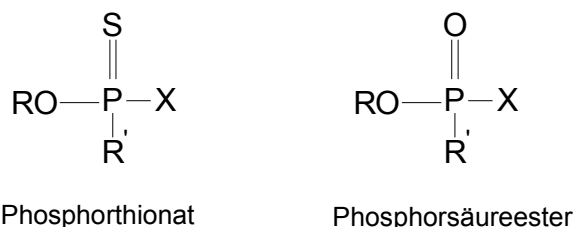


Abbildung 8: Allgemeine Struktur von Phosphorthionaten (schwache AChE-Inhibitoren) und den entsprechenden stark hemmenden Oxo-Verbindungen. R = Methyl oder Ethyl; R' = Methoxy, Ethoxy, Ethyl, Phenyl, Amino, substituierter Aminogruppen oder Alkylthio; X = Abgangsgruppe.

Die Stärke von Organophosphaten als anti-AChE Verbindungen zu wirken, hängt von der Elektrophilie des zentralen Phosphoratoms ab. Elektronendonoren reduzieren die Reaktivität von Organophosphaten gegenüber dem aktivierten Serin-Rest der AChE. Das Schwefelatom in Phosphorthionaten wirkt als eine ausreichend elektronenzuführende Gruppe, um zu extrem schwachen AChE-Inhibitoren zu führen (Chambers 1992a). Jeanty et

al. zeigten beispielsweise, dass sich der k_i -Wert von Chlorpyrifos nach Aktivierung zur korrespondierenden Oxo-Verbindung um den Faktor 1000 erhöht (Jeanty et al. 2001). Bei Menschen sind in erster Linie Cytochrom P450 3A3 und 2D6 an der oxidativen Biotransformation von Phosphorthionaten beteiligt (Sams et al. 2000). Phosphorthionate können auch chemisch in die Oxo-Form überführt werden. Dafür kann N-Bromsuccinimid (NBS) (DIN38415-1 1995) oder Brom verwendet werden (Lee et al. 2002; Pogacnik und Franko 1999a).

In dieser Arbeit wird ein neuartiges *in-vitro* Aktivierungssystem, basierend auf Cytochrom P450 BM-3 beschrieben. Cytochrom P450 BM-3 (CYP 102 A1) ist eine bakterielle Fettsäurehydroxylase aus *Bacillus megaterium*, welche die Hydroxylierung und Epoxidierung langkettiger gesättigter und ungesättigter Carbonsäuren katalysiert (Fulco 1991). P450 BM-3 wurde erstmals im Jahre 1986 von Fulco et al. in *E. coli* funktionell exprimiert (Narhi und Fulco 1986) und charakterisiert (Narhi und Fulco 1987). Die Kristallstruktur der P450-Domäne wurde 1993 von Ravichandran aufgeklärt (Ravichandran et al. 1993). Im Jahr 1997 wurde die Struktur der P450-Domäne zusammen mit Palmitoleinsäure aufgelöst (Li und Poulos 1997).

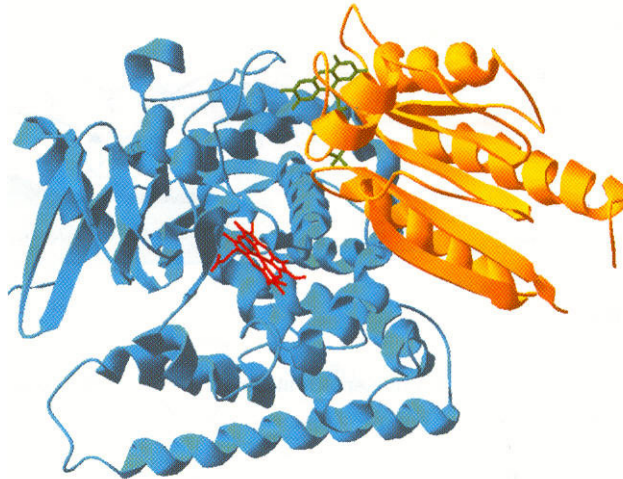


Abbildung 9: Kristallstruktur von Cytochrom P450 BM-3. Blau dargestellt ist die Monooxygenase-Domäne mit dem Häm-Zentrum in rot, gelb die FMN-Bindedomäne und in grün das FMN (Urlacher und Schmid 2002).

Mit einem Molekulargewicht von 118 kD war P450 BM-3 das erste bekannte wasserlösliche Fusionsprotein, das sowohl die Monooxygenase-Domäne als auch die Reduktase-Untereinheit, bestehend aus einer Flavinadeninindinukleotid (FAD)-Domäne und einer Flavinadeninmononukleotid (FMN)-Domäne in einer Polypeptidkette enthält. Alle anderen P450 bis auf zwei Monooxygenasen aus *Bacillus subtilis* (CYP 102 A2 und A3) (Kunst et al. 1997) und einer membrangebundenen P450-Monooxygenase aus *Fusarium oxysporum* (Nakayama et al. 1996) benötigen ein zusätzliches Reduktasesystem. Für Untersuchungen mit P450 BM-3 steht ein schneller, optischer Aktivitätstest zur Verfügung (Schwaneberg et al. 1999). Von P450 BM-3 wurden eine Reihe von Mutanten mit veränderter Substrat- und Stereospezifität hergestellt (Appel et al. 2001; Li et al. 2001b; Urlacher und Schmid 2002). Die Dreifachmutante Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly zeigte dabei eine ungewöhnliche Substratspezifität. Sie war in der Lage Indigo ausgehend von Indol, das keine Ähnlichkeit mit dem natürlichen Substrat von P450 BM-3 besitzt, zu produzieren (Li et al. 2000). In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von P450 BM-3 und der Dreifachmutanten (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) untersucht, die oxidative Desulphurierung von Phosphorthionaten zu katalysieren und diese Substanzklasse damit dem AChE-Hemmtest zugänglich zu machen.

3.3 Acetylcholinesterase

Die wichtigste physiologische Funktion von Acetylcholinesterase (AChE, EC. 3.1.1.7) ist die Terminierung des Reizes in den Synapsen der Nervenzellen durch schnellen Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh). AChE zählt mit einer Wechselzahl von $1,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ zu den schnellsten bekannten Enzymen. Die Umsetzung des natürlichen Substrates ist mit einem k_{cat}/K_m -Wert von $1,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine quasi diffusionskontrollierter Prozess (Bertonati et al. 2000; Rosenberry 1975). Wirbeltiere besitzen neben AChE noch eine zweite Cholinesterase, die Butyrylcholinesterase (BChE, EC. 3.1.1.8). Beide Cholinesterasen zeigen eine Identität der Aminosäuren von 51-54 % (Taylor und Radic 1994). Sie werden durch unterschiedliche Gene kodiert und unterscheiden sich in erster Linie in ihrer Substratspezifität. AChE hydrolysiert ACh schneller als andere Cholinester und zeigt quasi keine Aktivität gegenüber Butyrylcholin (BCh). BChE zeichnet sich durch eine hohe Affinität gegenüber BCh aus, hydrolysiert aber auch ACh. BChE ist weit verbreitet im Körper von Wirbeltieren. Im Gegensatz zu AChE ist deren physiologische Wirkung noch immer unklar (Savini et al. 2003). In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde nur ein Cholinesterase-Gen entdeckt (Hall und Kankel 1976). Das daraus kodierte Enzym zeigt eine Spezifität, die zwischen der von AChE und BChE liegt (Gnagey et al. 1987; Taylor und Radic 1994). In einigen Nematoden-Arten wurden bis zu vier verschiedene Cholinesterase-Gene identifiziert (Grauso et al. 1998; Hussein et al. 2002).

Strukturell definieren Cholinesterasen eine eigene Familie von Serin-Hydrolasen (Taylor und Radic 1994). Sie liegen in Form einer α/β -Hydrolasefaltung vor, deren Kern aus acht β -Faltblättern aufgebaut ist, die durch α -Helices miteinander verbunden sind. Insgesamt ist die Struktur von AChE aus 12 β -Faltblättern und 14 α -Helices aufgebaut (Sussman et al. 1991). AChE liegt in unterschiedlichen molekularen Formen vor, die sich in der Art der Assoziation von Untereinheiten und den hydrodynamischen Eigenschaften unterscheiden. *Torpedo californica* und *Drosophila melanogaster* AChE sowie Säugetier BChE enthalten acht Cysteine, wohingegen Säugetier AChE nur sieben Cysteine enthält (Fremaux et al. 2002; Taylor 1991). Sechs dieser Cysteine sind unter den Spezies konserviert und bilden intramolekulare Disulphidbrücken zwischen den Positionen 67-94, 254-265 und 402-521 (*Torpedo californica* AChE-Nummerierung) (Moralev und Rozengart 1999). Das C-terminal gelegene siebte Cystein führt zur Ausbildung von Dimeren über intermolekulare Disulphidbrücken, die sich über hydrophobe Wechselwirkung zu Tetrameren verbinden können (siehe Abbildung 10). Neben hydrophilen, globulären Formen ($G_{1,2,4}$) gibt es auch membrangebundene Formen (Massoulié et al. 1993). In diesen Fällen sind die katalytischen Untereinheiten im Falle der G-Formen über eine hydrophobe Untereinheit (P-Anker) oder einen Glycophosphatidylinositol-Membrananker an die Membran gebunden oder sie sind über einen kollagenartigen Rest zu einer asymmetrischen Struktur, bestehend aus 12 katalytischen Einheiten verknüpft (A_{12}).

Die Auflösung der Kristallstruktur von *Torpedo californica* AChE durch Sussman et al. (Sussman et al. 1991) lieferte die Grundlage für ein große Zahl an wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der AChE im zurückliegenden Jahrzehnt. Neben der *Torpedo californica* AChE sind mittlerweile auch die Kristallstrukturen von Maus AChE (Bourne et al. 1995; Bourne et al. 1999b), Zitteraal AChE (Bourne et al. 1999a), *Drosophila melanogaster* AChE (Harel et al. 2000a) und humaner AChE (Kryger et al. 2000) aufgeklärt. Einen Überblick über Sequenz- und Strukturdaten von Cholinesterasen liefert die ESTHER Database (Cousin et al. 1997) (<http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index>).

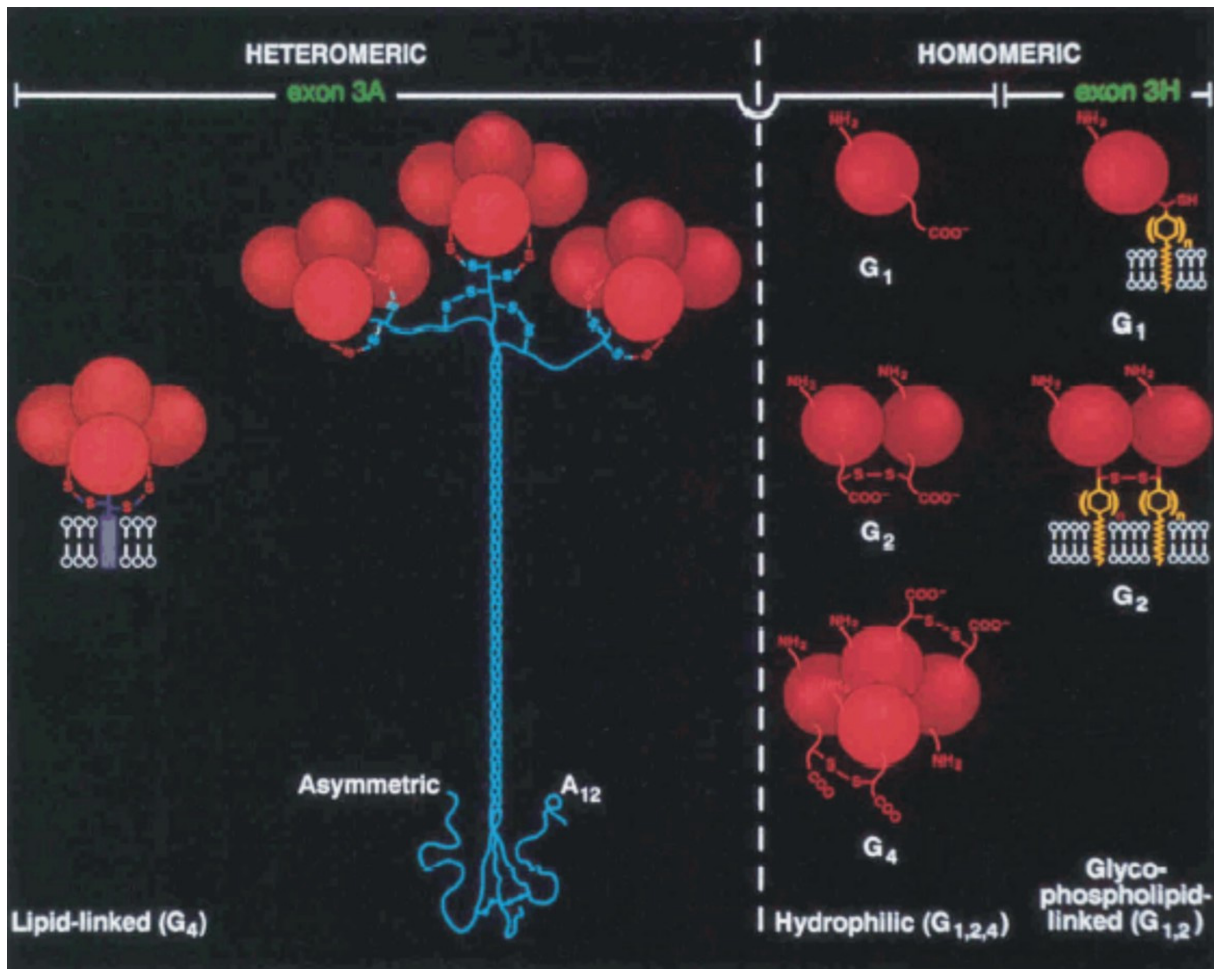


Abbildung 10: Molekulare Formen von AChE, aus (Taylor 1991). Rot dargestellt ist die katalytische Untereinheit von AChE, die in homomerer Form löslich oder membrangebunden oder heteromer und membrangebunden vorliegt.

3.3.1 Die funktionale Architektur des aktiven Zentrums

Das aktive Zentrum der AChE liegt im Inneren eines schmalen, ca. 20 Å langen Schlundes. Den Zugang zum aktiven Zentrum spannen 14 aromatische Reste auf, die zwischen unterschiedlichen Spezies hoch konserviert vorliegen. Diese 14 Aminosäuren belegen 40 % des Oberflächenbereichs des aktiven Zentrums, weshalb das aktive Zentrum der AChE auch „aromatischer Schlund“ genannt wird. In BChE sind sechs der 14 Reste durch aliphatische Aminosäuren ersetzt (Harel et al. 1992).

Serin-200 wurde als essentieller Bestandteil des aktiven Zentrums bereits 1985 von MacPhee-Quigley et al. identifiziert (MacPhee-Quigley et al. 1985). Mutationsstudien von *Torpedo californica* AChE führten zur Entdeckung von Histidin-440 als zweiten Bestandteil der katalytischen Triade (Gibney et al. 1990). Erst die Auflösung der Kristallstruktur und ortsspezifische Mutagenese von humaner AChE zeigten, daß Glutamat-327 der dritte Bestandteil der katalytischen Triade ist und nicht ein Asparagin-Rest wie bei den meisten anderen Serin-Hydrolasen (Shafferman et al. 1992a).

Ein Grund für die katalytische Effizienz der AChE und ihrer hohen Reaktivität gegenüber unterschiedlichsten kovalenten und reversiblen Inhibitoren könnte in der einzigartigen Architektur des aktiven Zentrums liegen. Dieses kann in mehrere Untereinheiten unterteilt werden (Ordentlich et al. 1996; Taylor und Radic 1994):

1. Die *katalytische Triade*, bestehend aus Ser-200, His-440 und Glu-327 (Gibney et al. 1990; MacPhee-Quigley et al. 1985; Shafferman et al. 1992a; Sussman et al. 1991).
2. Die *hydrophobe Untereinheit* oder *Cholinbindestelle* besteht in der humanen AChE aus Trp-86(84), Tyr-133(130), Tyr-337(330) und Phe-338(331) (In Klammern dargestellt ist jeweils die entsprechende Position in *Torpedo californica* AChE). Trp-86(84) bindet über Kation- π Wechselwirkungen das tertiäre Ammonium von Cholin. Die alkoholische Abgangsgruppe von kovalent gebundenen Inhibitoren wechselwirken mit Trp-86(84), Tyr-133(130), Tyr-337(330) und Phe-338(331). Tyr-133(130) sorgt für die funktionale Orientierung von Trp-86(84) (Ordentlich et al. 1993; Ordentlich et al. 1995; Ordentlich et al. 1996).
3. Die *Acyltasche* bestimmt die Substratspezifität. Sie wird bei den meisten Säugetier-AChEn aus zwei Phenylalanin-Resten aufgebaut (Phe-288 und Phe-290) (Fournier et al. 1992; Gnatt et al. 1994; Harel et al. 1992; Ordentlich et al. 1993; Taylor und Radic 1994; Vellom et al. 1993).
4. Die *Oxyanionbindestelle* stabilisiert den tetraedrischen Übergangszustand (Gly-118, Gly-119 und Ala-201) (Ordentlich et al. 1998).
5. *Periphere anionische Bindestelle* (Trp-279, Tyr-70, Tyr-121 und Asp-72). BChEn besitzen im Gegensatz zu AChEn keine periphere anionische Bindestelle und zeigen demnach auch keine Hemmung bei hohen Substratkonzentrationen, wie dies bei AChEn der Fall ist.

Der wesentlichste Unterschied der Struktur der beiden Cholinesterasen liegt in der Acyltasche. In BChE sind die beiden Phenylalanine durch die kleineren, aliphatischen Reste Leucin und Valin ausgetauscht. Dieser Austausch bewirkt eine veränderte Substratspezifität.

3.3.2 *Nippostrongylus brasiliensis* AChE

Ein Ziel dieser Arbeit war die weitere Erhöhung der Sensitivität des AChE-Biosensors. Dieses Ziel sollte durch eine Optimierung der biologischen Komponente des Biosensors erreicht werden. Hierfür wurde *Nippostrongylus brasiliensis* AChE (NbAChE) gezielt an bestimmten Positionen der Aminosäuresequenz verändert.

Der parasitische Wurm *Nippostrongylus brasiliensis* kolonisiert den Dünndarm von Ratten. Neben einer erst kürzlich identifizierten amphiphilen, vermutlich neuromuskulären AChE sekretiert die Nematode drei monomere, hydrophile (G_1) Varianten von AChE. Die A, B und C Varianten besitzen ein Molekulargewicht von 74, 69 bzw. 71 kDa (Hussein et al. 2002). Die physiologische Funktion der sekretierten AChEn ist noch unklar. Die Primärstruktur der sekretierten AChEn zeigt eine klare Ähnlichkeit zu AChEn von anderen Spezies. So sind 30 % der Aminosäuren identisch mit denen von ACE-1 aus *Caenorhabditis elegans* (Arpagaus et al. 1994) und 35 % verglichen mit *Torpedo californica* AChE (Schumacher et al. 1986). Die NbAChE unterscheidet sich jedoch von anderen AChEn darin, dass sie einen verkürzten C-Terminus besitzt. Drei der 14 in anderen Spezies konservierten, aromatischen Reste sind in NbAChE B durch aliphatische Aminosäuren ersetzt. Tyr-70 und Trp-279 aus der peripheren anionischen Bindestelle in *Torpedo californica* AChE sind durch Threonin und Asparagin ersetzt. Anstelle von Phe-288 findet sich mit Methionin, ähnlich wie bei BChE, eine aliphatische Aminosäure in der Acyltasche von NbAChE. Trotz dieser gewissen Ähnlichkeit zu BChE zeigen die drei sekretierten Formen von NbAChE alle charakteristischen Eigenschaften von AChEn. Acetylthiocholin wird wirkungsvoll hydrolysiert. Im Gegensatz dazu zeigt NbAChE nur eine minimale Affinität gegenüber Butyrylthiocholin (Hussein et al. 1999). Wie Untersuchungen von Hussein et al. zeigten, ist NbAChE sehr

sensitiv gegenüber dem AChE-spezifischen Inhibitor BW284c51 und wird auch durch die Liganden der peripheren anionischen Bindestelle Propidium-Iodid und Gallamin gehemmt. Iso-OMPA, ein BChE Inhibitor, verursacht demgegenüber keine Hemmung der NbAChE. Ausserdem zeigt NbAChE bei Substratkonzentrationen von über 2,5 mM eine Substrathemmung. Dies ist ein weiterer Beleg für das Vorhandensein der peripheren anionischen Bindestelle.

3.3.3 Strukturelle Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber kovalenten Inhibitoren

Im letzten Jahrzehnt wurden hauptsächlich für mechanistische Studien eine Vielzahl an Cholinesterase-Mutanten generiert. So untersuchte die Gruppe um Avigdor Shafferman intensiv die strukturellen Eigenschaften humaner AChE (Ordentlich et al. 1993; Ordentlich et al. 1998; Ordentlich et al. 1996; Shafferman et al. 1992a; Shafferman et al. 1992b; Velan et al. 1991), während die Gruppe um Palmer Taylor mit Maus AChE arbeitete (Radic et al. 1993; Vellom et al. 1993). Nur ein kleiner Teil der durch ortsspezifische Mutagenese erzeugten Mutanten wurden auf ihr Verhalten gegenüber kovalenten Inhibitoren (Organophosphate und Carbamate) getestet.

Ordentlich et al. untersuchten den Einfluss der funktionalen Architektur humaner AChE auf die Reaktion mit Organophosphaten (Ordentlich et al. 1996). Dafür wurden Mutationen an Positionen eingeführt, die wie frühere Untersuchungen zeigten, mit Substraten wechselwirken. Mutationen in der Acyltasche führten zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Paraoxon, Diisopropyl-Phosphorofluoridat (DFP) und Diethyl-Phosphorofluoridat (DEFP). Phenylalanin an Position 295(288) und 297(290) wurde dabei durch kleinere Aminosäuren ausgetauscht. Die F295(288)A-Mutante zeigte eine 20-fach höhere Sensitivität gegenüber Paraoxon, ausgedrückt in einer um den Faktor 20 größeren bimolekularen Geschwindigkeitskonstante (k_i) (siehe Tabelle 2). Der k_i -Wert stellt nach dem von Aldridge beschriebenen Mechanismus der Hemmung von AChE durch Organophosphate und Carbamate ein Maß für die Stärke der Hemmwirkung eines bestimmten Inhibitors auf die AChE dar und gibt dadurch Auskunft über die Sensitivität einer bestimmten AChE gegenüber dem jeweiligen Hemmstoff (siehe Abbildung 11) (Aldridge 1950).

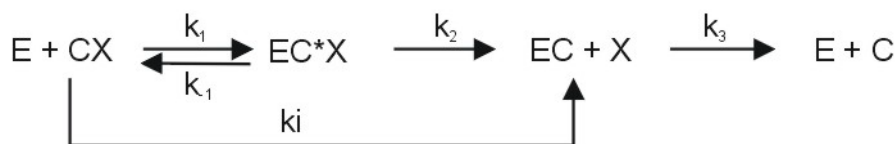


Abbildung 11: Mechanismus der AChE-Hemmung nach Aldridge. E = Enzym, CX = Carbamat oder Organophosphat, X = Abgangsgruppe, C = zurückbleibender Rest, Dissoziationskonstante $K_D = k_{-1}/k_1$; k_3 = Dephosphorylierungs- bzw. Decarbamylierungs-Geschwindigkeitskonstante, k_i = bimolekulare Geschwindigkeitskonstante ($= k_2/K_D$).

Die Einführung von Valin an Position 295(288) und Leucin an Position 297(290) in Analogie zu den entsprechenden Positionen in BChE führte zu einer 25-fach erhöhten Sensitivität gegenüber DFP. Mutationen von den zwischen unterschiedlichen Spezies hoch konservierten Resten Glu-450(443), Glu-202(199) und Tyr-133(130), die eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der funktionalen Architektur des aktiven Zentrums haben (Ordentlich et al. 1993; Ordentlich et al. 1995), führten durchweg zu einer stark reduzierten Sensitivität gegenüber Paraoxon, DFP und DEP.

Tabelle 2: k_i -Werte ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) von AChE-Mutanten gegenüber kovalenten Inhibitoren

	Para-oxon	DFP	DEFP	Paraoxon methyl	Carbaryl	Methamidophos	Ethoprophos	Ref.
WT Hu	97	14	40					[1]
HuF295(288)A	1800	65	830					[1]
HuF295(290)L	800	264	940					[1]
HuF295(288)L/ F297(290)V	117	340	310					[1]
HuY337(330)A	14	3	27					[1]
HuY337(330)F	180	40	99					[1]
HuE450(443)A	1,9	0,09	1,5					[1]
HuG121A	0,03	0,007	0,04					[2]
Hu 6-fach Mutante ^a		1500						[3]
WT HuBChE		1700						[3]
WT Dm	140			42	17	0,73		
DmF368(290)L	318			183	1,7			
DmY408(330)F	320			15	200			
Dm E107(70)Y	520			150	37			
Dm B08						220		
WT Rb	80			52			0,07	
Rb F295(288)L	550			120			5,6	

^a HuY72(70)N/Y124(121)Q/W286279)A/F295(288)L/F297(290)V/Y337(330)A; Dm: *Drosophila melanogaster*; Hu: human, Rb: Rattenhirn; [1]: (Ordentlich et al. 1996); [2]: (Ordentlich et al. 1998); [3]: (Kaplan et al. 2001).

Mutationen von Resten der Cholinbindestelle (Trp-86(84), Tyr-337(330) und Tyr-338(331)) ergaben ein Sensitivitätsprofil, das hauptsächlich von der Struktur der Abgangsgruppe abhing. Der Effekt war hier aber um einiges geringer als bei Veränderungen in der Acyltasche. Veränderungen in der Oxyanionbindestelle (HuG121(118)A) führten zu einer um mehr als drei Größenordnungen verringerten Reaktivität gegenüber den getesteten Organophosphaten (Ordentlich et al. 1998). Der Austausch von sechs aromatischen Aminosäuren in humaner AChE durch die entsprechenden aliphatischen Aminosäuren der humanen BChE führte zu einer 150-fach erhöhten Sensitivität gegenüber DFP (Kaplan et al. 2001). Dies entsprach in etwa dem Wert der humanen BChE. Wie der Vergleich der k_i -Werte von *Torpedo californica*, *Electrophorus electricus*, *Drosophila melanogaster* und humaner AChE mit humaner BChE in Tabelle 3 und 4 zeigt, ist BChE jedoch nicht grundsätzlich sensitiver als AChE. Hier wird auch deutlich, dass sich die Reaktivität von AChEn unterschiedlicher Spezies teilweise stark unterscheiden. In vielen, aber nicht in allen Fällen, ist *Drosophila melanogaster* AChE die sensitivste Cholinesterase (Villatte et al. 1998). Die Untersuchungen an humaner AChE von Ordentlich et al. zeigten, dass Veränderungen in der Struktur in erster Linie die Stabilisierung des Michaelis-Komplexes, d.h. die Affinität des Enzyms gegenüber dem Inhibitor beeinflussen und nicht die Geschwindigkeit des nukleophilen Angriffs (Ordentlich et al. 1993; Ordentlich et al. 1996). Dies drückte sich in einer relativen Invarianz der Phosphorylierungs-Geschwindigkeitskonstanten (k_2 in Abbildung 11) aus, die unabhängig von der Art des Enzyms und der Struktur des Inhibitors war. Demgegenüber variierten die Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor Michaelis-

Komplexes ($K_d = k_{-1}/k_1$) um einen Bereich von drei Größenordnungen für die einzelnen Inhibitoren.

Tabelle 3: k_i -Werte (angegeben in $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) von AChEn und BChE unterschiedlicher Spezies gegenüber Organophosphaten

Organophosphat	TcAChE	EeAChE	DmAChE	HuAChE	HuBChE
Azinphos-ethyl		$1,0 \cdot 10^6$ [1]		$1,4 \cdot 10^6$ [1]	$3,6 \cdot 10^6$ [1]
Azinphos-methyl		$0,6 \cdot 10^7$ [1]		$1,1 \cdot 10^6$ [1]	$1,5 \cdot 10^4$ [1]
Bromophos		$0,8 \cdot 10^4$ [1]		$0,8 \cdot 10^5$ [1]	$1,4 \cdot 10^6$ [1]
Bromophos-ethyl		$1,1 \cdot 10^5$ [1]		$5,4 \cdot 10^5$ [1]	$0,6 \cdot 10^8$ [1]
Chlorfenvinphos		$2,9 \cdot 10^4$ [1]		$2,4 \cdot 10^4$ [1]	$1,0 \cdot 10^6$ [1]
Chlorpyrifos		$1,8 \cdot 10^6$ [1]	$8,6 \cdot 10^8$ [4]	$0,6 \cdot 10^7$ [1]	$2,0 \cdot 10^8$ [1]
Chlorpyrifos-methyl		$0,7 \cdot 10^6$ [1]		$2,2 \cdot 10^6$ [1]	$2,2 \cdot 10^7$ [1]
Dimethon S methyl	$1,4 \cdot 10^3$ [2]	$1,0 \cdot 10^3$ [2]	$2,6 \cdot 10^4$ [2]		
Dimethon S methylsulfon		$4,2 \cdot 10^2$ [1]		$0,9 \cdot 10^3$ [1]	$2,8 \cdot 10^2$ [1]
Diazinon		$2,3 \cdot 10^4$ [1]		$5,3 \cdot 10^4$ [1]	$1,8 \cdot 10^7$ [1]
Dichlorvos	$1,9 \cdot 10^3$ [2]	$4,2 \cdot 10^4$ [1]	$5,0 \cdot 10^5$ [2]	$5,2 \cdot 10^4$ [1]	$2,3 \cdot 10^5$ [1]
Ethrimphos		$0,9 \cdot 10^6$ [1]		$4,8 \cdot 10^5$ [1]	$1,1 \cdot 10^6$ [1]
Fenitrothion		$4,4 \cdot 10^4$ [3]			
Fenthion		$6,4 \cdot 10^4$ [3]			
Malathion	$3,0 \cdot 10^5$ [2]	$1,7 \cdot 10^6$ [1]	$2,6 \cdot 10^6$ [2]	$3,3 \cdot 10^5$ [1]	$2,1 \cdot 10^4$ [1]
Methidathion		$0,6 \cdot 10^6$ [1]		$0,9 \cdot 10^5$ [1]	$1,9 \cdot 10^4$ [1]
Mevinphos		$1,5 \cdot 10^5$ [1]		$2,6 \cdot 10^5$ [1]	$5,4 \cdot 10^4$ [1]
Omethoat		$2,3 \cdot 10^3$ [1]	$2,1 \cdot 10^4$ [4]	$1,1 \cdot 10^3$ [1]	$0,8 \cdot 10^2$ [1]
Paraoxon	$5,8 \cdot 10^4$ [2]	$2,2 \cdot 10^5$ [1]	$1,4 \cdot 10^6$ [2]	$1,2 \cdot 10^6$ [1]	$1,5 \cdot 10^6$ [1]
Paraoxon-methyl	$2,1 \cdot 10^5$ [2]	$0,9 \cdot 10^5$ [1]	$4,2 \cdot 10^5$ [2]	$3,5 \cdot 10^5$ [1]	$1,7 \cdot 10^4$ [1]
Phosalon		$2,5 \cdot 10^5$ [1]		$1,3 \cdot 10^5$ [1]	$1,9 \cdot 10^5$ [1]
Phosmet		$1,3 \cdot 10^6$ [1]		$1,0 \cdot 10^5$ [1]	$3,7 \cdot 10^3$ [1]
Pirimiphos-methyl		$2,3 \cdot 10^4$ [3]			
Profenophos	$3,3 \cdot 10^3$ [2]	$< 10^3$ [2]	$2,7 \cdot 10^4$ [2]		
Pyrazophos		$1,6 \cdot 10^4$ [1]		$2,8 \cdot 10^4$ [1]	$5,7 \cdot 10^5$ [1]
Triazophos		$3,0 \cdot 10^6$ [1]		$1,4 \cdot 10^6$ [1]	$0,9 \cdot 10^8$ [1]

Tc: *Torpedo californica*; Ee: *Electrophorus electricus*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Hu: human. [1]: (Herzprung 1991); [2]: (Villatte et al. 1998); [3]: (Debruijn und Hermens 1993); [4]: (Charpentier et al. 2000)

Tabelle 4: k_i -Werte (angegeben in $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) von AChEn und BChE unterschiedlicher Spezies gegenüber Carbamaten

Carbamat	TcAChE	EeAChE	DmAChE	HuAChE	HuBChE
Oxamyl	$4,9 \cdot 10^5$ [2]	$4,2 \cdot 10^5$ [2]	$8,8 \cdot 10^5$ [2]	$1,4 \cdot 10^5$ [1]	$3,0 \cdot 10^4$ [1]
Thiofanox	$3,6 \cdot 10^5$ [2]	$2,8 \cdot 10^5$ [2]	$8,8 \cdot 10^4$ [2]		
Carbofuran	$2,3 \cdot 10^6$ [2]	$2,9 \cdot 10^6$ [2]	$5,1 \cdot 10^6$ [2]	$0,8 \cdot 10^6$ [1]	$0,6 \cdot 10^4$ [1]
3-Hydroxy-carbofuran		$3,5 \cdot 10^5$ [1]		$2,6 \cdot 10^5$ [1]	$1,1 \cdot 10^4$ [1]
Methiocarb		$1,0 \cdot 10^5$ [1]		$0,9 \cdot 10^5$ [1]	$1,3 \cdot 10^4$ [1]
Methiocarb-sulfoxid		$0,7 \cdot 10^5$ [1]		$0,7 \cdot 10^5$ [1]	$4,3 \cdot 10^4$ [1]
Methiocarb-sulfon		$0,7 \cdot 10^4$ [1]		$1,5 \cdot 10^4$ [1]	$3,2 \cdot 10^3$ [1]
Butocarboxim	$1,5 \cdot 10^3$ [2]	$0,7 \cdot 10^4$ [1]	$4,6 \cdot 10^2$ [2]	$1,6 \cdot 10^3$ [1]	$0,6 \cdot 10^3$ [1]
Butocarboxim-sulfoxid		$4,7 \cdot 10^3$ [1]		$3,2 \cdot 10^3$ [1]	$0,8 \cdot 10^3$ [1]
Butocarboxim-sulfon		$0,8 \cdot 10^4$ [1]		$1,7 \cdot 10^3$ [1]	$0,6 \cdot 10^3$ [1]
Aldicarb		$5,0 \cdot 10^4$ [1]	$5,5 \cdot 10^3$ [2]	$1,6 \cdot 10^4$ [1]	$2,4 \cdot 10^4$ [1]
Aldicarb-sulfoxid		$1,3 \cdot 10^6$ [1]		$0,7 \cdot 10^6$ [1]	$0,6 \cdot 10^6$ [1]
Aldicarb-sulfon		$1,5 \cdot 10^4$ [1]		$0,8 \cdot 10^4$ [1]	$2,5 \cdot 10^4$ [1]
Ethiofencarb		$3,0 \cdot 10^4$ [1]		$4,9 \cdot 10^3$ [1]	$1,5 \cdot 10^3$ [1]
Ethiofencarb-sulfoxid		$1,4 \cdot 10^3$ [1]		$1,7 \cdot 10^3$ [1]	$3,5 \cdot 10^2$ [1]
Ethiofencarb-sulfon		$5,8 \cdot 10^2$ [1]		$1,0 \cdot 10^3$ [1]	$5,2 \cdot 10^2$ [1]
Methomyl		$2,1 \cdot 10^5$ [2]	$9,0 \cdot 10^4$ [2]	$0,6 \cdot 10^5$ [1]	$3,9 \cdot 10^3$ [1]
Propoxur		$1,5 \cdot 10^5$ [2]	$8,3 \cdot 10^5$ [2]	$4,8 \cdot 10^4$ [1]	$0,8 \cdot 10^3$ [1]
Carbaryl		$6,6 \cdot 10^4$ [2]	$1,7 \cdot 10^5$ [2]	$2,7 \cdot 10^4$ [1]	$1,9 \cdot 10^3$ [1]
Promecarb		$2,9 \cdot 10^5$ [1]		$3,4 \cdot 10^5$ [1]	$1,5 \cdot 10^5$ [1]

Pirimicarb	$1,0 \cdot 10^3$ [1]	$2,4 \cdot 10^5$ [2]	$1,0 \cdot 10^4$ [1]	$2,4 \cdot 10^4$ [1]
------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Tc: *Torpedo californica*; Ee: *Electrophorus electricus*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Hu: human. [1]: (Herzprung 1991); [2]: (Villatte et al. 1998).

Der Einfluss von Mutationen auf die Protein-Inhibitor Wechselwirkung wurde mit Hilfe von „Molecular Modelling“-Techniken untersucht. Pleiss et al. modellierten die Proteinstruktur der Rattenhirn AChE nach der Kristallstruktur von *Torpedo californica* AChE und simulierten die Orientierung von Paraoxon und Aldicarb im aktiven Zentrum des Rattenhirn AChE-Modells (Pleiss et al. 1999).

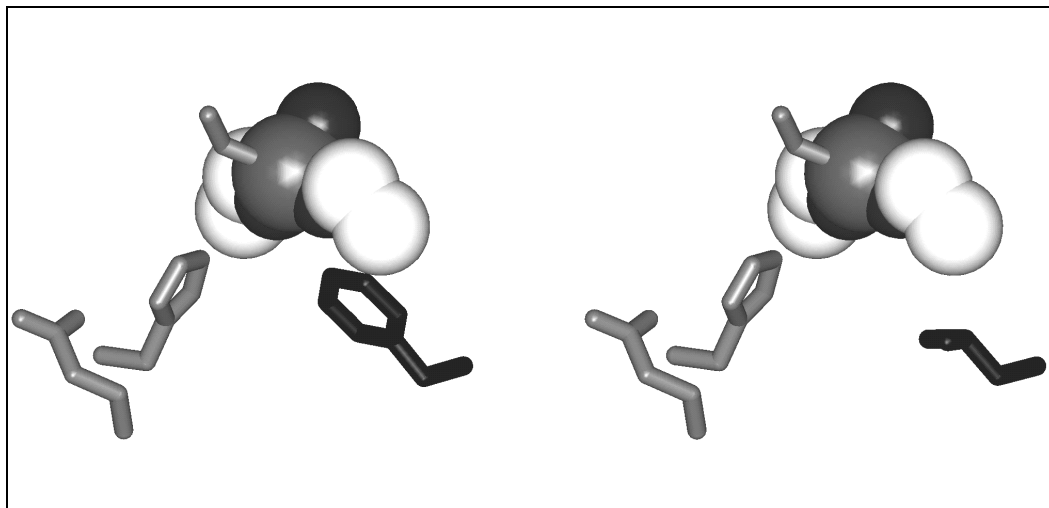


Abbildung 12: Komplex aus WT RbAChE (links) und RbF295(288)L (rechts) mit Paraoxon. Die katalytische Triade (Ser203(200), His447(440) und Glu334(327)) und die Mutation von Phenylalanin zu Leucin sind in grau bzw. schwarz dargestellt (Pleiss et al. 1997).

Anhand dieses Modells wurde der Effekt von Mutationen in der Acyltasche auf die Spezifität vorhergesagt und dann experimentell bestätigt. Der Austausch von Phenylalanin durch Leucin in der Acyltasche (RbF295(288)L) führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber allen fünf getesteten Organophosphaten und den drei untersuchten Carbamaten. Die Sensitivitätssteigerung fiel gegenüber Ethoprophos mit einem Faktor von 80 am deutlichsten aus.

Neben humaner und Rattenhirn AChE wurde *Drosophila melanogaster* AChE intensiv untersucht. Hier wurde der Schwerpunkt zunächst auf dem Verständnis von Resistenzmechanismen gelegt. Fournier et al. entdeckte, dass der Austausch lediglich einer Aminosäure für die Resistenz eines *Drosophila*-Stammes verantwortlich war (Fournier et al. 1992). Tyrosin anstelle von Phenylalanin an Position 368(290) in der Acyltasche von *Drosophila melanogaster* AChE führte zu dieser weitgehenden Resistenz. Villatte et al. produzierten eine Vielzahl von *Drosophila melanogaster*-Mutanten und untersuchte sie im Hinblick auf deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Organophosphaten und Carbamaten (Villatte et al. 2000). An 13 Stellen innerhalb der peripheren anionischen Bindestelle, der Cholinbindestelle und der Acyltasche wurden Mutationen eingeführt. Kinetische Untersuchungen der Mutanten ergab, dass der größte Teil der Mutationen eine Resistenz bewirkte. Einige Mutanten zeigten ein uneinheitliches Bild. DmF368(290)L zeigte beispielsweise eine verringerte Sensitivität gegenüber Carbaryl und eine gesteigerte gegenüber Paraoxon-methyl und den meisten anderen getesteten Organophosphaten. Drei *Drosophila*-Mutanten waren jedoch sensitiver gegenüber den meisten getesteten Organophosphaten und Carbamaten. Diese Mutationen umfassten Reste in der peripheren anionischen Bindestelle (DmE107(70)Y), in der Cholinbindestelle (DmY408(330)F) und einem Rest, der sich im Bereich des schmalen Zugangs zum aktiven Zentrum befindet und vermutlich eine Funktion in der Signalweiterleitung besitzt (DmY412(334)A). Savini et al.

postulierte eine zusätzliche Bindestelle innerhalb des schmalen Schlundes, dem Zugang zum aktiven Zentrum („mid-gorge recognition site“) (Savini et al. 2003). Tyrosin-334 war dabei ein Bestandteil dieser Erkennungsstelle. Als insgesamt sensitivste Mutante erwies sich der Austausch von Tyrosin durch Phenylalanin in der Cholinbindestelle (DmY408(330)F), der gegenüber 12 von 19 getesteten Insektiziden zu einer Sensitivitätssteigerung führte (Villatte et al. 1998). Dieser Austausch scheint π - π Wechselwirkung zwischen aromatischen Resten in der Cholinbindestelle und der Abgangsgruppe einiger kovalenter Inhibitoren zu begünstigen, wie ein Computermodell von Villatte et al. zeigte (siehe Abbildung 13).

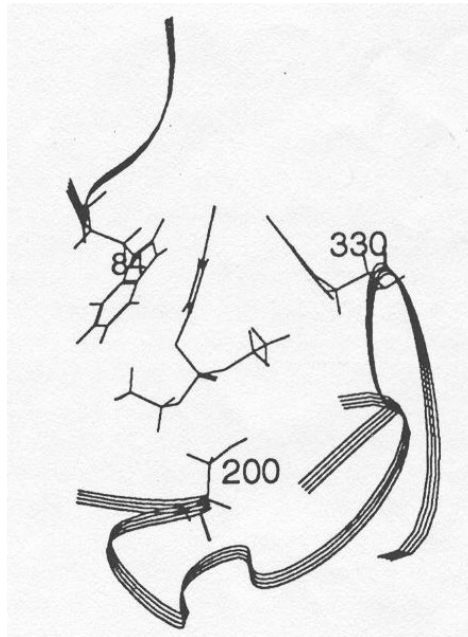


Abbildung 13: Ausschnitt des aktiven Zentrums von *Torpedo californica* AChE mit Paraoxon. Das Modell zeigt die π - π Wechselwirkung der *p*-Nitrophenyl-Abgangsgruppe mit den aromatischen Resten W84 und F330 der Cholinbindestelle. F330 entspricht dabei Y408 in *Drosophila melanogaster* AChE. Ausserdem dargestellt ist das S200 der katalytischen Triade (aus (Villatte et al. 1998)).

Die Gruppe um Didier Fournier ersetzte insgesamt 19 Aminosäuren, die mit Insektiziden auf deren Weg ins aktive Zentrum in Berührung kommen, gegen Alanin (Boublik et al. 2002). Damit sollte getestet werden welche Reste einen Einfluss auf die Sensitivität des Enzyms haben. Die Ergebnisse zeigten, dass ein einfaches „Docking“ des Inhibitors in das modellierte aktive Zentrum für die Vorhersage des Effektes von Mutationen auf die Sensitivität der AChE nicht ausreicht. Mutationen in der peripheren anionischen Bindestelle, weit weg vom aktiven Zentrum, führten in dieser Studie zu den sensitivsten Mutanten. Der Austausch von Glu-107(70) gegen Tryptophan erhöhte beispielsweise die Sensitivität gegenüber Omethoat um den Faktor 55 und zeigte eine erhöhte Sensitivität gegenüber den meisten getesteten Insektiziden. Eine doppelte Mutation innerhalb der peripheren anionischen Bindestelle (E107(70)Y, Y109(72)D) führte zu einer 300-fachen Sensitivitätssteigerung gegenüber Dichlorvos. Eine weitere Doppelmutterante der peripheren anionischen Bindestelle (Y109(72)D, Y111(74)Q) bewirkte eine vierfach erhöhte Sensitivität gegenüber Anatoxin-a(s), einem von Cyanobakterien gebildeten Neurotoxin, bei weitgehender Resistenz gegenüber Organophosphaten und Carbamaten (Devic et al. 2002). Abbildung 14 zeigt die beiden Tyrosin-Reste der peripheren anionischen Bindestelle, die in dieser Doppelmutterante verändert wurden.

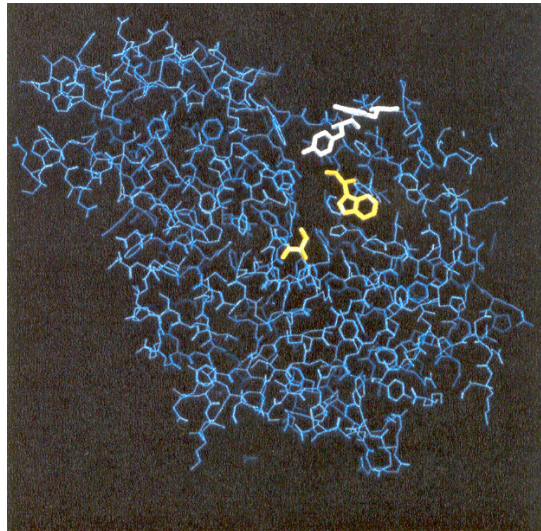


Abbildung 14: *Drosophila melanogaster* AChE-Struktur. Weiß dargestellt sind zwei Tyrosin-Reste der peripheren anionischen Bindestelle (Y109(72) und Y111(74)), deren Austausch zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Anatoxin-a(s) führte. Die periphere anionische Bindestelle befindet sich 20 Å entfernt vom aktiven Zentrum. Dargestellt sind in gelb das Serin (S276(200)) der katalytischen Triade und Tryptophan-121(84), ein Bestandteil der Cholinbindestelle (Devic et al. 2002).

3.3.4 Auswahl der Positionen für die ortsspezifische Mutagenese

Mutationen, die zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Organophosphaten oder Carbamaten führen, lassen sich nicht auf eine bestimmte Region des aktiven Zentrums beschränken. Sensitivere Mutanten wurden sowohl in der Acyltasche, in der Cholinbindestelle, als auch in der peripheren anionischen Bindestelle gefunden. Die meisten der in Kapitel 3.3.3 beschriebenen AChE-Mutanten wurden nicht mit dem Ziel hergestellt, sensitive Enzyme für Biosensoranwendungen zu erhalten, sondern waren das Ergebnis mechanistischer Studien. Deshalb wurden die meisten dieser Mutationen nur mit Modell-Analyten wie Paraoxon, DFP oder DEFP getestet. Das Verhalten dieser Mutanten gegenüber Organophosphaten und Carbamaten mit allgemein niedrigen k_i -Werten, wie etwa Aldicarb, Ethiofencarb oder Omethoat, ist in den meisten Fällen unbekannt. Jedoch geben diese Studien einen Hinweis auf Positionen innerhalb der AChE-Struktur, die zu einer Sensitivitätssteigerung gegenüber neurotoxischen Insektiziden führen können.

In dieser Arbeit wurden deshalb die in Tabelle 5 zusammengefassten Mutationen in der Acyltasche (Met-301(288), Trp-303(290)), der Cholinbindestelle (Phe-345(330)) und der peripheren anionischen Bindestelle (Trp-65(70)) von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE eingeführt. Zusätzlich zu diesen Mutationen wurde Tyr-349(334) in der „mid-gorge binding site“ durch kleinere Reste ersetzt.

Tabelle 5: Auswahl der *Nippostrongylus brasiliensis* AChE-Mutanten

NbAChE-Position (TcAChE-Position)	Ursprüngliche Aminosäure	Eingefügte Aminosäure
65 (70)	Threonin	Tyrosin
301 (288)	Methionin	Alanin Tryptophan
303 (290)	Tryptophan	Glycin Alanin Leucin
345 (330)	Phenylalanin	Alanin Tyrosin
349 (334)	Tyrosin	Glycin Leucin

In der peripheren anionischen Bindestelle sollte untersucht werden, ob ein Austausch von Threonin-65(70) gegen Tyrosin, in Analogie zu einer sensitiven *Drosophila melanogaster* AChE-Mutante (Glu107(70)Tyr) (Boublik et al. 2002; Villatte et al. 2000), ebenfalls zu einer erhöhten Sensitivität führt. Die beiden Reste der Acyltasche 301(288) und 303(290) wurden aufgrund der mit Rattenhirn, humaner und *Drosophila melanogaster* AChE erzielten Ergebnisse gegen kleinere, aliphatische Aminosäuren ersetzt (Boublik et al. 2002; Ordentlich et al. 1996; Pleiss et al. 1999; Villatte et al. 2000). Da bei *Nippostrongylus brasiliensis* AChE an Position 301(288), im Gegensatz zu den meisten anderen AChEn bereits eine aliphatische Aminosäure vorliegt, wurde diese nicht nur durch das kleinere Alanin, sondern auch durch die größere, aromatische Aminosäure Tryptophan ersetzt. Position 345(330) in der Cholinbindestelle wurde ausgewählt, weil entsprechende Mutationen in *Drosophila melanogaster* AChE zu einer der insgesamt sensitivsten AChE-Mutanten führte (Villatte et al. 1998). In *Drosophila melanogaster* AChE wurde Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt, das bei *Nippostrongylus brasiliensis* AChE an dieser Position bereits im Wildtyp vorliegt. Hier sollte nun getestet werden welchen Effekt eine Umkehr obiger Mutation bewirkt. Ausserdem wurde das aromatische Phenylalanin durch kleinere, aliphatische Reste ausgetauscht. Tyrosin-349(334) sollte ebenfalls durch aliphatische Aminosäuren ersetzt werden, weil Mutationen an dieser Position in *Drosophila melanogaster* AChE, trotz der relativ großen Entfernung zum aktiven Zentrum, Auswirkungen auf die Reaktivität gegenüber Organophosphaten und Carbamaten hatten.

Abbildung 15 zeigt ein Homologiemodell von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE B. Eine Kristallstruktur von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE ist bislang noch nicht aufgeklärt. Die gelb-markierten Reste stellen die Aminosäuren dar, an denen Mutationen in die Proteinstruktur eingeführt wurden.

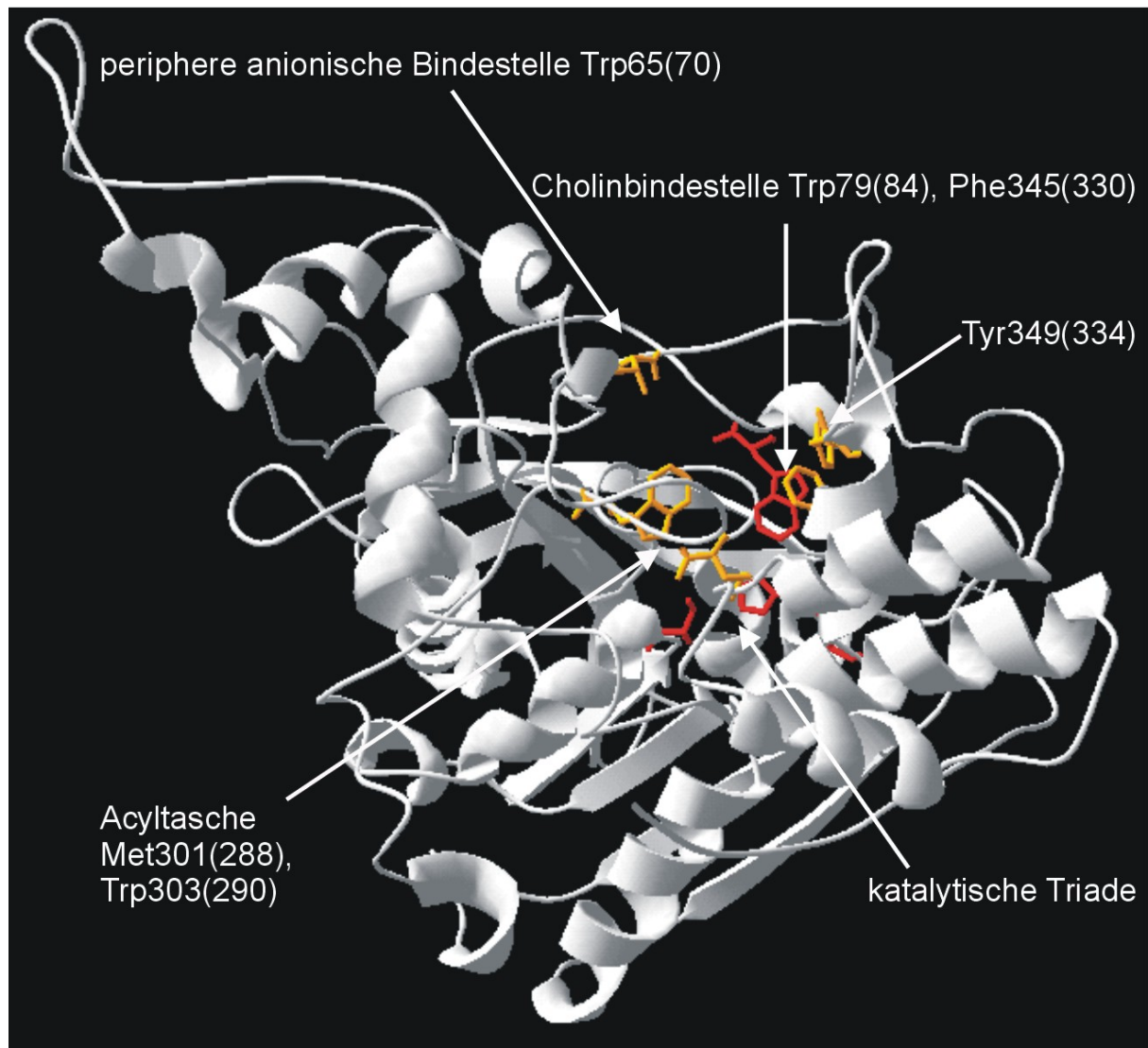


Abbildung 15: Modell von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE. Gelb dargestellt sind die Positionen, an denen Mutationen eingeführt wurden. Rot dargestellt ist das Serin, Histidin und Glutamat der katalytischen Triade und Tryptophan-79(84), ein essentieller Bestandteil der Cholinbindestelle.

Abbildung 16 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Strukturmodells. Met-301(288) und Trp-303(290) bilden die Acyltasche aus, die sich in räumlicher Nähe zu Ser-193(200) der katalytische Triade (Ser-193(200), His-446(440), Glu-342(327)). Ebenfalls dargestellt sind die Reste der Oxyanion-Bindestelle (Gly-111(118), Gly-112(119) und Ala194(201)). Phe-345(330) befindet sich in der Nähe von Trp-79(84), dem zentralen Bestandteil der Cholinbindestelle. Tyr-349(334) und in besondere Thr-65(70) befinden sich in relativ großer Entfernung zu Ser-193(200).

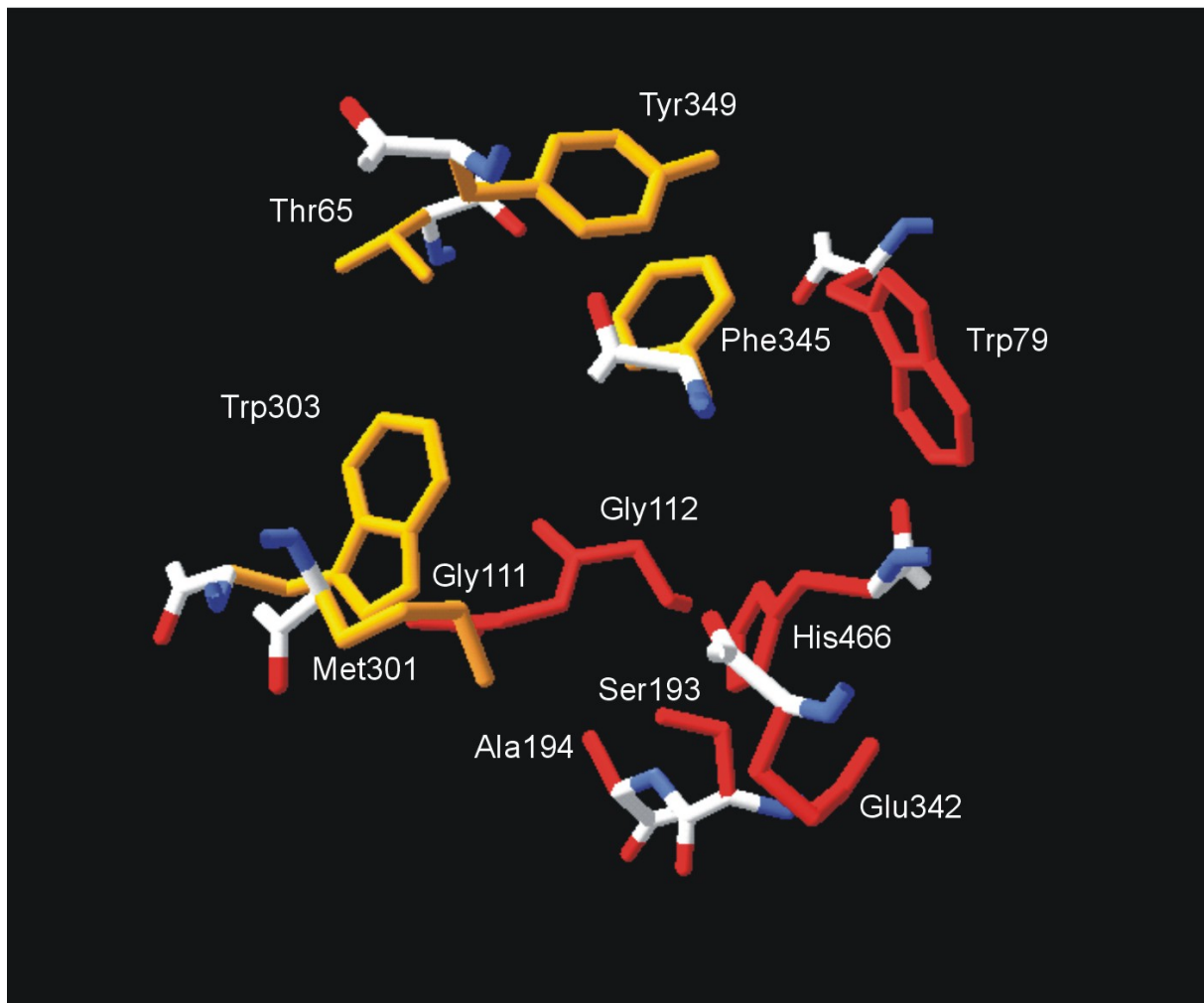


Abbildung 16: Vergrößerter Ausschnitt des *Nippostrongylus brasiliensis* AChE-Modells. Gelb dargestellt sind die Positionen, an denen Mutationen eingeführt wurden. Rot dargestellt ist das Serin, Histidin und Glutamat der katalytischen Triade und Tryptophan-79(84), ein essentieller Bestandteil der Cholinbindestelle. Glycin-111(118), Glycin-112(119) und Alanin-194(201) sind Teile der Oxyanion-Bindestelle.

3.4 AChE-Biosensoren

Für die Routineanalytik von Organophosphaten wird GC-MS/MS eingesetzt (Martinez et al. 1992; Pylypiw 1993). Die thermolabilen Carbamate können nur mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden. Diese Methoden zeichnen sich durch einen hohen apparativen Aufwand und lange Analysendauer aus. Dies hat oft zur Folge, dass die möglicherweise stark belasteten Lebensmittel schon verzehrt wurden, bevor die Untersuchungsergebnisse vorliegen. Die chromatographischen Methoden sind ausserdem begrenzt auf eine bestimmte Anzahl von Analyten. Da sich die Pestizide zum Teil erheblich in ihrem chemischen Verhalten unterscheiden, ist zu deren Erfassung oft der Einsatz mehrerer analytischer Verfahren notwendig. Aber auch dann kann nur gefunden werden wonach auch gesucht wurde. Daraus resultiert eine Gefahr von falsch negativen Ergebnissen. Hier können AChE-Biosensoren eine sinnvolle Ergänzung darstellen. Durch AChE-Tests kann die Gefahr von falsch negativen Befunden innerhalb der wegen ihrer hohen akuten Toxizität besonders relevanten Gruppe der Organophosphate und Carbamate quasi ausgeschlossen werden. Der Vorteil von AChE-Biosensoren ist, dass eine umfangreiche Gruppe von Stoffen mit ähnlichem Wirkmechanismus mit einer Methode detektiert werden können. Der AChE-Assay liefert einen Summenparameter, der sich aus der Gesamtheit aller in der Probe befindlichen Organophosphate und Carbamate zusammensetzt. Der Nachteil besteht darin, dass keine qualitativen oder quantitativen Aussagen über Einzelstoffe getroffen werden können.

Vor diesem Hintergrund wurde ein spektrophotometrischer Test entwickelt und in Deutschland standardisiert (DIN38415-1 1995). Er basiert auf dem von Ellman et al. beschriebenen optischen Nachweis von Thiocholin, das bei der Reaktion von Acetylthiocholin mit AChE entsteht (Ellman et al. 1961).

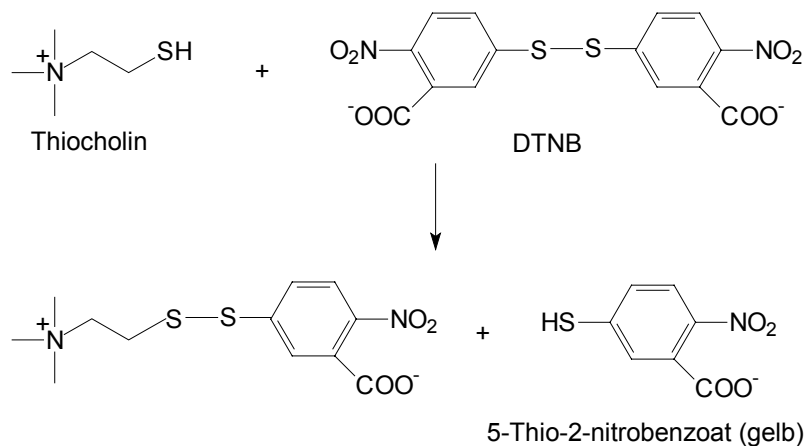


Abbildung 17: Spektrophotometrischer AChE-Aktivitätstest. Detektion des freigesetzten Thiocholins durch 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat (DNTB).

Für den Nachweis von neurotoxischen Organophosphaten und Carbamaten wurden, neben einem kommerziellen AChE-Test (Cide Lite von Charm Sciences, Malden, USA; (Saul et al. 1995)), eine Reihe von AChE-Biosensor-Prototypen entwickelt. Die Biosensoren basieren auf potentiometrischen (Evtugyn et al. 1996; Ghindilis et al. 1996; Lee et al. 2001), amperometrischen (Kulyys und D'Costa 1990; Kumaran und Tran-Minh 1992; Mionetto et al. 1992; Skladal 1991; Skladal 1992; Skladal und Mascini 1992), optischen (Choi et al. 2001; Danet et al. 2000; Fedosseeva et al. 2000; Marx et al. 2001; Pogacnik und Franko 1999b; Pogacnik und Franko 2003; White et al. 2003; Xavier et al. 2000) oder piezoelektrischen (Abad et al. 1998; Guilbault und Ngeh-Ngwainbi 1988) Transducern. Die weitaus größte Zahl der AChE-Biosensoren basiert jedoch auf einer amperometrischen Detektion der AChE-Aktivität. Dies zeigt sich auch an der großen Zahl an jüngsten Veröffentlichungen (Albareda-Sirvent et al. 2001a; Albareda-Sirvent et al. 2001b; Andreescu et al. 2002a; Andreescu et al.

2002b; Bachmann et al. 2000; Ciucu et al. 2003; Devic et al. 2002; Gogol et al. 2000; Guerrieri et al. 2002; Guerrieri und Palmisano 2001; Gulla et al. 2002; Jeanty et al. 2002; Kok et al. 2002; Montesinos et al. 2000; Neufeld et al. 2000; Schulze et al. 2002a; Schulze et al. 2002b; Villatte et al. 2002; Wilkins et al. 2000).

Tabelle 6 zeigt einen Vergleich der Nachweisgrenzen, die mit unterschiedlichen Biosensoren erreicht wurden. Neben Cholinesterase-Biosensoren sind auch Organophosphat-hydrolyase-Biosensoren mit aufgeführt. Es zeigt sich, dass Biosensoren mit amperometrischen Transducern in der Regel sensitiver sind als solche mit potentiometrischen bzw. piezoelektrischen Transducern.

Tabelle 6: Biosensoren für den Nachweis von Organophosphaten und Carbamaten

Enzym	Zusätzliche Enzyme	Transducer	Nachweisgrenze	Referenz
EeAChE bzw. PsBChE		amperometrisch	1.5 µg/L Paraoxon	(Skladal und Mascini 1992)
EeAChE bzw. PsBChE		amperometrisch	3 µg/L Paraoxon	(Hart et al. 1997)
EeAChE		amperometrisch FIA	0,3 µg/L Paraoxon	(Jeanty und Marty 1997)
EeAChE	Cholinoxidase	amperometrisch	0,2 µg/L Carbofuran	(Cagnini et al. 1995)
EeAChE	Cholinoxidase	amperometrisch	2 µg/L Carbofuran	(Palchetti et al. 1997)
EeAChE	Cholinoxidase	potentiometrisch Pt Mikroelektrode	52 µg/L Cholin 73 µg/L Acetylcholin	(Huang et al. 1993)
EeAChE		potentiometrisch FIA	25 µg/L Paraoxon	(Kumaran und Tran-Minh 1992)
EeAChE		piezoelektrisch	14 µg/L Paraoxon	(Abad et al. 1998)
DmAChE (Wildtyp und Mutanten)		amperometrisch	0,5 µg/L Paraoxon	(Bachmann et al. 2000)
ReAChE		amperometrisch FIA	3 µg/L Paraoxon	(Günther und Bilitewski 1995)
ReAChE		amperometrisch FIA	0,5 µg/L Diazinon	(Evtugyn et al. 1999)
ReAChE	Cholinoxidase	amperometrisch FIA	0,5 µg/L Carbofuran	(Kindervater et al. 1990)
BChE	Cholinoxidase Peroxidase	potentiometrische pH-Elektrode	0,1 ng/L Trichlorphon	(Ghindilis et al. 1996)
Organophosphat-hydrolyase		amperometrisch	25 µg/L Paraoxon	(Mulchandani et al. 1999a)
Organophosphat-hydrolyase		amperometrisch	6 µg/L Paraoxon	(Mulchandani et al. 2001)
Organophosphat-hydrolyase		potentiometrische pH-Elektrode	550 µg/L Paraoxon	(Mulchandani et al. 1999b)
Organophosphat-hydrolyase		potentiometrisch	1375 µg/L Paraoxon	(Gäberlein et al. 2000)

EeAChE: *Electrophorus electricus* AChE; DmAChE: *Drosophila melanogaster* AChE; PsAChE: Pferdeserum AChE; Re: Rindererythrozyten AChE; BChE: Butyrylcholinesterase; FIA: Fliessinjektionsanalyse; Pt: Platin.

Da die Enzymaktivität nach Kontakt mit der Probe in der Regel zerstört ist, muss entweder der gesamte Biosensor oder das Enzym ausgewechselt werden, wie es durch Kindervater et al. in einem Fliessinjektionssystem durch Binden der AChE an magnetischen Partikeln erreicht wurde (Kindervater et al. 1990). Die kostengünstige Herstellung von Dickschichtelektroden mittels Siebdruck ermöglichte den Einsatz der Biosensoren als Einmalsensoren (Kulys und D'Costa 1990). Abbildung 18 zeigt den schematischen Aufbau der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Biosensoren.

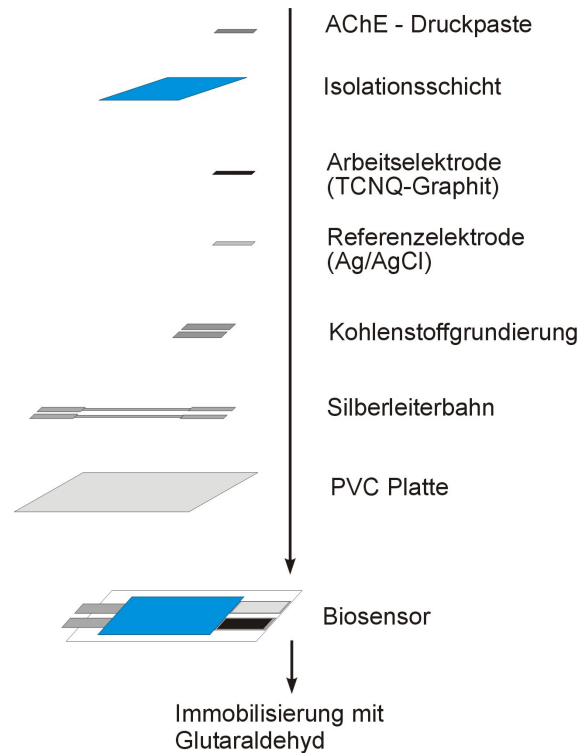


Abbildung 18: Schematischer Aufbau von im Siebdruckverfahren hergestellten Dickschichtelektroden, bestehend aus einer Ag/AgCl-Referenzelektrode und einer 7,7,8,8-Tetracyan-p-chinodimethan (TCNQ)-Graphit-Arbeitselektrode mit durch Quervernetzung immobilisierter AChE.

Für die Bestimmung der Hemmrates der AChE gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Die am weitesten verbreitete und auch in dieser Arbeit eingesetzte Methode basiert auf einer sequentiellen Bestimmung der Ausgangsaktivität (I_0), gefolgt von einer Inkubation in der Probe für eine definierte Zeitspanne und der darauf folgenden Messung der Restaktivität (I_H). Die prozentuale Hemmung der AChE lässt sich daraus dann, wie folgt, berechnen (Bachmann und Schmid 1999):

$$\%H = (I_0 - I_H) / I_0$$

Die AChE-Hemmung kann auch kinetisch bestimmt werden. Bei einer kontinuierlichen Signalaufnahme bewirkt die Zugabe der Probe einen Signalabfall. Die Steigung des Signalabfalls (dS/dt) ist dabei proportional zur Inhibitor-Konzentration. Bezogen auf das Ausgangssignal (S_0) berechnet sich die relative Hemmung (RH) wie folgt (Skladal 1991):

$$RH = (dS/dt) / S_0$$

Für die amperometrische Detektion der AChE-Aktivität kann entweder das natürliche Substrat Acetylcholin oder Acetylthiocholin verwendet werden. Bei Verwendung von Acetylcholin ist ein zweites Enzym, die Cholinesterase, notwendig, welches das bei der AChE-Reaktion gebildete Cholin weiter umsetzt.

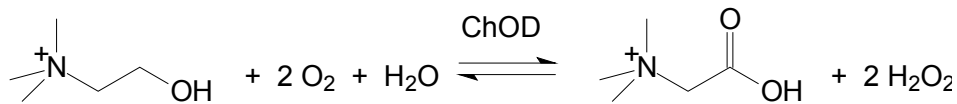


Abbildung 19: Cholindetektion mittels Cholinoxidase

Als Messgröße kann der Sauerstoffverbrauch mit einer Clark-Sauerstoffelektrode detektiert werden (Campanella et al. 1991; Mizutani und Tsuda 1982). Andere Verfahren verwenden die sensitivere Detektion des gebildeten Wasserstoffperoxids an einer Platinelektrode (650 mV vs Ag/AgCl) (Bernabei et al. 1991; Marty et al. 1992). Bei Acetylthiocholin als Substrat kann auf das zweite Enzym verzichtet werden. Das gebildete Thiocholin kann direkt elektrochemisch oxidiert werden (Skladal und Mascini 1992).

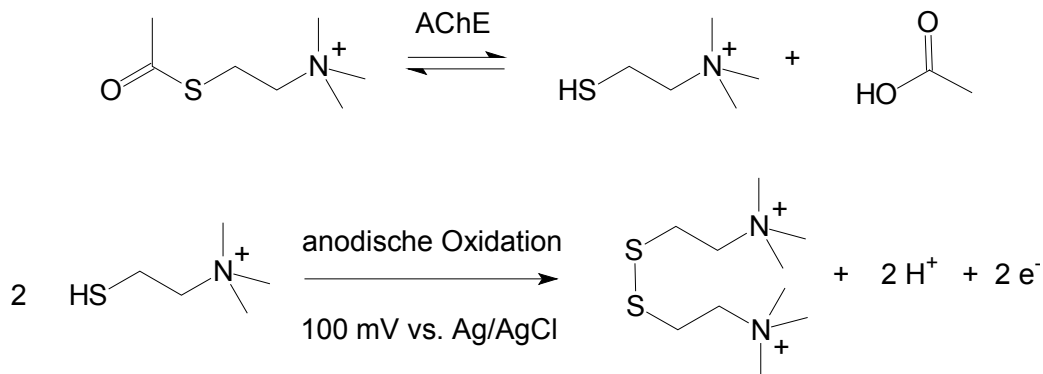


Abbildung 20: Thiocholin als Substrat für amperometrische AChE-Biosensoren

Durch den Einsatz von Mediatoren konnte das erforderliche Potential für die Thiocholin-Oxidation von 410 mV vs Ag/AgCl auf 100 mV vs Ag/AgCl gesenkt werden. Als Mediatoren werden Cobalt-Phthalocyanin (Skladal 1991) oder 7,7,8,8-Tetracyan-p-chinodimethan (TCNQ) eingesetzt (Kulys und D'Costa 1990; Kulys und Schmid 1991). Ein möglichst niedriges Potential verringert die Gefahr elektrochemischer Interferenzen mit in der Probe vorhandenen oxidierbaren Substanzen.

Die meisten der hier beschriebenen AChE-Biosensoren sind auf wässrige Proben beschränkt. Die wenigen bislang beschriebenen AChE-Biosensoren für Lebensmittel erfordern entweder eine aufwendige Probenvorbereitung oft mit organischen Lösungsmitteln oder es treten Probleme wegen Matrixeffekten auf (Argauer und Brown 1994; Nunes et al. 1998; Nunes et al. 1999; Palchetti et al. 1997; Pogacnik und Franko 1999a; Pogacnik und Franko 2003; Roda et al. 1994; Saul et al. 1995; Skladal et al. 1997).

3.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Biosensors für die Kontrolle von Lebensmitteln im Hinblick auf neurotoxische Pflanzenschutzmittel, basierend auf Acetylcholinesterase-Hemmung. Um dieses Vorhaben zu verwirklichen, mussten folgenden Fragestellungen geklärt werden:

1. Wie kann der bislang für Wasseranalytik entwickelte Biosensor (Bachmann und Schmid 1999) ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel auf komplexe Matrices übertragen werden?
2. Wie kann das Analytspektrum um die zahlenmäßig bedeutendste Gruppe an Insektiziden, den Phosphororganen, erweitert werden? Kann dafür das routinemässig für Wasserproben angewandte chemische Aktivierungsverfahren eingesetzt werden oder muss speziell für Lebensmittel eine neue Methode entwickelt werden?
3. Wie kann die Sensitivität des Systems noch weiter gesteigert werden? Dies ist für die Kontrolle des sehr niedrigen EU-Grenzwertes für Pflanzenschutzmittel in Säuglingsnahrung (10 µg/kg) von Bedeutung (EC 1999), da in der Entwicklung befindliche Kleinkinder insbesondere vor der Exposition neurotoxischer Insektiziden geschützt werden müssen.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) und Sigma Aldrich (Deisenhof, Deutschland) bezogen. Diese entsprachen mindestens der Reinheitsstufe *p.a.* Insektizid-Stammlösungen wurden in einer Konzentration von 1 g/L in Ethanol hergestellt und bei -20 °C gelagert. Verdünnungen für Biosensormessungen wurden täglich neu mit Phosphatpuffer verdünnt und auf Eis gelagert. Humane AChE (huAChE) wurde am Institut für Technische Biochemie in *Pichia pastoris* exprimiert (Vorlová 2002). Die Babybreiproben wurden in Supermärkten in Deutschland, Polen Spanien und in den USA gekauft. Desweiteren wurden folgende Chemikalien, Biochemikalien und molekularbiologische Kits verwendet:

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Electrodag 423 SS (Graphitpaste)	Acheson (Scheemda, Niederlande)
Electrodag 6037 SS (Ag/AgCl-Paste)	Acheson (Scheemda, Niederlande)
Electrodag PF-410 (Silberpaste)	Acheson (Scheemda, Niederlande)
Insektizide (Pestanal)	Riedel de Haën (Seelze, Deutschland)
Marabu Verdünner UKV2	Marabuwerke (Tamm, Deutschland)
Marastar SR 057	Marabuwerke (Tamm, Deutschland)
NADPH	Jülich Fine Chemicals (Jülich, Deutschland)
Polyvinylchlorid-Platten	SKK (Denzlingen, Deutschland)
T15 Graphit	Lonza (Sins, Schweiz)
Tween-20	Riedel de Haën (Seelze, Deutschland)
Zeocin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 8: Verwendete Biochemikalien und Kits

Biochemikalien / Kits	Hersteller
AChE vom Zitteraal (eeAChE, Type V-S, 970 U/mg)	Sigma Aldrich (Deisenhof, Deutschland)
Pfu Turbo Polymerase	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
DNA-Längenstandard 1kb ⁺ -Leiter	Gibco BRL GmbH (Eggenstein, Deutschland)
SDS-PAGE-Standard für kleine Molekülgrößen (LMW-Standard)	Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA)
Precision Protein Standard	Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA)
T4 DNA Ligase	Roche (Mannheim, Deutschland)
Oligonucleotide	Sigma ARK (Darmstadt, Deutschland)
DNA Taq-Polymerase	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Restriktionsendonucleasen (XbaI, PstI)	MBI Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland)

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz
NbAChEPstI (sens)	5'-tatactgcagatgatgggccggacggtggtg-3'
NbAChEXbaI (antisens)	5'-gccatctagattgccttagcttcatcaattag-3'
QC1/1NbT65Y	5'-gctttcaaaaacctgtttccaatacaaaagacgaaacgtaccggg-3'
QC1/2NbT65Y	5'-cccgggtacgtttcgtcttggattggaaacagggttttgaagc-3'
QC2/1NbM301W	5'-cgatatatgctgagatgcttccgtgggagtgccatttggtccg-3'
QC2/2NbM301W	5'-cggaccaaattggcactcccacggaagcatctcagcatatatcg-3'
QC3/1NbM301A	5'-cgatatatgctgagatgcttccggctgagtgccatttggtccg-3'
QC3/2NbM301A	5'-cggaccaaattggcactcagccggaagcatctcagcatatatcg-3'
QC4/1NbW303G	5'-gagatgctccgatggagggtccatttggtccgatcacc-3'
QC4/2NbW303G	5'-ggtgatcggaccaaattggaccctccatcggagcatctc-3'
QC5/1NbW303A	5'-gagatgcttccgatggagggtccatttggtccgatcacc-3'
QC5/2NbW303A	5'-ggtgatcggaccaaattggagcctccatcggagcatctc-3'
QC6/1NbW303L	5'-gagatgcttccgatggagggtccatttggtccgatcacc-3'
QC6/2NbW303L	5'-ggtgatcggaccaaattggcaactccatcggagcatctc-3'
QC7/1NbF345Y	5'-ggtgaaggacgaaggtagctactggctaccgtactacgtctgag-3'
QC7/2Nb345Y	5'-ctcagacaggtagtagcggtagccagtaggtacctcgtcctcacc-3'
QC8/1NbF345A	5'-ggtgaaggacgaaggtagcgttggctaccgtactacgtctgag-3'
QC8/2NbF345A	5'-ctcagacaggtagtagcggtagccaagcggtagcctcgtcctcacc-3'
QC10/1 (NbY349G)	5'-cgaaggtagccttctggctaccgggtacctgtctgagagtggc-3'
QC10/2 (NbY349G)	5'-gccactctcagacaggtaaccggtagccagaaggtagcctc-3'
QC12/1 (NbY349L)	5'-cgaaggtagccttctggctaccggtgtacgtctgagagtggc-3'
QC12/2 (NbY349L)	5'-gccactctcagacaggtaacaacggtagccagaaggtagcctc-3'

Die Oligonukleotide QC1/1 – QC12/2 wurden für die ortsspezifische Mutagenese (Kapitel 4.7.2.8) eingesetzt.

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Verwendete Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Agarose- Gelelektrophorese- Apparaturen	DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell	Biorad (München, Deutschland)
	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi (Cambridge, UK)
	BWM 9X Monitor	Javelin Electronics(Schaumburg, USA)
Autoklav	UV-Leuchttisch	MWG-Biotech(Ebersbach, Deutschland)
	PACS 2000	Gettinge AB (Schweden)
Inkubatoren	Multitron HAT Schüttler	Infors AG Bottmingen, Schweiz)
DNA-Sequenzier	ABI Prism 377 DNA Sequencer mit Auswertesoftware ABI Prism 377 Version 3.2	PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland)
PCR-Geräte	Master Cycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	DNA Thermal Cycler	PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland)
SpeedVac	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson (Danbury, USA)
SDS-PAGE	Minigel-Twin G42	Biometra (Göttingen, Deutschland)
	Model 583 Gel Dryer	Biorad Laboratories (München, Deutschland)
Zentrifugen	Wipptisch ROCKY	Labortechnik Fröbel (Lindau, Deutschland)
	Centrifuge 5416, 5417 C, 5417 R und 5810 R mit Einsätzen für Kunststoffreaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge mit Rotor SLA3000 Super Lite und SS34	DuPont Instruments (Leipzig, Deutschland)
Elektroporation	Gene Pulser, Pulse Controller	BioRad (München, Deutschland)
UV-Visible Spectrophotometer	Biochrom 4060	Pharmacia (Erlangen, Deutschland)
pH-Meter	Digital pH Meter	Wissenschaftlich-Technische Wrkstätten (Weilheim, Deutschland)
Siebdruckmaschine	DEK 249	DEK Ltd. (Weymouth, UK)
Potentiostat	641 VA-Detektor	Metrohm (Herisau, Schweiz)
4-Kanal-Potentiostat	MCP 94	Bank-Wenking (Clausthal-Zellerfeld, Deutschland)
Schreiber	L200E	Linseis (Selb, Deutschland)
Multikanal-Schreiber		Kipp-Zonen (Solingen, Deutschland)

4.2 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Tabelle 11: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1, endA1, phoA, hsdR17(rK ⁻ , mK [*]) phoA sup E44 λ -thi-1 gyrA96 rel A1	DSMZ
<i>P. pastoris</i> X33	Wildtyp	Invitrogen

Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe	Charakteristika	Referenz
pCYTEXP1	5,0 kb	Amp ^r , λ -Promotor, <i>E. coli</i> Vektor	
pPICZ α B	3,3 kb	Zeocin ^r , AOX-Promotor, α -Faktor, Polyhistidin-Taq, Schaukelvektor für <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	Invitrogen

4.3 Kulturmedien

Sämtliche Medien, Puffer und Lösungen wurden mit zweifach deionisiertem Wasser angesetzt. Die Sterilisierung erfolgte durch 20 minütiges Autoklavieren bei 121 °C.

Lauria-Bertani-Amp Medium(LB-Amp)

Bacto-Trypton	10 g/L
Hefe-Extrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ampicillin	100 µg/mL

Für feste Kultivierungsmedien wurde 15 g/L Agar zugesetzt.

YPDS Medium

Bacto-Pepton	20 g/L
Hefe-Extrakt	10 g/L
D-Sorbitol	182 g/L
D-Glucose	20 g/L (separat sterilisiert)
Agar	20 g/L

YPD Medium

Bacto-Pepton	20 g/L
Hefe-Extrakt	10 g/L
D-Glucose	20 g/L (separat autoklaviert)

YPP Medium

Bacto-Pepton	20 g/L
Hefe-Extrakt	10 g/L
Phosphatpuffer (1 M, pH 7,5)	100 mL/L (separat autoklaviert)

Glycerinkultur:

Glycerin (86%)	500 µL
Kultur ($OD_{600}=1$)	500 µL

4.4 Puffer und Antibiotika

Bei der Herstellung der Phosphatpuffer-Lösungen (PBS) wurde die di-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung vorgelegt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe der Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung eingestellt.

50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2):

8,709 g K_2HPO_4 in 1000 mL Wasser
6,805 g KH_2PO_4 in 1000 mL Wasser

10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5; 50 mM NaCl):

1,742 g K_2HPO_4 + 2,922 g NaCl in 1000 mL Wasser
1,361 g KH_2PO_4 + 2,922 g NaCl in 1000 mL Wasser

1M Phosphatpuffer (pH 7,5):

174,2 g K_2HPO_4 in 1000 mL Wasser
136,1 g KH_2PO_4 in 1000 mL Wasser

TE-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1mM

SDS-TE Puffer

Tris, pH 7,0	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	2 % (w/v)

Elutionspuffer

Tris-HCl, pH 8,5	10 mM
------------------	-------

Tabelle 13: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)	100 mg/mL in H ₂ O	100 µg/mL 1 µL/mL (<i>E. coli</i>)
Zeocin = Bleomycin-Derivat von Invitrogen	100 mg/mL in H ₂ O	0,25 µL/mL (<i>E. coli</i>) 1 µL/mL (<i>P. pastoris</i>)

4.5 Biosortest für Lebensmittel

4.5.1 Spektrophotometrischer Enzymaktivitätstest

Die Bestimmung der Aktivität der freien Acetylcholinesterase (AChE) wurde nach der Methode von Ellman et al. durchgeführt (Ellman et al. 1961) (T1, DIN 38415-1) durchgeführt. AChE spaltet Acetylthiocholin in Thiocholin und Essigsäure. Das freigesetzte Thiocholin reagiert mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat (DNTB) unter Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoat. Dieses wird im schwach alkalischen Bereich (pH 7,2) bei 412 nm photometrisch nachgewiesen. Gemessen wird die Änderung der Extinktion mit der Zeit.

Reagentien für den photometrischen Enzymaktivitätstest:

Phosphatpuffer-Lösung :	50 mM, pH 7,2
Acetylthiocholinjodid-Lösung (ATCh) :	10 mM in bidest. Wasser
DNTB-Lösung :	7,8 mM in 50 mM PBS
Acetylcholinesterase-Lösung	verdünnte Lösung in PBS

Versuchsdurchführung:

Wellenlänge :	412 nm
Einwegküvette :	1 cm Schichtdicke
Testvolumen :	1 mL
Extinktionskoeffizient ϵ :	13600 L mol ⁻¹ cm ⁻¹

Referenz

PBS	0,80 mL
DNTB-Lösung	0,10 mL
Start der Reaktion durch Zugabe von: ATCh-Lösung	0,10 mL

Proben

PBS	0,70 mL
DNTB-Lösung	0,10 mL
AChE-Lösung	0,10 mL
Start der Reaktion durch Zugabe von: ATCh-Lösung	0,10 mL

4.5.2 Berechnung der Enzymaktivität

Mit einem Spektrophotometer (Biochrom4060) wurde die Änderung der Extinktion mit der Zeit gemessen ($\Delta E/\Delta t$). Durch Umformung des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann daraus die Enzymaktivität bestimmt werden.

Lambert-Beersches-Gesetz : $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$

E = Extinktion

d = Schichtdicke der Küvette (1cm)

ε = Extinktionskoeffizient ($13600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V = Volumen (1mL)

$$\text{Aktivität (Akt.)} = \frac{n}{t}$$

$$E = \varepsilon \cdot \text{Akt} \cdot t \cdot d$$

$$\text{Akt} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\varepsilon \cdot d}$$

Die Aktivität wird in Units pro Milliliter angegeben : $[\text{Akt}] = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} = \frac{U}{\text{mL}}$.

Zur Ermittlung der Aktivität der Enzym-Stammlösung muß mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

4.5.3 Produktion von Dickschichtelektroden

Die Dickschichtelektroden wurden im Siebdruckverfahren mit der Siebdruckmaschine MicroDEK 248 hergestellt (Bachmann und Schmid 1999; Kulys und D'Costa 1990). Als Druckschicht dienten PVC-Platten (10x10x0,5 cm). Darauf wurden, wie in Abbildung 18 dargestellt, unterschiedlich zusammengesetzte Pasten schichtweise aufgedruckt.

Die Pasten wurden mit einer elastischen Leiste (Rakel) durch ein Sieb gepreßt. In Tabelle 14 sind die veränderbaren Parameter aufgeführt, die für die jeweilige Beschichtung gewählt wurden.

Tabelle 14: Siebdruckparameter

Produktions-schritt	Druckpaste	Druck	Siebabsprung [mm]	Rakel-geschwindigkeit [mm/s]
Silberleiterbahn	Electrodag PF-410	4	1,8	50/50
Graphit-grundierung	Electrodag 423 SS	5	1,3	70/70
Referenz-elektrode	Electrodag 6037 SS	5	1,4	70/70
Arbeitselektrode	15% (w/w) TCNQ-Graphit in 3% (w/w) HEC-Lösung	7	1,4	50/50
Isolation	Marastar SR 057 90 %ig in 5 Verdünner Matt Vinyl R14	5	2,0	70/70
AChE-Druckpaste	1 U/mL AChE in 5% (w/w) BSA in 1% (w/w) HEC	6	1,5	70/70

Der Siebabsprung gibt den Abstand zwischen Sieb und Substrat an. Die Rakel-Geschwindigkeit ist die Geschwindigkeit mit der das Rakel über das Sieb bewegt wird. Jede Schicht wurde nach dem Druck eine Stunde bei RT getrocknet, bevor die nächste aufgedruckt wurde. Nach Druck der 5. Schicht (Arbeitselektrode) wurden die bedruckten Platten eine Stunde im Trockenschrank bei 90 °C getrocknet. Danach wurden sie bei 4°C gelagert.

4.5.3.1 Arbeitselektrode

Die Arbeitselektrode bestand aus einer Mischung aus Graphit und dem Redoxmediators 7,7,8,8-Tetracyan-p-chinodimethan (TCNQ). Zur Herstellung der Druckpaste wurden 4g T15-Graphit mit 100 mg TCNQ durch Zugabe von 300 mL Aceton in einem 1 L Rundkolben gemischt. Das Aceton wurde wieder mit einem Rotationsverdampfer entfernt. Mit dem gebildeten TCNQ-Graphit wurde eine 15% ige (w/w) TCNQ-Graphit-Lösung in 3%iger Hydroxyethylcellulose (HEC)-Lösung hergestellt. Diese diente dann als Druckpaste.

4.5.3.2 AChE-Immobilisierung

Die Enzymdruckpaste enthielt 5 % (w/w) Rinderserumalbumin (BSA) und 1 U/mL huAChE oder eeAChE in 1 % (w/w) wässriger Hydroxyethylcellulose-Lösung (HEC). Diese Lösung wurde mit der Siebdruckmaschine auf die Arbeitselektroden gedruckt. Immobilisierung durch Quervernetzung wurde in einer mit Glutaraldehyddampf gesättigten Chromatographiekammer für 15 min bei RT durchgeführt. Die huAChE wurde nicht aufgereinigt in Form des *P. pastoris* Kulturüberstandes eingesetzt.

4.5.4 Biosensor-Messung

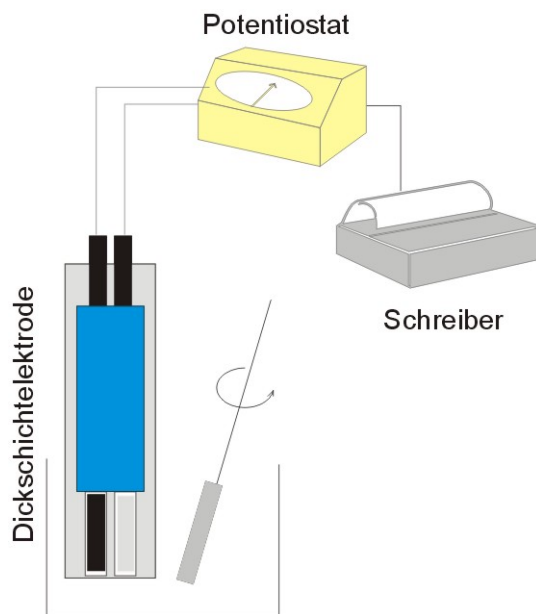


Abbildung 21: Messaufbau

Alle Biosensor-Messungen wurden, wie in Abbildung 21 exemplarisch dargestellt, in einer mit einem Überkopf-Rührer (RW 10, Ika, Staufen, Deutschland) gerührten Puffer-Lösung (10 mM PBS, 50 mM NaCl, pH 7,5) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Detektion der AChE Aktivität erfolgte durch enzymatische Hydrolyse von Acetylthiocholinchlorid (ATChCl) gemäß Abbildung 22. Dafür wurde der AChE Biosensor an einen Potentiostaten angeschlossen. Das Messsignal auf einem Schreiber aufgezeichnet.

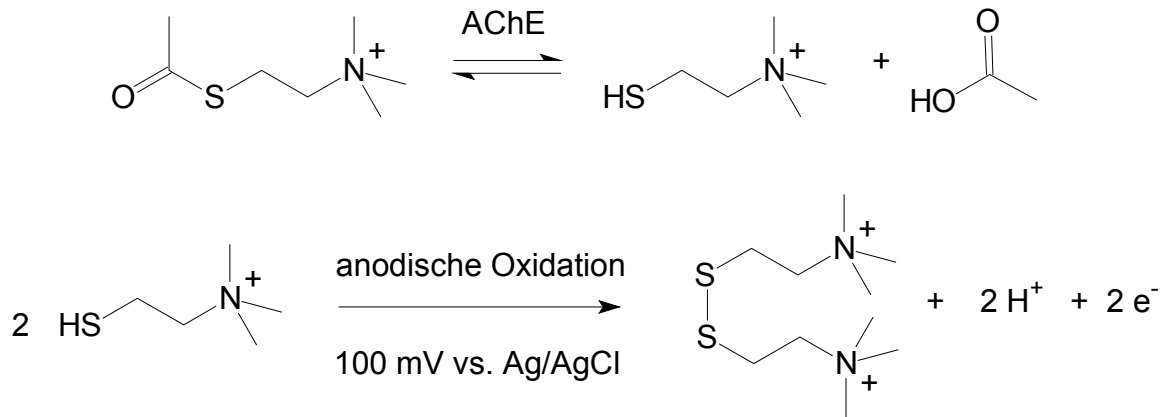


Abbildung 22: Elektrochemischer AChE Aktivitätstest

Dafür wurden nach erfolgter Equilibrierung der Elektroden (Einstellung einer konstanten Stromgrundlinie) 50 μL 100 mM ATChCl-Lösung zu 5 mL Puffer gegeben (Endkonzentration: 1mM). Das bei der enzymatischen Reaktion gebildete Thiocholin wird bei einem Potential von 100 mV gegen Ag/AgCl anodisch oxidiert. Der Stromfluss ist dabei proportional zur Ezymaktivität. Bei Hemmexperimenten wurde der Biosensor nach doppelter Bestimmung der Ausgangsaktivität für 30 min bei RT in einer nichtgerührten Probe inkubiert bevor die Restaktivität der AChE erneut bei einer Konzentration von 1mM ATChCl bestimmt wurde. Die prozentuale Hemmung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\%H = \frac{I_0 - I_H}{I_0} \cdot 100$$

%H = prozentuale AChE Hemmung

I_0 = Stromsignal vor Inkubation in der Probe (Ausgangsaktivität)

I_H = Stromsignal nach Inkubation (Restaktivität)

4.5.4.1 Reaktivierung der AChE Aktivität

Die Reaktivierung von durch Organophosphaten oder Carbamaten gehemmten AChE erfolgte mit Pyridin-2-aldoximethochlorid (2-PAM). Der Biosensor wurde dafür bei RT 30 min unter Rühren in einer 1 mM 2-PAM Lösung inkubiert. Die 1 mM 2-PAM Lösung wurde jeweils frisch in PBS (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7,5) angesetzt. Die Bestimmung der Restaktivität erfolgte dann erneut in PBS.

4.5.4.2 Untersuchung von Lebensmittelproben mit AChE Biosensoren

Homogenisierte Lebensmittelproben (10 g) wurden mit 10 mL 1 M PBS (pH 7,5) gemischt. Der AChE-Biosensor wurde nach Bestimmung der Ausgangsaktivität für 30 min in der Lebensmittelprobe inkubiert. Vor Bestimmung der Ausgangs- und Restaktivität wurden die Elektroden für 15 min in einer 1 v% (v/v) Tween-20 Lösung inkubiert und dann mit 10 mM PBS (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen.

4.6 Enzymatische Probenvorbereitung

4.6.1 30 L Batch-Fermentation

Das P450 BM-3 Gen des Wildtyps und der Dreifachmutanten (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly) wurden unter der Kontrolle des temperaturinduzierbaren P_{RPL} -Promotors von pCYTEXP1 in *E. coli* DH5 α exprimiert (Li et al. 2000; Schwaneberg et al. 1999). Die Fermentation wurde in einem 30 L Bioengineering Fermenter (Typ LP351; Wald; Schweiz), gefüllt mit 29 L LB-Medium und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin, durchgeführt. Inokuliert wurde mit 800 mL einer Übernachtskultur ($OD_{600} = 0,8-1$). Die Fermentation wurde mit einer Belüftungsrate von 25 L/min und einer Rührergeschwindigkeit von 400 UpM bei 37 °C gestartet. Nach Erreichen einer OD_{600} von 1,0 im Fermenter erfolgte die P450-Produktion mittels Hitzeschockinduktion durch Erhöhen der Temperatur für 5 Stunden von 37°C auf 42°C. Während der Induktion wurde die Menge an gelöstem Sauerstoff durch Verringerung der Belüftung auf 5,7 L/min und der Rührergeschwindigkeit auf 150 UpM reduziert. Die Aufkonzentrierung der *E. coli* Kultur von 30 L auf 2 L wurde durch Querstromfiltration mit einer Millipore Applikation (Eschborn, Deutschland) mit einer Filtron (Dreieich, Deutschland) Centrasette OMEGA (0,3 μm) Membran durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 9200 g für 20 min wurden die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.6.2 Zellaufschluß

Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g *E. coli* DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und in 20 mL Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5) suspendiert. Mittels einer Ultraschallbehandlung von viermal einer Minute (Branson Sonifier W250, Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20 %) wurde die auf Eis gekühlte *E. coli*-Zellsuspension aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde für 30 min bei 32 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird im folgenden als *Rohextrakt* bezeichnet. Der Rohextrakt wurde bei -20°C gelagert und in dieser Form für die Aktivierung von Phosphorthionaten eingesetzt.

4.6.3 GC-MS/MS Untersuchung der Reaktionsprodukte

Zu einer Lösung aus 4000 $\mu\text{g}/\text{L}$ Parathion oder Chlorpyrifos in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) wurden 0,32 μM des P450 BM-3 Wildtyps oder der Mutanten gegeben, 6 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und die Enzymreaktion durch Zugabe einer 1 mM NADPH-Lösung gestartet (Gesamtvolumen des Ansatzes: 4 mL). Nach einer Reaktionszeit von 1 h erfolgte die Extraktion der gebildeten Produkte und nicht umgesetzten Edukte mit 2 mL Dichlormethan, wobei zur Phasentrennung 30 min zentrifugiert wurde. Anschliessend wurde der Reaktionslösung 1 mL gesättigte Natriumchloridlösung zugesetzt, kräftig geschüttelt und erneut mit 2 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, abzentrifugiert und direkt zur GC-MS/MS-Untersuchung verwendet.

Die GC-MS/MS-Analyse erfolgte auf einem Star 3400CX Gaschromatograph (Varian, Palo Alto, USA) gekoppelt mit einer Iontrap Saturn 4D (Varian, Palo Alto, USA) im EI-Modus (70 eV) mit folgendem Temperaturprogramm: 45°C (1 min isotherm) – 20°C/min – 200°C – 7°C/min – 300°C (10 min isotherm). Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine DB-5MS Säule (30 m x 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 μm) von J&W Achroma (Muehlheim, Deutschland).

4.6.4 P450 BM-3 Aktivierung von Phosphorthionaten in Puffer

Phosphorthionate unterschiedlicher Konzentration wurden mit in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) mit 0,32 μM P450 BM-3 WT oder Mutante versetzt. Nach 6 min Vorinkubation wurde die

Aktivierung durch 1 mM NADPH (wässrige Lösung) gestartet. Nach 40 min wurde diese Lösung (Gesamtvolumen = 0,4 mL) als Inkubationslösung (Hemmansatz) für den optischen AChE Aktivitätstest verwendet.

4.6.5 Optischer AChE Aktivitätstest

Der spektrophotometrische Enzymaktivitätstest von Kapitel 4.5.1 wurde dahingegen abgeändert, das die AChE Restaktivität nach einer 30 minütigen Inkubation mit obigem Hemmansatz bestimmt wurde. Dafür wurden 100 µL des Hemmansatzes aus 4.6.4 mit 690 µL Phosphatpuffer (50 mM, pH7,5), 100 µL DTNB-Lösung (7,8 mM in Phosphatpuffer) und 100 µL AChE-Lösung in eine 1mL Küvette gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 10 µL ATCh-Iodid Lösung gestartet.

4.6.6 P450 BM-3 Aktivierung von Phosphorthionaten in Lebensmittelproben

Eine Lebensmittelprobe von 1,6 g wurde mit Phosphatpuffer (1 M, pH 7,5) und 0.32 µM P450 BM-3 WT oder Mutante versetzt. Nach 6 min Vorinkubation wurde 1 mM NADPH (0,8 mL wässrige Lösung) zu einer Gesamtprobenmenge von 4 g gegeben. Nach 40 min wurde diese Lösung als Inkubationslösung für den elektrochemischen AChE Biosensortest verwendet. Während der Inkubation mit P450 BM-3 wurde die Probe mit einem Überkopfrührer durchmischt. Die AChE Hemmung, die durch in der Lebensmittelprobe enthaltene aktivierte Phosphorthionate herrühren, wurde gemäß Kapitel 4.5.4 durchgeführt.

4.6.7 Chemische Aktivierung von Phosphorthionaten mit NBS

Phosphorthionate unterschiedlicher Konzentration wurden in 9,8 mL Phosphatbuffer (50 mM, pH 7,5) gelöst. Nach Zugabe von 100 µL N-Bromsuccinimid-Lösung (0,4 g/L wässrige Lösung) wurde 5 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 2 min wurden 100 µL Ascorbinsäure-Lösung (4g/L wässrige Lösung) zugegeben und erneut 5 min im Ultraschallbad inkubiert.

4.6.8 Bestimmung der P450-Konzentration durch CO-Differenzspektroskopie

Die Konzentration der P450 BM-3 Mutante wird mittels der CO-Differenzspektroskopiemethode über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt (Omura und Sato 1964). Das Differenzspektrum wird aus den Spektren zwischen reduziertem P450-CO-Komplex und reduziertem P450 ermittelt und die Konzentration an P450 nach folgender Formel berechnet:

$$c(P450) = \frac{\Delta E_{450-490} \cdot 1000 \cdot f}{\epsilon \cdot d}$$

c(P450)	Konzentration von P450 [nmol/mL]
$\Delta E_{450-490}$	Absorptionsdifferenz zwischen 450 nm der CO-begasten Probe und 490 nm der nicht begasten Probe
f	Verdünnungsfaktor
d	Länge der durchgestrahlten Küvette [cm]
	Extinktionskoeffizient von P450 (0,091 L·M ⁻¹ ·cm ⁻¹)

250 µL des AL4V Rohextraktes werden mit 2250 µL 50 mM KPP pH 7,5 verdünnt (Verdünnungsfaktor 10) und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt. Die 2,5 mL Reaktionslösung werden in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt, wobei durch eine der beiden Fraktionen 1 Min CO-Gas geleitet wird. Die zweite Probe dient als Referenz bei der spektroskopischen Messung, die in Quarzglasküvetten im Bereich von 400 nm bis 500 nm durchgeführt wird.

4.6.9 Aktivitätstest von P450 BM-3 mittels 10-pNCA-Assay

Mit Hilfe des pNCA-Assays (Schwaneberg et al. 1999) wird die Aktivität der P450 BM-3 Dreifachmutante ermittelt. Der Test basiert auf der Spaltung von p-Nitrophenoxycarbonsäuren zu σ -Oxycarboxylat und gelbem p-Nitrophenolat (pNP). Zu 5 μ L einer 15 mM 10-pNCA DMSO-Lösung werden 845 μ L Tris-HCl Pufferlösung (pH 8,0) und 50 μ L, der mit 50 mM KPP pH 7,5 verdünnten, Rohextraktlösung gegeben. Man läßt den Ansatz 5 Min bei Raumtemperatur inkubieren und startet die Reaktion durch die Zugabe von 100 μ L NADPH (5 mg/mL) und verfolgt photometrisch die Bildung von p-Nitrophenolat bei 410 nm. Die durch die Kinetikmessung erhaltene Steigung korreliert mit der Aktivität des Enzyms nach folgender Formel:

$$Akt = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon d} \cdot f \quad [Akt] = \mu\text{mol/ Min mL} = \text{U/ mL}$$

$\Delta E / \Delta t$	aus Extinktion über der Zeit ermittelte Steigung
ϵ_{pNP}	Extinktionskoeffizient ($13200 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke der Küvette
f	Verdünnungsfaktor

4.7 Sensitivitätssteigerung durch ortsspezifische Mutagenese

Für die Expression von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE B in *Pichia pastoris* wurde der kommerziell erhältliche Expressionsvektor pPICZ α B verwendet. Dieser Vektor ermöglicht die Sekretion des rekombinant exprimierten Proteins in das Medium und erleichtert dadurch die Aufreinigung bzw. ermöglicht die direkte Verwendung der produzierten AChE ohne Zellaufschluß. Hierfür wird das rekombinante Protein als Fusionsprotein mit dem α -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Das in pPICZ α B enthaltene *Streptoalloteichus hindustanus ble* Gen, das zu einer Zeocin-Resistenz führt, ermöglicht die Selektion positiver Transformanten in *E. coli* und *Pichia pastoris*. Die Expression erfolgt unter Kontrolle des Promoters der Alkoholoxidase 1 (AOX1), der durch Methanol induziert wird. In Anwesenheit von Glycerin oder Glucose wird dieser Promoter reprimiert.

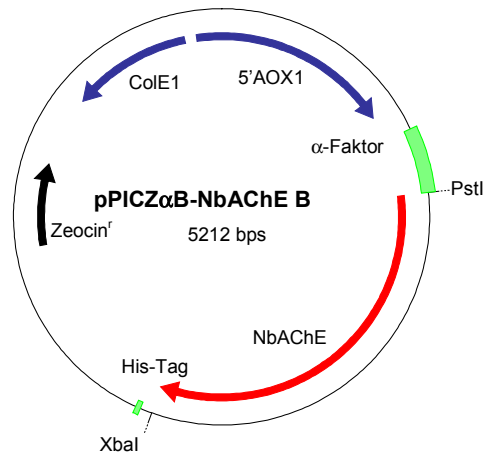


Abbildung 23: Schaukelvektor für *Pichia pastoris* und *E. coli* für die Expression der *Nippostrongylus brasiliensis* AChE in *Pichia pastoris*. Der Vektor enthält den Replikationsstartpunkt aus dem pUC-Vektor (ColE1) für die Replikation des Plasmids in *E. coli*, ein Zeocin-Resistenz-Gen für die Selektion positiver Transformanten, einen Polyhistidin-Tag für eine Affinitätsaufreinigung und den α -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae* für die Sekretion des heterolog exprimierten Proteins. Als Promotor dient der methanol-induzierbare AOX1-Promotor.

4.7.1 Mikrobiologische Methoden

4.7.1.1 Stammhaltung und Kultivierung

E. coli DH5 α wurde auf LB-Agarplatten mit Zeocin als Selektionsantibiotikum nach Anwachsen bei 37 °C über Nacht mit Parafilm verschlossen und im Kühlraum bei 10 °C gelagert. *P. pastoris* X-33 wurde nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C auf YPDS-Platten bei 10 °C gelagert.

Zur Langzeitlagerung wurden Glycerolstocks von Übernachtskulturen angelegt. Dafür wurden gleiche Volumina Übernachtskultur und Glycerin gemischt und dann bei –70 °C gelagert.

Zur Anzucht von Übernachtskulturen wurden je 4 – 10 mL Medium (*E. coli*: LB Medium; *P. pastoris*: YPD Medium) in sterilen Reagenzgläsern mittels steriler Zahnstocher von Einzelkolonien auf Agarplatten oder von Glycerolkulturen angeimpft und bei 200 Upm im Schüttelinkubator bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*P. pastoris*) inkubiert.

4.7.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurden 50 mL LB-Medium mit 0,5 mL einer Übernachtskultur angeimpft und 2 – 3 Stunden bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,7 inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 x g, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 2 mL eisklater TSS-Lösung (transformation storage solution: 10 % (v/v) PEG 6000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM Mg₂Cl aufgefällt mit LB Medium) resuspendiert und in 200 µL Portionen aliquotiert.

Für die Hitzeschocktransformation wurden 200 µL der kompetenten *E. coli* Zellen mit 1 µL Plasmid-Lösung gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 s bei 42 °C im Wasserbad) wurden die Zellen für weitere 5 min auf Eis inkubiert bevor 400 µL LB Medium zugegeben wurden. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 200 Upm wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit Zeocin als Selektionsantibiotikum ausplattiert.

4.7.1.3 Transformation von *P. pastoris*

Zur Herstellung kompetenter *P. pastoris* Zellen wurden 100 mL YPD Medium in einem 1000 mL Schikanekolben mit 200 µL einer Übernachtskultur angeimpft und 15 h bei 30 °C und 200 Upm inkubiert. Vor dem Ernten der Zellen durch Zentrifugation (1500 x g, 5 min, 4 °C) wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) bestimmt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem sterilem Wasser (90 mL und 50 mL) und dann mit 50 mL 1M Sorbitol-Lösung gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurden die Zellen jeweils zentrifugiert und in der jeweiligen Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen abhängig von der OD₆₀₀ der Ausgangskultur in Sorbitol-Lösung (1M) resuspendiert (1 mL Sorbitol-Lösung je 1,3 OD₆₀₀-Einheiten). Die zu transformierende DNA wurde durch Restriktionsverdau linearisiert. Dafür wurden 65 µL Plasmid DNA-Lösung mit 65 µL H₂O und 15 µL Puffer A (10 x; Boehringer Mannheim) gemischt und mit 5 µL des Restriktionsenzym *SacI* (10 u/µL; MBI-Fermentas) 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Reinigung der DNA durch Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Fällung wurden 5 – 10 µg der DNA mit 80 µL der kompetenten Zellen gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Für die Transformation durch Elektroporation wurde die Lösung in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und dann in einem Elektroporator (Bio-Rad) genePulser) transformiert (Spannung: 1500 V, Kapazität: 25 µF, Widerstand: 200 Ω). Sofort nach dem Puls wurde 1 mL Sorbitol-Lösung (1 M) in die Küvette gegeben, der Transformationsansatz in ein steriles Plastikgefäß überführt und ohne Schütteln für 1h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden auf YPDS-Platten mit Zeocin (100 mg/L) ausplattiert und 3 – 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.7.1.4 Expression von NbAChE in *P. pastoris* in Schüttelkolbenkulturen

Zur Expression von NbAChE wurde eine Kultur aus 50 mL YPP Medium mit 0,5 mL Glycerol und 50 µL Zeocin-Lösung versetzt und mit 0,5 mL einer Übernachtskultur angeimpft. Nach Inkubation für 18 – 24 h bei 30 °C und 200 Upm wurden entsprechend der optischen Dichte so viel *P. pastoris* Kultur entnommen, zentrifugiert (3000 Upm, 5 min, 4 °C) und in 200 mL YPP Medium mit 200 µL Zeocin-Lösung resuspendiert, so dass sich eine Anfangs-OD₆₀₀ von 1 ergab. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mL absolutem Methanol induziert. Zur Aufrechterhaltung der Induktion und als C-Quelle wurden täglich 0,5 % (v/v) Methanol zugegeben.

4.7.1.5 Expression im 5 L-Fermenter

Die Expression von NbAChE bzw. der AChE-Mutante M301(288)A in größerem Maßstab erfolgte durch *fed-batch*-Fermentation der rekombinanten *Pichia*-Stämme in einem 5 L-Bioreaktor (Labfors) der Firma Infors, wobei Rührerdrehzahl, Temperatur, pH und gelöster Sauerstoff online gemessen wurden.

Es wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt, indem 400 mL YPP-Medium mit 2 mL einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 200 Upm und 30 °C inkubiert wurden. Mit den Zellen der Vorkultur wurden 4,9 L YPP-Medium im Bioreaktor zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ ~ 1 angeimpft (Anfangs pH = 7,4). Die Expression erfolgte bei 30 °C, einer

Belüftungsrate von 10 L/min und einer Rührer-Drehzahl von 600rpm. Zu Beginn der Fermentation wurden 0,3 mL Hefe-Antischaummittel zugegeben.

Die Methanolzugabe erfolgte entweder computergesteuert, gekoppelt an den Gehalt an gelöstem Sauerstoff oder wurde kontinuierlich zugegeben. Bei der WT NbAChE-Fermentation F2 wurden 25 g Methanol pro Tag zugeführt. Bei WT NbAChE (F1)- und M301(288)A-Fermentation wurden jeweils 20 g Methanol zugegeben, wenn ein Schwellenwert von 90% Sauerstoffsättigung erreicht wurden. Bei der M301(288)A-Fermentation wurden zusätzlich 200 g YPP-Medium pro Tag zugefüttert.

Nach 8 bis 14 Tagen wird die Fermentation beendet und der Kulturüberstand durch Zentrifugation der Zellen (3000-5000 x g, 20 min, 4 °C) gewonnen.

4.7.1.6 Anionenaustausch-Chromatographie

NbAChE wurde mittels Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Als Säulenmaterial diente Q-Sepharose FF ((AmershamBiosciences, Freiburg, Deutschland). Die Probe wurde mit einer Flussrate von 5 mL/min aufgetragen. Zum Eluieren wurde die Flussrate auf 10 mL/min erhöht. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Stufengradienten (10%, 30% und 100% NaCl in Phosphatpuffer (20 mM, pH 8). Bei einer NaCl-Konzentration von 300 mM (30%) wurde NbAChE eluiert.

4.7.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.7.2.1 Produktion und Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolation sehr sauberer Plasmid-DNA wie sie für Sequenzierungsreaktionen benötigt wird wurde der „QIAprep Spin Purification Kit“ verwendet. Aus 4 mL einer Übernachtskultur wurden wie im Protokoll des Herstellers Qiagen beschrieben Plasmid-DNA mit Hilfe von Anionenaustausch-Säulen isoliert. Für größere Mengen wurden aus 50 mL einer Übernachtskultur mittels „Midi Plasmid Purification Kit“, entsprechend dem Protokoll des Herstellers, Plasmid-DNA isoliert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 300 µL Tris-HCl Puffer (10 mM, pH 8,5) aufgenommen und bei -18 °C gelagert.

4.7.2.2 Ethanol-Präzipitation von Plasmid-DNA

Zur Fällung von Plasmid-DNA wurden 1/10 Volumenteile Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumenteile Ethanol (95 %ig) gegeben. Nach kurzem Mischen wurde für 20 min bei -20 °C inkubiert und dann zentrifugiert (14000 Upm, 10 min, 4 °C). Der Niederschlag wurde mit 70 % (v/v) Ethanol (-20 °C) gewaschen, getrocknet und in H₂O wieder aufgenommen.

4.7.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Bei der Aufreinigung der DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die DNA-Lösung mit gleichen Volumina an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, gesättigt in TE-Puffer) versetzt und gut gemischt. Nach Zentrifugation (14000 Upm, 5 min, 4 °C) wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA gefällt und in H₂O resuspendiert.

4.7.2.4 Extraktion genomischer DNA aus *P. pastoris*

Die Zellen einer 10 mL *P. pastoris* Übernachtskultur wurden nach Zentrifugation (2500 Upm, 3 min, 4 °C) in 500 µL Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) resuspendiert. Für den Aufschluß der Zellen wurden 500 µL Glasperlen (0,75 – 1 µm) zugegeben und mit einem Schüttler geschüttelt (Retsch MM2000, 30 min, 4 °C, Amplitude 80). Nach Zentrifugation (14000 Upm, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand mit 150 µL SDS-TE Puffer in einem neuen Reaktionsgefäß versetzt und vorsichtig geschüttelt. Nach Erhitzen auf 65 °C (5 min) wurde 150 µL Kalium-Acetat-Lösung (5 M) zugesetzt, vorsichtig geschüttelt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000 Upm, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µL Natrium-Acetat-Lösung (3 M, pH 6) und 1 mL Isopropanol gemischt, 10 min bei -80 °C inkubiert und erneut zentrifugiert (14000 Upm, 10 min, 4 °C).

Das Pellet wurde nach 15 min trocknen an der Luft in 90 μL H_2O resuspendiert. Die genomische DNA wurde durch Zugabe von 10 μL Natrium-Acetat-Lösung (3 M, pH 6) und 200 μL Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und dann im Vakuum getrocknet (20 min, Speedvac) bevor es in 100 μL TE- RNase Puffer (1 mL TE Puffer + 2 μL RNase A (Qiagen, 100 mg/mL)) aufgenommen wurde. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert.

4.7.2.5 Restriktionsspaltung von DNA (*Pst*I und *Xba*I)

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA sequenzspezifisch.

Für die Klonierung des NbAChE Gens in pPICZ α B wurde das PCR Produkt des amplifizierten NbAChE Gens zunächst mit *Pst*I und dann mit *Xba*I behandelt. Zu 20 μL gereinigtem PCR Ansatz wurden 12 μL H_2O , 3 μL Y⁺/Tango Puffer und 2 μL *Pst*I-Lösung (10 U/ μL) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 μL Y⁺/Tango Puffer und 2 μL *Xba*I-Lösung (10 U/ μL) zugegeben und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert.

Das pPICZ α B Plasmid wurde ebenfalls mit *Pst*I und *Xba*I verdaut. Zu 10 μL Plasmid-Lösung wurden zunächst 22 μL H_2O 3 μL Y⁺/Tango Puffer und 2 μL *Pst*I-Lösung gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zu dieser Lösung wurden noch 1 μL Y⁺/Tango Puffer und 2 μL *Xba*I-Lösung zugeführt und wiederum 1 h bei 37 °C inkubiert.

4.7.2.6 Analytische Restriktionsspaltung von DNA

Für die analytische Restriktionsspaltung von DNA wurden 2 μL Plasmid-Lösung mit 22 μL H_2O und 3 μL Puffer (10x) gemischt und mit 3 μL Restriktionsenzym bzw. jeweils 1,5 μL von je zwei verschiedenen Restriktionsenzymen versetzt und für 2h bei 37 °C inkubiert.

4.7.2.7 Ligation

Zur Ligation von Vektor-DNA mit Insert-DNA wurden 32 μL H_2O , 5 μL Ligase-Puffer, 5 μL Vektor-Lösung (2-5 ng Vektor), 5 μL Insert-Lösung (20-30 ng Insert-DNA) und 5 μL T4-DNA-Ligase gemischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

4.7.2.8 Ortsspezifische Mutagenese

Mit der ortsspezifischen Mutagenese können Punktmutationen erzeugt und einzelne oder mehrere Aminosäuren deletiert, inseriert oder durch andere ersetzt werden. Die ortsspezifische Mutagenese wurde nach dem Protokoll des QuickChange™ Kit von Stratagene durchgeführt. Bei dieser Methode wird von einem doppelsträngigen Plasmid und zwei komplementären Oligonuklotiden mit der gewünschten Mutation in etwa in deren Mitte ausgegangen. Ausgehend von diesen Oligonukleotiden wird *PfuTurbo*® DNA Polymerase ein mutiertes Plasmid aufgebaut. Anschließend werden die parentalen, methylierten DNA-Stränge mit *Dpn*I verdaut. Die zurückbleibenden mutierten Plasmide werden nach Dialyse in *E. coli* transformiert.

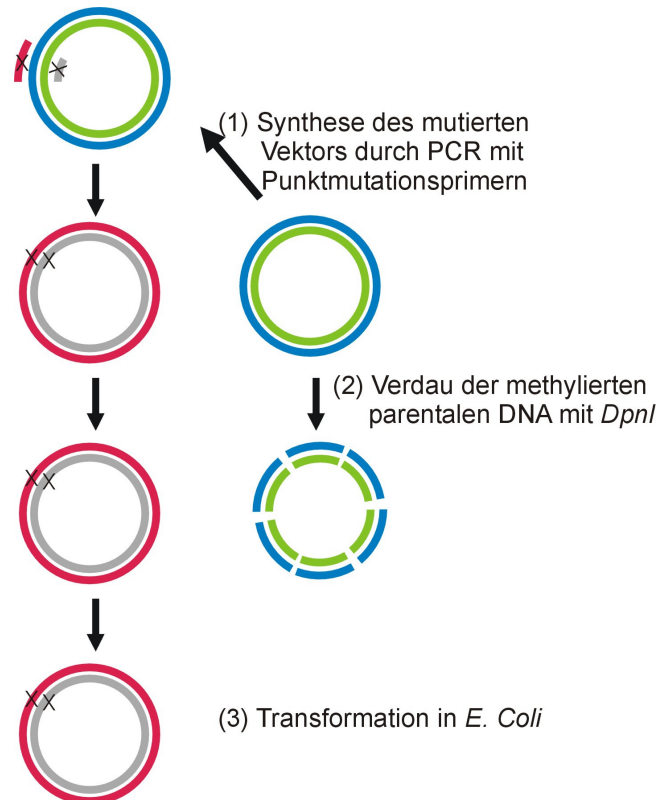


Abbildung 24: Prinzip des QuickChange-Mutagenese-Kits (Stratagene, La Jolla, USA)

Für die Durchführung der QuickChange™ PCR wurden folgender Ansatz und PCR Parameter verwendet:

Tabelle 15: Ansatz für QuickChange™ PCR

Komponente	Volumen [μL]	Menge/Konz.
H ₂ O	30,8	
10 x PfuTurbo Puffer	5	
Plasmid	1,5 (1:30 verdünnt)	5-50 ng
dNTP's	2	
Primer 1	2,1 (5 pmol/ μL)	125 ng
Primer 2	2,1 (5 pmol/ μL)	125 ng
DMSO	5	
PfuTurbo Polymerase	1,5	2,5 U/ μL

Tabelle 16: QuickChange™ PCR Parameter

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	0,5	1
Denaturierung	95	0,5	16
Anlagerung	55	1	
Extension	68	11 ^a	
Extension	68	11	1

^aExtensionszeit ist von der Plasmidgröße abhängig, ca. 2 min pro kb

Nach der PCR Reaktion wurden dem PCR Ansatz 2 μL *DpnI*-Lösung (10 U/ μL) zugesetzt und 1 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Vor der Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α wurde die verdaute Plasmid-DNA dialysiert. Dafür wurden 20 μL Verdau-Ansatz auf eine Nitrocellulosemembran (Millipore, CAS # 9004-70-0) aufgegeben, die in ein mit Wasser gefülltes Becherglas auf der Wasseroberfläche plaziert wurde. Nach 15 min wurde die dialysierte Lösung für die Transformation verwendet.

4.7.2.9 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

40 mL 1%ige Agarose-Lösung (m/v) wurden mit 4 µL Ethidiumbromid-Stammlösung vermischt und auf einen Gelträger mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Aus dem erstarrten Agarosegel konnte der Kamm entfernt werden und das Agarosegel in die Elektrophoresekammereingesetzt werden. Nach Überschichtung mit TAE-Puffer wurden die mit Auftragspuffer (Bromphenolblau-Glycerin-Lösung) vermischten DNA-Proben in die Taschen eingefüllt und eine konstante Spannung von 120 V für 40 min angelegt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte im UV-Durchlicht eines Transilluminators. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

4.7.2.10 SDS-Polyacrylamid gelelektrophorese

Zum Nachweis und zur Molekulargewichtsbestimmung rekombinant Hergestellter Proteine und deren Reinheitskontrolle wurde die SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wird ein 12,5 %iges Trenngel hergestellt, das nach Auspolymerisieren mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet wird, auf das vor der Elektrophorese die mit Auftragspuffer 1:2 verdünnten und kurz aufgekochten (5 min, 95°C) Proteinproben aufgetragen werden. Der Elektrophoreselauf erfolgt zunächst 10 min bei 10 mA pro Gel, anschließend bei 25 mA pro Gel für 40 min. Die Detektion der Proteinbanden nach dem Lauf erfolgte durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue R250 und anschließender Entfärbung der proteinfreien Bereiche in Entfärbelösung.

Sammelgel (4%)

Acrylamidlösung 30% (m/v)	0,52 mL
4x-Sammelgel-Puffer (Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8; 0,4% (m/v) SDS)	1 mL
H ₂ O	2,47 mL
TEMED	4 µL
APS (10% (m/v))	40 µL

Trenngel (12,5%)

Acrylamidlösung 30% (m/v)	3,33 mL
4x-Trenngel-Puffer (Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8, 0,4% (m/v) SDS)	2 mL
H ₂ O	2,67 mL
TEMED	4 µL
APS (10% (m/v))	40 µL

2x-SDS-Proben-Puffer

Tris	100 mM
DTT	200 mM
SDS	4% (m/v)
BPB	0,2% (m/v)
Glycerin	20% (v/v)

Elektrophorese-Puffer

Tris/HCl, pH 8,3	3 g/L
Glycerin	14,4 g/L
SDS	2 g/L

Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Brilliant Blue R-250	1 g/L
Methanol	30% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Coomassie-Entfärbelösung

Methanol	30% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

4.7.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgt nach der von Sanger entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (Sanger et al. 1977) mit Hilfe des Prism 377A-DNA-Sequencers von Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Es wurde eine zur PCR analoge und nur wenige doppelsträngige Template DNA erfordernde, zyklische Sequenzierung durchgeführt, bei der die vier ddNTPs mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, welche durch zwei Argonlaser bei 488 und 514 nm angeregt werden. Diese Vierfarbentechnik ermöglicht das Auftragen der bei der Sequenzreaktion entstandenen DNA-Fragmente in einer Spur des Polyacrylamidgels und erhöht so die Kapazität je Gel sowie die Geschwindigkeit der Datenerfassung.

Der Cycle-Sequencing-Reaktionsansatz wird gemäß folgendem Pipettierschema mit dem Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, das bereits die benötigten Mengen AmpliTaq-DNA Polymerase FS, dNTPs, Terminatoren, Salze und Puffer enthält, angesetzt:

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix	4 µL
Sequenzier-Primer	3,2 pmol
DNA	300-500 ng
H ₂ O	ad 20 µL

Die zyklische Sequenzierung erfolgt im Thermocycler unter den folgenden Bedingungen:

Tabelle 17: Programm-Parameter der zyklischen Sequenzierreaktion

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Zykluszahl
1	96°C, 1 min	-	-	1
2	95°C, 40 sec	55°C, 40 sec	60°C, 4 min	25
3	-	-	60°C, 4 min	1

Die Reinigung der bei der Sequenzreaktion entstandenen DNA-Fragmente erfolgte durch Gelfiltration mit einer Sephadex G50 Matrix, die mit einem Glasschaber in einer Multititerplatte MAHV N45 vereilt wurde und darin mit 300 µL H₂O je Kavität drei Stunden zum Quellen inkubiert wurde. Auf die gequollene Matrix wird die Probe pipettiert und durch Zentrifugation wieder eluiert. Nach zwei stündiger Trocknung wird das DNA-Pellet mit 3,5 µL einer 4:1 Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA, pH 8 resuspendiert. Hiervon wird 1 µL vor dem Elektrophoreselauf auf die Geltasche aufgetragen.

Sequenziergel-Lösung:

Harnstoff	30 g
Rotiphorese NF-10x-TBE-Puffer	6 mL
Acrylamid/Bis-Lösung 40% (29:1) für automatische Sequenzierung	9 mL
H ₂ O	23,5 mL

Die fertige Lösung wird durch eine Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert und entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 24 µL TEMED und 180 µL 10% (m/v) APS gestartet.

Resuspensionslösung für Sequenzreaktionen

Formamid	80% (v/v)
25 mM EDTA, pH 8	20% (v/v)

4.7.3 Bestimmung der Hemmkonstante k_i

Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante oder auch Hemmkonstante k_i stellt ein Maß für die Stärke der Hemmwirkung eines bestimmten Inhibitors auf die AChE dar und gibt dadurch Auskunft über die Sensitivität einer bestimmten AChE gegenüber dem jeweiligen Hemmstoff (siehe Abbildung 11).

Die Hemmung der AChE durch Organophosphate und Carbamate kann in den ersten 30 min als irreversible angesehen werden. Daher kann die Dephosphorylierungs- bzw. Decarbamylierungs-Geschwindigkeitskonstante k_3 vernachlässigt werden. Durch Verwendung einer mindestens 10-fach höheren Inhibitor-Konzentration verglichen mit der Enzym-Konzentration kann von einer Reaktion pseudo 1. Ordnung ausgegangen werden, d.h. es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der AChE-Restaktivität und der Inkubationszeit.

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -k_i [I]t$$

mit t = Inkubationszeit; $[I]$ = Inhibitor-Konzentration; $[E_0]$ = Ausgangsenzymkonzentration; $[E]$ = Konzentration an freiem Enzym nach Inkubation mit Hemmstoff; k_i = bimolekulare Geschwindigkeitskonstante.

Die Berechnung des k_i -Wertes erfolgte nach folgender Beziehung:

$$k_i = -\frac{m}{[I]}$$

mit m = ermittelte Steigung aus dem Verhältnis des Logarithmus der AChE-Restaktivität und der Inkubationszeit und $[I]$ = Inhibitor-Konzentration in mol/L.

Zur Bestimmung des k_i -Wertes wurde die AChE für unterschiedliche Zeiten mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inhibitorkonzentration war mindestens 10-fach größer als die Enzymkonzentration. Die AChE-Ausgangsaktivität und die Restaktivität wurden in leicht abgewandelter Form, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, bestimmt. In diesem Fall wurde die Reaktion in der Küvette nicht durch Zugabe von Acetylthiocholin-Iodid-Lösung, sondern durch Zugabe von 100 μ L Inkubationsansatz gestartet.

4.7.4 Multienzymsensor-Herstellung

Für Biosortests wurde eine Multienzymsensor bestehend aus vier verschiedenen Acetylcholinesterasen hergestellt. Neben der WT NbAChE wurden M301(288)A, W303(290)G und F345(330)G auf einem Elektrodenarray, bestehend aus vier nebeneinander liegenden Elektroden, immobilisiert (siehe Abbildung 25).

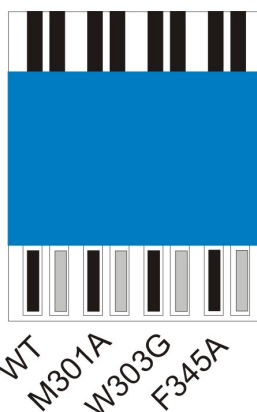


Abbildung 25: Multienzymsensor bestehend aus WT NbAChE und den drei Mutanten M301(288)A, W303(290)G und F345(330)G.

Die Enzyme wurden, wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, auf die Arbeitselektrode gedruckt und mit Glutaraldehyd quervernetzt.

4.7.5 Strukturmodell von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE

Als Template verwendet wurde die *Torpedo californica* AChE-Struktur (1EA5) mit einer Auflösung von 1,8 Å (Harel et al. 2000b). Die durch Sequenzierung des NbAChE-Gens erhaltene Sequenz (siehe Abbildung 45) wurde mit Clustal X 1.81 (Thompson et al. 1997) mit der *Torpedo californica* AChE-Sequenz unter Verwendung der voreingestellten Parameter aligned. Das Protein-Modell wurde mit den Modelling-Servern 3Djigsaw (Bates et al. 2001) und Swiss-Model (Guex und Peitsch 1997) erstellt. Mit Hilfe des 3Djigsaw-Servers wurde unter Angabe der Primaärsequenz der *Nippostrongylus brasiliensis* AChE und der Struktur der *Torpedo californica* AChE als Template die Modell-Struktur berechnet. Das vom 3Djigsaw-Server erstellte Alignment der beiden AChE-Sequenzen wurde auf der Grundlage des Clustal X-Alignments modifiziert. Die erhaltene Modell-Struktur war unvollständig. Die vorhandenen Unterbrechungen in der Struktur wurden mit der *Torpedo californica* AChE-Struktur unter Verwendung des Programms Swiss-PDB viewer und des Swiss-Modell-Servers modelliert.

5 Ergebnisse

5.1 Biosensortest für Lebensmittel

5.1.1 Vermeidung von Matrixeffekten

Für einen möglichst schnellen Testverlauf wurde untersucht ob eine direkte Messung der AChE-Restaktivität ohne weitere Behandlungsschritte möglich ist. Dies wurde mit Apfel- und Orangensaft, sowie Apfel- und Pfirsichbabybrei getestet. Wie Tabelle 18 zeigt verursachte die Inkubation in all diesen Proben eine starke Hemmung der AChE.

Tabelle 18: Wirkung von Lebensmittelproben mit natürlichem und neutralisiertem pH-Wert auf die Aktivität von immobilisierter Zitteraal-AChE im Vergleich zur hemmenden Wirkung nach Tween-20-Behandlung (unspezifische Hemmung); $n_{\min}=1$:

	AChE-Hemmung [%]		
	pH 4	pH 7	Tween-20 pH7
Apfelsaft	18	10	3
Orangensaft	56	41	2
Pfirsich-Babybrei	21	16	1
Apfel-Babybrei	19	12	1

Ein offensichtlicher Grund für die reduzierte AChE-Aktivität war der niedrige natürliche pH-Wert von Obst. Eine Neutralisierung der Probe konnte die Hemmung im Fall von Orangensaft von 56% auf 41% reduzieren. Die nach Inkubation in den neutralisierten Proben gemessene Hemmung der AChE konnte nicht durch Nukleophile wie 2-PAM reaktiviert werden. 2-PAM reaktiviert durch Organophosphate oder Carbamate inhibierte AChE durch Reaktion des Nukleophils mit dem phosphorylierten bzw. carbamylierten Serin-Rest der katalytischen Triade. Eine Reaktivierung der AChE-Aktivität ist ein sicherer Beleg für eine spezifische, durch Organophosphate oder Carbamate verursachte, Hemmung der AChE. In diesem Falle, in dem keine Reaktivierung möglich war, handelt es sich demnach um eine unspezifische AChE-Hemmung, die nicht durch Organophosphate oder Carbamate in der Probe verursacht wurde. Ein weiteres Problem bei diesen Messungen war eine extrem verlängerte Equilibrierungszeit der Elektroden nach Inkubation in der Lebensmittelprobe. Die Equilibrierungszeit ist die Zeit, die benötigt wird bis nach Anlegen eines Potentials ein konstanter Grundstrom erreicht wird. Demzufolge war es unmöglich die AChE-Aktivität direkt nach Inkubation des Biosensors in der Lebensmittelprobe zu bestimmen. Ein Grund für diese Schwierigkeiten waren wahrscheinlich Matrixpartikel, die an der Elektrodenoberfläche hefteten und auch durch kräftiges Abspülen mit Wasser nicht entfernt werden konnten. Eine Möglichkeit diese unspezifische Hemmung zu verhindern, ist die Einführung eines Extraktionsschrittes in das Testprotokoll, gefolgt von der Inkubation in dem Lösungsmittel-extrakt (Schulze et al. 2002b). In dieser Arbeit wurde ein neues, noch einfacheres Verfahren entwickelt, um die Matrixeinflüsse zu beseitigen. Nach Inkubation in der Lebensmittel wird der Biosensor, wie in Abbildung 26 zu sehen ist, in einer Detergenzlösung, bestehend aus Tween-20 (1 Vol.%) gelöst in Phosphatpuffer (pH 7,5), inkubiert.

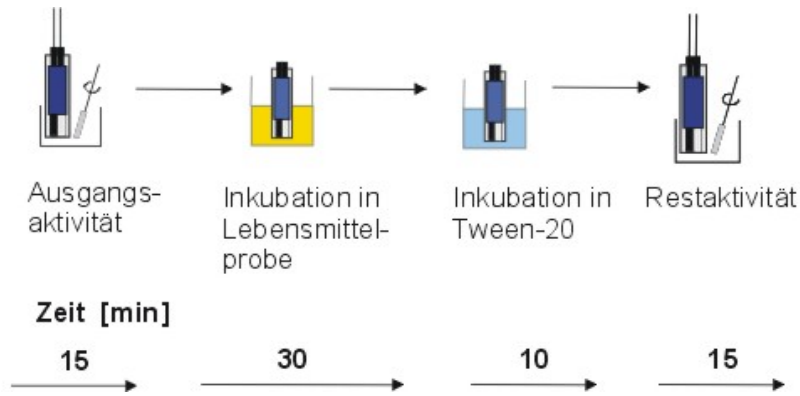


Abbildung 26: Testprotokoll des AChE-Biosensortests für Lebensmittel.

Die Tween-20-Behandlung beseitigte alle oben beschriebenen Probleme. Die unspezifische Hemmung konnte auf vernachlässigbare Werte zwischen 1 und 3% verringert werden. Die Equilibrierungszeit lag nach Tween-20-Behandlung wieder im normalen Bereich von 10 min. Die gepufferte Detergenzlösung selber verursachte keine Verringerung der AChE-Aktivität.

5.1.2 Sensor-Charakterisierung

Der neu entwickelte Biosensortest für Lebensmittel wurde in unterschiedlichen Lebensmittelproben getestet. Dafür wurde Paraoxon in Konzentrationen im Bereich des EU-Pestizidgrenzwertes für Säuglingsnahrung, der bei $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ liegt, den Lebensmitteln zugesetzt. Die daraus resultierende Hemmung von Zitteraal-AChE wurde mit einer in Puffer aufgenommenen Kalibriergerade (Abbildung 27) verglichen.

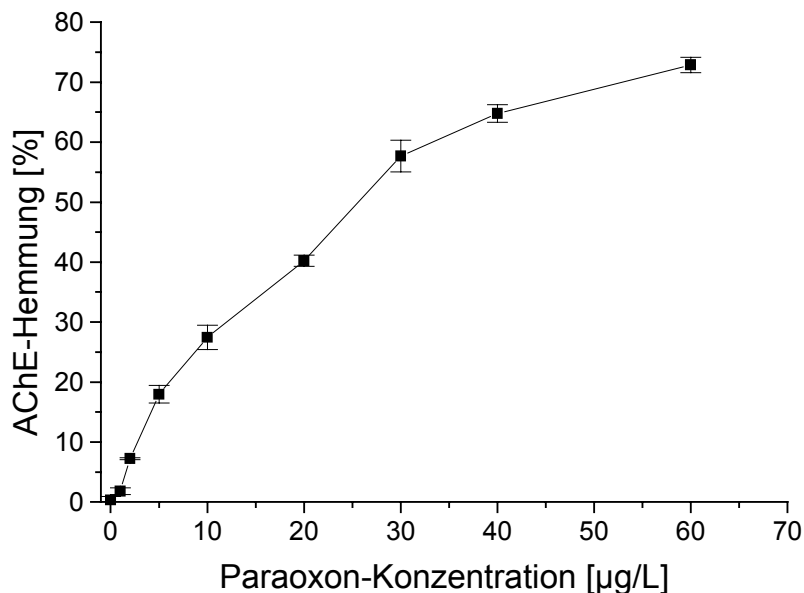


Abbildung 27: Kalibriergerade nach Inkubation von eeAChE mit unterschiedlichen Paraoxon-Konzentrationen in Puffer. Inkubationszeit: 30 min bei RT.

Aus der Differenz dieser beiden Werte wurde die Wiederfindungsrate von Paraoxon in den entsprechenden Testmatrices berechnet. Abbildung 28 zeigt die AChE-Hemmung nach Inkubation in Apfel-Babybrei.

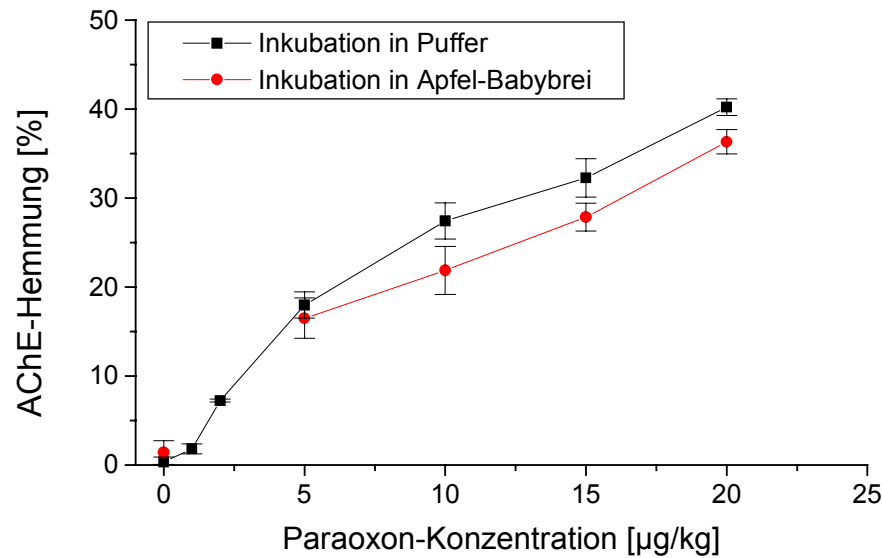


Abbildung 28: eeAChE-Hemmung verursacht durch unterschiedliche Paraoxon-Konzentrationen in Apfel-Babybrei (rot; n = 6) und Puffer (schwarz; n = 6). Inkubationszeit: 30 min bei RT.

Es ergab sich eine gute Korrelation der Hemmwerte nach Inkubation in Apfel-Babybrei mit den Daten der Paraoxon-Kalibriergerade. Die Wiederfindungsrate von Paraoxon in Apfel-Babybrei war 87%. In Pfirsich-Babybrei wurde eine Wiederfindungsrate von 83% ermittelt (siehe Abbildung 29).

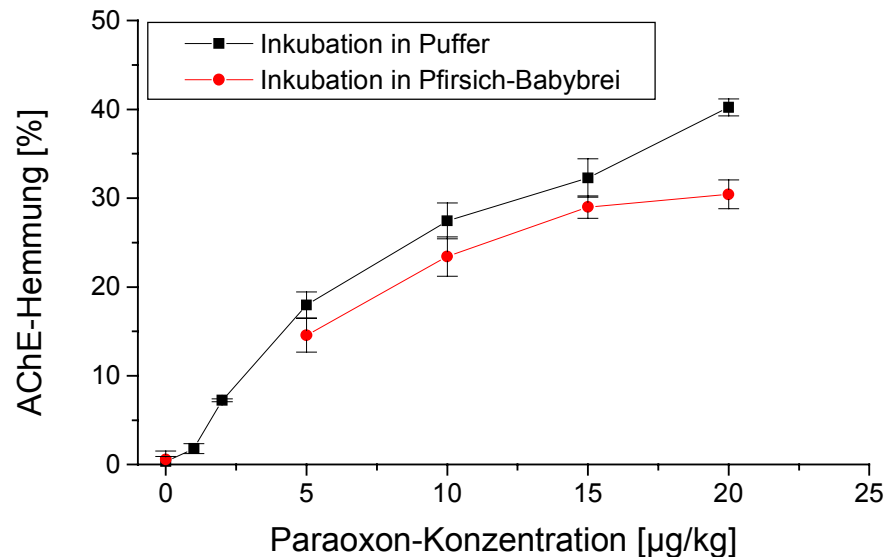


Abbildung 29: eeAChE-Hemmung verursacht durch unterschiedliche Paraoxon-Konzentrationen in Pfirsich-Babybrei (rot; n = 7) und Puffer (schwarz; n = 6). Inkubationszeit: 30 min bei RT.

Die Wiederfindungsraten liegen damit in dem gesetzlich vorgeschriebenen Bereich zwischen 70 und 110% (EC 1997). Die Standardabweichung der AChE-Hemmung lag selbst bei den hier untersuchten sehr niedrigen Konzentrationen unter 10%. So ergab sich eine prozentuale Standardabweichung von 5% in Puffer und 8 bzw. 9% in Pfirsich- und Apfel-Babybrei. Die Nachweisgrenze von Paraoxon lag sowohl in Pfirsich- als auch in Apfel-Babybrei unter $5 \mu\text{g/kg}$ ($1,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$). Das Signal/Rausch-Verhältnis bei $5 \mu\text{g/kg}$ lag in beiden Fällen

deutlich über einem Verhältnis von 3:1. Für Pfirsich-Babybrei ergab sich zum Beispiel ein Verhältnis von 8:1. Niedrigere Konzentrationen wurden in Lebensmitteln nicht getestet. Die Nachweisgrenze von Paraoxon in Puffer betrug $1 \mu\text{g/kg}$ ($3,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$).

5.1.3 Validierung mit Standardverfahren

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Biosensortest für Lebensmittel wurde mit 26 Obst- und Gemüseproben vom CVUA Stuttgart validiert. Diese Realproben wurden vorher am CVUA Stuttgart mittels GC-MS untersucht. Für die Biosensortests wurden zwei Arten von AChEn verwendet; kommerziell erhältliche Zitteraal-AChE und rekombinante humane AChE. Das Verhältnis der Hemmung der beiden Enzyme wurde in Tabelle 19 mit dem Verhältnis der Hemmkonstanten ($k_{i_{ee}} / k_{i_{hu}}$) verglichen.

Tabelle 19: Validierung des Biosensortests mit chromatographischen Standardverfahren

Sample	GC-MS	H_{ee} [%]	H_{hu} [%]	H_{ee} / H_{hu}	$k_{i_{ee}}$ [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]		$k_{i_{hu}}$ [$M^{-1} \text{ min}^{-1}$]		$k_{i_{ee}} / k_{i_{hu}}$
					[1]	[2]	[1]	[2]	
Birne	22 $\mu\text{g/kg}$ Carbofuran	48	25	1,9	$2,9 \cdot 10^6$	$0,8 \cdot 10^6$			3,6
Kirsche	40 $\mu\text{g/kg}$ Methiocarb	11	14	0,8	$1,0 \cdot 10^5$	$0,9 \cdot 10^5$			1,1
Apfel	158 $\mu\text{g/kg}$ Pirimicarb	1	4	0,3	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^4$			0,1
Apfel	40 $\mu\text{g/kg}$ Dichlorvos	33	38	0,9	$4,2 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^4$			0,8
Paprika	110 $\mu\text{g/kg}$ Methamidophos	24	37	0,6					
Apfel	114 $\mu\text{g/kg}$ Carbaryl	21	n.u.		$6,6 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$			2,4
Birne	50 $\mu\text{g/kg}$ Carbaryl	71	n.u.		$6,6 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$			2,4
	17 $\mu\text{g/kg}$ Chlorpyrifos-ethyl*				$1,8 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^7$			0,3
	20 $\mu\text{g/kg}$ Chlorpyrifos-methyl*				$0,7 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$			0,3
Zitrone	123 $\mu\text{g/kg}$ Chlorpyrifos-ethyl*	18	27	0,7	$1,8 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^7$			0,3
	813 $\mu\text{g/kg}$ Methidathion*				$0,6 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^5$			6,7
Zitrone	32 $\mu\text{g/kg}$ Chlorpyrifos-ethyl*	27	31	0,9	$1,8 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^7$			0,3
	2470 $\mu\text{g/kg}$ Methidathion*				$0,6 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^5$			6,7
Orange	5 $\mu\text{g/kg}$ Chlorpyrifos-ethyl*	21	32	0,7	$1,8 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^7$			0,3
	1060 $\mu\text{g/kg}$ Methidathion*				$0,6 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^5$			6,7
	838 $\mu\text{g/kg}$ Malathion*				$1,7 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^5$			5,2
Grapefruit	180 $\mu\text{g/kg}$ Chlorpyrifos-ethyl*	23	18	1,3	$1,8 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^7$			0,3
	830 $\mu\text{g/kg}$ Methidathion*				$0,6 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^5$			6,7
Pfirsich	n.d.	13	n.u.						
Apfel	n.d.	0	2						
Paprika	n.d.	0	0						
Erbse	n.d.	0	1						
Erbse	n.d.	0	1						
Erbse	n.d.	1	1						
Salat	n.d.	2	n.u.						
Spargel	n.d.	3	3						
Spargel	n.d.	4	7						
Spargel	n.d.	0	10						
Kartoffel	n.d.	22	9						
Karoffel	n.d.	5	5						
Stachel- beere	n.d.	13	19						
Nisperos	n.d.	5	3						
Pflaume	n.d.	8	5						

H_{ee} : Hemmung von Zitteraal-AChE; H_{hu} : Hemmung von humaner AChE; k_i : Hemmkonstante; n.d.: nichts detektiert; n.u.: nicht untersucht. * k_i Werte beziehen sich auf die oxidierte Form der Organophosphate.

[1]: P. Herzsprung, Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung, *Dissertation TU München* 1991.

[2]: F. Villatte, V. Marcel, S. Estrada-Mondaca, D. Fournier, Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides, *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998) 157.

In den ersten sechs Proben wurde jeweils nur ein Insektizid bei der GC-MS Untersuchung gefunden. Eine Birnenprobe, die 22 µg/kg Carbofuran enthielt, verursachte eine 48%ige Hemmung der eeAChE und eine 25%ige Hemmung der huAChE. Die unterschiedlich starke Hemmung der Enzyme korreliert mit der Differenz der k_i -Werte gegenüber den entsprechenden Neurotoxinen. Die schwache Hemmung nach Inkubation in einer Apfelprobe mit 158 µg/kg Pirimicarb steht in Einklang mit den niedrigen k_i -Werten von $1,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ der eeAChE und $1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ der huAChE. Die Verhältnisse der AChE-Hemmung der ersten vier Proben (1,9 / 0,8 / 0,3 / 0,9) entsprachen dem Verhältnis der k_i -Werte (3,6 / 1,1 / 0,1 / 0,8). Für Methamidophos sind bislang keine k_i -Werte bekannt. Die nächsten fünf Proben in Tabelle 6 enthielten eine Mischung verschiedener Neurotoxine. In Birnen wurden 50 µg/kg Carbaryl, 17 µg/kg Chlorpyrifos-ethyl und 20 µg/kg Chlorpyrifos-methyl detektiert. Diese Probe verursachte eine Hemmung der eeAChE von 71%. Der Grund für die beobachtete Hemmung, verursacht durch die folgenden vier Proben (2x Zitrone, Orange, Grapefruit) konnte nicht abschließend geklärt werden. In diesen Proben wurden bei der GC-MS Untersuchung nur Phosphorthionate gefunden, die in diesen Konzentrationsbereichen AChE nicht hemmen (siehe 6.2). Möglicherweise wurde ein Teil dieser Phosphorthionate durch spontane Oxidation, z.B. durch die Einwirkung von UV-Licht, in die korrespondierende Oxo-Form überführt (Chambers und Levi 1992). Des Weiteren wurden 15 Proben getestet, in denen mittels GC-MS keine Pestizide gefunden wurden. Die meisten dieser Proben verursachten keine oder nur eine schwache AChE-Hemmung (< 10%). Einige dieser Proben zeigten jedoch eine deutliche, über 10%ige Hemmung, wie z.B. Stachelbeeren mit 13 % Hemmung von eeAChE und 19% Hemmung der huACHE. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist das eingeschränkte Analytenspektrum der GC-MS-Methode. So decken die für Pestizidanalytik von Obst und Gemüse üblicherweise eingesetzten Multimethoden nur ca. 200 von 500 eingesetzten Pestiziden ab. Eine ganze Reihe von AChE-Inhibitoren sind dabei nicht enthalten.

5.1.4 Untersuchung von Babynahrung

Babynahrung aus Deutschland, Spanien, Polen und den USA wurde mit dem AChE-Biosensor getestet. Die Proben mit einem positiven Befund wurden daraufhin vom CVUA Stuttgart mit LC-MS und GC-MS Multimethoden untersucht. In Tabelle 20 sind die Carbamate mit den entsprechenden Nachweisgrenzen aufgeführt, die von der LC-MS Multimethode abgedeckt wurden. Tabelle 21 zeigt die Liste der Organophosphate, nach denen mittels GC-MS gesucht wurde.

Tabelle 20: Liste der mit LC-MS untersuchten Carbamate. Aufgeführt sind die Target- und Qualifierionen mit den dazugehörigen Fragmentor-Spannungen (Frag. [V])

N-Methyl-Carbamate	M+1 (Frag. [V])	M-56 (Frag. [V])	M+18 plus NH ₄ ⁺ (Frag. [V])	M+23 plus Na ⁺ (Frag. [V])	Andere Ionen (Frag. [V])	Nachweisgrenze [mg/kg]
Aldicarb	213 (30)	-	208 (20)		116 (50)	0,005
Aldicarb Sulfon (Aldoxycarb)	223 (65)	166 (100)	240 (30)	245 (100)		0,01
Aldicarb Sulfoxid	207 (40)	-	224 (20)	229 (75)	132 (65) 166 (100)	0,01
Aminocarb	209 (40)	152 (90)				0,005
Bendiocarb	224 (50)	167 (100)	241 (15)		109 (100)	0,01
Carbanolat	214 (50)	157 (90)				0,01
Carbaryl	202 (50)	145 (100)	219 (70)	224 (60)		0,01
Carbofuran	222 (50)	165 (90)			123 (140)	0,005
Dioxacarb	224 (30)	167 (65)			123 (90)	0,01
Ethiofencarb	226 (30)	169 (55)	243 (10)		164 (70) 107 (90)	0,01
Ethiofencarb Sulfon	-	201 (50)			218 (30) 223 (60) 107 (80)	0,01
Ethiofencarb Sulfoxid	-	185 (30)			207 (50) 107 (65)	0,01
Fenobucarb	208 (50)	152 (90)	225 (15)			0,002
Isoproc carb	194 (60)	137 (80)			152 (90)	0,005

N-Methyl- Carbamate	M+1 (Frag. [V])	M-56 (Frag. [V])	M+18 plus NH ₄ ⁺ (Frag. [V])	M+23 plus Na ⁺ (Frag. [V])	Andere Ionen (Frag. [V])	Nachweisgrenze [mg/kg]
Landrin	194 (50)	137 (100)	211 (20)			0,002
Methiocarb	226 (20-70)	169 (90)			121 (110) 107 (110) 218 (25)	0,005
Methiocarb Sulfon	258 (70)	201 (100)			122 (100) 107 (110) 170 (140)	0,01
Methiocarb Sulfoxid	242 (80-90)	185 (115)			122 (140) 106 (10)	0,005
Methomyl	163 (40)	106 (80)		185 (80)		0,005
Metolcarb	166 (50)	109 (100)	183 (10)			0,005
Oxamyl	220 (40)	-	237 (10)	242 (80)		0,01
Promecarb	208 (50)	151 (100)	225 (10)		109 (100)	0,002
Propoxur	210 (25)	153 (70)	227 (10)		111 (100) 168 (70)	0,005
Pestizidvorstufen						
Thiodicarb	355 (30)	-			193 (60) 149 (70) 108 (90)	0,005
Benfuracarb	411 (50)	-		433 (130)	190 (90) 195(130)	0,005
Furathiocarb		-		405 (150)	252(110) 195(130)	0,005
Carbosulfan	381 (80)	-		419 (90) plus K ⁺	160 (120) 118 (130) 195 (130)	0,005

Tabelle 21: Liste der mit GC-MS untersuchten Organophosphate

Organophosphate	Target- und Qualifier-Ionen				Nachweisgrenze
					[mg/kg]
Acephate	136	94	125		0,01
Azinphos-methyl	160	132	77		0,02
Bromophos	331	329	333	125	0,001
Bromophos-ethyl	359	303	357	301	0,002
Chlorfenvinphos	323	267	269		0,001
Chlorpyrifos	197	199	314		0,001
Chlorpyrifos-methyl	286	288	125	109	0,001
Demeton-S-methyl	88	109	142	230	0,01
Dichlorvos	222	220	185	187	0,01
Dicrotophos	237	192	193		0,01
Dimethoat	125	93	229		0,01
Disulfoton	274	142	186	88	0,002
Ethion	384	231	153		0,001
Ethoprophos	242	200	158	139	0,002
Etrimfos	292	277	181	153	0,001
Fenamiphos	303	288	260	217	0,001
Fenchlorphos	285	125	287	241	0,01
Fenitrothion	277	125	260		0,002
Fenthion	278	125	169		0,002
Fonofos	246	137	109		0,001
Isofenphos	213	255	121		0,002
Malaoxon	268	239	195	127	0,01
Malathion	173	125	127		0,001
Methamidophos	126	94	95	141	0,01
Methidathion	145	85	125		0,005
Mevinphos	192	109	164	127	0,01
Monocrotophos	223	192	193		0,01
Omethoate	156	110	79		0,01
Paraoxon	275	247	220	149	0,01
Paraoxon-methyl	247	230	200	109	0,02
Parathion	291	155	235		0,001
Parathion-methyl	263	125	109	233	0,001
Phorate	260	231	121	75	0,001
Phosalone	367	184	182	121	0,002
Phosmet	160	317	133		0,005
Phosphamidon	264	127	138		0,01
Pirimiphos-methyl	290	305	276	233	0,001
Profenofos	208	337	339	139	0,005
Prothiofos	309	267	311		0,001
Pyrazophos	221	232	265	373	0,005
Pyridaphenthion	340	199	188		0,002
Quinalphos	146	298	156		0,002
Tolyfluanid	238	240	181		0,002
Sulfotep	322	266	202	294	0,001
Terbufos	288	231	186	153	0,002
Tolclofos-methyl	265	267	125	250	0,001
Triazophos	257	161	162		0,005
Trichlorfon	221	145	109	147	0,02

Insgesamt wurden 23 unterschiedliche Sorten von Säuglingsnahrung getestet: 13 Proben von vier deutschen Herstellern, vier Sorten von zwei spanischen Herstellern, vier Sorten einer polnischen Marke und je eine Sorte Babynahrung zweier amerikanischer Produzenten. Die Biosensormessungen wurden erneut mit Zitteraal AChE und humaner AChE durchgeführt. Da es sich bei der Kontrolle von Babynahrung um extrem niedrige Pestizidkonzentrationen handelt wurde in dem Test eine zusätzliche Absicherung eingebaut (siehe Abbildung 30).

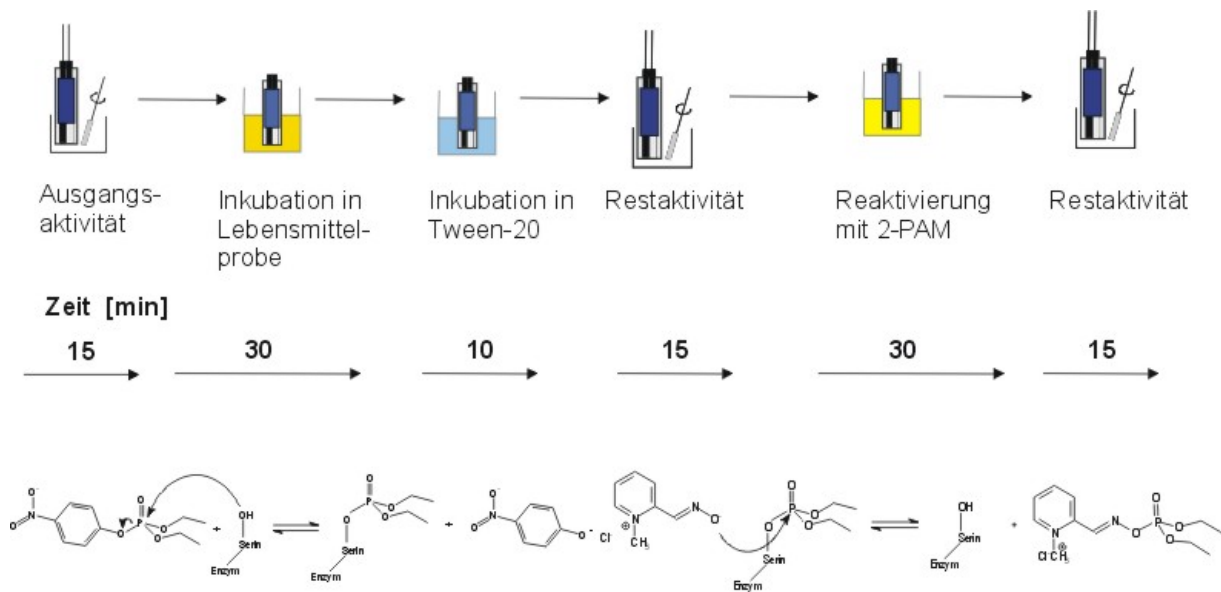


Abbildung 30: Testprotokoll des AChE-Biosensortests für die Kontrolle von Babynahrung.

Die Bestimmung der Reaktivierungsrate der gehemmten AChE stellte sich als ein geeignetes Mittel heraus, um eindeutig Babynahrung, die mit Neurotoxinen belastet war von unbelasteter Babynahrung zu unterscheiden. Die Reaktivierung von AChE mit einem Nukleophil, hier 2-PAM, ist jedoch nur solange möglich bis der sogenannte Alterungsprozeß („Aging“; Abspaltung eines Alkylrestes) des phosphorylierten Enzyms einsetzt. Die Kinetik des Alterungsprozesses ist abhängig von der Struktur des Organophosphates, das mit der AChE reagiert. Methoxy-Reste altern z.B. schneller als Ethoxy-Reste (Chambers und Levi 1992). Gulla et al zeigten, dass der Alterungsprozess bereits nach einer Wartezeit von 15 min nach Hemmung von AChE durch Paraoxon einsetzt (Gulla et al. 2002). Nach 180 min konnte die AChE-Aktivität nur noch zu 40% durch 2-PAM reaktiviert werden.

Von den 23 getesteten Babybreiproben verursachten 13 eine zumindest teilweise reaktivierbare AChE-Hemmung (siehe Tabelle 22). In 11 von diesen 13 Proben wurden Pestizide gefunden. In zwei Proben, die eine reaktivierbare AChE-Hemmung verursachten wurden keine Neurotoxine bei den GC-MS und LC-MS Messungen detektiert. Hier muss sicherlich wiederum das begrenzte Analytspektrum der chromatographischen Standardverfahren berücksichtigt werden. Die anderen zehn getesteten Babybreis verursachten keine reaktivierbare AChE-Hemmung. Diese Proben wurden nicht per GC-MS oder LC-MS untersucht. Von den 14 gefundenen Pestiziden sind die folgenden AChE-Inhibitoren: Pirimicarb, Ethiofencarb, Carbaryl, Methiocarb und Paraoxon. Carbaryl wurde am häufigsten detektiert.

Tabelle 22: Untersuchung von Babynahrung mit dem AChE-Biosensor und mittels GC- und LC-MS

Babybrei		H _{ee} [%]	R _{ee} [%]	H _{hu} [%]	R _{hu} [%]	GC/LC-MS
Banane-Mandarine-Birne (Deutschland)	(Jul01)	5	0	10	68	20 µg/kg Pirimicarb 50 µg/kg Ethiofencarb
Banane-Mandarine-Birne (Deutschland)	(Jun00)	n.u.		0	0	n.u.
Obstsalat (Deutschland)		6	79	9	59	10 µg/kg Carbaryl 6 µg/kg Metalaxyl
Ananas-Banane (Spanien)		13	74	5	50	4 µg/kg Metalaxyl
Pfirsich-Maracuja (Deutschland)		7	97	2	100	n.d.
Pfirsich-Mango (Polen)		20	20	8	20	1 µg/kg Carbaryl
Karotten (Polen)		8	59	8	50	n.d.
Gemischte Früchte (Spanien)		15	29	16	30	4 µg/kg Methiocarb 4 µg/kg Diphenylamin
Banane-Pfirsich-Apfel (Deutschland)		11	19	9	25	2 µg/kg Carbaryl
Aprikose-Joghurt (Deutschland)		12	47	6	33	2 µg/kg Methiocarb 2 µg/kg Myclobutanil 1 µg/kg Piperonyl-butoxid 3 µg/kg Iprodion
Aprikose-Birne (Deutschland)		15	30	6	40	3 µg/kg Methiocarb
Apfel-Pfirsich (Polen)		30	2	5	0	n.d.
Pfirsich (USA)		12	21	13	13	70 µg/kg Propiconazol 20 µg/kg Esfenvalerat
Banane (USA)		27	50	29	26	1 µg/kg Carbaryl
Apfel-Banane (Deutschland)		9	0	14	0	n.u.
Fruchtdessert (Deutschland)		6	3	12	0	n.u.
Banane-Pfirsich-Apfel (Deutschland)		8	3	3	0	n.u.
Apfel (Spanien)		13	0	1	0	n.u.
Williams-Christ-Birne (Deutschland)		16	0	0	0	n.u.
Pfirsichnektar (Spanien)		0	0	16	7	2 µg/kg Paraoxon 1 µg/kg Fenhexamid 1 µg/kg Azoxystrobin
Apfel-Banane (Deutschland)		3	100	0	0	n.u.
Apfel (Polen)		2	0	n.u.		n.u.
Pfirsich in Apfel (Deutschland)		0	0	n.u.		n.u.
Apfel-Reisbrei (Deutschland)		0	0	0	0	n.u.

H_{ee}: Hemmung von Zitteraal-AChE; H_{hu}: Hemmung von humaner AChE; R_{ee}: Reaktivierungsrate der Zitteraal-AChE; R_{hu}: Reaktivierungsrate der humanen AChE; n.d.: nichts detektiert; n.u.: nicht untersucht.

Bei dieser Testreihe wurden drei Überschreitungen des von der Europäischen Union festgelegten Grenzwertes für Babynahrung von 10 µg/kg festgestellt. Ein deutscher Bananen-Mandarinen-Birnen-Brei enthielt 20 µg/kg Pirimicarb und 50 µg/kg Ethiofencarb. Die Untersuchung dieser Probe mit dem huAChE-Biosensor ergab eine 10 %ige Hemmung, die zu 68% reaktiviert werden konnte. Eine ältere Charge des selben Babybreis enthielt keine Neurotoxine, hier wurde keine Hemmung der huAChE detektiert. Ein deutscher Obstsalat-Babybrei enthielt 10 µg/kg Carbaryl. Auch in diesem Fall wurden hohe Reaktivierungsraten von 79% (eeAChE) bzw. 59% (huAChE) festgestellt. Propiconazol (70 µg/kg) und 20 µg/kg Esfenvalerat wurden in einem amerikanischen Pfirsichbrei gefunden. Die beiden Verbindungen sind keine AChE-Inhibitoren. Propiconazol ist eine Fungizid und Esfenvalerat ein Pyrethroid-Insektizid. Die reaktivierbare AChE-Hemmung läßt jedoch auf das Vorhandensein von zusätzlichen Neurotoxinen in der Probe schließen. Esfenvalerat wird häufig in Kombination mit Carbamaten und Organophosphaten eingesetzt.

5.2 Enzymatische Probenvorbehandlung

Phosphorthionate sind in ihrer ursprünglichen, nicht metabolisierten Form sehr schwache AChE-Inhibitoren. Parathion-Konzentrationen von 20, 100, 1000 und 2000 µg/L verursachten nur eine geringfügige AChE Hemmung zwischen 3 und 9% (siehe Abbildung 31).

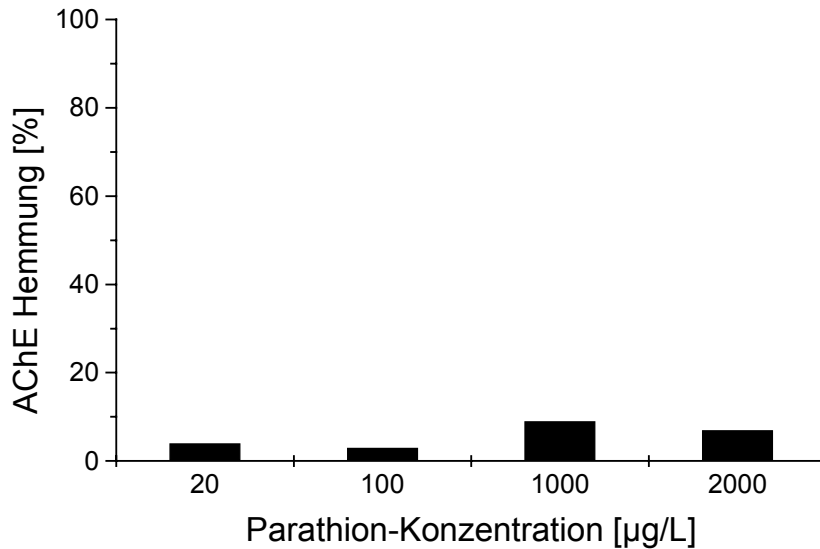


Abbildung 31: AChE Hemmung verursacht durch unterschiedliche Parathion-Konzentrationen. Parathion wurde vor der AChE Inkubation (30 min bei RT) weder chemisch noch enzymatisch aktiviert.

Die Standardmethode der chemischen Aktivierung mit NBS wurde in Lebensmittelproben getestet. Es zeigte sich hierbei, dass die DIN-Vorschrift nicht direkt auf Lebensmittel ohne eine Extraktion der Probe mit organischen Lösungsmitteln übertragbar ist. Selbst eine vierfach höhere NBS-Konzentration (20 mg/L) als die für wässrige Proben verwendete ergab keine AChE-Hemmung nach Inkubation in Apfel-Babybrei mit 20 µg/kg Parathion. Eine sehr viel höhere NBS-Konzentration von 1,6 g/L bewirkte nach Inkubation in Lebensmittelproben mit und ohne Parathion (20 µg/kg) eine gleich große AChE-Hemmung von ca. 20 %.

5.2.1 GC-MS/MS Analyse der Reaktionsprodukte der P450-Aktivierung

Cytochrom P450 BM-3 wurde ausgewählt, um andere spezifischere Methoden für die Aktivierung von Phosphorthionaten zu testen. Untersucht wurde die Fähigkeit von WT P450 BM-3 und der Dreifachmutanten (Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly), Phosphorthionate in die entsprechenden AChE-hemmenden Oxo-Verbindungen zu überführen. Mit GC-MS/MS Analyse wurden dabei die nicht umgesetzten Edukte und die gebildeten Produkte im Reaktionsansatz nachgewiesen. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist bewirkte die Mutante eine nahezu vollständige Transformation von Parathion (Retentionszeit = 16,82 min) zu Paraoxon (Retentionszeit = 16,15 min), wohingegen bei der Reaktion mit WT P450 BM-3 kein Paraoxon entstand.

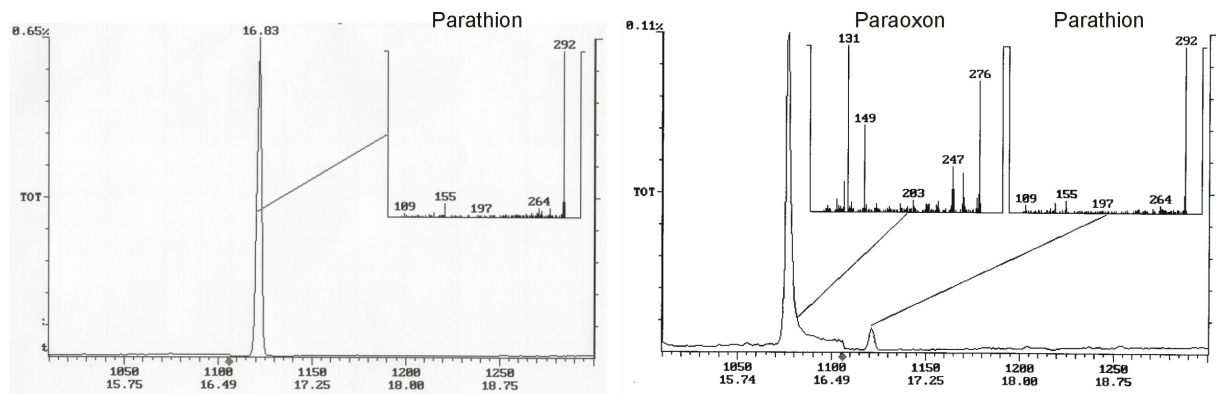


Abbildung 32: GC-MS/MS-Spektren der Reaktionsprodukte der Umsetzung von Parathion (MW=291 g/mol) durch WT P450 BM-3 (links) und der P450 BM-3 Mutante (rechts). Bei der Reaktion von Parathion mit dem WT fand keine Umsetzung zu Paraoxon (MW=275 g/mol) statt (links). Dagegen wird bei der Umsetzung von Parathion mit der Mutante Paraoxon gebildet (rechts).

Über den Vergleich der MS-Spektren der Reinsubstanzen Parathion (MW=291 g/mol) und Paraoxon (MW=275 g/mol) wurden die Produkte und Edukte identifiziert. Die Analyse einer Mischung aus gleichen Mengen an Parathion und Paraoxon ergab eine 6-fach höhere Signalintensität für Parathion als bei Paraoxon (siehe Abbildung 33).

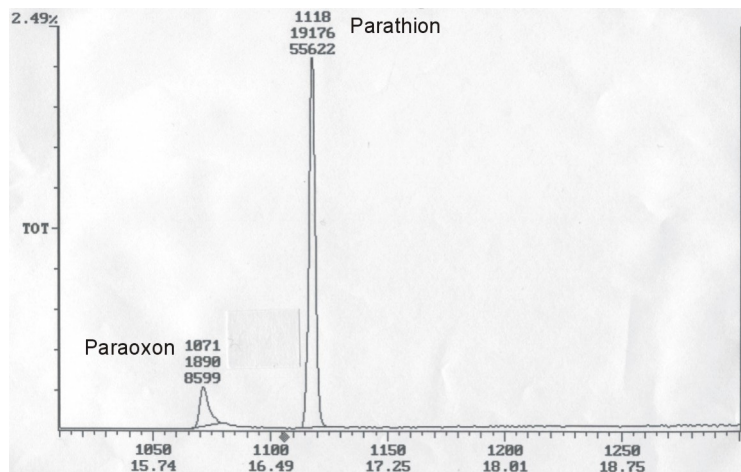


Abbildung 33: GC-MS/MS-Spektrum einer 1:1 Mischung von Parathion und Paraoxon (je 4 mg/L) für die Ermittlung des Signalintensitätsverhältnisses.

Die Umsetzung von Parathion mit der P450 BM-3 Mutante ergab ein Peakverhältnis Paraoxon/Parathion von 15:1. Berücksichtigt man das Signalintensitätsverhältnis kann hier von einer nahezu quantitativen Transformation von Parathion zu Paraoxon ausgegangen werden.

Untersuchungen mit Chlorpyrifos führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Der größte Teil von Chlorpyrifos (MW=350 g/mol) wurde durch die P450 BM-3 Mutante zu Chlorpyrifos-oxon (MW=334 g/mol) umgesetzt. Die Analyse der Einzelmassen-Registrierung („Selected Ion Monitoring“, SIM-Modus) zwischen $m/z=314-317$, spezifisch für Chlorpyrifos, und $m/z=333-337$, spezifisch für Chlorpyrifos-oxon, ergab ein Produktverhältnis Chlorpyrifos-oxon / Chlorpyrifos von 650 zu 1 (siehe Abbildung 34).

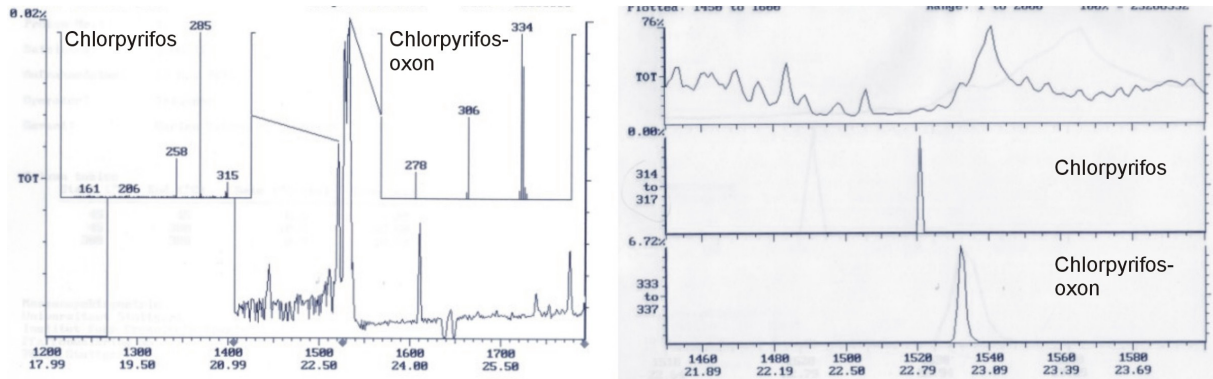


Abbildung 34: GC-MS/MS-Spektrum der Reaktionsprodukte der Umsetzung von Chlorpyrifos (MW=350 g/mol) zu Chlorpyrifos-oxon (MW=334 g/mol) durch die P450 BM-3 Mutante (links). Rechts ist die Einzelmassen-Registrierung (SIM) zwischen $m/z=314-317$, spezifisch für Chlorpyrifos und $m/z=333-337$, spezifisch für Chlorpyrifos-oxon dargestellt.

Die Reaktion von Chlorpyrifos mit dem unveränderten WT P450 BM-3 ergab keine Bildung von Chlorpyrifos-oxon, wie in Abbildung 35 zu sehen ist. Nach Umsetzung von Chlorpyrifos mit dem WT P450 BM-3 wurde nur Chlorpyrifos und kein Chlorpyrifos-oxon nachgewiesen.

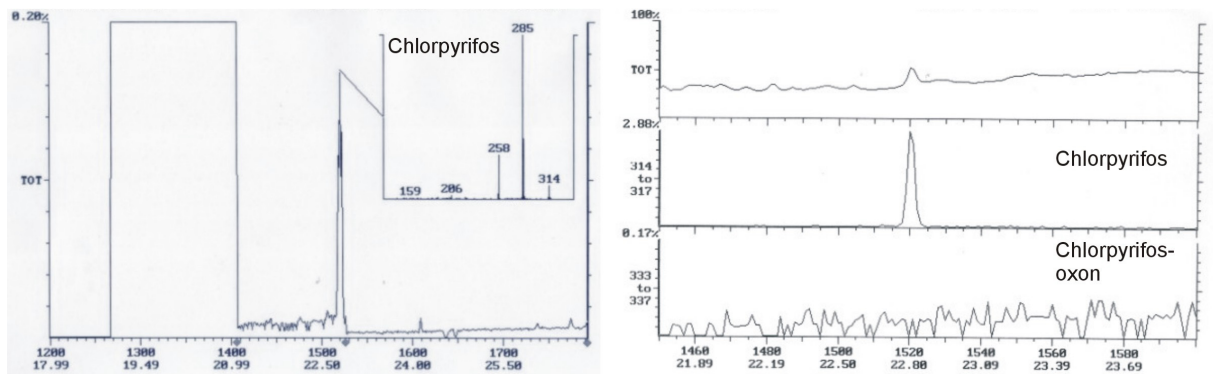


Abbildung 35: GC-MS/MS-Spektrum der Reaktionsprodukte der Umsetzung von Chlorpyrifos (MW=350 g/mol) mit WT P450 BM-3 (links). Rechts ist die Einzelmassen-Registrierung (SIM) zwischen $m/z=314-317$, spezifisch für Chlorpyrifos und $m/z=333-337$, spezifisch für Chlorpyrifos-oxon dargestellt. In diesem Fall wurde kein Chlorpyrifos-oxon gefunden.

5.2.2 AChE-Hemmtest mit enzymatisch aktivierten Phosphorthionaten

Die Aktivierung von Phosphorthionaten durch die P450 BM-3 Mutante wurde anhand ihrer AChE-hemmenden Wirkung untersucht. Tests in wässriger Lösung wurden mit dem optischen AChE-Aktivitätstest nach Ellman et al. durchgeführt (Ellman et al. 1961). Ausgewählt wurden dafür die vier häufig in Lebensmitteln gefundenen Phosphorthionate Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Methidathion und Parathion. Diese unterscheiden sich in der Struktur der aromatischen Seitenkette und der Alkoxyreste am zentralen Phosphoratom, wie in Abbildung 36 zu sehen ist.

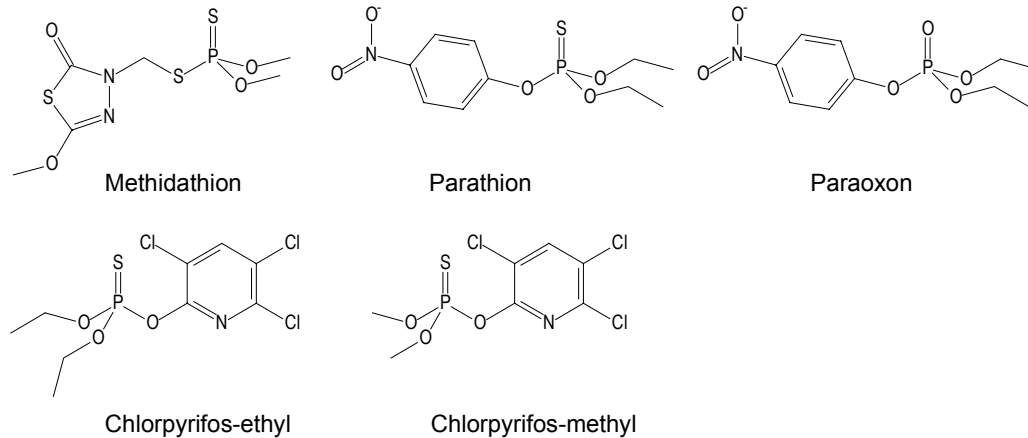


Abbildung 36: Struktur der untersuchten Organophosphate

Die Ergebnisse des AChE-Hemmtests sind in Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt. Phosphorthionat-Konzentrationen im Bereich zwischen 1 und 100 µg/L führten nach Aktivierung mit der P450 BM-3 Mutante zu einer Hemmung von AChE. Die Effizienz der enzymatischen Aktivierung von Chlorpyrifos und Parathion wurde verglichen mit der chemischen Oxidation von Chlorpyrifos und der AChE-Hemmung, die durch dieselben Konzentrationen von Paraoxon, dem Oxo-Analog von Parathion, verursacht wurden. Der Vergleich ergab eine Transformations-Effizienz von 85 % im Falle von Parathion und 99 % für Chlorpyrifos.

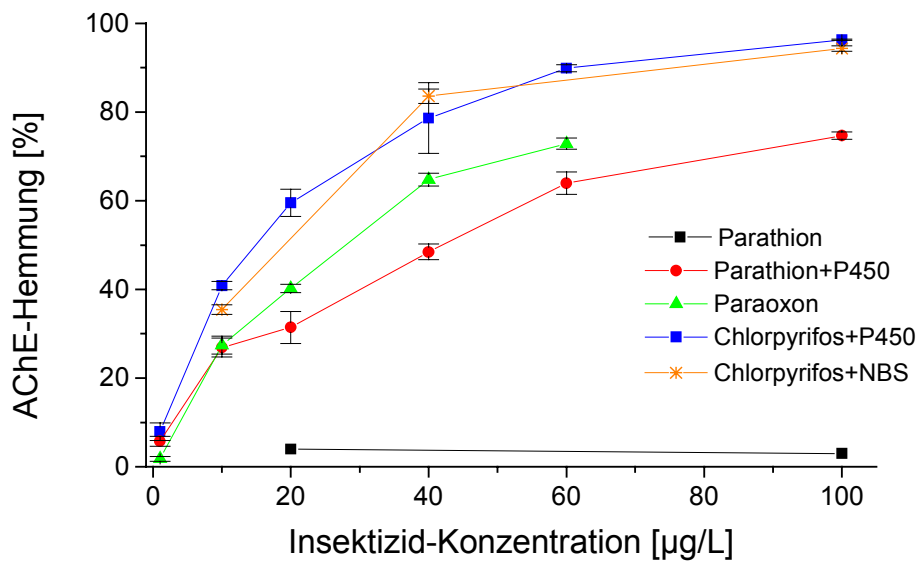


Abbildung 37: eeAChE-Hemmung in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedlicher Organophosphate in Puffer, bestimmt mit dem optischen AChE Aktivitätstest. Chlorpyrifos und Parathion wurden vor der AChE-Inkubation mit der P450-BM3 Mutante aktiviert. Zusätzlich sind Daten von chemisch oxidiertem Chlorpyrifos und Paraoxon, dem Oxo-Analog von Parathion, und von nicht-aktiviertem Parathion dargestellt. Die AChE-Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur.

Die ansteigende Hemmwirkung von Parathion, über Chlorpyrifos-methyl zu Chlorpyrifos, bei gleicher Inhibitor-Konzentration, steht im Einklang mit den k_i -Werten der entsprechenden Enzym/Inhibitor-Kombinationen von $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für Parathion, $0,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für Chlorpyrifos-methyl und $1,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für Chlorpyrifos (Herzprung 1991). Verglichen damit war die Hemmung durch aktiviertes Methidathion höher als es der von Herzprung publizierte k_i -Wert von $0,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ erwarten ließ.

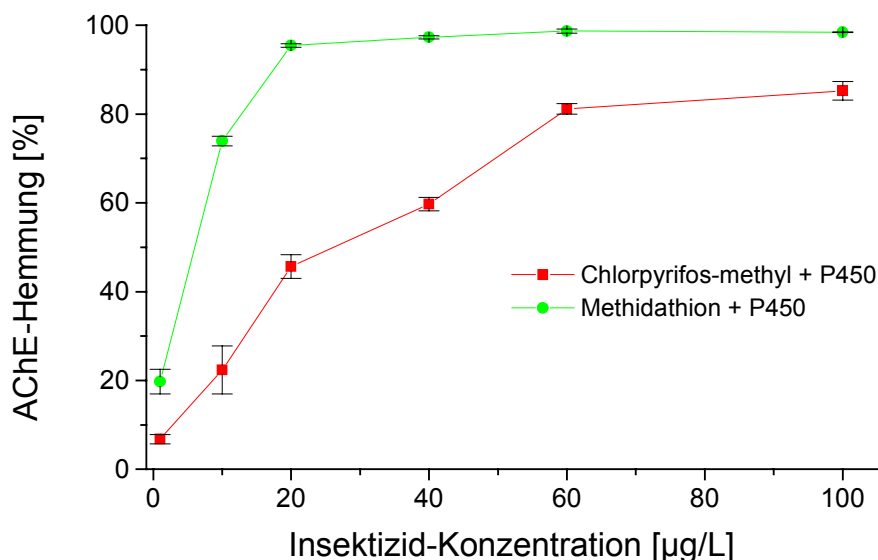


Abbildung 38: eeAChE-Hemmung in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedlicher Organophosphate in Puffer, bestimmt mit dem optischen AChE Aktivitätstest. Die Aktivierung von Chlorpyrifos-methyl und Methidathion erfolgte mit der P450 BM-3 Mutanten. Die AChE-Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur.

5.2.3 Phosphorthionat-Aktivierung in Lebensmittelproben

Die Anwendbarkeit der neuen enzymatischen Aktivierungsmethode für komplexe Lebensmittelproben wurde untersucht. Dafür wurde die P450 BM-3 Aktivierung mit dem in 5.1 beschriebenen Biosensortest kombiniert, wie in Abbildung 39 dargestellt ist.

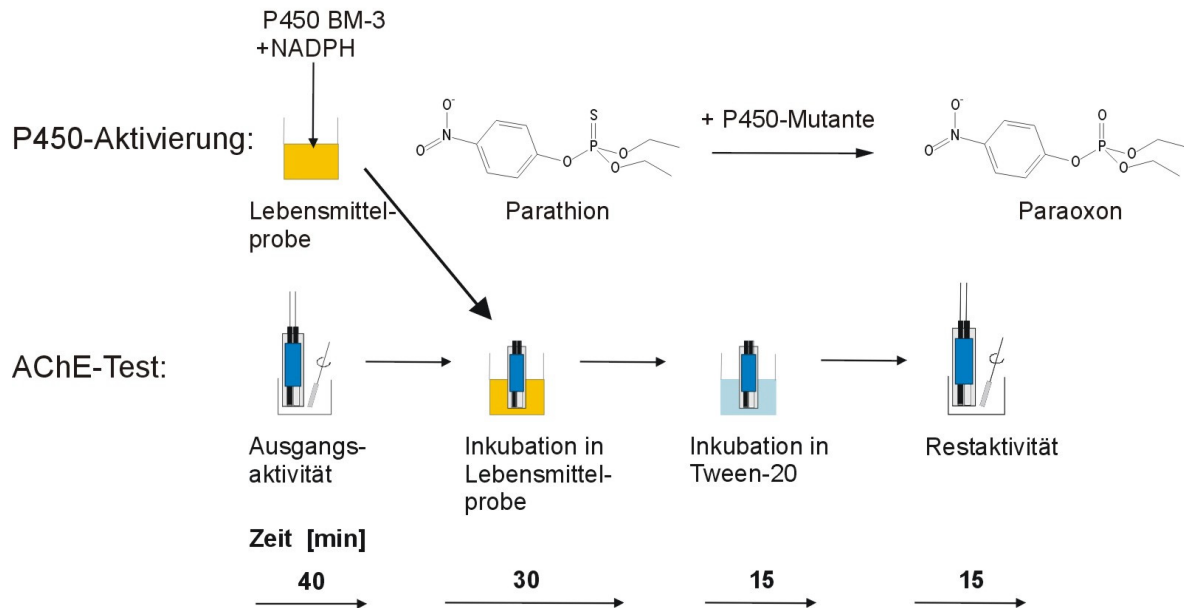


Abbildung 39: Prinzip des Biosensortests für die Detektion von Phosphorthionaten in Lebensmittelproben. Die Ausgangs- bzw. Restaktivität wurde amperometrisch bestimmt.

Die Phosphorthionat-Aktivierung mit der P450 BM-3 Mutanten wurde in Lösung in der neutralisierten Lebensmittelprobe (Apfel-Babybrei) durchgeführt. Die hohe Pufferkapazität (1 M Phosphatpuffer), die für die Neutralisierung der Proben notwendig war, beeinflusste die Aktivität von P450 BM-3 offensichtlich nicht. Die Transformations-Effizienz von Parathion war in Lebensmittelproben genau so hoch wie in wässriger Lösung (siehe Abbildung 40).

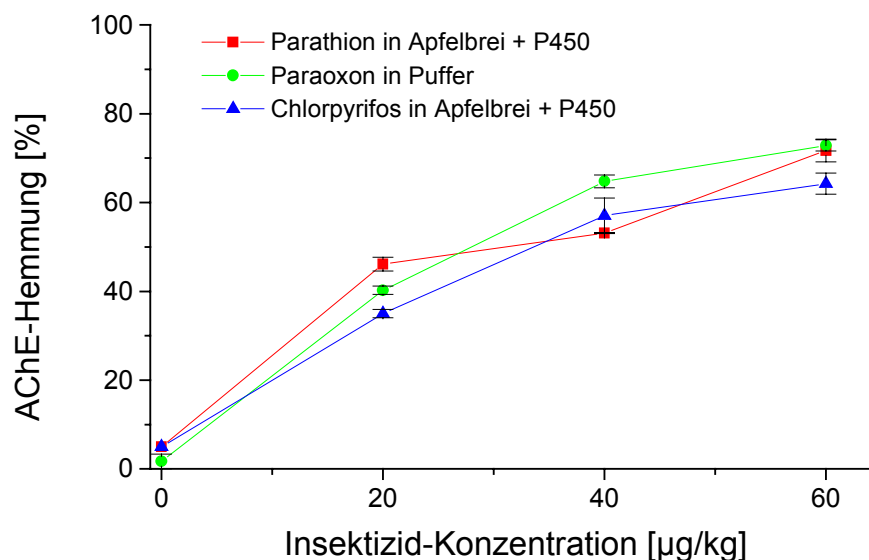


Abbildung 40: eeAChE-Hemmung in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedlicher Organophosphate in Apfelbrei, bestimmt mit dem amperometrischen AChE-Biosensortest. Parathion und Chlorpyrifos wurden vor der AChE-Inkubation mit der P450-BM3 Mutante aktiviert. Zum Vergleich sind Daten von Paraoxon in Puffer dargestellt. Die AChE-Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur.

5.3 Sensitivitätssteigerung durch ortsspezifische Mutagenese

Die in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Tests mit Realproben zeigten, dass die Sensitivität gegenüber manchen Organophosphaten und Carbamaten noch unzureichend ist. Speziell für die Kontrolle des Pestizidgrenzwertes von Säuglingsnahrung, der bei 10 µg/kg liegt, musste die Nachweisgrenze einiger Insektizide gesenkt werden. Die in Abbildung 27 dargestellte Paraoxon-Kalibriergerade mit Zitteraal-AChE zeigt, dass Konzentrationen im Bereich von 10 µg/kg bei einem k_i -Wert von $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ sicher nachgewiesen werden können. Die Nachweisgrenze lag in diesem Fall bei 1 µg/kg Paraoxon. Ziel war es demnach, die k_i -Werte der relevanten Organophosphate und Carbamate auf einen Wert von größer als $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zu erhöhen. Dieses Ziel sollte mit Methoden des Protein-Designs erreicht werden. Dafür wurde die Aminosäuresequenz von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE B gezielt an bestimmten Positionen, die in humaner, Rattenhirn oder *Drosophila melanogaster* AChE einen Effekt auf die Reaktivität gegenüber Organophosphaten bzw. Carbamaten zeigten (siehe Kapitel 3.3.3), verändert.

5.3.1 Klonierung von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE in pPICZαB

Ausgangspunkt für die Klonierung des *Nippostrongylus brasiliensis* AChE Gens waren *Pichia pastoris* Zellen, die freundlicherweise von Ayman S. Hussein (Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, United Kingdom) zur Verfügung gestellt wurden. Nach Extraktion der genomischen DNA wurde das AChE-Gen mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert. Dabei wurden *Pst*I und *Xba*I Restriktionsschnittstellen in das Gen eingeführt. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, entstanden bei dem PCR-Ansatz mit verdünnter genomischer DNA als Template schwache Nebenprodukte. Deshalb wurde das AChE-Gen aus dem PCR-Ansatz mit unverdünnter genomischer DNA isoliert.

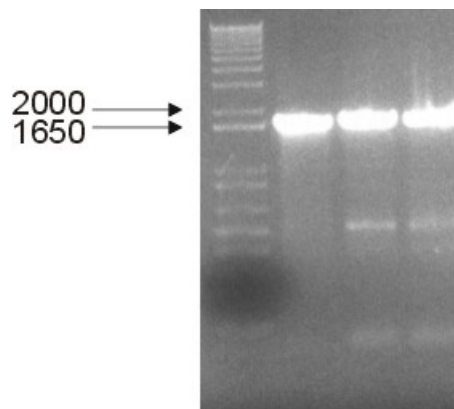


Abbildung 41: Agarosegel der PCR-Produkte von der Amplifikation des NbAChE-Gens (1683 bp), ausgehend von genomischer *P. pastoris* DNA mit *Pst*I- und *Xba*I-Primern. Spur 1: Größenstandard (Kb); Spur 2: unverdünnte genomische DNA; Spur 3: 1:10 verdünnte gen. DNA; Spur 4: 1:30 verdünnte gen. DNA.

Abbildung 42 zeigt das Agarosegel des mittels Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigten Gens und des pPICZ α B-Vektors nach Restriktionsverdau mit *Pst*I und *Xba*I.

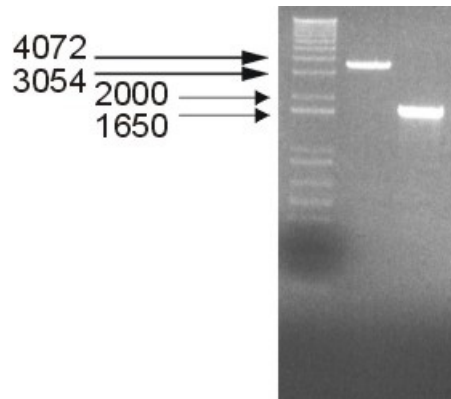


Abbildung 42: Agarosegel des mittels Anionenaustausch-Chromatographie („QIAquick PCR purification kit“) aufgereinigten Vektors pPICZ α B und des NbAChE-Gen nach Restriktionsverdau mit *Pst*I und *Xba*I. Spur 1: Größenstandard (Kb⁺); Spur 2: verdautes und gereinigtes Plasmid pPICZ α B (3597 bp); Spur 3: verdautes und gereinigtes PCR-Produkt des NbAChE-Gens (1683 bp).

Nach Ligation und Hitzeschock-Transformation in *E. coli* wurden die positiven Klone durch analytischen Restriktionsverdau bestimmt. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, enthielten vier von 12 Klonen den Vektor mit dem AChE-Gen.

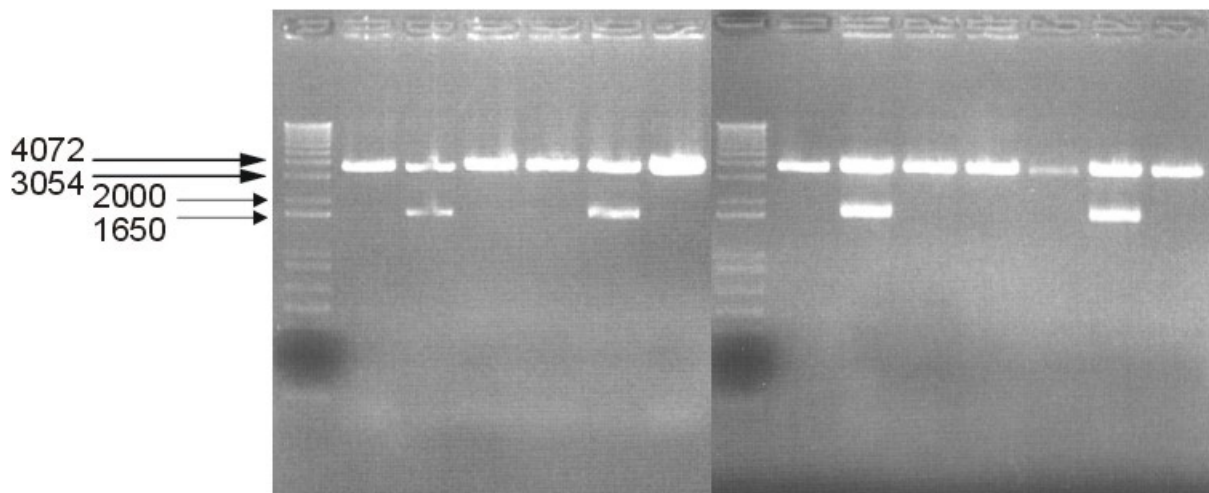


Abbildung 43: Agarosegel des Analytischen Verdaus der Plasmid-DNA von 12 untersuchten Klonen mit *Pst*I und *Xba*I. Spur 1 und 8: Größenstandard (Kb⁺); Spur 2-7 und 9-14: verdaute Plasmid-DNA aus den 12 untersuchten Kolonien; Spur 15: pPICZ α B verdaut mit *Pst*I und *Xba*I.

Mit Hilfe des Stratagene QuickChange-Mutagenese-Kits wurden die in Kapitel 3.3.4 beschriebenen 10 Punktmutationen an fünf Stellen innerhalb des AChE-Gens eingeführt. Hierfür wurde zunächst der mutierte Vektor in einer PCR-Reaktion mit Punktmutationsprimern synthetisiert. Abbildung 44 zeigt, daß erst die Zugabe von DMSO zu dem PCR-Ansatz die erwarteten Produkte von einer Länge von 5280 bp ergab. Bei PCR-Ansätzen ohne DMSO wurden im Agarose-Gel keine Produkte gefunden. Die methylierte, parentale Plasmid-DNA wurde mit *Dpn*I verdaut (siehe Abbildung 24). Nach Transformation in *E. coli* werden die Einzelstrangbrüche repariert. Die Sequenzierung der getesteten Klone bestätigte das Vorhandensein der jeweiligen Punktmutation.

Lediglich bei der Mutante W303(290)A ergab die Sequenzierung mehrerer Klone neben dem gewünschten Produkt ungewöhnliche Nebenprodukte, die einen mehrfachen Einbau des Punktmutationsprimers zeigten. So entstanden Produkte, die eine Insertion, bestehend aus der wiederholten Nukleotidabfolge der Primersequenz, enthielten. Zwischen dem Ende des Primers und der darauffolgenden Gensequenz war die Primersequenz bei einzelnen Klonen einmal, zweimal, viermal, fünfmal und in einem Fall sogar siebenmal eingebaut. Dieses Phänomen wurde bei anderen Mutationsprimern nicht beobachtet.

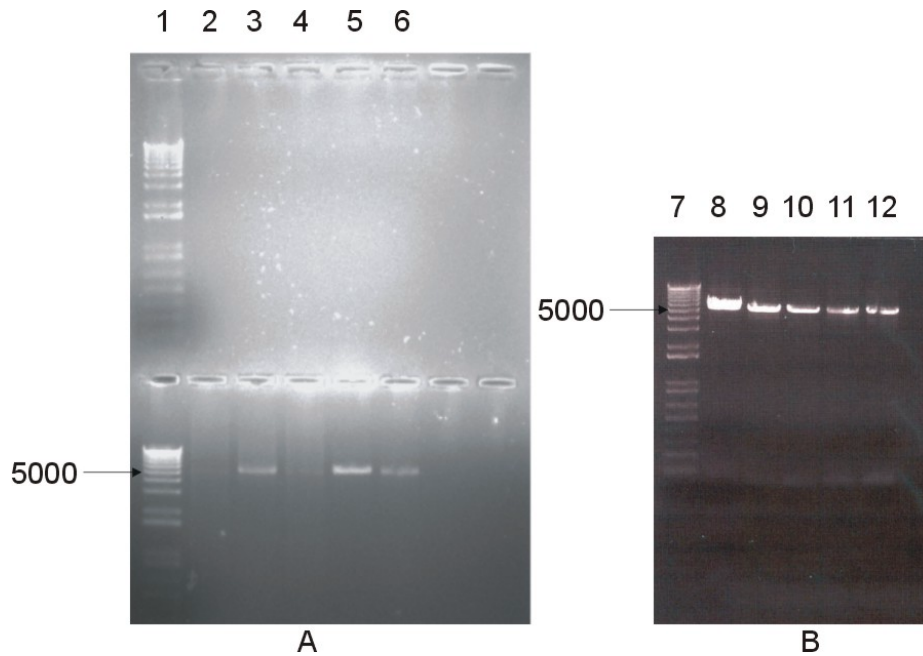


Abbildung 44: Agarose-Gel von Quick-Change-PCR-Produkten; A oberes Agarose-Gel: PCR ohne DMSO-Zusatz; A unteres Agarose-Gel: PCR mit 10% DMSO. Spur 1: Größenstandard (Kb^+); Spur 2: QC-Primer 4 (W303G); Spur 3: QC-Primer 5 (W303A); Spur 4: QC-Primer 6 (W303L); Spur 5: QC-Primer 10 (Y349G); Spur 6: QC-Primer 12 (Y349L). B: Spur 7: Größenstandard (Kb^+); Spur 8: QC-Primer 1 (T65Y); Spur 9: QC-Primer 2 (M301W); Spur 10: QC-Primer 3 (M301A); Spur 11: QC-Primer 7 (F345Y); Spur 12: QC-Primer 8 (F345A).

1 GATGATGGTC CGACGGTGGT GCTTTCCTCG GGAACAAAAA TTCATGGAAT ATACATGGAT
 61 GTAAACGGAC AAACGGTGAG CGCCTACCTA GGTGTTCCAT TTGCTACGGC GGAGAGGTTT
 121 GCGATGCCGA CGTTAACCGA AACCTACGGC GGAGATATTG AAGCTCTACA GCTTTCAAAA
 181 ACCTGTTTCC AA**ACC**AAAGA CGAAACGTAC CCGGGATTTG ATGGTGCTGA AATGTGGAAT
 241 CCACCAACGG AGCTTTCAGA AGATTGTCTG AGTTTGAACA TCTGGGTCCT GGAAAATCCC
 301 GATGGCAATG TGATTGTTTG GATTTATGGA GGAGGTTTCT TCAGTGGTTC CCCGTCGCTT
 361 GCACTTTACA ATGGATCCGT GCTGGCCG**CT** AAAACGAACG CAGTAGTTGT GAATGTCAAC
 421 TATCGAGTTG GACCATTCGG CTTCTTCTAC CTCGGAGCCA ACTCAAAGGC ACCTGGAAT
 481 GTTGGTTTGC TGGATCAGCA AACTGCACTG AAATGGATTC ATAATAACAT AGAATACTTC
 541 AAAGGAGATC CTAGCAAGGT TACGCTTTTC GGTGAAT**TCGG** CTGGTGGC**GC** CTCTGTCACG
 601 TCTCATCTGC TGGCCCCCGA CAGCCACAGC TTGTTACAGCA AAATCATTGT TAATAGCGGA
 661 TCTATACATA ATGTATGGGC GACTAGAAGT CCATGACTA TGCTACACAT CTCAATGAAA
 721 ACAGCGAAGG CGCTAGGATG TGTCGAAAAT TACGAGATCA AACCCATCAG AGAAGCAGAG
 781 GGTCGATGCA CTGTATTGGG AGCAGACGCT GATACGATTT ACGAGTGCAT GAAGGAGAAG
 841 ACACCGGAGA AGATTCAGAG CGAGGGCAAC TCTGACGCGA TATATGCTGA GATGCTTCCG
 901 **ATGGAGTGGC** CATTGGTCC GATCACCTAC GACGATAACT ACTTCAAGGG AGAAGTACGG
 961 CGAAAGCTCT TCAGCGGTGA GTTCAAGACG GACGTGTCCG CGATCTTCGG AACGGTGAAG
 1021 GAC**GAAG**GAA CA**TTC**TGGCT ACCG**TAC**TAC CTGTCTGAGA GTGGCTTCAG TTTCTTTCCT
 1081 GACCAGGATT CTGACAGTGA GGCAAACGCA GCAAAAATAG ACGAGGCCAA CTATACGGCA
 1141 TCAATGCAAG CTTTCGAGGG GTACTTTGGA AAGAGCAGCA AAGCTATAGA GATCCTCAAG
 1201 GAAGGATTCA AAGATTTGGG TGATGTACAA ACAATGTATC GCGACGGTGT TGCTCGATTC
 1261 GTTGGAGACT TCTTCTTAC CTGCAATTTG GTGGAATTTG TCGATCATGT CACCCAGAAG
 1321 ATTAGCGAAG CCTACATGTA CTACTTCAA GCACGATCTT CCGCAAACCC ATGGCCAAAA
 1381 TGGATGGGAG TCATG**CAC**GG ATACGAGATC GAATATGAAT TCGGATATCC TTTTCATCAAC
 1441 TCCACTGCTT ACAAGGAAGT AGACAAGGAT CGAACAACTCT CCGAGGAGTT CATGCAACTA
 1501 ATCAAGGAAT TCGTAAAGAA CGGAAAGTTT GATGACGAAT GGCCGAAATA TGAGGGAGGA
 1561 AAGGTAATGG TGATTGAGGA CGACGCTTCG AGAAAGATCG AAGACAAAGA CATCCAGCAG
 1621 AAATATTGCA AAATCATTAA TGATGCCAGA CAAGCTCTAA TTGATGAAGC TAAAGGCAAT

Abbildung 45: Nukleotid-Sequenz des *Nippostrongylus brasiliensis* AChE Gens. An den rot markierten Positionen wurden Punktmutationen eingeführt. In den grün markierten Nukleotiden unterscheidet sich die Gensequenz von der in der Literatur publizierten Sequenz (Hussein et al. 1999). Die blauen Triplets kodieren für die katalytische Triade, bestehend aus Serin, Glutaminsäure und Histidin.

```
Nb A VLAAKTKAVVWNINIRVSPFGFFYLGDETKAPGNVGLLDQQVALQWIRKHISVFGGNSDKVTLFGESAGGASV 198
Nb B VLAAKTNAVWNVNYRVGPFPGFFYLGANSKAPGNVGLLDQQTALKWIHNNIEYFKGDPSKVTLFGESAGGASV
Nb C VLAARTGAVFVTNIRVGPFGFFYLGADSK-PGNVGLLDQQTALKWIHNNIEFFKGDPSKVTLFGESAGGASV
Tc YLAYTEEVVLVLSYRVGAFGLALHGSQEAPGNVGLLDQRMALQWVHDNIQFFGGDPKTVTIFGESAGGASV 205
```

Abbildung 46: Vergleich eines Ausschnittes der Proteinsequenz der drei *Nippostrongylus brasiliensis* AChE-Isoformen A, B und C und der AChE aus *Torpedo californica*. Dargestellt ist nur ein Ausschnitt aus 72 Aminosäuren. An der rot markierten Position unterscheidet sich die Sequenz der NbAChE B von den Literaturdaten (Hussein et al. 2002).

Abbildung 45 zeigt die nach Sequenzierung erhaltene Nukleotidsequenz des NbAChE-Gens. In den beiden grün-markierten Nukleotiden unterscheidet sich die Sequenz von der in der Literatur von Hussein et al. publizierten Sequenz (Hussein et al. 1999). Daraus ergab sich eine, verglichen mit den von Hussein et al publizierten Daten, in zwei Positionen veränderte Aminosäuresequenz. An Position 130(137) und 197(204) liegen Alanin anstelle von Glycin bzw. Threonin vor. Der Vergleich mit den NbAChE-Isoformen A und C und mit der Aminosäuresequenz von *Torpedo californica* AChE deutet darauf hin, daß die hier erhaltene Sequenz der tatsächlichen entspricht. Rot-markiert sind die Positionen, an denen die Nukleotidsequenz verändert wurde.

5.3.2 Expression in *Pichia pastoris*

Als Maß für die Expressionsrate der AChE in *Pichia pastoris* diente die AChE-Aktivität im Medium nach Abtrennung der Zellen. Die Expression von vier Wildtyp-Klonen in *Pichia pastoris* ergab eine einheitliche Expressionsrate zwischen 132 und 157 U/mL (siehe Abbildung 48). Die Expressionsraten der Mutanten variierten zwischen 113 und 3019 U/mL. Neben den Einfachmutanten wurde auch eine Insertionsmutante exprimiert, die zwischen Threonin 309(294) und Tyrosin 310(295) eine Insertion von 26 Aminosäuren enthielt. Dies entspricht einem Einbau der doppelten Nukleotidabfolge des Mutagenese-Primers in das NbAChE-Gen (siehe Abbildung 47). Die beiden exprimierten Klone der Insertionsmutanten zeigten eine deutlich niedrigere Aktivität von 2 bzw. 19 U/mL.

gag atg ctt ccg atg gag gct cca ttt ggt cca atc acc gag atg ctt ccg atg gag gct cca ttt ggt ccg atc acc
 E M L P M E A P F G P I T E M L P M E A P F G P I T
 Abbildung 47: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Insertion der Mutante W303Ains.

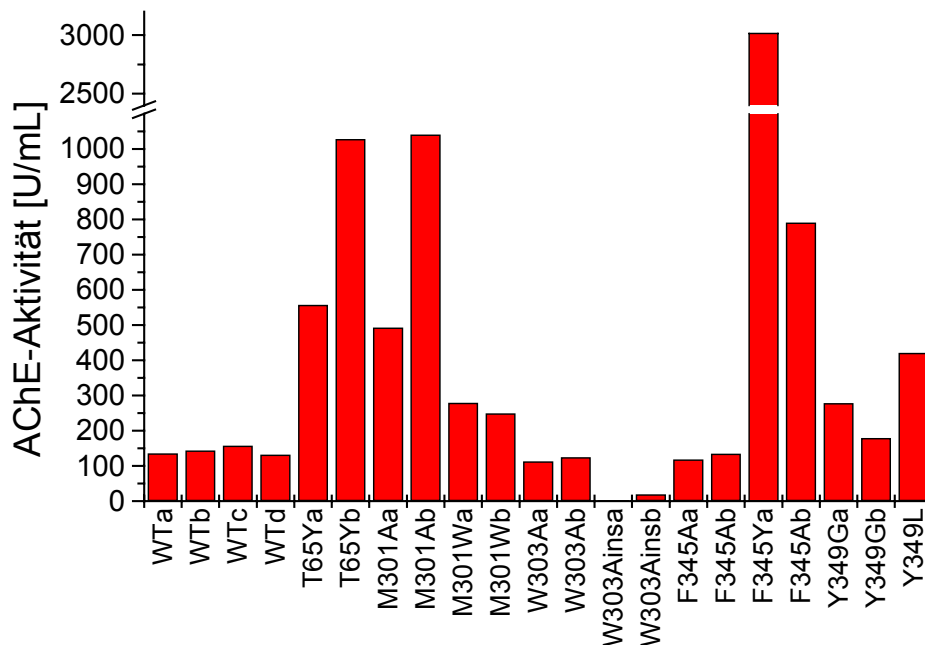


Abbildung 48: AChE-Aktivitäten im *P. pastoris* Überstand nach kontinuierlicher Expression im Schüttelkolben-Maßstab nach acht Tagen.

Neben der Expression im Schüttelkolben wurden Wildtyp-NbAChE und die Mutante M301(288)A auch im 5L-Fermenter in größeren Mengen produziert. Hier wurden zwei alternative Fütterungsstrategien getestet. Bei Fermentation F2 wurde Methanol kontinuierlich zugeführt (25 g/Tag, 0,5% des Fermentationsvolumens). Bei Fermentation F1 wurde die Methanolzugabe an den Sauerstoffgehalt der Fermentations-Lösung gekoppelt. Ein erhöhter Sauerstoffgehalt ist gleichbedeutend mit einer Reduzierung des Zellstoffwechsels, verursacht durch Nährstoffmangel. Bei Erreichen des Schwellenwertes von 90% Sauerstoffsättigung wurden jeweils 20 g Methanol zugesetzt. Sofort nach Methanolzugabe reduzierte sich der Sauerstoffgehalt der Lösung wieder. Die zugesetzte Menge Methanol von ca. 0,4% des Fermentationsvolumens wurde jeweils nach etwa 5h aufgebraucht (siehe Abbildung 51). Im Durchschnitt wurden pro Tag 80 g Methanol zugeführt. Die an den Sauerstoffgehalt gekoppelte Fütterungsstrategie führte, wie schon frühere Arbeiten zur

Expressionsoptimierung in *Pichia pastoris* zeigten (Minning et al. 2001), zu einer deutlich erhöhten Zellmassenproduktion. So wurde nach neun Tagen eine optische Dichte von 170 erreicht, verglichen mit einer optischen Dichte von 70 bei kontinuierlicher Methanolfütterung. Die Expressionsrate von AChE unterschied sich noch deutlicher. Die AChE-Aktivität war bei kontrollierter Fütterung mit 1700 U/mL ca. viermal so hoch wie die AChE-Aktivität bei kontinuierlicher Methanolzugabe (siehe Abbildung 49). Daraus ergibt sich bei der Fermentation mit kontrollierter Methanolfütterung bei einer zugrunde gelegten spezifischen Aktivität von 2080 U/mg (Hussein et al. 1999) eine Produktion von ca. 2,5 g *Nippostrongylus brasiliensis* AChE.

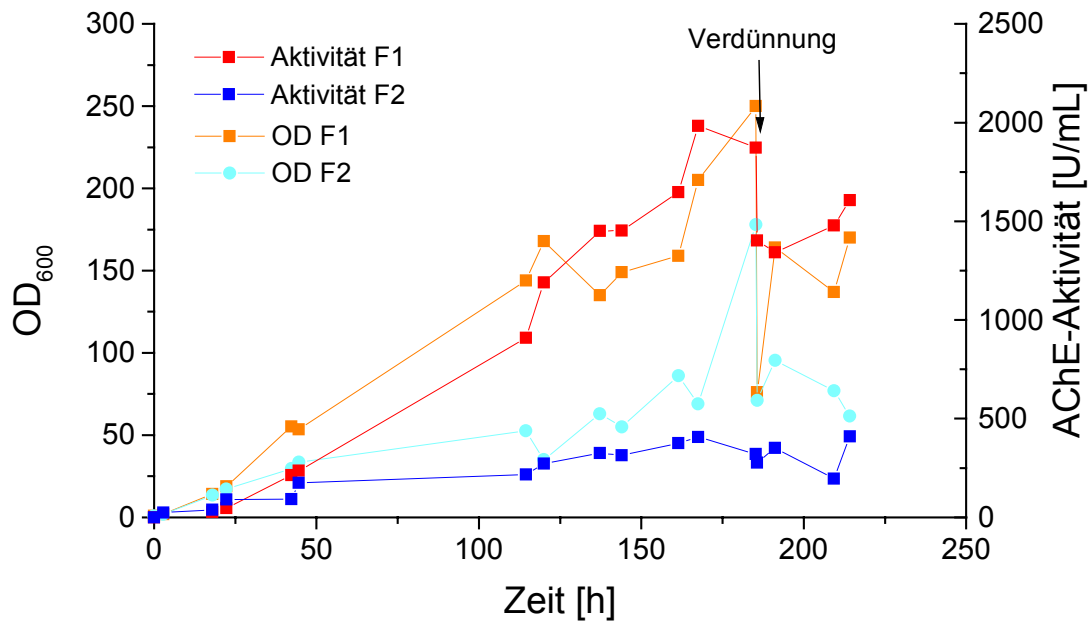


Abbildung 49: *P. pastoris*-Fermentation zur Produktion von WTNbAChE mit zwei unterschiedlichen Fütterungsstrategien. Die AChE-Aktivität wurde mit dem optischen AChE-Aktivitätstest nach Ellman bestimmt. Die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen. Nach 180 h wurde die durch Verdunstung verringerte Flüssigkeitsmenge mit Wasser wieder auf fünf Liter aufgefüllt.

Das SDS-PAGE in Abbildung 50 zeigt eine Zeit abhängige Expression der *Nippostrongylus brasiliensis* AChE, die ein Molekulargewicht von 69 kDa hat.

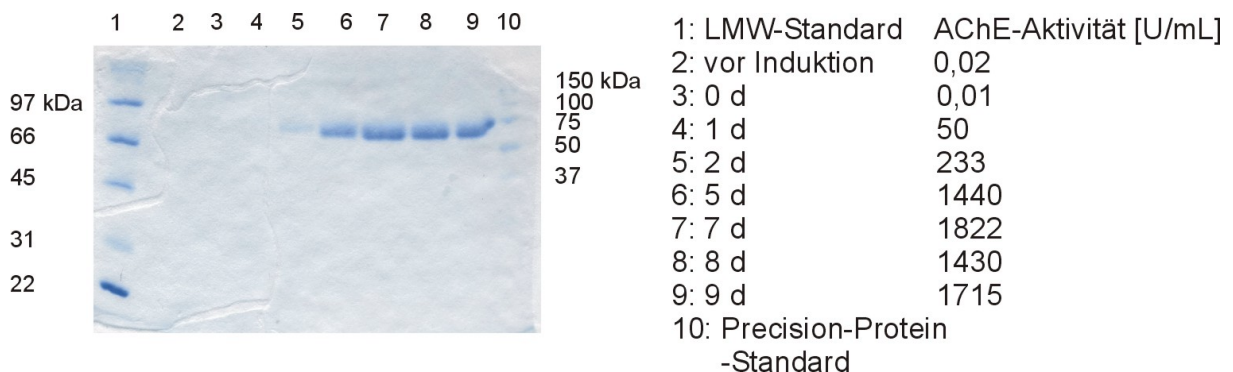


Abbildung 50: SDS-PAGE der *P. pastoris*-Fermentation zur Produktion von WTNbAChE nach unterschiedlichen Induktionszeiten. Spur 1: LMW-Standard (Bio-Rad Laboratories, USA); Spur 10: „Precision Protein Standards“ (Bio-Rad Laboratories, USA). Spur 2-9: Proben von nicht aufkonzentrierten und nicht aufgereinigten Kulturüberständen. Die AChE-Aktivität wurde mit dem optischen AChE-Aktivitätstest nach Ellman bestimmt.

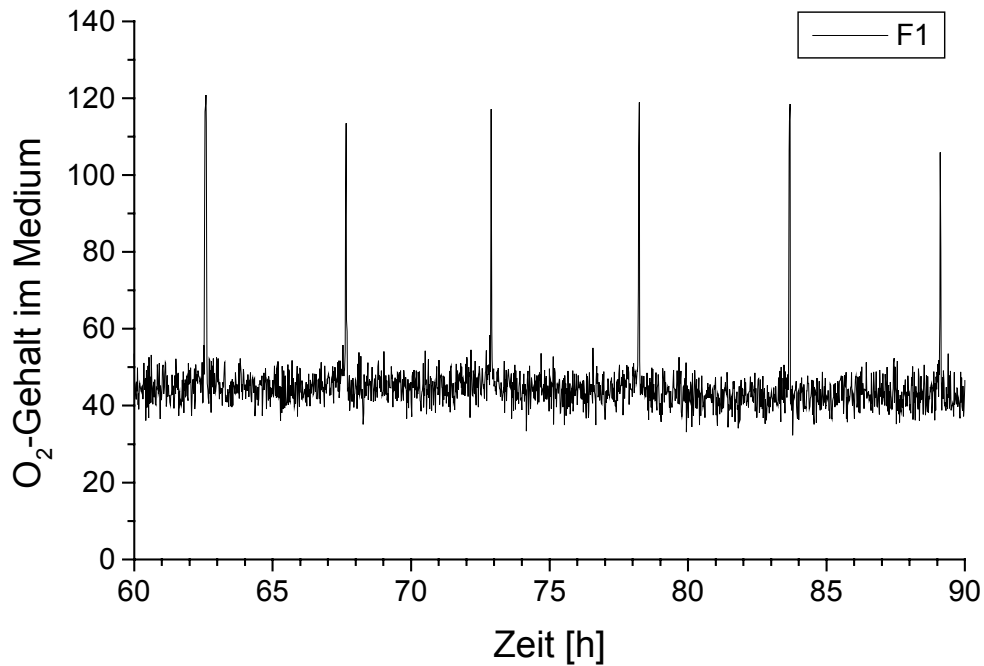


Abbildung 51: Kontrollierte Methanol-Fütterung in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt des Mediums. Ausschnitt aus den Messdaten des Sauerstoffgehalts im Fermentationsmediums in der Zeit zwischen 60 und 90 h nach Induktion. Beim Erreichen des Schwellenwertes von 90 % Sauerstoffgehalt wurden der Fermentationslösung 20 g Methanol zugesetzt.

Die AChE-Mutante M301(288)A wurde ebenfalls in einer 5L-Fermentation produziert. Die Methanolzugabe wurde an den Sauerstoffgehalt der Lösung gekoppelt. Der Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung, der bei einer so langen Fermentationsdauer nicht vernachlässigt werden kann, wurde durch eine einmal tägliche Zugabe von Medium ausgeglichen. Nach neun Tagen wurde eine OD_{600} von 340 und eine AChE-Aktivität von 1800 U/mL erreicht. (siehe Abbildung 52). Die Fermentation wurde um weitere acht Tage verlängert. Nach 17 Tagen wurde eine optische Dichte von 460 und eine AChE-Aktivität von 2800 U/mL erreicht.

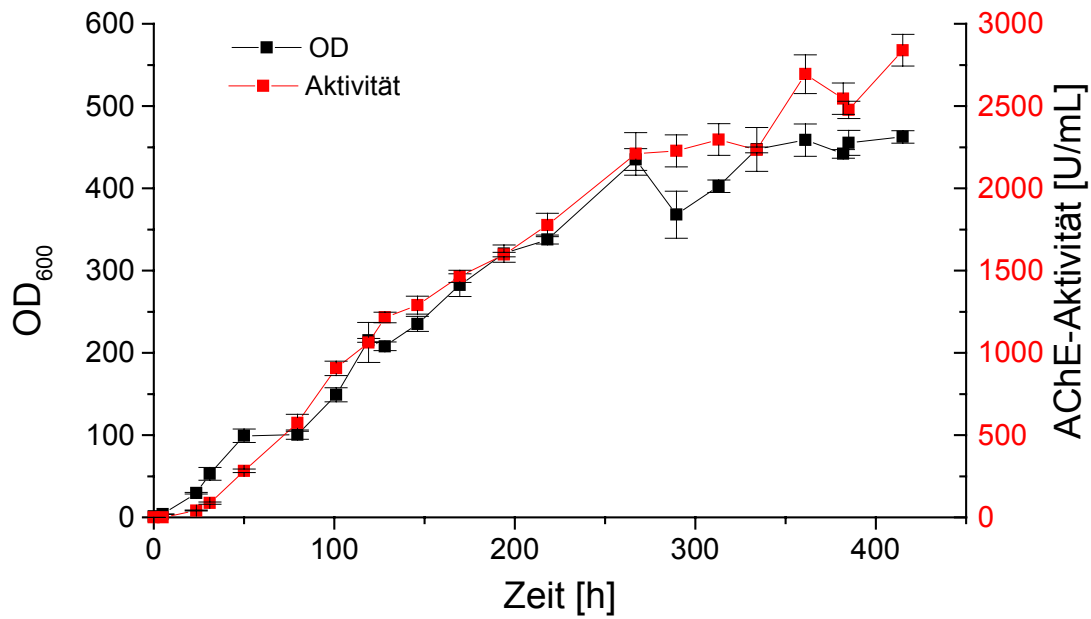


Abbildung 52: *P. pastoris*-Fermentation zur Produktion der NbAChE-Mutanten M301(288)A. Die AChE-Aktivität wurde mit dem optischen AChE-Aktivitätstest nach Ellman bestimmt. Die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen. Das durch Verdunstung verringerte Flüssigkeitsvolumen wurde durch tägliche Mediumzugabe ausgeglichen. Die Methanolfütterung wurde an den Sauerstoffgehalt der Lösung gekoppelt.

Das SDS-PAGE zeigt erneut eine zeitabhängige Expression. In den Proben, die 8, 12 und 17 Tage nach Fermentationsbeginn genommen wurden, sind schwache Nebenprodukte sichtbar.

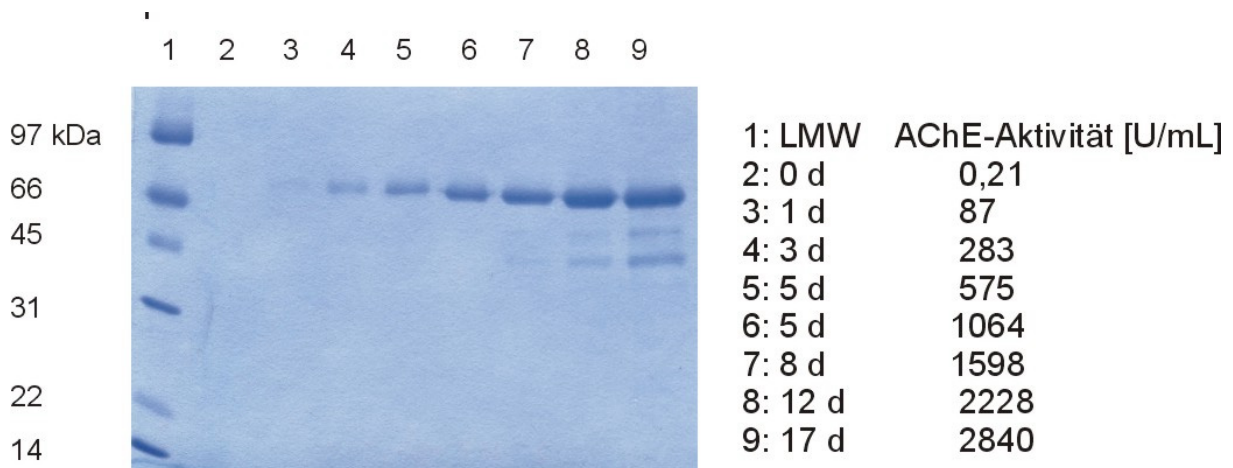


Abbildung 53: SDS-PAGE von Proben der *P. pastoris*-Fermentation zur Produktion von M301(288)A nach unterschiedlichen Induktionszeiten. Spur 1: LMW-Standard (Bio-Rad Laboratories, USA); Spur 2-9: Proben von nicht aufkonzentrierten Überständen. Die AChE-Aktivität wurde mit dem optischen AChE-Aktivitätstest nach Ellman bestimmt.

5.3.3 Proteinreinigung

Ziel war es eine effektive und kostengünstige Reinigungsmethode zu entwickeln, die eine einfache Maßstabsvergrößerung erlaubt. Für diese Zwecke wurde die Anionenaustauscher-Chromatographie ausgewählt. Eine affinitätschromatographische Reinigung über den His₆-Tag des Proteins lässt sich nur schwer auf den präparativen Maßstab übertragen und wäre zu teuer. Als Säulenmaterial diente Q-Sepharose FF, ein starker Anionenaustauscher. Eluiert wurde das gebundene Protein mit einem NaCl-Gradient. Bei 10% NaCl wurden Verunreinigungen abgetrennt. Die *Nippostrongylus brasiliensis* AChE wurde bei einer NaCl-Konzentration von 300 mM (30%) eluiert (siehe Abbildung 54). Bei 1 M NaCl wurde eine weitere Fraktion ohne AChE-Aktivität eluiert.

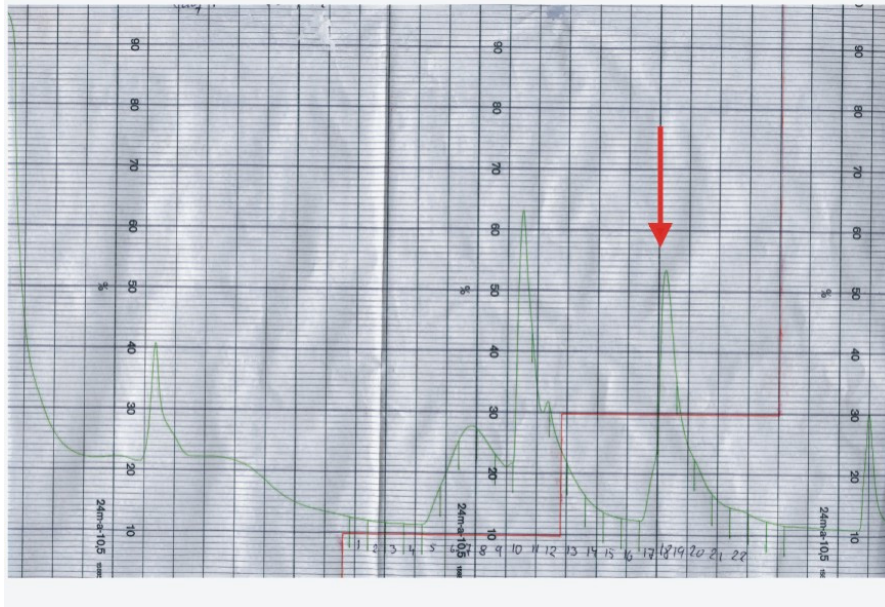


Abbildung 54: Chromatogramm der Anionenaustausch-Aufreinigung von WT *Nippostrongylus brasiliensis* AChE. Säulenmaterial: Q-Sepharose FF. Gestufter NaCl-Gradient (erste Stufe 100 mM NaCl/zweite 300 mM in 20 mM Phosphatpuffer, pH 8).

AChE-Aktivität wurde nur in den Fraktionen 17-22 des markierten Elutionspeaks detektiert. Abbildung 55 zeigt das SDS-PAGE von *Pichia pastoris*-Überständen vor und nach Anionenaustausch-Aufreinigung.

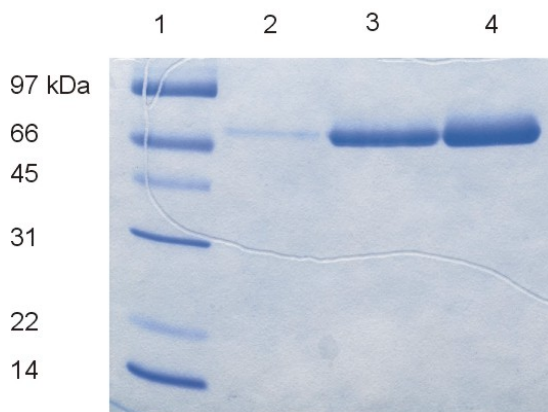


Abbildung 55: SDS-PAGE der aufgereinigten *Nippostrongylus brasiliensis* AChE. Spur 1: LMW-Proteinstandard; *Pichia* Überstand aus Schüttelkolbenexpression von NbAChE vor Aufreinigung (AChE-Aktivität: 154 U/mL); *Pichia* Überstand aus Fermentation vor Aufreinigung (2227 U/mL); NbAChE nach Aufreinigung (Elutionsfraktion) (2349 U/mL).

5.3.4 Bestimmung der Hemmkonstanten

Zur Bestimmung des k_i -Wertes wurde das Enzym für bestimmte Zeiten mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen inkubiert. Die Restaktivität wurde mit Acetylthiocholin-Jodid als Substrat nach der Methode von Ellman bestimmt. Abbildung 56 A zeigt exemplarisch Messdaten von der Bestimmung der Omethoat-Hemmkonstanten gegenüber WT NbAChE und der Mutanten M301(288)A. Der k_i -Wert der WT NbAChE wurde durch Inkubation für 2, 4, 6, 8 und 10 min mit 20000 $\mu\text{g/L}$ Omethoate ermittelt. Der k_i -Wert der um Größenordnungen sensitiveren Mutante M301(288)A wurde mit einer Omethoat-Konzentration von 800 $\mu\text{g/L}$ bestimmt. Abbildung 56 B zeigt die k_i -Wert-Bestimmung von Carbaryl gegenüber WT NbAChE und der sensitiveren Mutante F345(330)A.

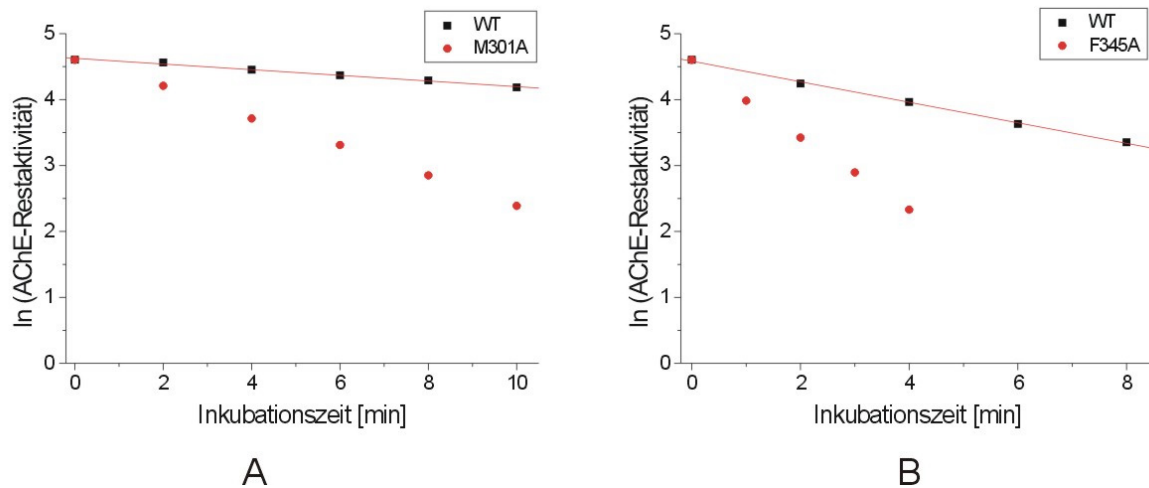


Abbildung 56: Prinzip der k_i -Wert Bestimmung. Folgende Inhibitor-Konzentrationen wurden verwendet: A: WT: 20000 $\mu\text{g/L}$ Omethoate; M301A: 800 $\mu\text{g/L}$ Omethoate. B: 1000 $\mu\text{g/L}$ Carbaryl.

Die zehn Einfachmutanten und eine Insertionsmutante wurden gegenüber den in Abbildung 57 dargestellten sechs Organophosphaten und fünf Carbamaten getestet.

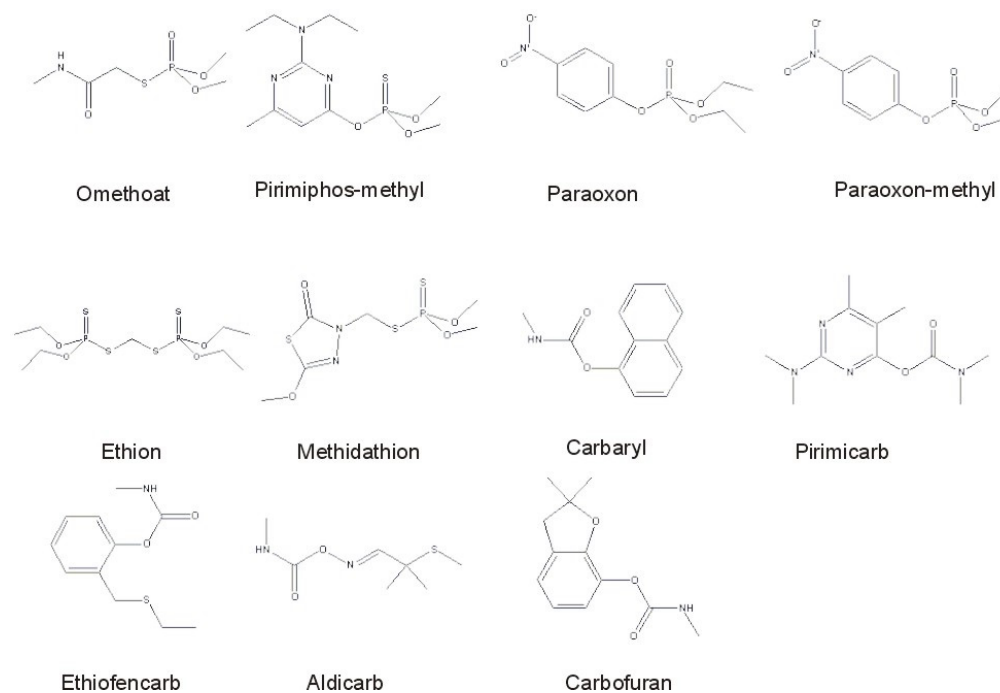


Abbildung 57: Strukturen der Organophosphate und Carbamate, mit denen die Enzym-Mutanten charakterisiert wurden.

Diese Insektizide wurden ausgewählt, weil sie häufig in Lebensmitteln detektiert werden und daher von hoher praktischer Bedeutung sind. Ausserdem wurden vorwiegend Organophosphate und Carbamate ausgewählt, die wegen ihrem kleinen k_i -Wert gegenüber Zitteraal oder humaner AChE bislang nur unzureichend mit AChE-Biosensoren nachgewiesen werden konnten. Aus dem entgegengesetzten Grund wurden Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl und Quinalphos nicht in die Untersuchung der Mutanten mit einbezogen. Deren k_i -Wert war bereits gegenüber der unveränderten *Nippostrongylus brasiliensis* AChE sehr groß, wie in Tabelle 23 zu sehen ist.

Tabelle 23: k_i -Werte der WT NbAChE gegenüber 14 Organophosphaten bzw. Carbamaten:

Insektizid	k_i [$M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]
Omethoat	$5,2 \cdot 10^2$
Pirimiphos-methyl ^a	$2,6 \cdot 10^5$
Paraoxon	$1,0 \cdot 10^6$
Paraoxon-methyl	$1,7 \cdot 10^5$
Ethion ^a	$3,0 \cdot 10^4$
Methidathion ^a	$1,5 \cdot 10^4$
Chlorpyrifos ^a	$2,0 \cdot 10^7$
Chlorpyrifos-methyl ^a	$5,6 \cdot 10^6$
Quinalphos ^a	$4,6 \cdot 10^6$
Dichlorvos	$1,3 \cdot 10^5$
Fenthion ^a	$< 10^2$
Carbaryl	$3,1 \cdot 10^4$
Pirimicarb	$5,7 \cdot 10^4$
Ethiofencarb	$4,6 \cdot 10^3$
Aldicarb	$8,0 \cdot 10^3$

^a Insektizide wurden vor der k_i -Wert Bestimmung chemisch in die Oxo-Form überführt.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der 11 Mutanten mit den 11 ausgewählten Insektiziden im einzelnen dargestellt.

a) Omethoat

Der Austausch von Methionin an Position 301 (288) durch Alanin bewirkte eine 108-fache Steigerung der Sensitivität gegenüber Omethoat. Der k_i -Wert erhöhte sich von $5,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $5,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Der Austausch von Methionins gegen Tryptophan bewirkte eine Verdoppelung des k_i -Wertes. Der Austausch von Tryptophan an Position 303 (290) bzw. von Tyrosin 345 (330) gegen Glycin bewirkte jeweils eine Halbierung des k_i -Wertes. Die prozentuale Standardabweichung betrug im Durchschnitt 9%.

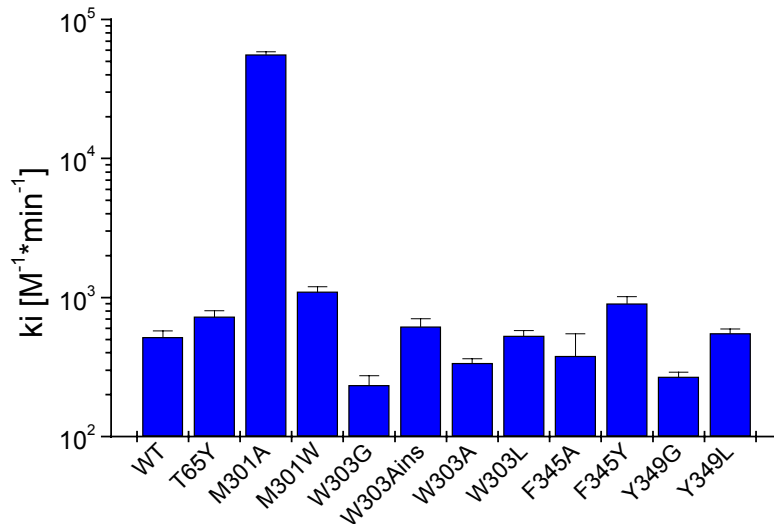


Abbildung 58: k_i -Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Omethoat, $n \geq 3$

b) Pirimiphos-methyl

Untersuchungen mit Pirimiphos-methyl ergaben eine erhöhte Sensitivität aller Mutanten bis auf F345(330)Y. Im Allgemeinen wurde die Inkubation der Enzyme mit Inhibitoren für die k_i -Wert-Bestimmung bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei den Mutanten M301(288)A, W303(290)G, W303(290)Ains, W303(290)A, W303(290)L und F345(330)A ergab sich hierbei jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der AChE-Restaktivität und der Inkubationszeit (siehe Abbildung 60). Es handelte sich demnach nicht mehr um eine Reaktion Pseudo 1. Ordnung, sondern um eine Reaktion 2. Ordnung. Charpentier et al. machten ähnliche Beobachtungen bei sehr starken Inhibitoren von *Drosophila melanogaster* AChE (Charpentier et al. 2000). Um zu einer linearen Beziehung zu kommen, musste die Inkubationstemperatur auf 4°C reduziert werden. Unter diesen Bedingungen verlangsamte sich die Reaktion und folgte wieder einer Kinetik Pseudo 1. Ordnung.

Der bei 4°C bestimmte k_i -Wert der WT NbAChE war, wie erwartet, mit $2,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ deutlich kleiner als der bei Raumtemperatur bestimmte k_i -Wert von $1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

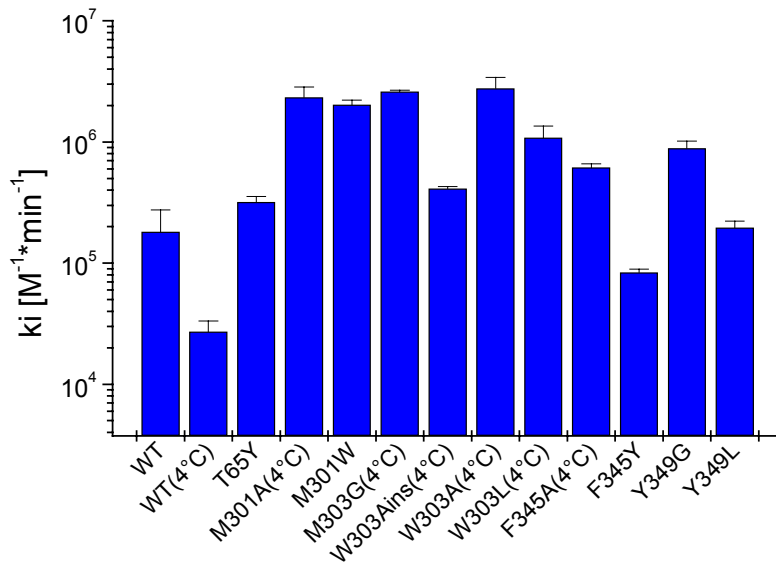


Abbildung 59: k_i -Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Pirimiphos-methyl. Pirimiphos-methyl wurde vor der Inkubation chemisch mit NBS oxidiert. Die Inkubation wurde bei den mit (4°C) gekennzeichneten Mutanten bzw. beim WT bei 4°C durchgeführt, ansonsten bei RT. $n \geq 3$

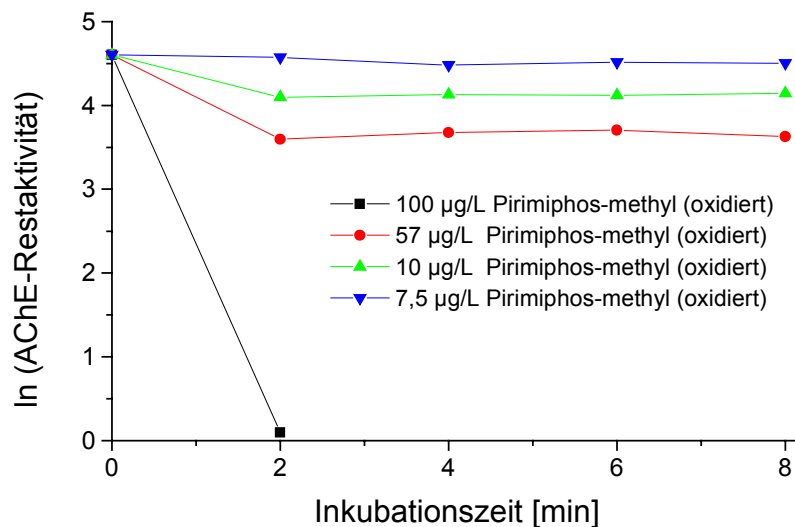


Abbildung 60: Logarithmus der AChE-Restaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit von W303L mit unterschiedlichen Pirimiphos-methyl-Konzentrationen nach chemischer Oxidation mit NBS; Inkubation bei RT.

Alle Mutationen, die in der Acyltasche durchgeführt wurden, bewirkten eine deutliche Sensitivitätssteigerung. Pirimiphos-methyl stellt dabei den einzigsten Fall dar, in dem ein Austausch des Tryptophanrestes in der Acyltasche gegen Glycin, Alanin und Leucin jeweils eine deutlich Zunahme der Sensitivität zur Folge hatte.

c) *Paraoxon*

Bei Paraoxon bewirkte der Austausch von Tyrosin 349 (334) durch Leucin eine Erhöhung des k_i -Wertes um den Faktor 5 von $1,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $5,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Fast alle anderen Mutationen bewirkten eine Resistenz gegenüber Paraoxon, d.h. die Hemmkonstante verkleinerte sich gegenüber dem Wert der WT AChE. Am deutlichsten fiel die Resistenz bei W303G (290) und F345Y (330) aus.

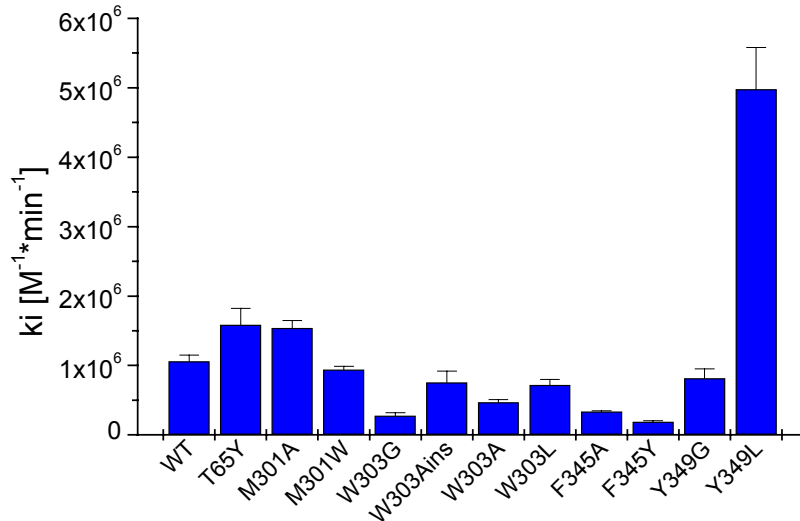


Abbildung 61: k_i -Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Paraoxon; $n \geq 3$

d) *Paraoxon-methyl*

Bei Paraoxon-methyl, das sich nur in der Länge der beiden Alkylreste am zentralen Phosphatatom von Paraoxon unterscheidet, zeigte sich ein deutlich anderes Sensitivitätsmuster als bei Paraoxon. Hier zeigte M301A (288) die größte Sensitivitätssteigerung (Faktor 9) von $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Und nicht der Austausch von Tyrosin 349 (334) gegen Leucin führte zu einer Erhöhung des k_i -Wertes wie bei Paraoxon, sondern der Ersatz durch das kleinere Glycin bewirkte eine 4-fach höhere Sensitivität. Auffällig ist hier die extreme Resistenz W303G und W303A, deren k_i -Wert um einen Faktor kleiner war als der des Ausgangsenzyms.

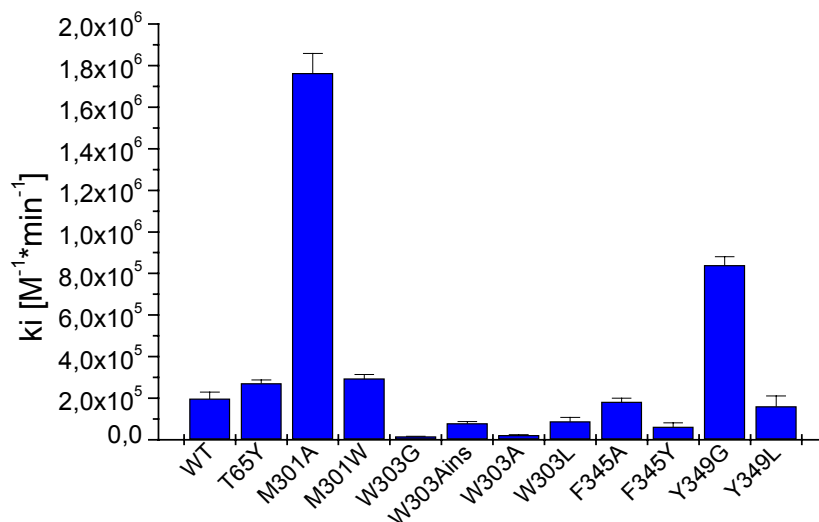


Abbildung 62: k_i -Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Paraoxon-methyl; $n \geq 3$

e) *Ethion*

Bei Ethion bewirkte erneut M301A (288) die größte Sensitivitätssteigerung (Faktor 4) von $3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Außer M301A bewirkte nur noch M301W (288) eine Verdoppelung der Sensitivität gegenüber Ethion. Die stärkste Resistenz zeigte sich wie schon bei Paraoxon und Paraoxon-methyl bei W303G (290) und F345Y (330).

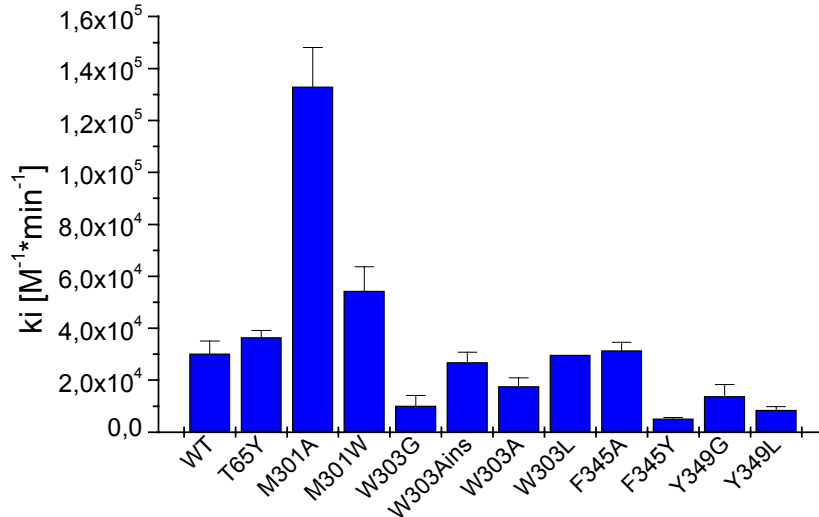


Abbildung 63: ki-Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Ethion; Ethion wurde vor der Inkubation mit NBS chemisch oxidiert; n ≥ 3

f) *Methidathion*

Untersuchungen mit Methidathion lieferten ähnliche Ergebnissen wie Ethion. Hier führte M301A (288) zu einer 6-fachen Sensitivität und M301W (288) wiederum zu einer Verdoppelung. Der ki-Wert erhöhte sich bei M301A von $1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. W303G (290) zeigte erneut die stärkste Resistenz. Bei Methidathion bewirkte jedoch nicht der Austausch von Phenylalanin 345 (330) gegen Tyrosin eine starke Resistenz, wie dies bei Ethion und Paraoxon der Fall war, sondern ein Austausch gegen Alanin (F345A).

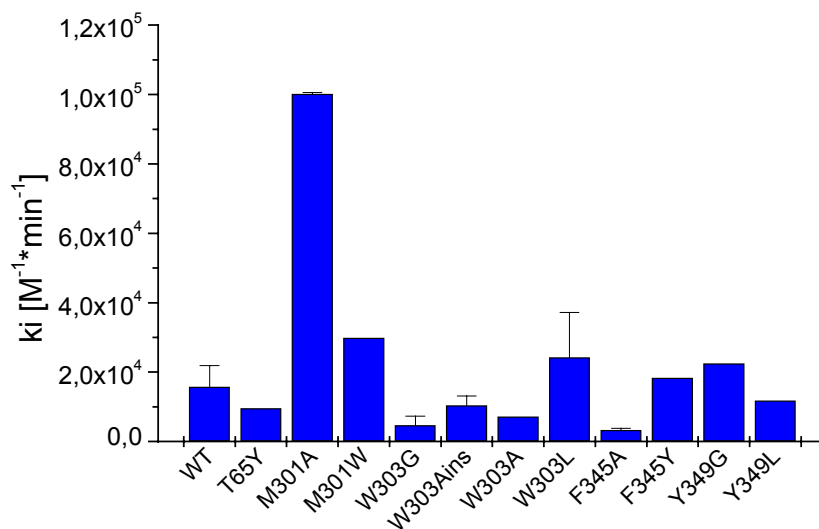


Abbildung 64: ki-Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Methidathion; Methidathion wurde vor der Inkubation mit NBS chemisch oxidiert n ≥ 3

g) *Carbaryl*

Bei Carbaryl bewirkte der Austausch von Phenylalanin 345 (330) durch Alanin eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 4 von $3,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Der Austausch derselben Aminosäure gegen Tyrosin verursachte die stärkste Resistenz. Der Ersatz des Tryptophanrestes in der Acyltasche des aktiven Zentrums durch kleinere Aminosäuren bewirkte durchweg eine Resistenz gegenüber Carbaryl.

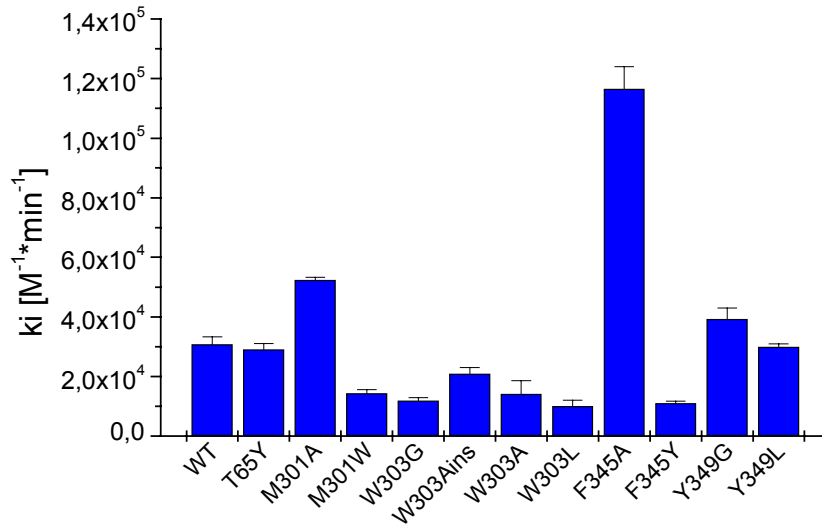


Abbildung 65: k_i -Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Carbaryl; $n \geq 3$

h) *Pirimicarb*

Der Austausch von Threonin 65 (70) in der „Peripheral Anionic Site“ durch Tyrosin (T65Y) und M301A bewirkte eine Verdoppelung der Sensitivität gegenüber Pirimicarb und damit eine Erhöhung des k_i -Wertes von $5,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für T65Y bzw. $1,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für M301A. Die Mutationen an Position 303, 345 und 349 verursachten in allen eine Resistenz gegenüber Pirimicarb.

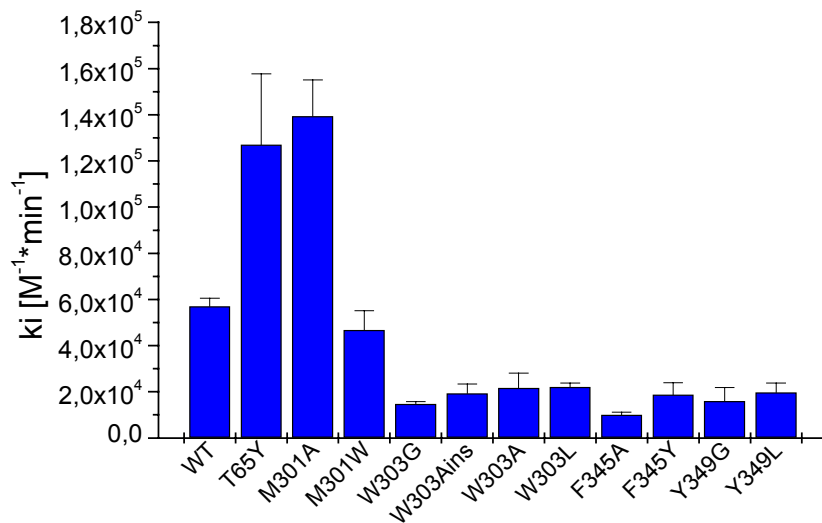


Abbildung 66: k_i -Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Pirimicarb; $n \geq 3$

j) *Ethiofencarb*

Bei Ethiofencarb verursachte nur M301A eine Sensitivitätssteigerung von $4,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Mutationen an Position 303 (290) und die Mutante F345A bewirkten eine starke Resistenz.

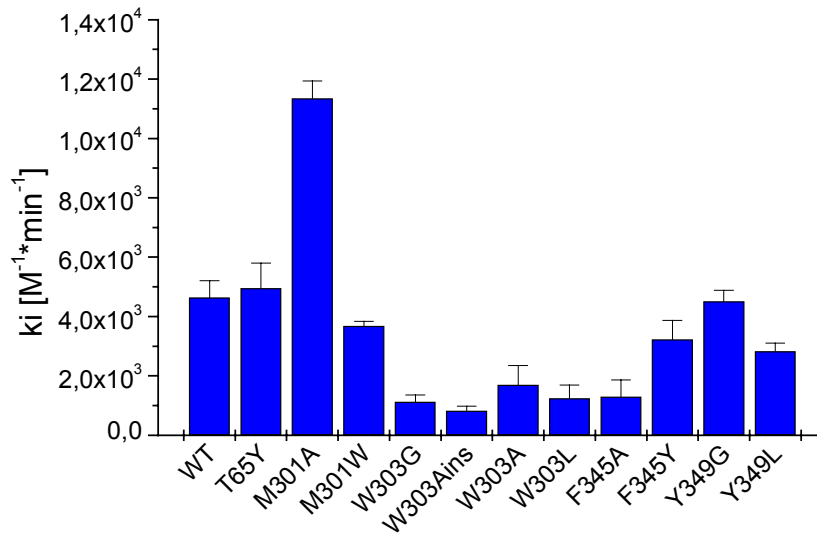


Abbildung 67: Ki-Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Ethiofencarb; n ≥ 3

j) *Aldicarb*

Das Verhalten der Mutanten gegenüber Aldicarb ähnelte sehr dem oben beschriebenen Verhalten gegenüber Ethiofencarb. Auch hier bewirkte lediglich M301A (288) eine schwach gesteigerte Sensitivität von $8,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Mutationen an Position 303 (290) und F345A bewirkten erneut die stärkste Resistenz.

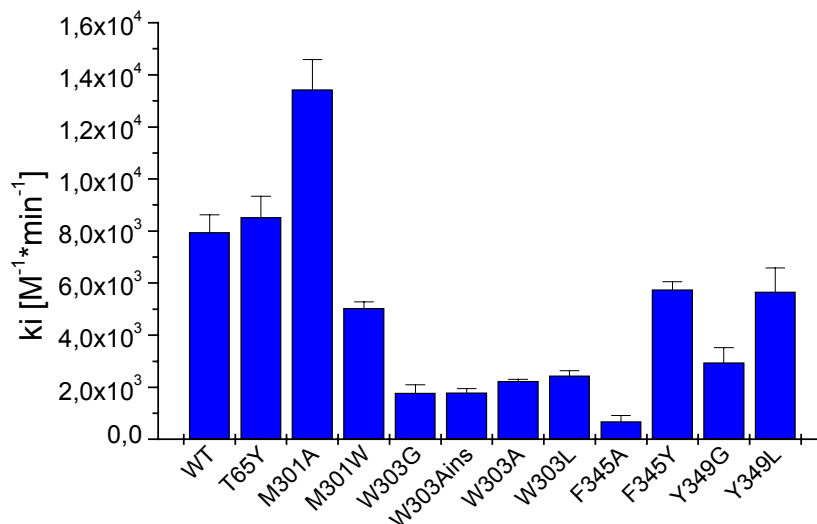


Abbildung 68: Ki-Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Aldicarb; n ≥ 3

k) Carbofuran

Carbofuran ist das einzige der getesteten Organophosphate und Carbamate das keine erhöhte Sensitivität gegenüber M301A zeigt. Generell bewirkte keine der Mutanten eine nennenswerte Sensitivitätssteigerung. Mutationen an Position 303 (290) verursachten die stärkste Resistenz.

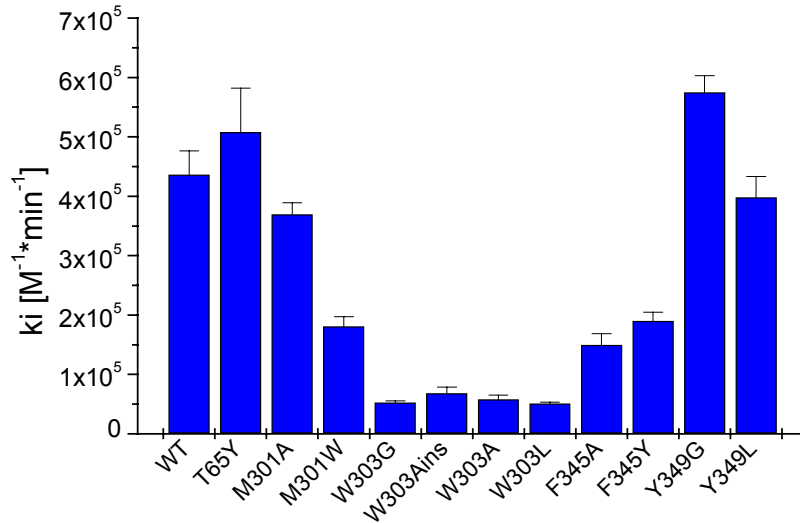


Abbildung 69: K_i -Werte der WT NbAChE und deren Mutanten gegenüber Carbofuran; $n \geq 3$

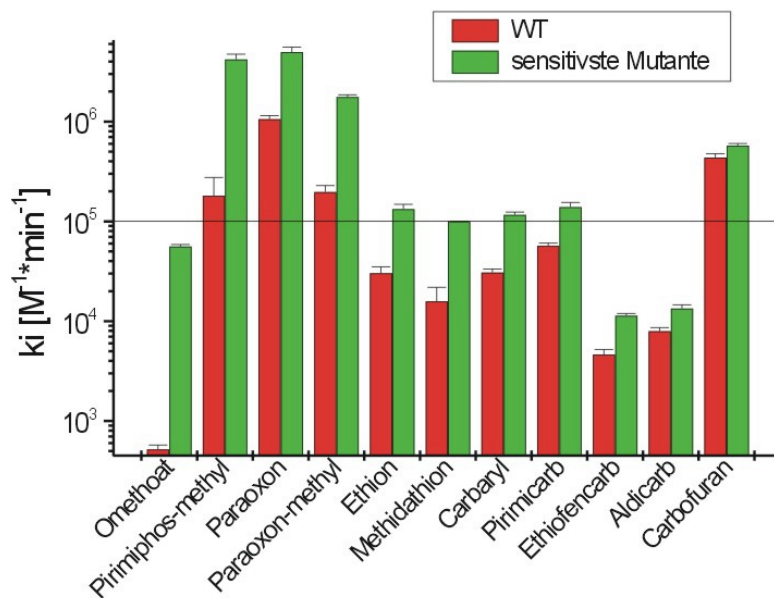


Abbildung 70: K_i -Werte der WT NbAChE und der für das jeweilige Insektizid sensitivsten Mutante

5.3.4.1 Hemmmuster der AChE-Mutanten

Im folgenden werden die ermittelten k_i -Werte in anderer Form dargestellt. Aus dem Verhältnis der k_i -Werte der Mutanten und des Wildtyps ergeben sich charakteristische Hemm-Muster für die einzelnen Mutanten.

a) Periphere anionische Bindestelle (T65Y)

Der Austausch von Threonin 65 (70), ein Bestandteil der peripheren anionischen Bindestelle, gegen Tyrosin hatte nur einen schwachen Effekt auf die Hemmkonstanten der getesteten Insektizide. Es zeigte sich zwar bei fast allen Inhibitoren, außer bei Methidathion, eine schwache Sensitivitätssteigerung, diese führte aber lediglich bei Pirimicarb mindestens zu einer Verdopplung der Sensitivität. Zusätzlich zu den 11 Insektiziden mit denen alle 11 Mutanten getestet wurden, wurde der Einfluss dieser Mutation in der peripheren anionischen Bindestelle auf Dichlorvos untersucht, da diese Mutation im Falle von *Drosophila melanogaster* AChE zu einer extremen Sensitivitätssteigerung gegenüber Dichlorvos führte (Boublik et al. 2002).

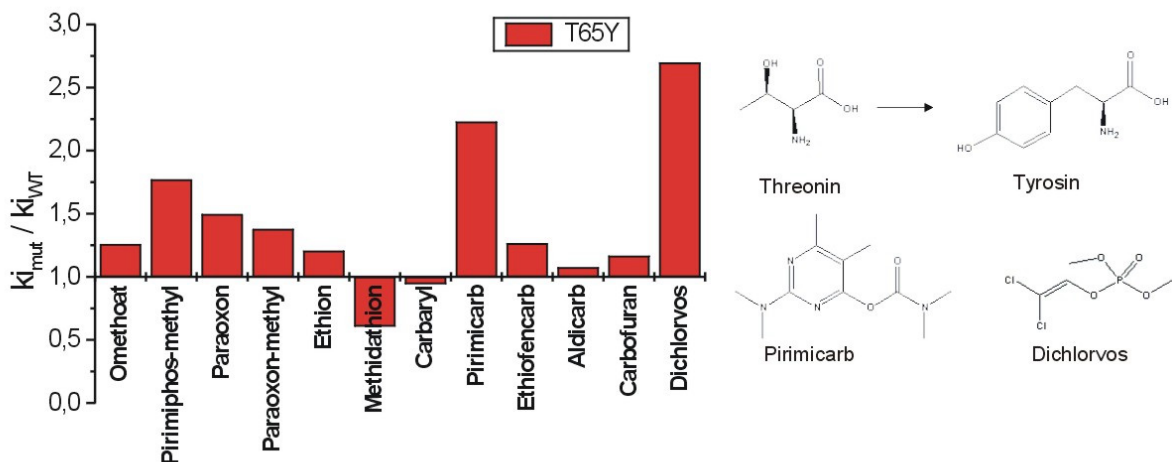


Abbildung 71: Sensitivitätsprofil von T65(70)Y.

Der Austausch von Threonin durch Tyrosin an Position 65(70) erhöhte den k_i -Wert der WT NbAChE von $1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ auf $3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$.

b) Acyltasche - M301(288)A

Mutationen in der Acyltasche an Position 301 (288) hatten einen starken Einfluss auf das Verhalten der AChE gegenüber den getesteten Insektiziden. Der Austausch von Methionin 301 gegen Alanin erzeugte die sensitivste aller Mutanten. M301A zeigte gegenüber allen Insektiziden eine zumindest unveränderte oder erhöhte Sensitivität. Die größte Sensitivitätssteigerung wurde bei Dimethoxy-Organophosphaten beobachtet. Gegenüber Omethoat wurde die Sensitivität um einen Faktor 108 gesteigert. Bei Pirimiphos-methyl ergab sich eine 86-fache Sensitivitätssteigerung. M301A zeigte keine erhöhte Sensitivität gegen Paraoxon, einem Diethoxy-Organophosphat. Der Effekt gegenüber den getesteten Carbamaten ist viel geringer als bei den Organophosphaten.

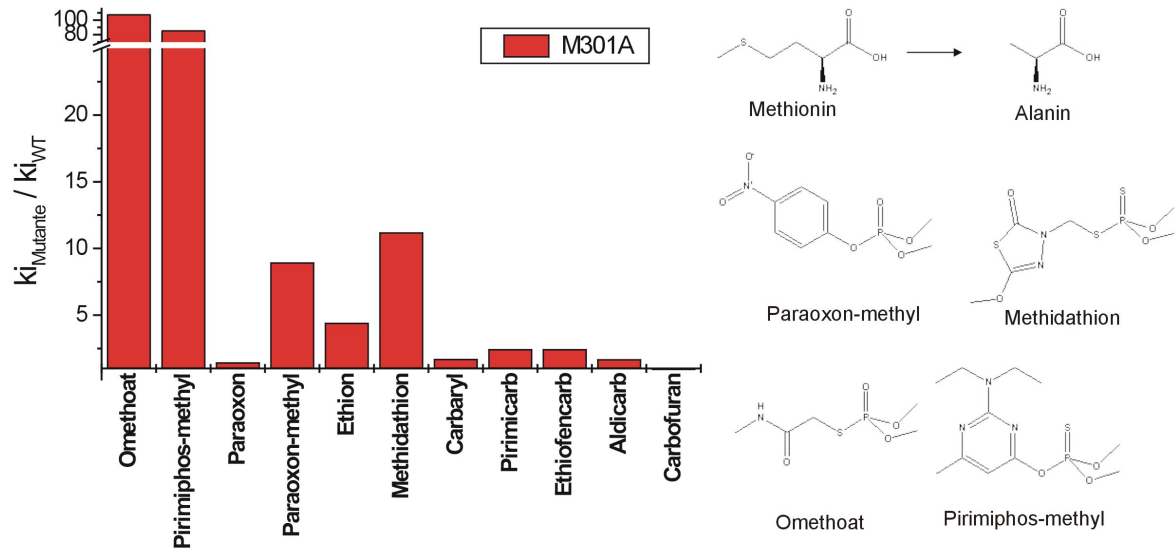


Abbildung 72: Sensitivitätsprofil von M301(288)A

c) *Acyltasche* - M301(288)W

Ein Tryptophan an Position 301 (288) bewirkte eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Dimethoxy-Organophosphaten und eine Resistenz gegenüber den Carbamaten. Der mit Abstand größte Effekt wurde bei Pirimiphos-methyl beobachtet.

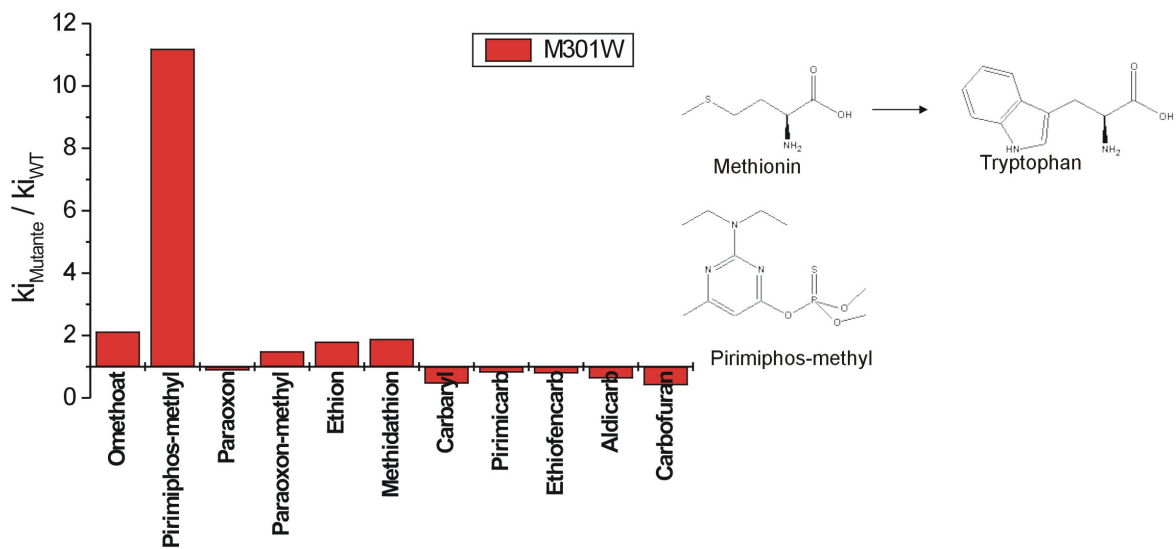


Abbildung 73: Sensitivitätsprofil von M301(288)W

d) Acyltasche - W303(290)X

Der Ersatz des Tryptophanrestes an Position 303 (290), ebenfalls ein Bestandteil der Acyltasche, durch kleinere Aminosäuren erzeugte durchweg resistente Mutanten. Die einzige Ausnahme stellt Pirimiphos-methyl dar. W303G und W303A zeigten eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber Pirimiphos-methyl. Bei W303L ist dieser Effekt ebenfalls, aber in etwas abgeschwächter Form erkennbar. Die zusätzliche Insertion von 26 Aminosäuren bei W303Ains verringerte die Affinität für Pirimiphos-methyl.

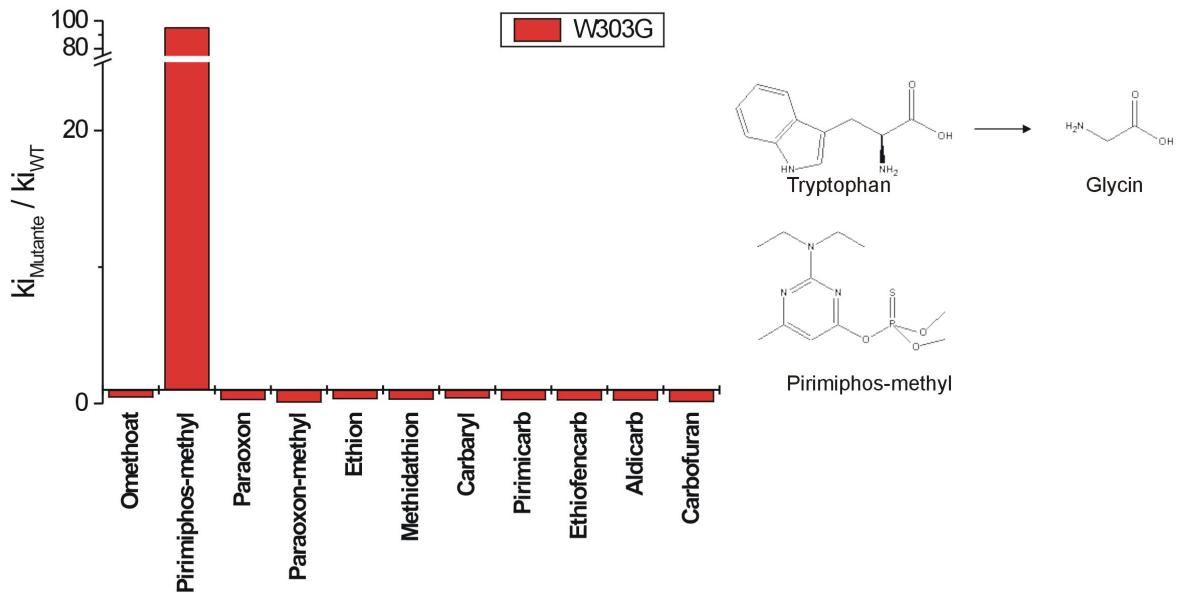


Abbildung 74: Sensitivitätsprofil von W303(290)G

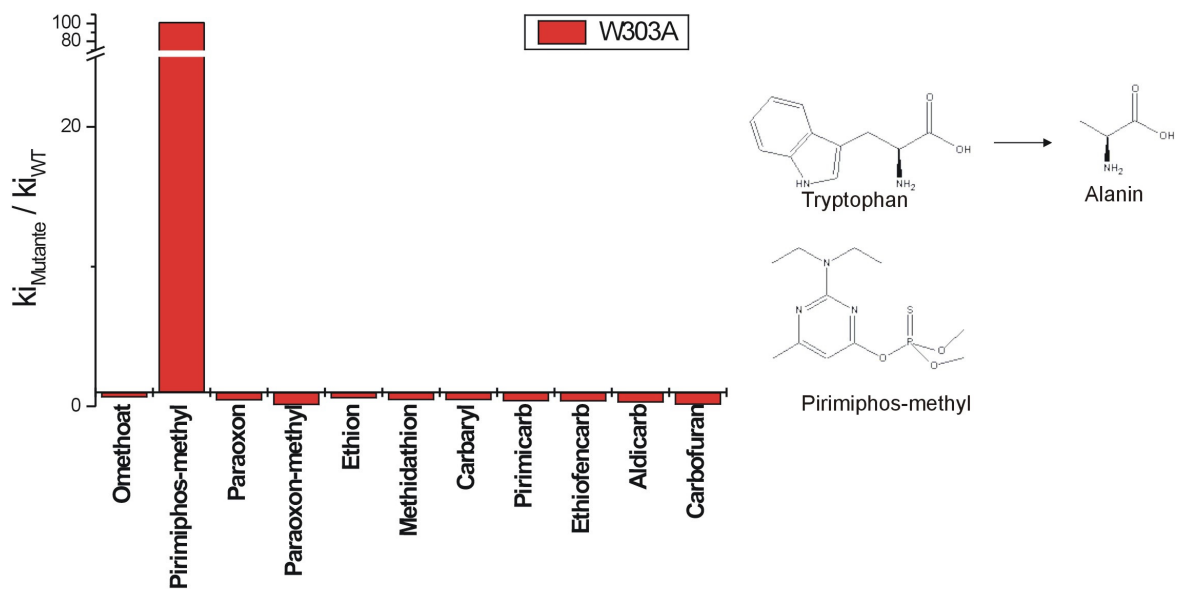


Abbildung 75: Sensitivitätsprofil von W303(290)A

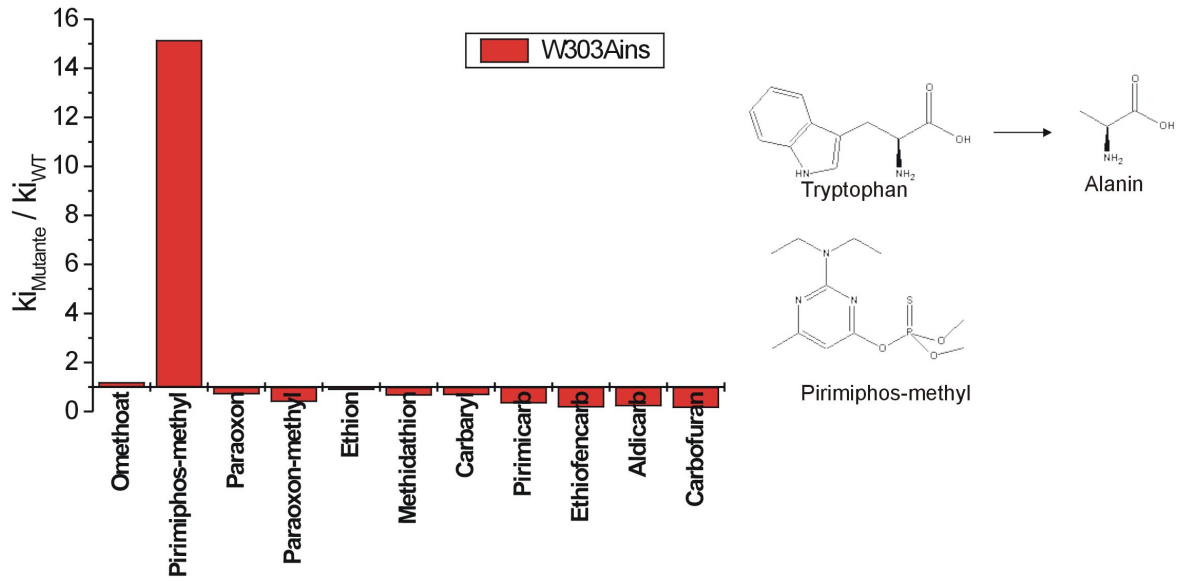


Abbildung 76: Sensitivitätsprofil von W303(290)Ains

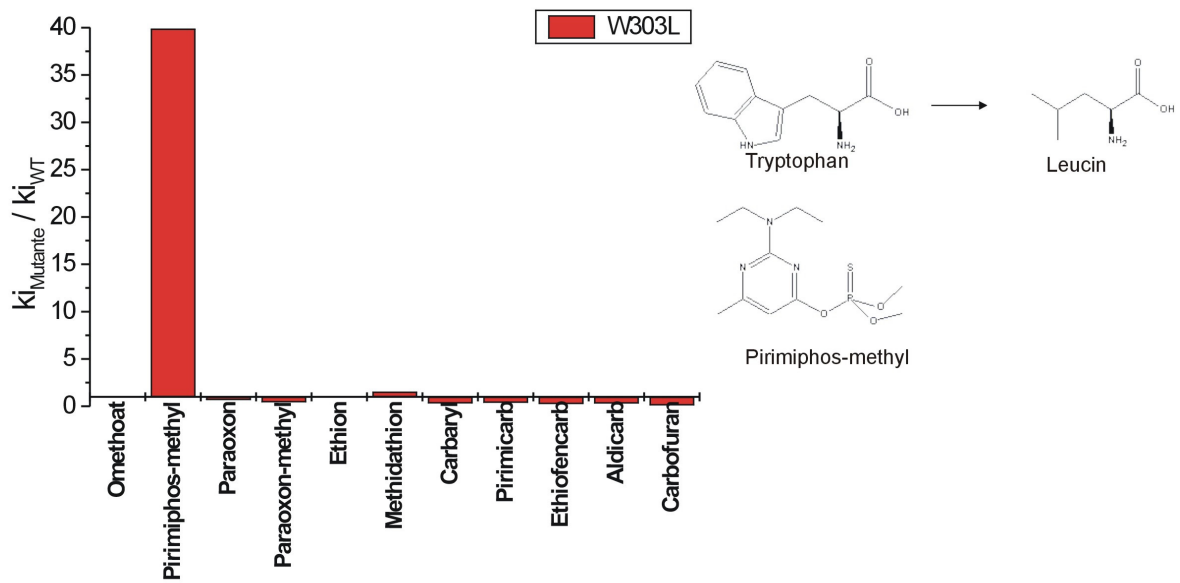


Abbildung 77: Sensitivitätsprofil von W303(290)L

e) Cholinbindestelle - F345(330)X

Der Austausch von Phenylalanin 345 (330) gegen das kleinere Alanin verursachte eine gesteigerte Affinität für Pirimiphos-methyl und Carbaryl. Die Hemmkonstanten aller anderen Insektizide außer bei Ethion verringerten sich durch diese Mutation. Ein Ersatz gegen Tyrosin drehte den Effekt gegenüber Pirimiphos-methyl und Carbaryl ins Gegenteil um. F345Y zeigte sich jedoch sensitiver gegenüber Omethoat. F345Y bewirkte bei allen Inhibitoren außer Omethoat und Methidathion eine starke Verringerung des k_i -Wertes verglichen mit dem Wildtyp.

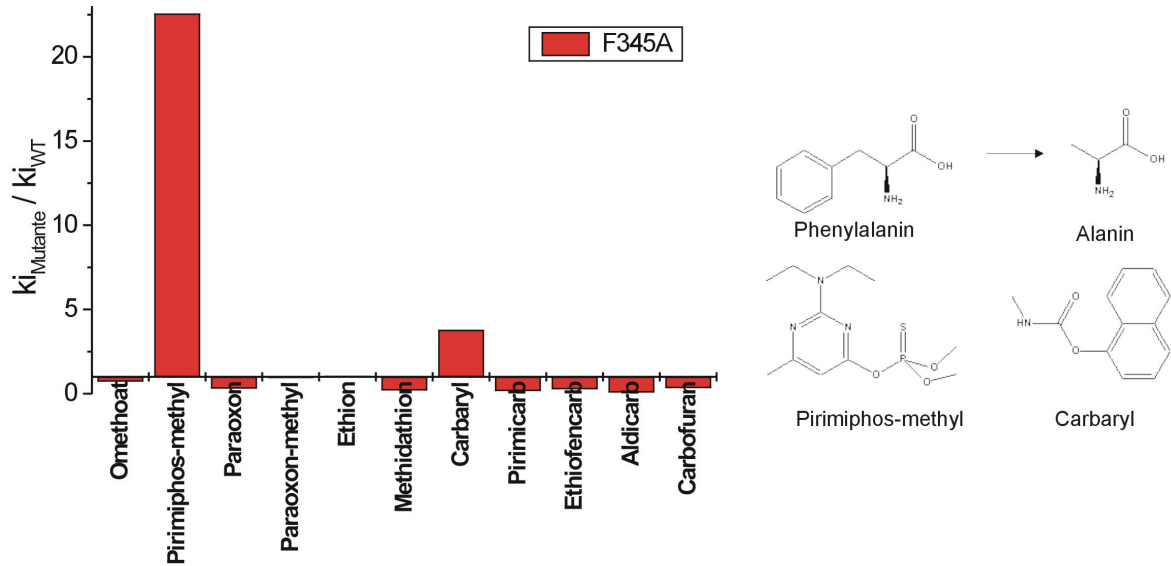


Abbildung 78: Sensitivitätsprofil von F345(330)A

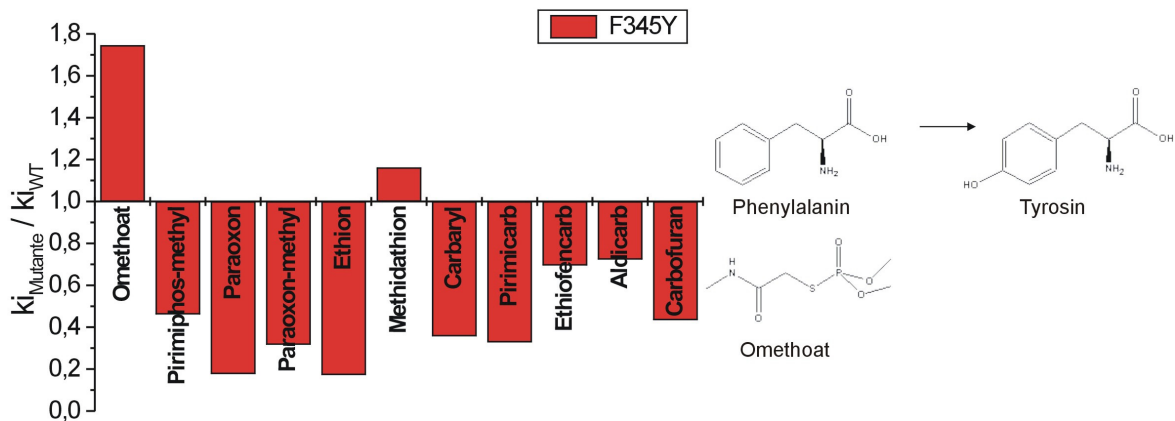


Abbildung 79: Sensitivitätsprofil von F345(330)Y

f) Substratzugangsbereich - Y349(334)X

Der Austausch von Tyrosin 349 (334) gegen Glycin bewirkte eine Sensitivitätssteigerung gegenüber Pirimiphos-methyl und Paraoxon-methyl. Diese beiden Verbindungen ähneln sich in der Art der Abgangsgruppe, die in beiden Fällen aus einer O-Aryl-Verbindung besteht. Es handelt sich bei beiden Inhibitoren um Dimethoxy-Organophosphate. Y349L zeigte andererseits keine erhöhte Sensitivität gegen Pirimiphos-methyl und Paraoxon-methyl, sondern gegenüber Paraoxon.

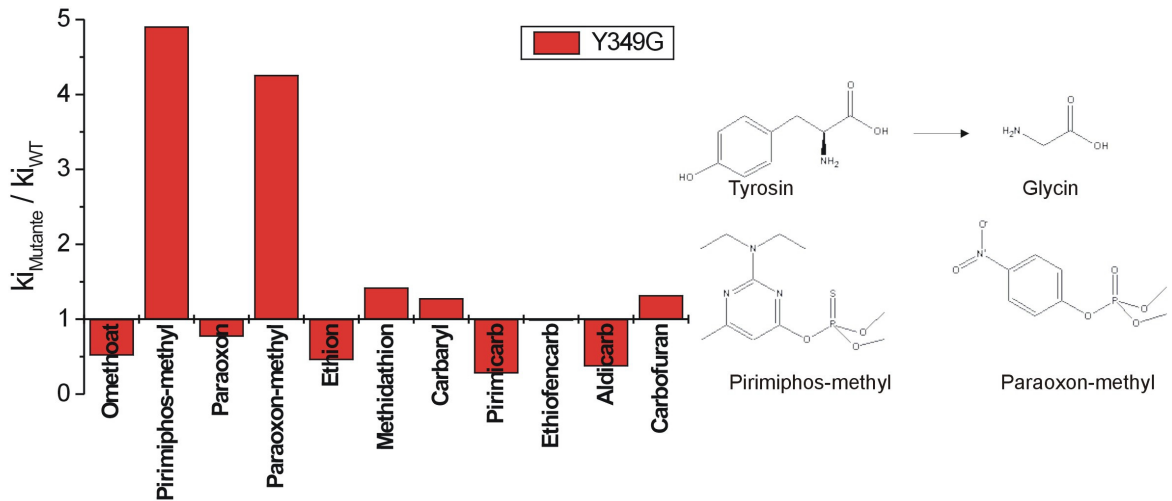


Abbildung 80: Sensitivitätsprofil von Y349(334)G

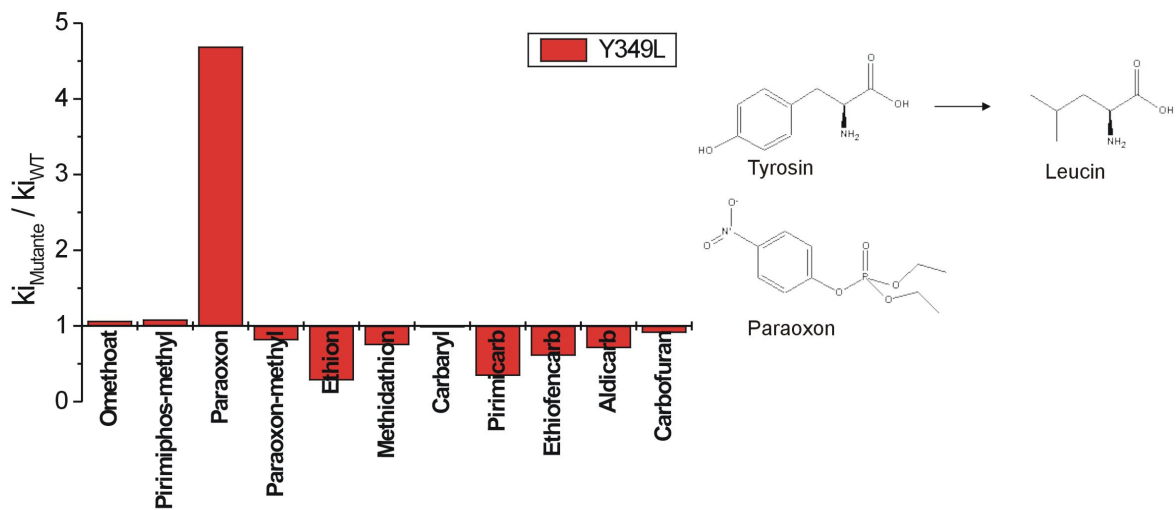


Abbildung 81: Sensitivitätsprofil von Y349(334)L

Abbildung 82 stellt eine Zusammenfassung aller 121 ermittelten k_i -Werte dar.

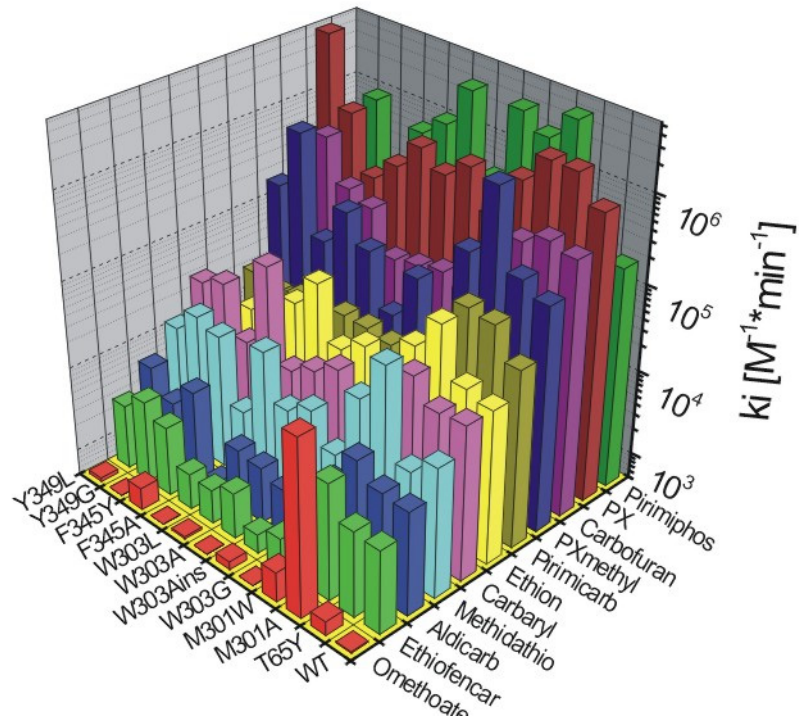


Abbildung 82: Hemm-Muster der 11 Mutanten gegenüber den 11 getesteten Organophosphaten bzw. Carbamten.

5.3.4.2 Insertionsmutante

Eine Vergleich der Daten der Insertionsmutanten mit der entsprechenden Einfachmutanten M303(290)A und der WT AChE zeigt ein tendenziell unterschiedliches Verhalten von Organophosphaten und Carbamaten. Bei allen getesteten Organophosphaten ausgenommen Pirimiphos-methyl, das eine stark erhöhte Affinität zu W303(290)A zeigt, bewirkte die Einfachmutation eine reduzierte Sensitivität (siehe Abbildung 83). Die zusätzliche Insertion von 26 Aminosäuren verringerte diesen Effekt oder kehrte ihn sogar ins Gegenteil um wie bei Omethoat.

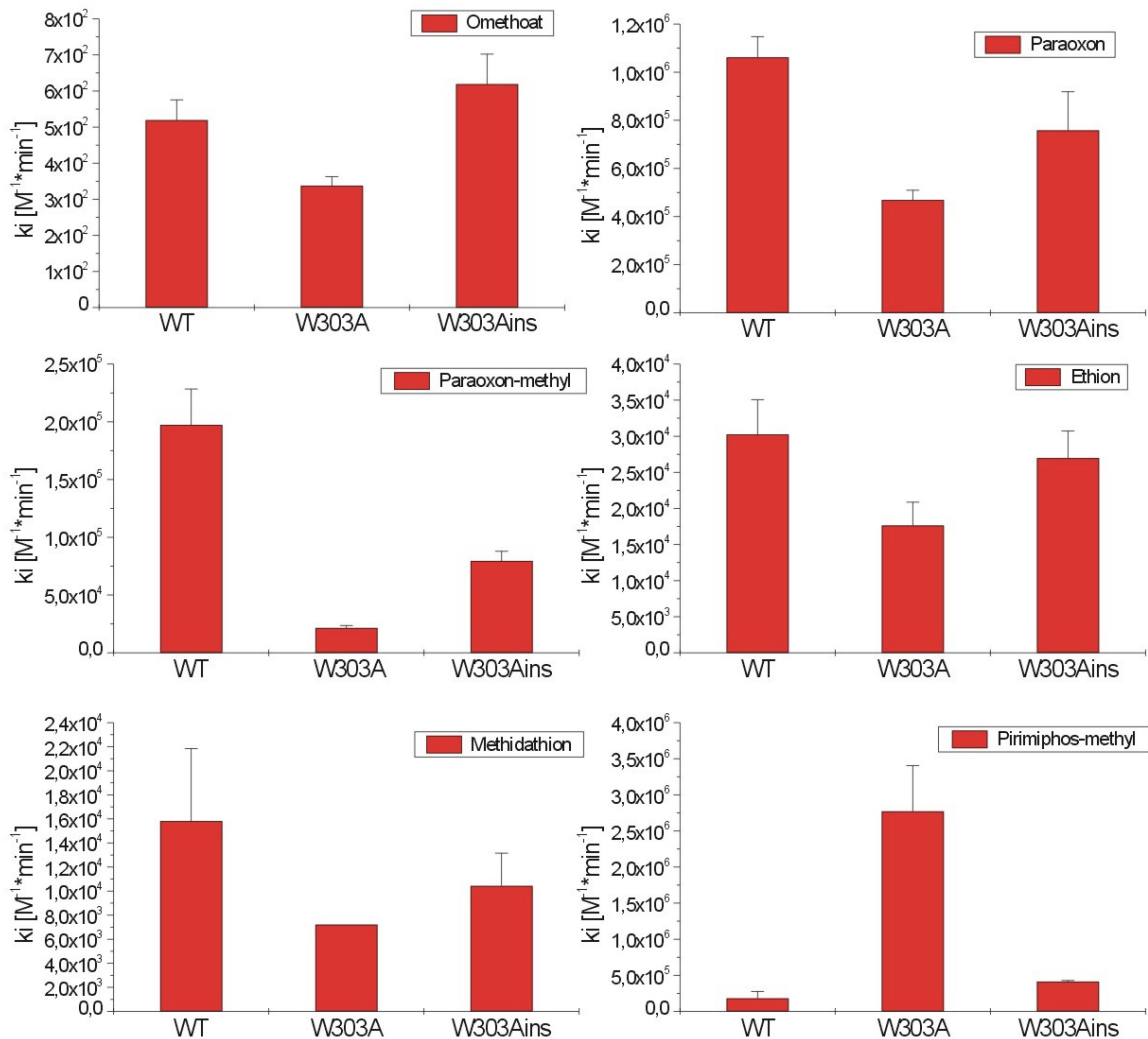


Abbildung 83: Vergleich der K_i -Werte von WT AChE, W303(290)A und W303(290)Ains gegenüber Organophosphaten.

Bei den getesteten Carbamaten wurde dieser Effekt mit Ausnahme von Carbaryl nicht beobachtet. Hier unterschied sich die Insertionsmutante nicht von W303(290)A oder vergrößerte die Resistenz noch weiter.

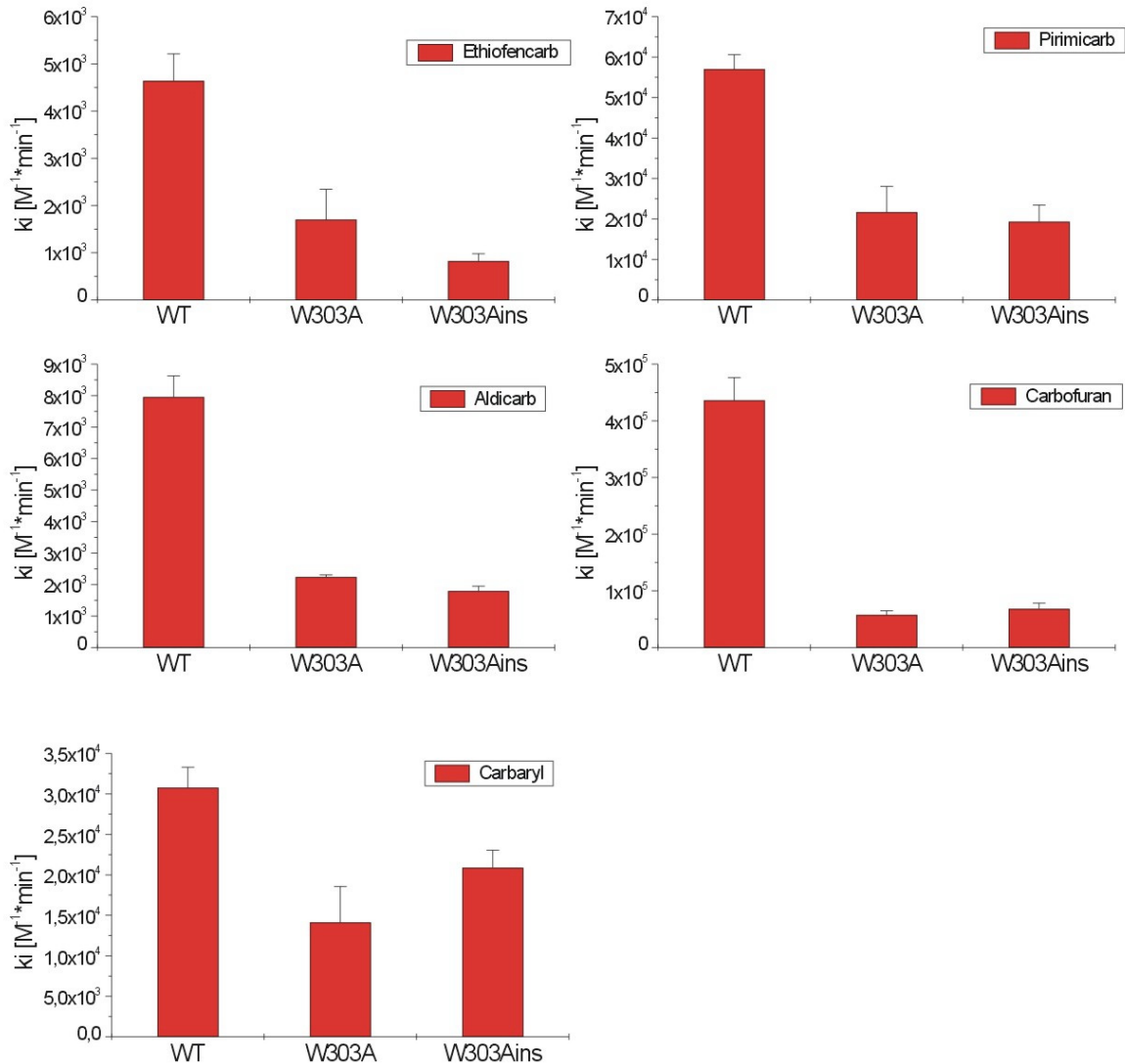


Abbildung 84: Vergleich der k_i -Werte von WT AChE, W303(290)A und W303(290)Ains gegenüber Carbamaten.

5.3.5 Biosensortests mit ausgewählten NbAChE-Mutanten

Das Verhalten der AChE-Mutanten in immobilisierter Form auf dem Biosensor wurde mit M301(288)A, W303(290)G und F345(330)G exemplarisch getestet. Es wurde ein Multienzymsensor bestehend aus vier verschiedenen Acetylcholinesterasen hergestellt. Neben den drei Mutanten wurde die WT NbAChE auf einem Elektrodenarray, bestehend aus vier nebeneinander liegenden Elektroden, immobilisiert (siehe Abbildung 25).

Abbildung 85 zeigt das unterschiedliche Verhalten der vier Enzyme gegenüber Omethoat. M301(288)A zeigte eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Omethoat als die WT NbAChE und die beiden anderen Mutanten. M301(288)A wurde schon bei einer Omethoat-Konzentration von 1000 $\mu\text{g/L}$ vollständig inaktiviert, bei der die anderen drei Enzyme noch nicht gehemmt wurden. Bei diesen zeigte sich erst bei 10000 $\mu\text{g/L}$ eine Hemmung zwischen 20 und 35%. Mit M301(288)A konnten um zwei Größenordnungen niedrigere Omethoat-Konzentrationen detektiert werden als mit dem Wildtyp. Eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/L}$ Omethoate verursachte noch eine 10%ige Hemmung. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den ermittelten k_i -Werten.

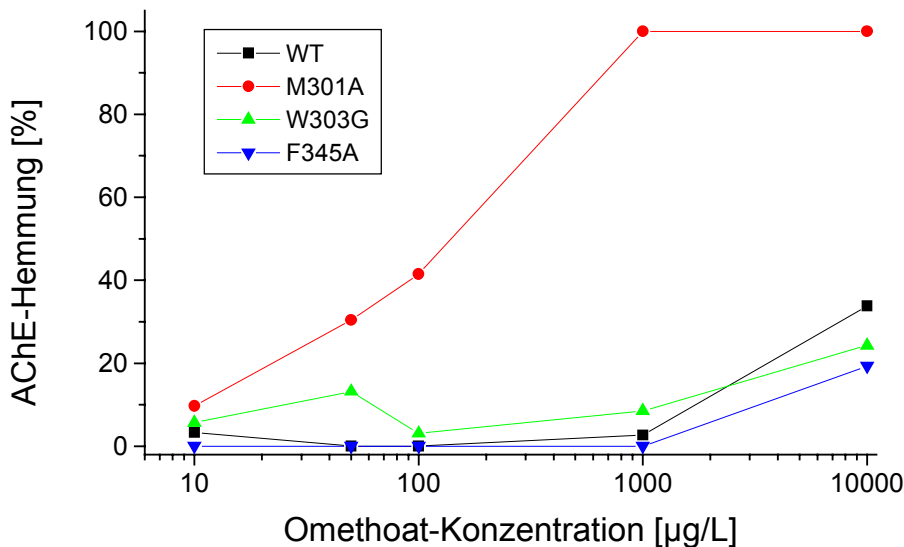


Abbildung 85: AChE-Hemmung in Abhängigkeit von der Omethoat-Konzentration. Inkubation des Multienzymsensors in Lösungen mit unterschiedlichen Omethoat-Konzentrationen 30 min bei RT.

Gegenüber Pirimiphos-methyl zeigte der Multienzymsensor ebenfalls das von den k_i -Werten erwartete Ergebnis. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/L}$ wurde der WT nicht gehemmt, wohingegen die dreifach sensitivere Mutante F345A zu 36% und die noch die noch viel sensitiveren Mutanten M301(288)A und W303(290)G schon zu 90% inaktiviert wurden. Mit diesen extrem sensitiven Mutanten konnten sogar noch 0,1 $\mu\text{g/L}$ Pirimiphos-methyl nachgewiesen werden.

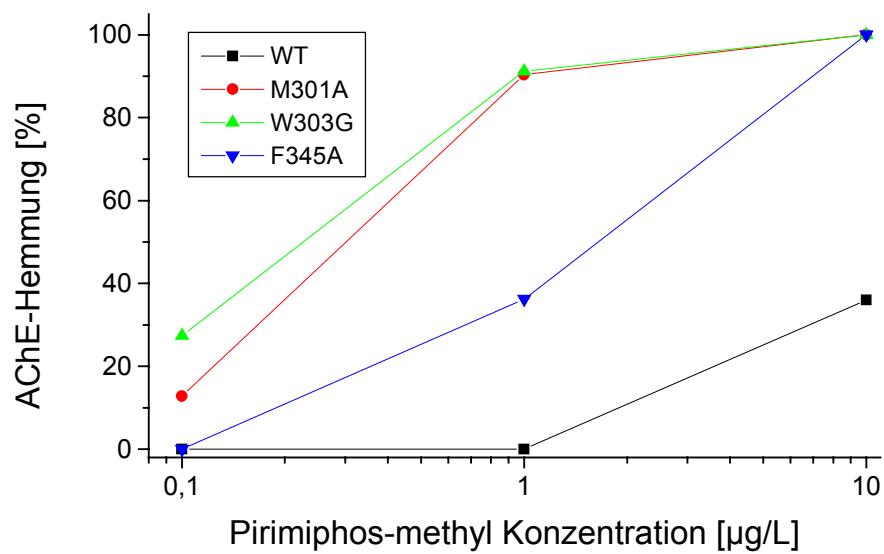


Abbildung 86: AChE-Hemmung in Abhängigkeit von der Pirimiphos-methyl-Konzentration. Inkubation des Multienzymsensors in Lösungen mit unterschiedlichen Pirimiphos-methyl-Konzentrationen 30 min bei RT. Pirimiphos-methyl wurde vorher mit NBS chemisch oxidiert.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines AChE-Biosensors für die Analyse von Lebensmitteln, der den Sensitivitätsanforderungen, Säuglingsnahrung schnell und einfach zu kontrollieren, gerecht wird. Die zu Beginn der Arbeit aufgestellten Zielsetzungen konnten alle erfüllt werden:

1. Das Ziel den bislang für Wasseranalytik entwickelten Biosensor auf komplexe Matrices zu übertragen, konnte durch ein neuartiges Assaysystem, welches Matrix-Einflüsse beseitigt, verwirklicht werden. Diese Assayentwicklung machte es möglich, Lebensmittelproben mit minimaler Probenvorbereitung sehr exakt zu untersuchen.
2. Für Phosphorthionate konnte eine neuartige Aktivierungsmethode, basierend auf der Reaktion mit einer Cytochrom P450 BM-3-Mutante entwickelt werden, die diese wichtige Gruppe an Insektiziden dem AChE-Biosensortest zugänglich macht.
3. Die Sensitivität des AChE-Biosensors konnte durch Protein-Design von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE gesteigert werden. Damit erhöhte sich die Anzahl der Stoffe erheblich, die im Bereich des Pestizidgrenzwertes von Säuglingsnahrung detektierbar sind.

Prinzipielle Nachteile von AChE-Biosensoren bleiben jedoch bestehen. Die Untersuchungen liefern keine qualitativen oder quantitativen Aussagen über Einzelstoffe, sondern nur einen Summenparameter, der sich aus der Gesamtheit aller in der Probe befindlicher Neurotoxine zusammensetzt. Ein AChE-Biosensor wird die konventionelle Analytik nie ersetzen können, kann sie aber in einigen Bereichen sinnvoll ergänzen.

Die einzelnen Bestandteile, die zum Erfolg dieser Entwicklung führten, werden im folgenden Kapitel diskutiert.

6.1 AChE-Biosensortest für Lebensmittel

a) Matrixeffekte

Der hier beschriebene Test stellt eine Weiterentwicklung und Vereinfachung einer früher beschriebenen Methode dar. Darin wurden Probleme, die durch die komplexe Matrix verursacht wurden, durch eine Extraktion der Lebensmittelprobe mit Isooctan umgangen („Isooctan-Methode“) (Schulze et al. 2002b). Die Inkubation der AChE erfolgte direkt in dem Lösungsmittel-extrakt. In der neu entwickelten Methode konnte im Gegensatz zu Arbeiten von Saul et al und Palchetti et al ganz auf organische Lösungsmittel verzichtet werden (Palchetti et al. 1997; Saul et al. 1995). Probleme bezüglich einer extrem verlängerten Equilibrierung der Elektroden und die unspezifische Reduzierung der AChE-Aktivität, die mit der komplexen Matrix der Lebensmittel zusammenhängen, konnten durch eine Behandlung der Elektroden in einer Tween-20-Lösung beseitigt werden. Ähnliche Schwierigkeiten mit Matrixeinflüssen bei der Detektion von Organophosphaten oder Carbamaten in Lebensmitteln wurden in früheren Arbeiten beschrieben. Skladal et al. berichtete von einer verlangsamten Reaktion des Stromsignals der AChE-Biosensoren nach Inkubation in Gemüseproben (Skladal et al. 1997). Außerdem wurden signifikante Matrixeinflüsse beobachtet. So verursachten z.B. Kartoffeln eine unspezifische Hemmung von 11%. Auch Roda et al. berichtete von erheblichen Matrixproblemen bei der Detektion von Paraoxon und Aldicarb in Lebensmittelproben, obwohl die Probe mit Puffer verdünnt (1:5) und zweifach gefiltert wurde (Roda et al. 1994). Salat verursachte hier z.B. eine 66%ige unspezifische Reduzierung des Messsignals. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten von Paraoxon und Aldicarb in den getesteten Lebensmitteln wurde deshalb für jede Matrix eine Art interne Kalibrierung durchgeführt, d.h. die Hemmung nach Zugabe bestimmter Insektizidmengen wurde mit der unspezifischen Hemmung der entsprechenden Testmatrix verglichen. Für eine praktische Anwendung als Schnelltest in der Lebensmittelkontrolle wäre ein derartiges Verfahren undenkbar. Das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren stellt demnach eine erhebliche Weiterentwicklung von Biosensorverfahren für Neurotoxine in Lebensmitteln dar.

b) Wiederfindungsraten

Der Fortschritt gegenüber früheren Biosensortests zeigt sich auch im Vergleich der Wiederfindungsraten der Neurotoxine in Lebensmitteln. Waren die Wiederfindungsraten in Lebensmittel mit einem niedrigen Wasseranteil bei der „Isooctan-Methode“ noch unbefriedigend so liegen die Wiederfindungsraten der neu entwickelten Methode mit 83% bzw. 87% in dem gesetzlich vorgeschriebenen Bereich zwischen 70 und 110% (EC 1997). Dies stellt eine deutliche Verbesserung zu früher beschriebenen AChE-Biosensoren dar. Skladal et al erreichte zwar eine Wiederfindungsrate von Carbofuran in Karotten von 110%. Die Werte von Carbofuran in Kartoffeln und Propoxur in Kartoffeln und Karotten lagen aber mit ca. 50% weit unter dem geforderten Bereich (Nunes et al. 1998; Skladal et al. 1997). Eine Weiterentwicklung dieses AChE-Biosensors von Nunes et al ergab durchweg erhöhte Wiederfindungsraten von ca. 120%. Dies deutet wiederum auf Matrixeinflüsse hin, obwohl die Proben mit der zehnfachen Menge Puffer verdünnt wurden. Pogacnik et al entwickelten einen optischen AChE-Biosensor basierend auf photothermischer Detektion (Pogacnik und Franko 1999a; Pogacnik und Franko 2003). Untersuchungen von Fruchtsäften ergaben erneut unzureichende Wiederfindungsraten. So lag die Wiederfindungsrate von Paraoxon in Apfelsaft, der mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, nur bei 33%. Die Wiederfindungsraten in Apfel- und Orangensaft mit natürlichem pH-Wert von 3,2 bzw. 3,7 lagen zwischen 50 und 60%. Hier scheint sich der Einfluß des niedrigen pH-Wertes der Realproben, der wie in dieser Arbeit bewiesen wurde zu einer teilweisen Inaktivierung der AChE führt, und die schlechte Wiederfindung von Paraoxon bei dieser Methode teilweise gegenseitig auszugleichen.

All die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, daß die Bestimmung der AChE-Aktivität direkt nach Inkubation in Lebensmittelproben zu unzureichenden Ergebnissen führt und ein Elektrodenbehandlungsschritt mit Tween-20 unerlässlich ist. Die hier beschriebene Methode stellt damit eine einfache und schnelle, aber auch äußerst exakte Methode für den Nachweis von Organophosphaten und Carbamaten dar. Die Probenvorbereitung konnte auf ein Minimum reduziert werden. Die Proben werden nur homogenisiert mit gleichen Teilen Phosphatpuffer gemischt, so daß es lediglich zu einer 1:2 Verdünnung der Analyten kommt. Dies erhöht die Nachweisgrenze der Methode im Gegensatz zu früheren Verfahren, bei denen die Proben 1:5 (Roda et al. 1994) oder sogar 1:10 (Nunes et al. 1999) verdünnt wurden um Matrixeinflüsse zu reduzieren.

c) *Nachweisgrenze*

Die Nachweisgrenze des AChE-Biosensors liegt im Bereich der Nachweisgrenzen der chromatographischen Standardverfahren für Pestizide in Lebensmitteln und ist ausreichend für die Kontrolle des Grenzwertes von Organophosphaten und Carbamaten in Obst und Gemüse, der in Deutschland zwischen 50 und 10000 µg/kg liegt (EC 1997; EC 2000). Der Grenzwert für die sehr starken AChE-Inhibitoren Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl und Quinalphos liegt zwischen 10 und 200 µg/kg. Die Kontrolle dieser Grenzwerte ist mit dem hier beschriebenen Test problemlos möglich, da die K_i -Werte dieser drei Organophosphate gegenüber eeAChE und huAChE größer sind als der von Paraoxon. Die Kontrolle des Pestizidgrenzwertes in Babynahrung von 10 µg/kg kann mit dem hier eingesetzten System, bestehend aus einer Kombination aus Zitteraal und humaner AChE, für viele aber noch nicht alle Organophosphate und Carbamate gewährleistet werden. Einige dieser Verbindungen zeigen eine sehr schwache Hemmwirkung gegenüber diesen beiden Enzymen (z.B. Dimethoat und Ethiofencarb). Diese Verbindungen können deshalb nicht in dem geforderten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit die Sensitivität zu steigern, ist die Auswahl von Cholinesterasen anderer Herkunft, wie etwa von *Drosophila melanogaster* AChE (Villatte et al. 1998). Eine andere Möglichkeit besteht in der Veränderung der Proteineigenschaften mit gentechnischen Mitteln durch rationales Protein-Design wie in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 5.3).

d) *Validierung*

Das korrekte Funktionieren des Tests konnte in vielen verschiedenen Arten von Obst und Gemüse, von sehr faserigen, fast wasserfreien Erbsen bis hin zu unterschiedlichen Zitrusfrüchten, bestätigt werden. Der Einsatz eines Bienzym-Systems mit humaner und Zitteraal-AChE, die unterschiedlich auf bestimmte Neurotoxine reagieren, erbrachte zusätzliche Sicherheit, daß die Hemmung durch Organophosphate oder Carbamate und nicht durch unspezifische Effekte verursacht wurde. Das aus den K_i -Werten erwartete Hemmmuster konnte in Proben mit nur einem Organophosphat oder Carbamat bestätigt werden. Der Einsatz humaner AChE liefert zusätzliche Informationen über das Gefährdungspotentials der Probe.

e) *Vergleich mit Standardverfahren für Pestizidanalytik*

Der hier beschriebene Test zeichnet sich durch eine Reihe von Vorteilen gegenüber den bislang eingesetzten Analysenverfahren aus. Ein Vorteil der auf der Hand liegt, ist die Zeitersparnis. Mit dem Biosensor können Proben in ca. 90 min untersucht werden. Das bedeutet eine Zeitersparnis von mindestens vier bis fünf Stunden im Vergleich zu chromatographischen Methoden, bei denen eine aufwendige Probenvorbereitung inklusive mehrerer Extraktionsschritte notwendig ist (Anastassiades und Scherbaum 1997). Der apparative Aufwand und dementsprechend die Kosten für die Ausstattung sind bei dem

Biosensor-Verfahren ebenfalls erheblich geringer. Die Auswertung der GC-Spektren erfordert speziell dafür ausgebildetes Personal wohingegen die Biosensor-Messungen nach kurzer Einarbeitung von jedermann durchgeführt werden kann. Ein weiterer Vorteil von Biosensor-Schnelltests besteht in der Möglichkeit, Lebensmittel vor Ort kontrollieren zu können. Das enzymatische Verfahren deckt eine ganze Gruppe von Insektiziden ab. Diese Tatsache verringert die Gefahr von falsch negativen Ergebnissen erheblich. Die für das Lebensmittel-Monitoring eingesetzten Standardverfahren decken lediglich 150 von etwa 500 eingesetzten Pestiziden nachgewiesen werden können. Hier ist die Gefahr von falsch-negativen Befunden nicht zu vernachlässigen. Der AChE-Biosensor kann die GC- bzw. LC-MS Untersuchungen nicht ersetzen, da in der jetzigen Form keine Informationen über die Art und Konzentration von Einzelsubstanzen erhalten werden. Er kann aber eine sinnvolle Ergänzung darstellen, beispielsweise kann die Zahl der untersuchten Proben erheblich erhöht werden. Belastete Proben können dann mittels GC/LC-MS genauer untersucht werden. Dies wäre insbesondere für die Kontrolle von Babynahrung wünschenswert. Denkbar ist aber auch eine Anwendung bei der Überwachung von Lieferanten für Produkte des ökologischen Landbaus. Gerade die Kontrolle des Pestizidgrenzwertes von Kindernahrung ist mit Standardverfahren nur mit hohem apparativem und zeitlichen Aufwand zu gewährleisten. Hier wäre ein Test speziell für die extrem toxischen Organophosphate und Carbamate ein deutlicher Fortschritt.

f) *Babybrei-Untersuchung*

Als Praxistest wurde eine vergleichende Studie von Babynahrung mit dem Biosensortest und der GC/LC-MS-Methode durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, daß der AChE-Biosensor geeignet ist, um mit Neurotoxinen belastete Babynahrung aufzuspüren. In 85% der positiv getesteten Proben wurden tatsächlich Pestizide detektiert. Auch wenn die mittels GC/LC-MS gefundenen Pestizide nicht ausschließlich AChE-Inhibitoren waren und die Konzentrationen teilweise unter den erwarteten lagen, so zeigt dies, daß die Rohstoffe, die zu Babybrei verarbeitet wurden, mit Pflanzenschutzmitteln behandelt wurden. Hier liegt die Vermutung nahe, daß diese Pflanzen auch noch mit anderen Pestiziden in Berührung kamen. Möglicherweise solche, die nicht zu der Liste der getesteten Pflanzenschutzmittel gehören. Insgesamt waren 57% der untersuchten Proben mit Pestiziden belastet. Wobei hier verstärkt Zitrusfrüchte und Pflirsiche untersucht wurden, die im allgemeinen in einem höheren Maße belastet sind als andere Erzeugnisse. Dies ergab eine Studie der amerikanischen Verbraucherschutzorganisation „Environmental Working Group“ (EWG) (Wiles und Davies 1995). Ausgehend von Daten des amerikanischen Landwirtschaftsministeriums (USDA) und der „Food and Drug Administration“ (FDA) wurde die Wahrscheinlichkeit ermittelt, mit der Kinder unter sechs Jahren gesundheitsgefährdenden Konzentrationen an Organophosphaten ausgesetzt werden. Die Gefahr ist demnach bei Pflirsichen (25%ige Wahrscheinlichkeit), Äpfeln (13%) und Nektarinen (12%) am größten. Eine von der EWG in Auftrag gegebene Untersuchung von amerikanischen Babybreiherstellern kam zu ähnlichen Ergebnissen. In 53% der Proben wurden Pestizide nachgewiesen. Zwei oder mehrere Pestizide wurden in 18% der untersuchten Babybreis gefunden. Von den 16 detektierten Pestiziden waren 9 Organophosphate oder Carbamate. Ein Test von 155 Babybreis mit dem kommerziell erhältlichen "Charm Pesticide Test" ergab einen Anteil von 14% Proben, die mit Pestiziden belastet waren (Saul et al. 1995). Carbaryl war auch hier das am häufigsten gefundene Pflanzenschutzmittel. Der Charm-Test hat den Nachteil, daß eine aufwendige Probenvorbereitung, inklusive Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und Wiederaufnahme in Wasser, notwendig ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Einsatzfähigkeit des neuen Biosensortests für die Kontrolle von Babynahrung bestätigt werden konnte. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen den Ergebnissen des Biosensors und denen der GC/LC-MS Untersuchungen. Durch den Einsatz des AChE-Biosensors kann die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen in der Gruppe der für Kleinkinder besonders gefährlichen Neurotoxine minimiert werden.

Verglichen mit dem "Charm Pesticide Test" konnte die Probenvorbereitung auf ein Minimum reduziert werden, wobei auf organische Lösungsmittel ganz verzichtet werden konnte.

6.2 Notwendigkeit der enzymatischen Phosphorthionataktivierung

Die in Kapitel 5.2 beschriebene sehr schwache Hemmwirkung von Parathion auf AChE steht in Einklang mit Literaturdaten (Barber et al. 1999; Jokanovic 2001). Barber et al. fand keine AChE-Hemmung nach 60 min Inkubation mit 291 µg/L Parathion bei 37°C und nur 10% Hemmung verursacht durch 2910 µg/L Parathion. Daher ist es für einen auf AChE-Hemmung basierenden Test zwingend notwendig, dass Phosphorothionate in die korrespondierenden Oxo-Form überführt werden. Erst diese Aktivierung ermöglicht die Detektion der Phosphorthionate mit AChE-Hemmtests in dem benötigten Konzentrationsbereich von 10 bis 10 000 µg/kg, dem Bereich der Pestizidgrenzwerte in Lebensmitteln (EC 1997; EC 2000). Es zeigte sich, dass das für diese Zwecke entwickelte DIN-Verfahren, basierend auf der chemischen Oxidation von Phosphorthionaten, nicht auf Lebensmittel übertragbar ist (DIN38415-1 1995). Eine direkte Oxidation von Phosphorthionaten in Lebensmittelproben durch Reaktion mit NBS ist nicht möglich. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass Ascorbinsäure als künstlicher Zusatzstoff bzw. natürlicher Bestandteil von Lebensmitteln weit verbreitet ist. Das zugesetzte NBS wird hierbei durch die Ascorbinsäure inaktiviert bevor es mit Phosphorthionaten reagieren kann. Der Versuch dieses Problem durch noch weitere Erhöhung der NBS- und Ascorbinsäure-Konzentrationen zu umgehen, schlug fehl, da extrem hohe Konzentrationen zu einer teilweisen Inaktivierung der AChE führten. Aus diesen Gründen war es notwendig, eine neue Aktivierungsmethode für Phosphorthionate in Lebensmitteln zu entwickeln. Bei allen bislang entwickelten AChE-Biosensortests, die sich mit Lebensmitteln als Testmatrix beschäftigten, war das Analytspektrum auf Carbamate und die wenigen Organophosphate beschränkt, die direkt in Form von Oxo-Verbindungen eingesetzt werden (Nunes et al. 1998; Nunes et al. 1999; Palchetti et al. 1997; Pogacnik und Franko 1999a; Skladal et al. 1997). Die in dieser Arbeit beschriebene neuartige Aktivierungsmethode stellt eine enorme Erweiterung des Analytspektrums von AChE-Hemmtests dar. Dieser Schritt ist besonders wichtig, da die Phosphorthionate die weitaus größte Gruppe der als Pestizide eingesetzten AChE-Inhibitoren darstellen.

6.3 P450 BM-3 katalysierte Aktivierung von Phosphorthionaten

Sowohl die Untersuchung der Reaktionsprodukte mittels GC-MS/MS als auch deren Wirkung auf AChE zeigte, daß die P450 BM-3 Dreifachmutante Phe87Val/Leu188Gln/Ala74Gly zu einer spezifischen Transformation der getesteten Phosphorthionate in die korrespondierenden Oxo-Formen führte. Die GC-MS/MS-Untersuchungen deuten sogar auf eine quasi quantitative Umsetzung hin. Wohingegen das unveränderte P450 BM-3 nicht mit Phosphorthionaten zu den Oxo-Verbindungen reagiert. Barber et al verglich die chemische Oxidation von Phosphorthionaten mit Brom-Lösung mit der enzymatischen Aktivierung durch Rattenlebermikrosomen (RLM) (Barber et al. 1999). Sie beobachteten dabei ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der AChE in behandelten humanen Neuroblastomazellen. Die Transformationseffizienz war jedoch viel geringer als die in dieser Arbeit mit der P450 BM-3 Mutanten erreichten Werte. So ergab die Aktivierung von Parathion mit RLM eine Transformationseffizienz von weniger als 50 %, verglichen mit der AChE-Hemmung der entsprechenden Paraoxon-Konzentration. Die RLM Aktivierung von Chlorpyrifos war sogar noch weniger effektiv. Die Aktivierung durch Brom war gegenüber Parathion weniger wirksam als die Aktivierung mit RLM und effektiver als die RLM Aktivierung von Chlorpyrifos. Ein weiteres Problem hinsichtlich der Anwendung mikrosomaler Präparationen für analytische Zwecke ist das Auftreten von Nebenprodukten. Neben der Aktivierung von Chlorpyrifos und Parathion wurden auch Detoxifikationsmechanismen beobachtet. Diese Entgiftung wird durch enzymatische

Abspaltung des Arylrestes verursacht und reduziert dadurch die Aktivierungsausbeute der RLM gegenüber Phosphorthionaten.

Hernandez et al. zeigte, daß neben den Cytochrom P450-Systemen auch Chlorperoxidase in der Lage ist, Phosphorthionate zu aktivieren (Hernandez et al. 1998). Dabei wurden keine Hydrolyseprodukte von Entgiftungsmechanismen detektiert, wie sie bei mikrosomalen Präparationen entstehen. Die spezifische Aktivität der Chlorperoxidase von *Caldariomyces fumago*, angegeben in mol oxidierte Phosphorthionate pro mol Biokatalysator und Zeiteinheit (s), variierten dabei zwischen 2,4 für Phosmet bis zu 3,4 für Chlorpyrifos und 5,6 für Parathion. Die Transformationseffizienz bezüglich der AChE hemmenden Wirkung der Reaktionsprodukte wurde nicht untersucht. Daher gibt es keine Informationen darüber ob Chlorperoxidase eine mögliche Alternative für AChE-Biosensoranwendung sein könnte.

In den meisten *in vitro* Studien, die sich bislang mit der Aktivierung von Phosphorthionaten beschäftigten, wurden mikrosomale Präparationen oder isolierte und aufgereinigte Cytochrom P450 Enzyme eingesetzt (Hodgson et al. 1995; Levi und Hodgson 1985; Sams et al. 2000). Die Untersuchungen beschränkten sich dabei auf mechanistische Fragestellungen der Biotransformation von Phosphorthionaten und hatten keine praktische oder gar analytische Anwendung. Die Verwendung rekombinanter Enzyme hat mehrere Vorteile gegenüber isolierten Monooxygenasen. So kann P450 BM-3 in ausreichend großen Mengen rekombinant in *E. coli* als Expressionssystem in reproduzierbarer Qualität produziert werden. Außerdem kann die Proteinstruktur und damit auch die Funktion durch gentechnische Methoden verändert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Vorteile dieser Vorgehensweise. Im Gegensatz zu dem Wildtyp P450 BM-3 war erst ein an drei Positionen verändertes Enzym in der Lage Phosphorthionate zu aktivieren. Diese Dreifachmutante wurde ursprünglich von Qing-Shan Li am Institut für Technische Biochemie in Stuttgart für die biokatalytische Produktion von Feinchemikalien entwickelt. Diese Mutante ist in der Lage Indigo ausgehend von Indol zu produzieren (Li et al. 2000). Der Austausch des voluminösen Phenylalanins durch Alanin in Position 87 führt dabei zu einer Vergrößerung des zur Verfügung stehenden Raumes in der Bindungstasche (Li et al. 2001a; Noble et al. 1999; Oliver et al. 1997). Aus der Struktur des Palmetoleinsäure/P450 BM-3 Häm-Domänen Komplexes ergibt sich ein direkter Kontakt der Aminosäure an Position 188 mit dem Substrat (Li und Poulos 1997). Diese Position scheint daher eine wichtige Rolle, in der Substratbindung oder der Orientierung des Substrates zu haben.

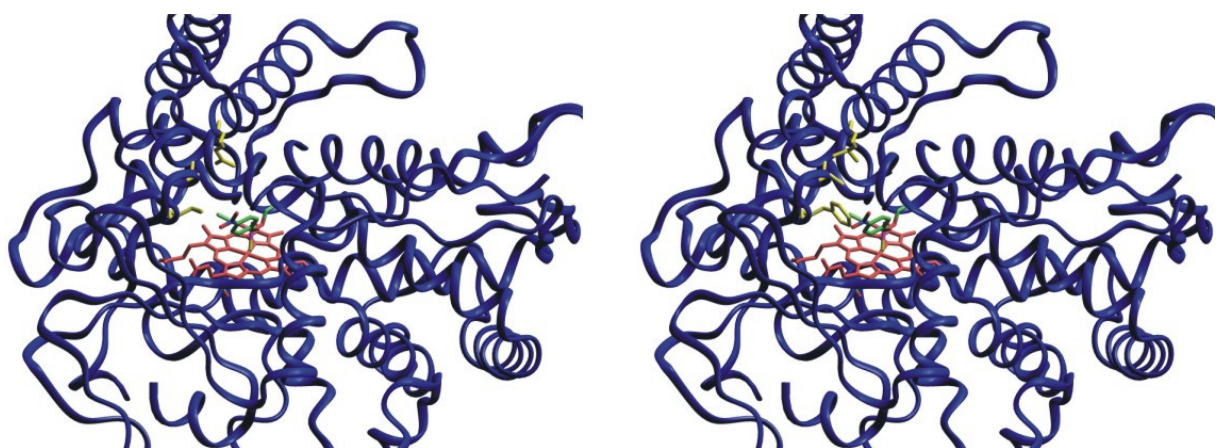


Abbildung 87: Cytochrom P450 BM-3 Phe87Val/Leu188Gln/Ala74Gly (gelb) mit Parathion an der Häm-Gruppe (links). Auf der rechten Seite ist der WT Cytochrom P450 BM-3 dargestellt.

Das in dieser Arbeit verwendete prokaryotische P450 BM-3 hat verglichen mit eukaryontischen Säugetier-Monooxygenasen weitere Vorteile bezüglich der Aktivität und Stabilität. Bakterielle P450-Enzyme sind deutlich thermostabiler als eukaryotische. Humane Lebermikrosomen, die eine Vielzahl verschiedener P450 enthalten, verlieren bei 25 °C nach

sechs Stunden 90% ihrer P450-Aktivität (Yamazaki et al. 1997). P450 BM-3 besitzt außerdem eine 100-1000fach höhere Umsatzrate als vergleichbare eukaryotische Monooxygenasen (Boddupalli et al. 1990; Guengerich 1991; Roberts 1999; Schwaneberg et al. 2000). All diese Tatsachen sprechen gegen einen Einsatz anderer P450-Systeme und machen das gentechnisch veränderte P450 BM-3 zu einem idealen Kandidaten für Biosensoranwendungen.

6.4 Sensitivitätssteigerung durch Protein-Design

Der Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Expressionsrate mit denen von Cholinesterasen anderer Herkunft in *Pichia pastoris* und weiteren Expressionssystemen, die in Tabelle 24 zusammengefasst sind, verdeutlicht die ausgezeichnete Ausbeute von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE in *Pichia pastoris*.

Tabelle 24: Expressionsraten von AChE in unterschiedlichen Expressionssystemen:

Expressions-system	Herkunft der AChE	Ausbeute		Referenz
		Aktivität	Spezifische Aktivität [U/mg]	
<i>P. pastoris</i> (Fermentation)	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> WT	1600 U/mL		
<i>P. pastoris</i> (Fermentation)	<i>N. brasiliensis</i> M301A	2700 U/mL		
<i>P. pastoris</i> (Schüttelkolben)	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> WT	140 U/mL		
<i>P. pastoris</i> (Schüttelkolben)	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> WT	72 U/mL	2080	(Hussein et al. 1999)
<i>P. pastoris</i>	<i>Bungarus fasciatus</i>	100 U/mL		(Frobert et al. 1997; Morel und Massoulie 1997)
<i>P. pastoris</i>	Rattenhirn	20-30 U/mL		(Frobert et al. 1997; Morel und Massoulie 1997)
Baculovirus-System	Rattenhirn	23 U/mL		(Mionetto et al. 1997)
Baculovirus-System	<i>Drosophila melanogaster</i>	5-10 mg/L. (10 ⁶ cells) 25-49 U/mL	4900 (Villatte 2003)	(Chaabihi et al. 1994)
<i>P. pastoris</i>	human	8 U/mL	1400	(Vorlová 2002)
HEK 293	human	150 U/10 ⁶ cells	6000	(Kronman et al. 1992)
<i>E. coli</i>	human		2289	(Fischer et al. 1993)
Transgene Tomaten	human	0,1 U/mg Blätter	0,025 (Blätter) 0,25 (Früchte)	(Mor et al. 2001)

Die hier erhaltene Ausbeute übersteigt alle bislang beschriebenen Expressionsraten von Cholinesterasen um ein Vielfaches. Durch eine optimierte, an den Sauerstoffgehalt in der Lösung gekoppelte, Methanolfütterung und eine optimale Sauerstoffversorgung im Fermenter konnte die Expressionsrate verglichen mit den Ergebnissen im Schüttelkolben nochmals um einen Faktor 10 gesteigert werden. Dies erfüllt eine wichtige Voraussetzung für den technischen Einsatz von Biosensoren, nämlich die einfache Verfügbarkeit von ausreichend großen Mengen der Biokomponente. Mit dem hier beschriebenen System ist es möglich AChE im Gramm-Maßstab zu produzieren. Ein weiterer Vorteil von *Pichia pastoris* als Expressionssystem liegt in der einfachen Handhabbarkeit. Durch die Expression zusammen mit dem α -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*, der eine Sekretion des rekombinant gebildeten Proteins in den Kulturüberstand bewirkt, kann auf einen Zellaufschluss verzichtet werden. *Nippostrongylus brasiliensis* AChE konnte in dieser Form als Zellüberstand mehr als 12 Monate lang in Lösung bei 4°C ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Das Baculovirus-Insektenzellen Expressionssystem, mit dem *Torpedo californica*, Maus und *Drosophila melanogaster* AChE funktionell exprimiert wurden (Chaabihi et al. 1994; Radic et al. 1992), ist dem gegenüber sehr viel aufwendiger. Insbesondere ist die Kontaminationsgefahr bei diesem System sehr hoch. Die Expressionsraten lagen bei *Drosophila melanogaster* AChE mit 5-10 mg/L (10⁹ Zellen) um fast zwei Größenordnungen niedriger, als die der *Nippostrongylus brasiliensis* AChE in *Pichia pastoris* (600 mg/L). Der

Versuch von Chaabihi et al., die Ausbeute mit einem optimierten Baculovirus-System zu steigern, scheiterte (Chaabihi et al. 1994).

Villatte et al. zeigte, dass *Drosophila melanogaster* AChE gegenüber den meisten Organophosphaten und Carbamaten (15 von 19 getesteten) eine höhere Sensitivität zeigt als *Torpedo californica*-, *Caenorhabditis elegans*-, *Electrophorus electricus*- und Rinder-AChE (Villatte et al. 1998). Diese Eigenschaft macht *Drosophila melanogaster* AChE interessant für analytische Anwendungen. Die Schwierigkeiten bezüglich der Bereitstellung von ausreichend großen Mengen an Enzym müssen berücksichtigt werden (s.o.). Die Sensitivität von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE liegt in den meisten Fällen unter der von *Drosophila melanogaster* AChE, wie Tabelle 25 zeigt. In 8 von 11 Fällen zeigt *Nippostrongylus brasiliensis* AChE aber eine höhere Hemmkonstante als *Electrophorus electricus* AChE. Die Sensitivität liegt meistens im Bereich von humaner AChE. Diese relativ hohe Sensitivität gepaart mit der exzellenten Expressionsausbeute machen *Nippostrongylus brasiliensis* AChE zu einem geeigneten Kandidaten für Biosensor-Anwendungen.

Die für *Nippostrongylus brasiliensis* AChE erhaltenen k_i -Werte zeigen aber auch, dass das Ziel der Arbeit, den Pestizidgrenzwert für Säuglingsnahrung von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, zu kontrollieren, noch nicht für alle relevanten Organophosphate und Carbamate erreicht wurde. Abbildung 27 macht deutlich, dass Paraoxon mit Zitteraal AChE problemlos in diesem Konzentrationsbereich nachweisbar ist. Ein k_i -Wert von $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ist demnach ausreichend für die Kontrolle des Grenzwertes. Ziel dieser Arbeit war es, die Hemmkonstanten durch ortsspezifische Mutagenese auf einen Wert von 10^5 zu steigern. Sechs der 14 wichtigsten Organophosphate und Carbamate konnten bereits von der unveränderten Wildtyp *Nippostrongylus brasiliensis* AChE in diesem Konzentrationsbereich detektiert werden (Abbildung 70). Durch die Einführung von Einfachmutationen konnte die Sensitivität gegenüber zwei Organophosphaten und zwei Carbamaten über den erforderlichen Wert von 10^5 gesteigert werden. Bei Ethion, Methidathion und Pirimicarb bewirkte dies ein Aminosäureaustausch in der Acyltasche. Im Fall von Carbaryl wurde die Mutation in der Cholinbindestelle durchgeführt. Die insgesamt größte Sensitivitätssteigerung ergab sich gegenüber Omethoat. In diesem Fall vergrößerte sich der k_i -Wert um zwei Größenordnungen durch eine Mutation in der Acyltasche. Die Sensitivität gegenüber Omethoat liegt aber noch unter dem erforderlichen Wert. Die Sensitivität gegenüber den auch gegenüber anderen Cholinesterasen schwach hemmenden Carbamaten Ethiofencarb und Aldicarb konnte zwar gesteigert werden. Die erhaltenen Hemmkonstanten lagen aber noch eine Größenordnung unter dem Schwellenwert von 10^5 .

Tabelle 25: Vergleich der k_i -Werte (in $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) der *Nippostrongylus brasiliensis* AChE mit denen von AChE anderer Herkunft:

Insektizid	NbAChE	DmAChE	HuAChE	EeAChE
Omethoat	$5,2 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^3$
Pirimiphos-methyl ^a	$2,6 \cdot 10^5$			$2,3 \cdot 10^5$
Paraoxon	$1,0 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^5$
Paraoxon-methyl	$1,7 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$0,9 \cdot 10^5$
Ethion ^a	$3,0 \cdot 10^4$			
Methidathion ^a	$1,5 \cdot 10^4$		$0,9 \cdot 10^5$	$0,6 \cdot 10^6$
Chlorpyrifos ^a	$2,0 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^8$	$0,6 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^6$
Quinalphos ^a	$4,6 \cdot 10^6$			
Dichlorvos	$1,3 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^5$	$0,6 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^4$
Fenthion ^a	$< 10^2$			
Carbaryl	$3,1 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^4$
Pirimicarb	$5,7 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^3$
Ethiofencarb	$4,6 \cdot 10^3$		$4,9 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
Aldicarb	$8,0 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^4$

^a entsprechende Insektizide wurden vor der k_i -Wert Bestimmung chemisch in die Oxo-Form überführt. [(Charpentier et al. 2000; Herzsprung et al. 1989; Villatte et al. 1998)]

Ein Vergleich der erhaltenen Hemmmuster mit Daten von *Drosophila melanogaster* und humaner AChE zeigt ein uneinheitliches Bild. In einigen Fällen verhalten sich entsprechende Mutanten der unterschiedlichen Cholinesterasen sehr ähnlich, es gibt aber auch gravierende Unterschiede. Wobei die Datenlage in diesem Bereich sehr eingeschränkt ist. Mutationen der humanen AChE wurde nur mit drei Model-Organophosphaten getestet. Die einzige vergleichbare Studie wurde von der Arbeitsgruppe von Didier Fournier anhand von *Drosophila melanogaster* AChE durchgeführt. Mutationen im Bereich der peripheren anionischen Bindestelle (siehe Abbildung 88) führte bei *Drosophila melanogaster* AChE zu erheblichen Sensitivitätssteigerung. Der Austausch von Glutamat durch Tryptophan (DmE107(70)W) führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber den meisten getesteten Organophosphaten und Carbamaten. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede zu den erhaltenen Ergebnissen mit *Nippostrongylus brasiliensis* AChE, wie in Tabelle 26 dargestellt ist.

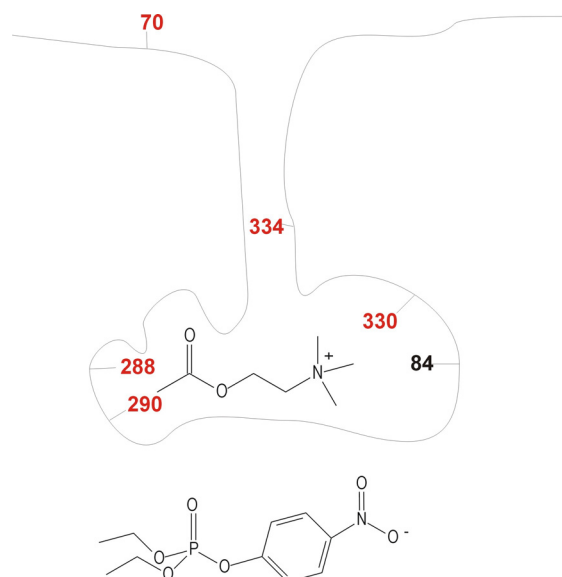


Abbildung 88: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von AChE mit Acetylcholin bzw. Paraoxon. Rot markiert sind die Positionen, an denen Mutationen in die AChE-Struktur eingeführt wurden. Dazu zählen Position 70 als Bestandteil der peripheren anionischen Bindestelle; 288 und 290 (Acyltasche), 330 (Cholinbindestelle) und Rest 334, der im Bereich des Substratzugangskanals liegt.

Tabelle 26: Effekt von Mutationen in der peripheren anionischen Bindestelle bei *Nippostrongylus brasiliensis* und *Drosophila melanogaster* AChE ($k_{i\text{Mutante}} / k_{i\text{WT}}$)

	NbT65(70)Y	DmE107(70)Y-Y109(72)D	DmE107(70)Y ^a
Omethoat	1,3	~ 10 ^b	~ 50 ^b
Paraoxon	1,5	~ 4 ^b	3,7 ^a
Paraoxon-methyl	1,4		2,9 ^a
Dichlorvos	2,7	300 ^b	
Carbaryl	0,9	~ 4 ^b	2,2 ^a
Pirimicarb	2,2		3,1 ^a

^a [Villatte et al. 2000], ^b [Boublik et al. 2002]

NbT65(70)Y, das in der Aminosäurenabfolge der Doppelmutante DmE107(70)Y-Y109(72)D entspricht, zeigt eine nur schwach erhöhte Sensitivität gegenüber Dichlorvos, wohingegen die Doppelmutante von *Drosophila melanogaster* AChE eine 300-fach erhöhte Hemmkonstante aufwies. DmE107(70)Y-Y109(72)D zeigte auch gegenüber Omethoat, Paraoxon und Carbaryl einen erhöhten k_i -Wert. Die entsprechende Mutation in *Nippostrongylus brasiliensis* AChE bewirkte nahezu keine Änderung in der Reaktivität gegenüber den getesteten Organophosphaten und Carbamaten.

Alanin an Position 288 in der Acyltasche führte bei *Nippostrongylus brasiliensis* AChE zu erheblichen Sensitivitätssteigerungen gegenüber Methoxy-Organophosphaten. Die Hemmkonstante von Paraoxon, einem Ethoxy-Organophosphat, war quasi unverändert (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Effekt von Mutationen an Position 288 in der Acyltasche ($k_{i\text{Mutante}} / k_{i\text{WT}}$)

	NbM301(288)A	HuF295(288)A ^a	DmL366(288)A ^b
Omethoat	108		~ 0,3
Paraoxon	1,4	18,6	~ 1,5
Paraoxon-methyl	8,9		
Carbaryl	0,8		~ 0,2

^a [Ordentlich et al. 1996], ^b [Boublik et al. 2002]

Alanin an dieser Position in humaner AChE bewirkte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Paraoxon. Informationen über das Verhalten von HuF295(288)A gegenüber Methoxy-Organophosphaten stehen nicht zur Verfügung. Alanin an entsprechender Position in *Drosophila melanogaster* AChE führte im Gegensatz zu der stark erhöhten Sensitivität von NbM301(288)A zu einer Resistenz gegenüber Omethoat.

Mutationen an Position 290, dem zweiten die Acyltasche begrenzenden Rest, bewirkten in den allermeisten Fällen eine Resistenz (siehe Tabelle 28). Das Phenylalanin bzw. Tryptophan scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung des Übergangszustandes zu haben. Die Ausnahme bildete dabei Pirimiphos-methyl. Der Austausch von Tryptophan gegen Glycin, Alanin oder Leucin führten jeweils zu einer deutlich erhöhten Sensitivität der *Nippostrongylus brasiliensis* AChE. Die drei *Nippostrongylus brasiliensis* AChE-Mutanten zeichnen sich demnach durch eine hohe Selektivität gegenüber Pirimiphos-methyl aus.

Tabelle 28: Effekt von Mutationen an Position 290 in der Acyltasche ($k_{i\text{Mutante}} / k_{i\text{WT}}$)

	NbW303 (290)G	DmF368 (290)G ^a	NbW303 (290)A	HuF297 (290)A ^b	NbW303 (290)L	DmF368 (290)L ^a
Paraoxon	0,3	0,3	0,4	0,7	0,7	2,3
Paraoxon-methyl	0,1	0,3	0,1		0,4	4,3
Pirimiphos-methyl	95,3		101,6		39,9	
Carbofuran	0,1	0,2	0,1		0,1	0,1
Pirimicarb	0,3	0,003	0,4		0,4	1,3
Carbaryl	0,4	0,03	0,5		0,3	0,1

^a [Villatte et al. 2000], ^b [Ordentlich et al. 1996]

Mutationen in der Cholinbindestelle führten neben denen in der peripheren anionischen Bindestelle bei *Drosophila melanogaster* AChE zu den sensitivsten Enzymen. DmY408(330)F zeichnete sich durch eine besonders hohe Sensitivität aus (Villatte et al. 1998). Die quasi umgekehrte Mutation von Phenylalanin zu Tyrosin (NbF345(330)Y) führte bei *Nippostrongylus brasiliensis* AChE zu einer starken Resistenz gegenüber allen Carbamaten und den meisten Organophosphaten. Alanin in dieser Position führte bei beiden Cholinesterasen zu einem sehr ähnlichen Sensitivitätsprofil. Sowohl NbF345(330)A als auch DmY408(330)A zeigen einen erhöhten k_i -Wert gegenüber Carbaryl (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Effekt von Mutationen in der Cholinbindestelle ($k_{i\text{Mutante}} / k_{i\text{WT}}$)

	NbF345(330)A	HuF337(330)A ^a	DmY408(330)A ^b
Paraoxon	0,3	0,1	0,8
Paraoxon-methyl	0,9		1
Pirimicarb	0,2		0,4
Carbaryl	3,8		3,5

^a [Ordentlich et al. 1996], ^b [Villatte et al. 2000]

Mutationen innerhalb des schmalen Zugangs zum aktiven Zentrum von *Nippostrongylus brasiliensis* AChE zeigen, dass relativ kleine Größenunterschiede bei den eingeführten

Aminosäuren zu einem deutlich veränderten Sensitivitätsprofil führten. Y349(334)G zeigte eine erhöhte Sensitivität gegen die Methoxy-Verbindungen Pirimiphos-methyl und Paraoxon-methyl, bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber Paraoxon. Der Austausch von Tyrosin gegen das etwas größere Leucin kehrte dieses Verhalten ins Gegenteil um. Y349(334)L führte zu einer größeren Sensitivität gegenüber Paraoxon. Im Falle der *Drosophila melanogaster* AChE führte der Austausch von Tyrosin gegen Alanin zu einer gesteigerten Sensitivität sowohl gegenüber Paraoxon-methyl als auch Paraoxon-ethyl (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Effekt von Mutationen im Substratzugangsbereich ($k_{i\text{Mutante}} / k_{i\text{WT}}$)

	NbF349(334)G	NbF349(334)L	DmY412(334)A ^a
Paraoxon	0,8	4,3	4
Paraoxon-methyl	4,3	0,8	10
Pirimicarb	0,3	0,4	0,7
Carbaryl	1,3	1	5

^a [Villatte et al. 2000]

Der Vergleich mit *Drosophila melanogaster* AChE-Mutanten zeigt, dass genaue Vorhersagen über die Auswirkung bestimmter Mutationen auf die Enzymeigenschaft in den meisten Fällen nicht möglich sind. Es zeigten sich aber dennoch gewisse Ähnlichkeiten besonders bei Mutationen im Bereich der Cholinbindestelle und des Zugangs zum aktiven Zentrum. Die größten Unterschiede ergaben sich bei Mutationen im Bereich der Acyltasche und der peripheren anionischen Bindestelle.

Der Einsatz ausgewählter Mutanten in Form eines Multienzymsensors verdeutlichen den Nutzen des Protein-Designs für die Analytik von Neurotoxinen. Die Ergebnisse der Biosensor-Messungen bestätigten das nach den k_i -Werten erwartete Verhalten. Mit M301(288)A war es möglich, im Vergleich mit dem Wildtyp zwei Größenordnungen niedrigere Omethoat-Konzentrationen zu detektieren. Dadurch war es möglich, Omethoat-Konzentrationen im Bereich des Pestizidgrenzwertes von Säuglingsnahrung nachzuweisen. Mit dem Wildtyp-Enzym konnten nur Konzentrationen von mehr als 1 mg/L detektiert werden. Pirimiphos-methyl zeigt eine wesentlich höhere Affinität gegen *Nippostrongylus brasiliensis* AChE als Omethoat. Durch die Biosensor-Messungen konnte die Annahme bestätigt werden, dass die Kontrolle des Pestizidgrenzwertes von 10 µg/kg mit einem k_i -Wert von $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ möglich ist. Mit M301(288)A und W303(290)G konnten sogar noch Konzentrationen von 0,1 µg/L bzw. 0,3 nmol/L nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die extrem hohe Sensitivität von AChE-Biosensoren für bestimmte Organophosphate und Carbamate. Bestimmte Organophosphate und Carbamate können durch den Einsatz von AChE-Mutanten im Femtomol-Bereich nachgewiesen werden. Derart niedrige Konzentrationen können mit herkömmlichen Analyseverfahren nicht erreicht werden. Es gibt aber nach wie vor noch einige Organophosphate und Carbamate mit niedrigen k_i -Werten, die nicht in dem erforderlichen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden können. Hier könnten möglicherweise weitere AChE-Mutanten oder auch Kombinationen aus sensitiven Einzelmutanten Abhilfe schaffen.

6.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß die Analyse von Lebensmittelproben mit der notwendigen Sensitivität möglich ist. Eine weitere Vereinfachung durch Integration des Probenvorbereitungsschrittes ist in Arbeit. Es wurde gezeigt, dass P450 BM-3 in einem Sol-Gel-Verfahren funktionell immobilisiert werden kann (Huber 2002; Maurer et al. 2003). Weitere Aktivitäten sind diesbezüglich im Gange (Waibel 2003).

Die Herstellung von spezifischen Mutanten der AChE soll in einem weiterführenden Ansatz für die Entwicklung von Protein-Chips eingesetzt werden. Arbeiten von Bachmann et al. zeigten, dass es durch Kombination von AChE-Mutanten, die sich in ihrem Sensitivitätsprofil unterscheiden, möglich ist, stoffspezifische Informationen zu erhalten (Bachmann et al. 2000; Bachmann und Schmid 1999). Bei einer Kombination von vier Mutanten war es möglich, Zweistoffgemische zu untersuchen. Auf dem Protein-Chip soll die Zahl der Mutanten um ein Vielfaches erhöht werden. Zu diesem Zweck werden weitere AChE-Mutanten generiert (Münch 2003).

Literatur

- Abad, J.M., Pariente, F., Hernandez, L., Abruna, H.D., Lorenzo, E., 1998. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using piezoelectric biosensors. *Analytical Chemistry* 70, 2848-2855.
- Albareda-Sirvent, M., Merkoci, A., Alegret, S., 2001a. Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology. *Analytica Chimica Acta* 442, 35-44.
- Albareda-Sirvent, M., Merkoci, A., Alegret, S., 2001b. Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite-epoxy composite and biocomposite pastes. *Sensors and Actuators B-Chemical* 79, 48-57.
- Aldridge, W.N., 1950. Some properties of specific acetylcholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochemical Journal* 46, 451-456.
- Anastassiades, M., Scherbaum, E., 1997. Multimethode zur Bestimmung von Pflanzenschutz- und Oberflächenbehandlungsmittel-Rückständen in Zitrusfrüchten mittels GC-MSD; Teil 1: Theoretische Grundlagen und Methodenentwicklung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 10, 316-27.
- Andreescu, S., Avramescu, A., Bala, C., Magearu, V., Marty, J.L., 2002a. Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase - comparative study of two enzyme sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 374, 39-45.
- Andreescu, S., Noguer, T., Magearu, V., Marty, J.L., 2002b. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. *Talanta* 57, 169-176.
- Appel, D., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schwaneberg, U., Schmid, R.D., 2001. A P450 BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes. *J. Biotechnol.* 88, 167-171.
- Argauer, R.J., Brown, R.T., 1994. Detection of Carbofuran and Other Carbamates Using Cholinesterase Inhibition with N-Methylindoxyl Acetate As Substrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1920-1924.
- Arpagaus, M., Fedon, Y., Cousin, X., Chatonnet, A., Berge, J.B., Fournier, D., Toutant, J.P., 1994. Cdna Sequence, Gene Structure, and In-Vitro Expression of Ace-1, the Gene Encoding Acetylcholinesterase of Class-A in the Nematode *Caenorhabditis-Elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 9957-9965.
- Bachmann, T.T., Leca, B., Villatte, F., Marty, J.-L., Fournier, D., Schmid, R.D., 2000. Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multiresidue biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosensors & Bioelectronics* 15, 193-201.
- Bachmann, T.T., Schmid, R.D., 1999. A disposable, multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution. *Analytica Chimica Acta* 401, 95-103.

- Bar-On, P., Millard, C.B., Harel, M., Dvir, H., Enz, A., Sussman, J.L., Silman, I., 2002. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* 41, 3555-3564.
- Barber, D., Correll, L., Ehrich, M., 1999. Comparison of two in vitro activation systems for protoxicant organophosphorous esterase inhibitors. *Toxicol. Sci.* 47, 16-22.
- Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., Sternberg, M.J., 2001. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins Suppl* 5, 39-46.
- Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M., Palleschi, G., 1991. Determination of Organophosphorus and Carbamic Pesticides with A Choline and Acetylcholine Electrochemical Biosensor. *Analytical Letters* 24, 1317-1331.
- Bertonati, C., Marta, M., Patamia, M., Colella, A., Pomponi, M., 2000. Inhibition of AChE: Structure-activity relationship among conformational transition of Trp84 and bimolecular rate constant. *Journal of Enzyme Inhibition* 15, 547-556.
- Boddupalli, S.S., Estabrook, R.W., Peterson, J.A., 1990. Fatty acid monooxygenation by cytochrome P-450BM-3. *J. Biol. Chem.* 265, 4233-4239.
- Boublik, Y., Saint-Aguet, P., Lougarre, A., Arnaud, M., Villatte, F., Estrada-Mondaca, S., Fournier, D., 2002. Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Engineering* 15, 43-50.
- Bourne, Y., Grassi, J., Bougis, P.E., Marchot, P., 1999a. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography. *Journal of Biological Chemistry* 274, 30370-30376.
- Bourne, Y., Taylor, P., Bougis, P.E., Marchot, P., 1999b. Crystal structure of mouse acetylcholinesterase - A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly. *Journal of Biological Chemistry* 274, 2963-2970.
- Bourne, Y., Taylor, P., Marchot, P., 1995. Acetylcholinesterase Inhibition by Fasciculin - Crystal-Structure of the Complex. *Cell* 83, 503-512.
- Bunk, S., 2002. Sensing evil. *Scientist* 16, 13-14.
- Cagnini, A., Palchetti, I., Lioni, I., Mascini, M., Turner, A.P.F., 1995. Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticide monitoring. *Sensors and Actuators B* 24-25, 85-89.
- Campanella, L., Achilli, M., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., 1991. Butyrylcholine Enzyme Sensor for Determining Organophosphorus Inhibitors. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 26, 237-249.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? *Annual Review of Entomology* 43, 1-16.
- Chaabihi, H., Fournier, D., Fedon, Y., Bossy, J.P., Ravallec, M., Devauchelle, G., Cerutti, M., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase expressed by recombinant baculoviruses. *Biochemical and biophysical research communications* 203, 734-742.

- Chambers,H.W., 1992a. Organophosphorus Compounds: An Overview. In: Chambers,J.E., Levi,P.E. (Eds.), Organophosphates. Academic Press, San Diego.
- Chambers,J.E., 1992b. The Role of Target Site Activation of Phosphorothionates in Acute Toxicity. In: Chambers,J.E., Levi,P.E. (Eds.), Organophosphates. Academic Press, San Diego.
- Chambers,J.E., Levi,P.E., 1992. Organophosphates - Chemistry, Fate, and Effects. Academic Press, San Diego, California.
- Charpentier,A., Menozzi,P., Marcel,V., Villatte,F., Fournier,D., 2000. A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Anal. Biochem.* 285, 76-81.
- Choi,J.W., Kim,Y.K., Lee,I.H., Min,J., Lee,W.H., 2001. Optical organophosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase/viologen hetero Langmuir-Blodgett film. *Biosens. Bioelectron.* 16, 937-943.
- Ciucu,A.A., Negulescu,C., Baldwin,R.P., 2003. Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferrophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosens. Bioelectron.* 18, 303-310.
- Cousin,X., Hotelier,T., Giles,K., Lievin,P., Toutant,J.P., Chatonnet,A., 1997. The alpha/beta fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. *Nucleic Acids Research* 25, 143-146.
- Danet,A.F., Badea,M., Marty,J.L., Aboul-Enein,H.Y., 2000. Flow analysis for determination of paraoxon with use of immobilized acetylcholinesterase reactor and new type of chemiluminescent reaction. *Biopolymers* 57, 37-42.
- Debruijn,J., Hermens,J., 1993. Inhibition of Acetylcholinesterase and Acute Toxicity of Organophosphorous Compounds to Fish - A Preliminary Structure-Activity Analysis. *Aquatic Toxicology* 24, 257-274.
- Dencker,L., Ericsson,P., 1998. Susceptibility in utero and upon neonatal exposure. *Food Additives and Contaminants* 15 (suppl), 37-43.
- DeSantis,G. Database on pesticide consumption. 2003.
Ref Type: Personal Communication
- Devic,E., Li,D., Dauta,A., Henriksen,P., Codd,G.A., Marty,J.L., Fournier,D., 2002. Detection of anatoxin-a(s) in environmental samples of cyanobacteria by using a biosensor with engineered acetylcholinesterases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4102-4106.
- DIN38415-1, 1995. Suborganische Testverfahren (Gruppe T), Teil 1: Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden. Deutsche Norm.
- Donaldson,D., Kiely,T., Grube,A. Pesticides - 1998-1999 Pesticide Market Estimates. U.S.Environmental Protection Agency. 2002.
Ref Type: Report
- EC, 1997. Council Directive 97/57/EC of Sept 22, 1997 establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities* L265, 87-109.

- EC, 1999. Commission Directive 1999/50/EC of 25 May 1999 amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow-on formulae. Official Journal of the European Communities L 139, 29-31.
- EC, 2000. Official Journal of the European Communities L244, 76.
- Ellman,G.L., Courtney,K.D., Andres,V., Featherstone,R.M., 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7, 88-92.
- Evtugyn,G.A., Budnikov,H.C., Nikolskaya,E.B., 1996. Influence of surface-active compounds on the response and sensitivity of cholinesterase biosensors for inhibitor determination. *Analyst* 121, 1911-1915.
- Evtugyn,G.A., Ivanov,A.N., Gogol,E.V., Marty,J.-L., Budnikov,H.C., 1999. Amperometric flow-injection biosensor for the determination of cholinesterase inhibitors. *Analytica Chimica Acta* 385, 13-21.
- FAOSTAT. Database on Pesticide Consumption. 2003. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Analysis Service.
Ref Type: Report
- Fedosseeva,O.V., Uchida,H., Katsube,T., Ishimaru,Y., Iida,T., 2000. Novel type cholinesterase sensor based on SPV measurement technique. *Sensors and Actuators B-Chemical* 65, 55-57.
- Fischer,M., Ittah,A., Liefer,I., Gorecki,M., 1993. Expression and reconstitution of biologically active human acetylcholinesterase from *Escherichia coli*. *Cell Mol Neurobiol* 13, 25-38.
- Fournier,D., Bride,J.M., Hoffmann,F., Karch,F., 1992. Acetylcholinesterase - 2 Types of Modifications Confer Resistance to Insecticide. *Journal of Biological Chemistry* 267, 14270-14274.
- FQPA, 1996. The Food Quality Protection Act. US Pub. L. 104-170.
- Fremaux,I., Mazeret,S., Brisson-Lougarre,A., Arnaud,M., Ladurantie,C., Fournier,D., 2002. Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC. Biochem.* 3, 21.
- Frobert,Y., Creminon,C., Cousin,X., Remy,M.H., Chatel,J.M., Bon,S., Bon,C., Grassi,J., 1997. Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1339, 253-267.
- Fukuto,T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 87, 245-254.
- Fulco,A.J., 1991. P450BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 177-203.
- Gäberlein,S., Knoll,M., Spener,F., Zaborosch,C., 2000. Disposable potentiometric enzyme sensor for direct determination of organophosphorus insecticides. *Analyst* 125, 2274-2279.

- Ghindilis,A.L., Morzunova,H.C., Barmin,A.V., Kurochkin,I.N., 1996. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. *Biosensors & Bioelectronics* 11, 837-880.
- Gibney,G., Camp,S., Dionne,M., MacPhee-Quigley,K., Taylor,P. Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87[19], 7546-7550. 1990.
- Gnagey,A.L., Forte,M., Rosenberry,T.L., 1987. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 262, 13290-13298.
- Gnatt,A., Loewenstein,Y., Yaron,A., Schwarz,M., Soreq,H., 1994. Site-Directed Mutagenesis of Active-Site Residues Reveals Plasticity of Human Butyrylcholinesterase in Substrate and Inhibitor Interactions. *Journal of Neurochemistry* 62, 749-755.
- Gogol,E.V., Evtugyn,G.A., Marty,J.L., Budnikov,H.C., Winter,V.G., 2000. Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors. *Talanta* 53, 379-389.
- Grauso,M., Culetto,E., Combes,D., Fedon,Y., Toutant,J.P., Arpagaus,M., 1998. Existence of four acetylcholinesterase genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *FEBS Letters* 424, 279-284.
- Guengerich,F.P., 1991. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* 266, 10019-10022.
- Guerrieri,A., Monaci,L., Quinto,M., Palmisano,F., 2002. A disposable amperometric biosensor for rapid screening of anticholinesterase activity in soil extracts. *Analyst* 127, 5-7.
- Guerrieri,A., Palmisano,F., 2001. An acetylcholinesterase/choline oxidase-based amperometric biosensors as a liquid chromatography detector for acetylcholine and choline determination in brain tissue homogenates. *Anal. Chem.* 73, 2875-2882.
- Guex,N., Peitsch,M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Guilbault,G.G., Ngeh-Ngwainbi,J., 1988. Analytical uses of immobilized biological compounds for detection, medical and industrial uses. Reidel, Dordrecht, The Netherlands.
- Gulla,K.C., Gouda,M.D., Thakur,M.S., Karanth,N.G., 2002. Reactivation of immobilized acetyl cholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. *Biochim. Biophys. Acta* 1597, 133-139.
- Günther,A., Bilitewski,U., 1995. Characterisation of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system. *Analytica Chimica Acta* 300, 117-125.
- Hall,J.C., Kankel,D.R., 1976. Genetics of Acetylcholinesterase in *Drosophila-Melanogaster*. *Genetics* 83, 517-535.
- Harel,M., Kryger,G., Rosenberry,T.L., Mallender,T.L., Fletcher,R.J., Guss,J.M., Silman,I., Sussman,J.L., 2000a. Three-dimensional structure of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*

9, 1063-1072.

Harel,M., Sussman,J.L., Krejci,E., Bon,S., Chanal,P., Massoulie,J., Silman,I., 1992. Conversion of Acetylcholinesterase to Butyrylcholinesterase - Modeling and Mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10827-10831.

Harel,M., Weik,M., Silman,I., Sussman,J.L. Native Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) From Torpedo Californica At 1.8A Resolution. 2000b.

Ref Type: Unpublished Work

Hart,A.L., Collier,W.A., Janssen,D., 1997. The response of screen-printed enzyme electrodes containing cholinesterases to organophosphates in solution and from commercial formulations. *Biosensors & Bioelectronics* 12, 645-654.

Hernandez,J., Robledo,N.R., Velasco,L., Quintero,R., Pickard,M.A., Vazquez-Duhalt,R., 1998. Chloroperoxidase-Mediated Oxidation of Organophosphorus Pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 61, 87-94.

Herzsprung,P. Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung. 1991. Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Herzsprung,P., Weil,L., Quentin,K., 1989. Bestimmung von Phosphorpestiziden und insektiziden Carbamaten mittels Cholinesterasehemmung; Mitt. 1: Hemmwirkung von Phosphorpestiziden und insektiziden Carbamaten auf immobilisierte Cholinesterase. *Zeitschrift Wasser-Abwasser-Forschung* 22, 67-72.

Hobbiger,F., Sadler,P.W., 1958. Protection by Oximes of Bis-Pyridinium Ions Against Lethal Diisopropyl Phosphonofluoridate Poisoning. *Nature* 182, 1672-1673.

Hodgson,E., Rose,R.L., Ryu,D.Y., Falls,G., Blake,B.L., Levi,P.E., 1995. Pesticide-metabolizing enzymes. *Toxicol. Lett.* 82-83, 73-81.

Huang,Z., Villarta-Snow,R., Lubrano,G.J., Guilbault,G.G., 1993. Development of Choline and Acetylcholine Pt Microelectrodes. *Analytical Biochemistry* 215, 31-37.

Huber,N. Untersuchungen zum Einsatz von P450 Monooxygenasen in Bienzym-Biosensoren zur Detektion von Neurotoxinen in Kindernahrung. 2002. Insitute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart.

Ref Type: Thesis/M.S.

Hussein,A., Harel,M., Selkirk,M., 2002. A distinct family of acetylcholinesterases is secreted by *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 123, 125.

Hussein,A.S., Chacon,M.R., Smith,A.M., Tosado-Acevedo,R., Selkirk,M.E., 1999. Cloning, Expression, and Properties of a Nonneuronal Secreted Acetylcholinesterase from the Parasitic Nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 9312-9319.

Jeanty,G., Ghommidh,C., Marty,J.L., 2001. Automated detection of chlorpyrifos and its metabolites by a continuous flow system-based enzyme sensor. *Analytica Chimica Acta* 436, 119-128.

- Jeanty,G., Marty,J.-L., 1997. Detection of paraoxon by continuous flow system based enzyme sensor. *Biosensors & Bioelectronics* 13, 213-218.
- Jeanty,G., Wojciechowska,A., Marty,J.L., Trojanowicz,M., 2002. Flow-injection amperometric determination of pesticides on the basis of their inhibition of immobilized acetylcholinesterases of different origin. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 691-695.
- Jeyaratnam,J., 1990. Pesticides poisoning: as a major global health problem. *World Health Statistics Quarterly* 43, 139-44.
- Jokanovic,M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139-160.
- Kaplan,D., Ordentlich,A., Barak,D., Ariel,N., Kronman,C., Velan,B., Shafferman,A., 2001. Does "Butyrylization" of Acetylcholinesterase through Substitution of the Six Divergent Aromatic Amino Acids in the Active Center Gorge Generate an Enzyme Mimic of Butyrylcholinesterase? *Biochemistry* 40, 7433-7445.
- Karalliedde,L., 1999. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. *Anaesthesia* 54, 1073-88.
- Kennedy,S.W., 1991. The mechanism of organophosphate inhibition. In: Mineau,P. (Ed.), *Cholinesterase-inhibiting insecticides*. Elsevier, Amsterdam, pp. 77-80.
- Kindervater,R., Künnecke,W., Schmid,R.D., 1990. Exchnageable immobilized enzyme reactor for enzyme inhibition tests in flow-injection analysis using a magnetic device. Determination of pesticides in drinking water. *Analytica Chimica Acta* 234, 113-117.
- Kok,F.N., Bozoglu,F., Hasirci,V., 2002. Construction of an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor for aldicarb determination. *Biosens. Bioelectron.* 17, 531-539.
- Koletzko,B., Aggett,P.J., Agostoni,C., Baerlocher,K., Bresson,J.L., Cooke,R.J., Decsi,T., Deutsch,J., Janda,J., Manz,F., Moya,M., Rigo,J., Socha,J., 1999. Pesticides in dietary foods for infants and young children. Report of the Working Group on Pesticides in Baby Foods of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). *Archives of Disease in Childhood* 80, 91-92.
- Kress-Rogers,E., 1997. *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and the environment*. CRC Press, Boca Raton.
- Kronman,C., Velan,B., Gozes,Y., Leitner,M., Flashner,Y., Lazar,A., Marcus,D., Sery,T., Papier,Y., Grosfeld,H., et al., 1992. Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene* 121, 295-304.
- Kryger,G., Harel,M., Giles,K., Toker,L., Velan,B., Lazar,A., Kronman,C., Barak,D., Ariel,N., Shafferman,A., Silman,I., Sussman,J.L., 2000. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 56, 1385-1394.
- Kulys,J., D'Costa,E.J., 1990. Printed Amperometric Sensor Based on TCNQ and Cholinesterase. *Biosensors & Bioelectronics* 6, 109-115.

- Kulys, J., Schmid, R.D., 1991. Bienenzyme Sensoren Basierend auf Chemisch Modifizierten Elektroden. *Biosensors & Bioelectronics* 6, 43-48.
- Kumaran, S., Tran-Minh, C., 1992. Determination of Organophosphorous and Carbamate Insecticides by Flow Injection Analysis. *Analytical Biochemistry* 200, 187-194.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., KlaerrBlanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., Danchin, A., 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Larsen, J.C., Pascal, G., 1998. Workshop on the applicability of the ADI to infants and children: consensus summary. *Food Additives and Contaminants* 15 (suppl), 1-9.
- Lee, H.S., Kim, Y.A., Cho, Y.A., Lee, Y.T., 2002. Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere* 46, 571-576.
- Lee, H.S., Kim, Y.A., Chung, D.H., Lee, Y.T., 2001. Determination of carbamate pesticides by a cholinesterase-based flow injection biosensor. *International Journal of Food Science and Technology* 36, 263-269.
- Levi, P.E., Hodgson, E., 1985. Oxidation of pesticides by purified cytochrome P-450 isozymes from mouse liver. *Toxicol. Lett.* 24, 221-228.
- Li, H., Poulos, T.L., 1997. The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat. Struct. Biol.* 4, 140-146.
- Li, Q.S., Ogawa, J., Schmid, R.D., Shimizu, S., 2001a. Residue size at position 87 of cytochrome P450BM-3 determines its stereoselectivity in propylbenzene and 3-chlorostyrene oxidation. *FEBS Letters* 508, 249-252.
- Li, Q.S., Schwaneberg, U., Fischer, M., Schmitt, J., Pleiss, J., Lutz-Wahl, S., Schmid, R.D., 2001b. Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant. *Biochim. Biophys. Acta* 1545, 114-121.

- Li, Q.S., Schwaneberg, U., Fischer, P., Schmid, R.D., 2000. Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry - a European Journal* 6, 1531-1536.
- Ligler, F.S., 2002. *Optical Biosensors: Present and Future*. Elsevier Science, Amsterdam.
- MacPhee-Quigley, K., Taylor, P., Taylor, S., 1985. Primary Structures of the Catalytic Subunits from 2 Molecular-Forms of Acetylcholinesterase - A Comparison of N_h2-Terminal and Active-Center Sequences. *Journal of Biological Chemistry* 260, 2185-2189.
- Martinez, C.R., Gonzales, R.E., Moran, A.M.J., Mendez, H.J., 1992. Sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and surface waters by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 607, 37-45.
- Marty, J.L., Sode, K., Karube, I., 1992. Biosensor for Detection of Organophosphate and Carbamate Insecticides. *Electroanalysis* 4, 249-252.
- Marx, S., Kaushansky, N., Gratziany, N., Barness, I., Liron, Z., 2001. Acoustic and optical transduction of BuChE binding to procainamide modified surfaces. *Biosens. Bioelectron.* 16, 239-244.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. *Progress in Neurobiology* 41, 31-91.
- Maurer, S.C., Schulze, H., Schmid, R.D., Urlacher, V. Immobilisation of P450 BM-3 and a Cofactor Regenerating Enzyme: A highly stable solid Hydroxylation Biocatalyst. *Advanced Synthesis and Catalysis* . 2003.
- Ref Type: In Press
- Minning, S., Serrano, A., Ferrer, P., Sola, C., Schmid, R.D., Valero, F., 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 86, 59-70.
- Mionetto, N., Morel, N., Massoulie, J., Schmid, R.D., 1997. Biochemical determination of insecticides via cholinesterases. 1. Acetylcholinesterase from rat brain: functional expression using a baculovirus system, and biochemical characterization. *Biotechnol. Tech.* 11, 805-812.
- Mionetto, N., Rouillon, R., Marty, J.L., 1992. Inhibition of Acetylcholinesterase by Organophosphorus and Carbamates Compounds - Studies on Free and Immobilized Enzymes. *Zeitschrift fur Wasser- und Abwasser-Forschung-Journal for Water and Wastewater Research-Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 171-174.
- Mizutani, F., Tsuda, K., 1982. Amperometric Determination of Cholinesterase with Use of An Immobilized Enzyme Electrode. *Analytica Chimica Acta* 139, 359-362.
- Montesinos, T., Perez-Munguia, S., Marty, J.-L., Mitsubayashi, K., 2000. Screen-printed electrodes, with genetically modified cholinesterase, for detection of pesticides in water-miscible organic solvent. *Journal of Advanced Science* 12, 217-222.
- Mor, T.S., Sternfeld, M., Soreq, H., Arntzen, C.J., Mason, H.S., 2001. Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants. *Biotechnol Bioeng* 75, 259-66.

- Moralev, S.N., Rozengart, E.V., 1999. Current concepts of structure and catalytic properties of vertebrate and invertebrate cholinesterases. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 35, 1-18.
- Morel, N., Massoulie, J., 1997. Expression and processing of vertebrate acetylcholinesterase in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical Journal* 328, 121-129.
- Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J., Rogers, K.R., 2001. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosens. Bioelectron.* 16, 225-230.
- Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W., 1999a. Amperometric Thick-Film Strip Electrodes for Monitoring Organophosphate Nerve Agents Based on Immobilized Organophosphorus Hydrolase. *Analytical Chemistry* 71, 2246-2249.
- Mulchandani, P., Mulchandani, A., Kaneva, I., Chen, W., 1999b. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode. *Biosensors & Bioelectronics* 14, 77-85.
- Münch, S. Multienzyme biosensors for food monitoring: Improving sensitivity by protein engineering of acetylcholinesterase. 2003. Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart.
Ref Type: Thesis/M.S.
- Nakayama, N., Takemae, A., Shoun, H., 1996. Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biochemistry* 119, 435-440.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J., 1986. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 261, 7160-7169.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J., 1987. Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 262, 6683-6690.
- Neufeld, T., Eshkenazi, I., Cohen, E., Rishpon, J., 2000. A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides. *Biosensors & Bioelectronics* 15, 323-329.
- Noble, M.A., Miles, C.S., Chapman, S.K., Lysek, D.A., Mackay, A.C., Reid, G.A., Hanzlik, R.P., Munro, A.W., 1999. Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochemical Journal* 339, 371-379.
- Nunes, G.S., Barcelo, D., Grabaric, B.S., Diaz-Cruz, J.M., Ribeiro, M.L., 1999. Evaluation of highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. *Analytica Chimica Acta* 399, 37-49.
- Nunes, G.S., Skladal, P., Yamanaka, H., Barcelo, D., 1998. Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques. *Analytica Chimica Acta* 362, 59-68.

- Oliver, C.F., Modi, S., Sutcliffe, M.J., Primrose, W.U., Lian, L.Y., Roberts, G.C., 1997. A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regioselectivity of hydroxylation. *Biochemistry* 36, 1567-1572.
- Omura, T.I., Sato, R.J., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 94, 2370-2378.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B., Shafferman, A., 1995. Contribution of Aromatic Moieties of Tyrosine-133 and of the Anionic Subsite Tryptophan-86 to Catalytic Efficiency and Allosteric Modulation of Acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry* 270, 2082-2091.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B., Shafferman, A., 1998. Functional Characteristics of the Oxyanion Hole in Human Acetylcholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 19509-19517.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Segall, Y., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B., Shafferman, A., 1993. Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 17083-17095.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B., Shafferman, A. The architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 271[20], 11953-11962. 1996.
- Ostergard, G., Knudsen, I., 1998. The applicability of the ADI (acceptable daily intake) for food additives to infants and children. *Food Additives and Contaminants* 15 (suppl), 63-74.
- Palchetti, I., Cagnini, A., Carlo, M.D., Coppi, C., Mascini, M., Turner, A.P.F., 1997. Determination of pesticides in real samples using a disposable biosensor. *Analytica Chimica Acta* 337, 315-321.
- Pleiss, J., Mionetto, N., Schmid, R.D., 1997. Protein engineering of rat brain acetylcholinesterase: a point mutation enhances sensitivity to pesticides. *Protein Engineering* 10 (Suppl.), 66.
- Pleiss, J., Mionetto, N., Schmid, R.D., 1999. Probing the acyl binding site of acetylcholinesterase by protein engineering. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6, 287-296.
- Pogacnik, L., Franko, M., 1999b. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. *Biosensors & Bioelectronics* 14, 569-578.
- Pogacnik, L., Franko, M., 1999a. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. *Biosens. Bioelectron.* 14, 569-578.
- Pogacnik, L., Franko, M., 2003. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 18, 1-9.
- Pylypiw, H.M., 1993. Rapid Gas Chromatographic Method for the Multiresidue Screening of Fruits and Vegetables for Organochlorine and Organophosphate Pesticides. *Journal of AOAC International* 76, 1369-1373.

- Radic,Z., Gibney,G., Kawamoto,S., MacPhee-Quigley,K., Bongiorno,C., Taylor,P., 1992. Expression of recombinant acetylcholinesterase in a baculovirus system: kinetic properties of glutamate 199 mutants. *Biochemistry* 31, 9760-7.
- Radic,Z., Pickering,N.A., Vellom,D.C., Camp,S., Taylor,P., 1993. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* 32, 12074-12084.
- Rampa,A., Piazzini,L., Belluti,F., Gobbi,S., Bisi,A., Bartolini,M., Andrisano,V., Cavrini,V., Cavalli,A., Recanatini,M., Valenti,P., 2001. Acetylcholinesterase inhibitors: SAR and kinetic studies on omega-[N-methyl-N-(3-alkylcarbamoyloxyphenyl)methyl]aminoalkoxyaryl derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 44, 3810-3820.
- Ravichandran,K.G., Boddupalli,S.S., Hasemann,C.A., Peterson,J.A., Deisenhofer,J., 1993. Crystal-Structure of Hemoprotein Domain of P450Bm-3, A Prototype for Microsomal P450S. *Science* 261, 731-736.
- Roberts,G.C., 1999. The power of evolution: accessing the synthetic potential of P450s. *Chem. Biol.* 6, R269-R272.
- Roda,A., Rauch,P., Ferri,E., Girotti,S., Ghini,S., Carrea,G., Bovara,R., 1994. Chemiluminescent flow sensor for the determination of Paraoxon and Aldicarb pesticides. *Analytica Chimica Acta* 294, 35-42.
- Rosenberry,T.L., 1975. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 43, 103-218.
- Roth,M., Weisser,W., 2000. Jahresbericht des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Stuttgart. CVUA Stuttgart, Fellbach, Germany.
- Sams,C., Mason,H.J., Rawbone,R., 2000. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicol. Lett.* 116, 217-221.
- Sanger,F., Nicklen,S., Coulson,A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Saul,J.S., Zomer,E., Puopolo,D., Charm,S.E., 1995. Use of a new rapid bioluminescence method for screening organophosphate and N-methylcarbamate insecticides in processed baby food. *Journal of Food Protection* 59, 303-311.
- Savini,L., Gaeta,A., Fattorusso,C., Catalanotti,B., Campiani,G., Chiasserini,L., Pellerano,C., Novellino,E., McKissic,D., Saxena,A., 2003. Specific Targeting of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Recognition Sites. Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 46, 1-4.
- Scheller,F., Schubert,F., 1989. Biosensoren. Akademie-Verlag, Berlin.
- Scheuplein,R.J., 2000. Pesticides and Infant Risks: Is There a Need for an Additional Safety Margin? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31, 267-79.
- Schilter,B., Huggett,A.C., 1998. The ADI as a basis to establish standards for pesticide residues in food products for infants and young children. *Food Additives and Contaminants* 15 (suppl), 83-9.

- Schmid,R.D., 2002. Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH, Weinheim.
- Schulze,H., Scherbaum,E., Anastassiades,M., Vorlova,S., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2002a. Development, validation, and application of an acetylcholinesterase-biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food. *Biosens. Bioelectron.* 17, 1095-1105.
- Schulze,H., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2002b. Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase-biosensors and simple solvent extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 268-272.
- Schumacher,M., Camp,S., Maulet,Y., Newton,M., Macpheequigley,K., Taylor,S.S., Friedmann,T., Taylor,P., 1986. Primary Structure of Torpedo-Californica Acetylcholinesterase Deduced from Its Cdna Sequence. *Nature* 319, 407-409.
- Schwaneberg,U., Appel,D., Schmitt,J., Schmid,R.D., 2000. P450 in biotechnology: zinc driven omega-hydroxylation of p-nitrophenoxydodecanoic acid using P450 BM-3 F87A as a catalyst. *J. Biotechnol.* 84, 249-257.
- Schwaneberg,U., Schmidt-Dannert,C., Schmitt,J., Schmid,R.D., 1999. A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Anal. Biochem.* 269, 359-366.
- Shafferman,A., Kronman,C., Flashner,Y., Leitner,M., Grosfeld,H., Ordentlich,A., Gozes,Y., Cohen,S., Ariel,N., Barak,D., Harel,M., Silman,I., Sussman,J.L., Velan,B., 1992a. Mutagenesis of Human Acetylcholinesterase - Identification of Residues Involved in Catalytic Activity and in Polypeptide Folding. *Journal of Biological Chemistry* 267, 17640-17648.
- Shafferman,A., Velan,B., Ordentlich,A., Kronman,C., Grosfeld,H., Leitner,M., Flashner,Y., Cohen,S., Barak,D., Ariel,N., 1992b. Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J.* 11, 3561-3568.
- Shani,A., 1998. Integrated pest management using pheromones. *Chemtech* 28, 30-35.
- Skladal,P., 1991. Determination of organophosphate and carbamate pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode and a cholinesterase enzyme membrane. *Analytica Chimica Acta* 252, 11-15.
- Skladal,P., 1992. Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase. *Analytica Chimica Acta* 269, 281-287.
- Skladal,P., Mascini,P., 1992. Sensitive detection of pesticides using amperometric sensors based on cobalt phthalocyanine-modified composite electrodes and immobilized cholinesterases. *Biosensors & Bioelectronics* 7, 335-343.
- Skladal,P., Nunes,G.S., Yamanaka,H., Ribeiro,M.L., 1997. Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors. *Electroanalysis* 9, 1083-1087.

- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oeffner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholinesterase-binding protein. *Science* 253, 872-879.
- Taylor, P., 1991. The Cholinesterases. *Journal of Biological Chemistry* 266, 4025-4028.
- Taylor, P., Radic, Z., 1994. The Cholinesterases - from Genes to Proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34, 281-320.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S., 1987. *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford University Press, Oxford New York Toronto.
- Urlacher, V., Schmid, R.D., 2002. Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 557-564.
- Velan, B., Grosfeld, H., Kronman, C., Leitner, M., Gozes, Y., Lazar, A., Flashner, Y., Markus, D., Cohen, S., Shafferman, A., 1991. The Effect of Elimination of Intersubunit Disulfide Bonds on the Activity, Assembly, and Secretion of Recombinant Human Acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry* 266, 23977-23984.
- Vellom, D.C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N.A., Camp, S., Taylor, P., 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry* 32, 12-7.
- Villatte, F. 2003.
Ref Type: Personal Communication
- Villatte, F., Marcel, V., Estrada-Mondaca, S., Fournier, D., 1998. Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosensors & Bioelectronics* 13, 157-164.
- Villatte, F., Schulze, H., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., 2002. A disposable acetylcholinesterase-based electrode biosensor to detect anatoxin-a(s) in water. *Anal Bioanal Chem* 372, 322-6.
- Villatte, F., Ziliani, P., Marcel, V., Menozzi, P., Fournier, D., 2000. A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67, 95-102.
- Vorlová, S. Die humane Acetylcholinesterase: Design und Synthese eines optimierten Gens und die Expression in *Pichia Pastoris*. 2002. Universität Stuttgart.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Waibel, M. 2003. Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart.
Ref Type: Thesis/M.S.
- White, B.J., Legako, J.A., Harmon, H.J., 2003. Spectrophotometric detection of cholinesterase inhibitors with an integrated acetyl-/butyrylcholinesterase surface. *Sensors and Actuators B-Chemical* 89, 107-111.

Wiles,R., Davies,K. Pesticides in Baby Food.

http://www.ewg.org/pub/home/reports/Baby_food/baby_short.html . 1995. EWG, Washington, D.C.

Ref Type: Electronic Citation

Wiles,R., K.,D., Campbell,C. Overexposed: Organophosphate insecticides in children's food. 1998. Washington D.C., Environmental Working Group.

Ref Type: Report

Wilkins,E., Carter,M., Voss,J., Ivnitski,D., 2000. A quantitative determination of organophosphate pesticides in organic solvents. *Electrochemistry Communications* 2, 786-790.

Xavier,M.P., Vallejo,B., Marazuela,M.D., Moreno-Bondi,M.C., Baldini,F., Falai,A., 2000. Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red. *Biosens. Bioelectron.* 14, 895-905.

Yamazaki,H., Inoue,K., Turvy,C.G., Guengerich,F.P., Shimada,T., 1997. Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 25, 168-174.

Yess,N.J., Gunderson,E.L., Roy,R.R., 1993. U.S. Food and Drug Administration monitoring of pesticide residues in infant foods and adult foods eaten by infants/children. *J. AOAC Int.* 76, 492-507.

7 Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Holger Schulze, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann, Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase-biosensors and simple solvent extraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2002) 372, 268-272.

Holger Schulze, Ellen Scherbaum, Michelangelo Anastassiades, Sandra Vorlová, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann, Development, validation, and application of an acetylcholinesterase-biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food, *Biosensors & Bioelectronics* (2002) 17, 1095-1105.

Holger Schulze, Sandra Vorlová, Francois Villatte, Till T. Bachmann, Rolf D. Schmid, Design of acetylcholinesterases for biosensor applications, *Biosensors & Bioelectronics* (2003) 18, 201-209.

Francois Villatte, Holger Schulze, Rolf D. Schmid, Till T. Bachmann, A disposable acetylcholinesterase-based electrode biosensor to detect anatoxin-a(s) in water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2002) 372, 322-326.

Francois Villatte, Holger Schulze, Rolf D. Schmid and Till T. Bachmann, A long insertion reverts the functional effect of a substitution in acetylcholinesterase, *Protein Engineering* in press.

Steffen C. Maurer, Holger Schulze, Rolf D. Schmid, Vlada Urlacher, Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP⁺ Cofactor Recycling System: Towards a Technical Application of Heme-containing Monooxygenases in Fine Chemical Synthesis, *Advanced Synthesis and Catalysis* in press.

Patentanmeldung

Alexander Makower, Jan Halamek, Petr Skladal, Holger Schulze, Rolf D. Schmid, Till Bachmann, Dorothea Pfeiffer, Verfahren und Assay zum Nachweis und zur Bestimmung der Konzentration von Enzymhemmstoffen und/oder deren inaktiven Vorstufen, BST BioSensor Technologie GmbH, Berlin, 2002. Deutsches Patent- und Markenamt.

Konferenzbeiträge

- | | |
|------|--|
| 2000 | Bioengineering & Products, Stuttgart
Poster „Novel developments in neuroinhibitor analysis based on acetylcholinesterases“ |
| 2000 | 2 nd caesarium, Bonn
Poster „Neurotoxin detection in food using biosensors“ |
| 2001 | 2. BioSensor Symposium, Tübingen
Poster „Neurotoxin detection in food using disposable AChE-biosensors“ |
| 2001 | DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig
Poster „Neurotoxin detection in food using biosensors“ |
| 2001 | 5 th Euroconference on Environmental Analytical Chemistry, Blarney (Irland)
Poster „Improved neurotoxin detection in food using disposable biosensors“ |
| 2002 | The Seventh World Congress on Biosensors, Kyoto (Japan) |

-
- 2003 Poster „Disposable AChE-biosensor for rapid infant food testing with high accuracy at trace concentrations”
3. BioSensor Symposium, Potsdam
- Poster „Sensitivitätssteigerung von Neurotoxin-Biosensoren für Lebensmittel durch Protein-Design von Acetylcholinesterase und Cytochrom P450 BM-3“

8 Lebenslauf

Name: Holger Schulze
Geburtsdatum: 23. August 1971
Geburtsort: Waiblingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Schorndorfer Str. 3, 73614 Schorndorf

Schulbildung:

1978 – 1982 Grundschule in Geradstetten
1982 – 1991 Burg-Gymnasium Schorndorf

Wissenschaftliche Ausbildung:

Okt. 1991 – Feb. 1999 Chemiestudium an der Universität Stuttgart

Sep. 1995 – Aug. 1996 Studium und Master of Science Thesis an der University of Cincinnati (USA) mit dem Titel: *„Approaches to the total synthesis of the naturally occurring cyclolignan konyanin“*

Sept. 1998 – Feb. 1999 Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart mit dem Titel: *„Entwicklung eines sensitiven Schnelltests zur Bestimmung von insektiziden Organophosphaten in Lebensmitteln mittels Kombination von Flüssigextraktion und Acetylcholinesterase-Biosensoren“*

März 1999 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Technische Biochemie, Prof. Dr. Rolf D. Schmid

9 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 28. April 2003