

**Erprobung endogener Rezeptoren und monoklonaler
Antikörper zur Differentialdiagnostik von
Rizinintoxikationen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Thea Neumann

2020

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Quellen und Hilfsmitteln wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde von Mai 2016 bis Februar 2020 in der Arbeitsgruppe „Biologische Toxine“ im Zentrum für biologische Gefahren und Pathogene am Robert Koch-Institut in Berlin unter der Leitung von Dr. Brigitte G. Dorner angefertigt.

1. Gutachter*in: Dr. Brigitte G. Dorner
2. Gutachter*in: Prof. Dr. Rupert Mutzel
Disputation am: 29.06.2020

Zusammenfassung

Biologische Toxine verursachen als maßgebliche Pathogenitätsfaktoren schwere Erkrankungen im Menschen. Die Aufnahme der Toxine kann akzidentell oder nach intentionaler Ausbringung im Rahmen bioterroristischer Anschläge erfolgen. Orale Intoxikationen mit den Pflanzentoxinen Rizin und Abrin führen zu blutigen Durchfällen mit Leukozyten im Stuhl. Diese unspezifische Symptomatik kann auch auf natürlicherweise auftretende Gastroenteritiden durch Shigatoxin (Stx)-produzierende Bakterien sowie durch die von *Clostridium perfringens* produzierten Toxine *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) und Epsilon-Toxin (Etx) zurückzuführen sein. Zur Abgrenzung zwischen natürlichen und intentionalen Krankheitsgeschehen ist eine schnelle Differentialdiagnostik notwendig, welche bisher nicht verfügbar ist. Besondere Herausforderungen liegen in der hohen Toxizität der untersuchten Toxine sowie in der Tatsache, dass biologische Toxine oft in strukturell unterschiedlichen Varianten vorkommen, die alle sicher erfasst werden müssen. Ziel dieser Arbeit war es, stationäre und mobile Nachweisverfahren für Rizin, Abrin, Stx, CPE und Etx auf Basis monoklonaler Antikörper (mAk) und endogener Rezeptorstrukturen zu etablieren und vergleichend zu erproben.

Hierzu wurden im Rahmen der Arbeit neu generierte oder kommerziell verfügbare mAk in laborbasierte Immunoassays integriert und für den schnellen Nachweis in ein multiplexfähiges Vor-Ort-System (pBDi, Bruker Daltonik) übertragen. Geeignete mAk wurden auf Grundlage der kinetischen Bindungseigenschaften sowie distinkter Epitoperkennung identifiziert. Da das Auftreten von Toxinvarianten die Detektion durch hochspezifische mAk beeinträchtigen kann, wurden die funktionellen endogenen Rezeptoren der jeweiligen Toxinfamilien als innovative Fängerstrukturen erprobt. Analog zu den mAk wurden Proteinrezeptoren oder in Phospholipidnanodisks integrierte Glykosphingolipide hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert und optimale Bedingungen für hochaffine Interaktionen identifiziert.

Für alle adressierten Toxine gelang die Etablierung Antikörper-basierter Immunoassays mit exzellenten Detektionslimits im unteren pg/ml-Bereich. Mit Ausnahme von Etx konnten zudem hochaffine Rezeptorinteraktionen identifiziert und in Kombination mit monoklonalen Detektionsantikörpern für laborbasierte Nachweise mit vergleichbaren Sensitivitäten funktionalisiert werden. Die Erkennung von nativem CPE und Etx wurde mit einem Panel an Bakterienüberständen verifiziert. Die breitbandige Erkennung von Stx-Toxinvarianten (Stx1 a, c, d; Stx2 a-g) durch die Antikörper- und Rezeptor-basierten Immunoassays wurde mit Hilfe von Bakterienüberständen überprüft. Es gelang eine lückenlose Detektion sowohl unter Verwendung der endogenen Rezeptoren, als auch durch oligoklonale Mischungen von mAk.

Die Übertragung der mAk-basierten Nachweissysteme in das pBDi-System ermöglichte eine schnelle Vor-Ort-Detektion aller Toxine mit Nachweisgrenzen im ng/ml-Bereich. Einer der untersuchten Rezeptoren (Claudin-4 als Rezeptor für CPE) konnte mit gleicher Sensitivität in das Vor-Ort-System transferiert werden.

Für die in dieser Arbeit adressierten Toxine wurde demonstriert, dass mAk und endogene Rezeptoren einen breitbandigen Nachweis ermöglichten und je nach untersuchtem Toxin in die Vor-Ort-Detektionsplattform übertragbar waren. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist es erstmals möglich, eine relevante Palette von

bakteriellen und pflanzlichen Toxinen, die blutige Durchfälle auslösen, spezifisch und sensitiv mit all ihren Toxinvarianten zu erfassen. Die Realisierung des Vorhabens stellt einen zentralen Beitrag zur Unterstützung von Expertenlaboren und Einsatzkräften vor Ort dar, um durch Toxine ausgelöste intentionale Geschehen von natürlichen Krankheitsausbrüchen zu unterscheiden.

Abstract

Biological toxins are essential pathogenicity factors often contributing critically to severe human diseases. The uptake of toxins can occur accidentally, e.g. in food-borne intoxications, or intentionally by bioterrorism attacks. Intoxications caused by oral ingestion of the plant toxins ricin and abrin lead to bloody diarrhea and leucocytes in the stool. However, these unspecific symptoms are also associated with naturally occurring gastroenteritis caused by Shigatoxin (Stx)-producing bacteria as well as *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) and Epsilon toxin (Etx) produced by *Clostridium perfringens*. To discriminate naturally occurring from intentional intoxications caused by ricin or abrin, a rapid differential diagnosis targeting a panel of relevant toxins would be needed but is lacking to date. In fact, detection of biological toxins is challenging due to their high toxicity and the existence of structurally different toxin variants, all of which must be detected reliably. To this aim, the objective of this work was to establish and compare both stationary and mobile detection methods for ricin, abrin, Stx, CPE and Etx based on monoclonal antibodies (mAbs) and endogenous receptor structures.

In this work, newly generated or commercially available mAbs were integrated into laboratory-based immunoassays and implemented in a fast and multiplex on-site detection system (pBDi, Bruker Daltonik). Suitable mAbs were identified based on kinetic binding properties and distinct epitope recognition. Since the occurrence of structurally heterogeneous toxin variants can impair detection by highly specific mAbs, the functional endogenous receptors of the respective toxin families were tested as innovative capture structures. Analogous to the mAbs, protein receptors or glycosphingolipids integrated into phospholipid nanodiscs were characterized with respect to their binding properties and optimal conditions for high-affinity interactions were identified.

For all toxins addressed the establishment of antibody-based immunoassays was successful with excellent detection limits in the low pg/ml range. Additionally, apart from Etx, high-affinity receptor interactions were identified, characterized and combined with monoclonal detection antibodies for toxin detection. Subsequently, the detection of native CPE and Etx was verified with a panel of bacterial supernatants. Along the same line, using bacterial supernatants from *E.coli* strains broad detection of distinct Stx toxin variants (covering Stx1 a, c, d; Stx2 a-g) was verified successfully by both antibody- and receptor-based immunoassays.

Implementation of the mAb-based detection assays into the pBDi system enabled fast on-site detection of all toxins with detection limits in the ng/ml range. Additionally, one of the receptors investigated (Claudin-4 as receptor for CPE) could be transferred into the on-site system achieving the same sensitivity.

In conclusion, it was demonstrated for all toxins addressed in this work that mAbs and endogenous receptors enabled broad detection of toxins / toxin subtypes and, depending on the toxin under investigation, could be transferred to an on-site detection platform. Based on these results, it is now for the first time possible to detect a comprehensive panel of bacterial and plant toxins causing bloody diarrhea covering all relevant toxin variants, both specifically and sensitively. The outcomes of this project strengthen technical capacities of expert laboratories and first responders and help to distinguish intentional bioterrorism incidents triggered by biological toxins from natural disease outbreaks.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Rizin und Abrin als Auslöser blutiger Diarrhöen.....	1
1.2 Zu Rizinintoxikationen differentialdiagnostisch relevante biologische Toxine	3
1.2.1 <i>Rizin und Abrin wirken als RNA-N-Glykosidasen</i>	4
1.2.2 <i>Shigatoxine als Pathogenitätsfaktoren von EHEC</i>	5
1.2.3 <i>Die Porenbildner CPE und Etx</i>	5
1.3 Herausforderungen beim immunologischen Nachweis der Toxine	7
1.3.1 <i>Limitationen von molekularbiologischen Verfahren</i>	7
1.3.2 <i>Anforderungen an den proteinbiochemischen Nachweis der Toxine</i>	8
1.3.3 <i>Immunologische Nachweismethoden für biologische Toxine</i>	9
1.3.4 <i>Monoklonale Antikörper als unverzichtbare Nachweisreagenzien</i>	10
1.4 Evaluation endogener Rezeptoren als alternative Fängerstrukturen für die breitbandige Detektion biologischer Toxine	12
1.4.1 <i>Rizin und Abrin binden terminale Galaktosereste</i>	13
1.4.2 <i>Globoside als gemeinsame Rezeptoren der Shigatoxine</i>	14
1.4.3 <i>CPE bindet spezifisch an Claudine aus tight junctions</i>	15
1.4.4 <i>MAL als potenzieller Rezeptor für Etx</i>	16
1.4.5 <i>Funktionalisierung von Rezeptoren in Nanodisks</i>	17
1.5 Vor-Ort-Detektion biologischer Toxine.....	18
1.6 Zielsetzungen der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 <i>Geräte</i>	23
2.1.2 <i>Software</i>	24
2.1.3 <i>Kommerzielle Kits</i>	24
2.1.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	25
2.1.5 <i>Chemikalien, Reagenzien und Puffer</i>	26
2.1.6 <i>Antikörper und Enzyme</i>	28
2.1.7 <i>GSL- und Proteorezeptoren</i>	30
2.1.8 <i>Toxine und Bakterienüberstände</i>	30
2.1.9 <i>Zelllinien und Medien</i>	31

2.1.10	<i>Tiere</i>	32
2.2	Kultivierung von Zellen	33
2.2.1	<i>Handhabung von Suspensionszellen und adhärenen Zellen</i>	33
2.2.2	<i>Vitalfärbung mittels Türks-Lösung und Trypanblau</i>	33
2.2.3	<i>Kryokonservierung von Zellen</i>	33
2.3	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	34
2.3.1	<i>Immunisierung und Testung der Serumaktivität</i>	34
2.3.2	<i>Präparation von Splenozyten</i>	34
2.3.3	<i>Präparation von Thymozyten</i>	35
2.3.4	<i>Präparation von Myelomzellen</i>	35
2.3.5	<i>Hybridomfusion und Aussaat der Hybridome</i>	35
2.3.6	<i>Subklonierung von Hybridomklonen</i>	36
2.3.7	<i>Durchflusszytometrische Untersuchung der intrazellulären Antikörperproduktion</i>	36
2.3.8	<i>Antikörperproduktion und -reinigung</i>	36
2.3.9	<i>Isotypbestimmung von Antikörpern</i>	37
2.3.10	<i>Biotinylierung von Antikörpern</i>	37
2.4	Biochemische Methoden	38
2.4.1	<i>SDS-PAGE</i>	38
2.4.2	<i>Proteinfärbungen</i>	38
2.4.3	<i>Enzymatische Spaltung und Extraktion von MAL</i>	39
2.5	Herstellung von Nanodisks und SMALPs.....	40
2.5.1	<i>Assemblierung von Nanodisks</i>	40
2.5.2	<i>Reinigung und Charakterisierung von Nanodisks</i>	41
2.5.3	<i>Herstellung und Reinigung von SMALPs</i>	41
2.6	Immunoassays	42
2.6.1	<i>Indirekter ELISA</i>	42
2.6.2	<i>Klassische und Rezeptor-basierte Sandwich-ELISA</i>	42
2.6.3	<i>ELLA</i>	43
2.6.4	<i>Western Blot</i>	43
2.6.5	<i>Messungen im pBDi/pTD</i>	44
2.7	SPR-basierte Methoden	44
2.7.1	<i>Direkte Immobilisierung von Asialofetuin</i>	45
2.7.2	<i>Kovalente Kopplung von Fängerantikörpern zur Immobilisierung von Liganden</i>	46
2.7.3	<i>Bestimmung der Bindungskinetik</i>	46
2.7.4	<i>Bestimmung distinkter Epitoperkennung durch Epitopbinning</i>	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Pflanzentoxine Rizin und Abrin	50
3.1.1	<i>Antigencharakterisierung der verwendeten Pflanzentoxine</i>	50
3.1.2	<i>Affinität von Asialofetuin und Asialo-GM1 als Rezeptoren für Rizin und Abrin</i>	51
3.1.3	<i>Vergleich von Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis von Rizin und Abrin</i>	54

3.1.4	<i>Matrizeinfluss von Milch auf den Nachweis mittels ELLA und ELISA</i>	55
3.1.5	<i>Spezifität von Asialofetuin als Fänger für Rizin und Abrin</i>	56
3.1.6	<i>Vor-Ort-Nachweise von Rizin und Abrin</i>	57
3.2	<i>Shigatoxine Stx1 und Stx2</i>	59
3.2.1	<i>Antigencharakterisierung von kommerziellen, nativen Shigatoxinen</i>	59
3.2.2	<i>Affinität von Globosiden als Rezeptoren für Shigatoxine</i>	60
3.2.3	<i>Charakterisierung von kommerziellen Stx-spezifischen Antikörpern</i>	62
3.2.4	<i>Vergleich von Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis der Shigatoxine</i>	65
3.2.5	<i>Nachweis diverser Stx-Subtypen aus Bakterienlysaten von E. coli</i>	67
3.2.6	<i>Lagerstabilität der Gb3/GalCer-Nanodisks</i>	69
3.2.7	<i>Spezifität der Globosid-Nanodisks als Fänger für die Shigatoxine</i>	71
3.2.8	<i>Vor-Ort-Nachweise von Stx1 und Stx2</i>	71
3.3	<i>Clostridium perfringens Enterotoxin</i>	73
3.3.1	<i>Charakterisierung von CPE-basierten Antigenen und dem Rezeptor Claudin-4</i>	73
3.3.2	<i>Affinität von Claudin-4 als Rezeptor für CPE</i>	75
3.3.3	<i>Generierung monoklonaler, CPE-spezifischer Antikörper</i>	76
3.3.4	<i>Charakterisierung monoklonaler, CPE-spezifischer Antikörper</i>	81
3.3.5	<i>Vergleich von Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis von CPE</i>	83
3.3.6	<i>Nachweis von nativem CPE aus Bakterienüberständen</i>	85
3.3.7	<i>Spezifität von Claudin-4 als Fänger für CPE</i>	87
3.3.8	<i>Vor-Ort-Nachweis von CPE</i>	87
3.4	<i>Epsilon-Toxin aus Clostridium perfringens</i>	89
3.4.1	<i>Charakterisierung von Etx-basierten Antigenen und MAL</i>	89
3.4.2	<i>Erprobung von MAL als Rezeptor für Etx</i>	90
3.4.3	<i>Generierung von Etx-spezifischen monoklonalen Antikörpern</i>	93
3.4.4	<i>Charakterisierung der generierten monoklonalen Antikörper</i>	94
3.4.5	<i>Antikörper-basierter Nachweis von Etx im Sandwich-ELISA</i>	96
3.4.6	<i>Nachweis von nativem Etx aus Bakterienüberständen</i>	97
3.4.7	<i>Vor-Ort-Nachweis von Etx</i>	99
4	Diskussion	101
4.1	<i>Evaluation von mAk und endogenen Rezeptoren für den Nachweis von Proteotoxinen</i>	102
4.1.1	<i>Der Herstellungsprozess von mAks führt zu maßgeschneiderten Nachweisreagenzien</i>	102
4.1.2	<i>Die Verwendung endogener Rezeptoren erfordert ein individuelles Maß an Anpassung</i>	104
4.2	<i>Hochaffine endogene Rezeptoren ermöglichen hochsensitive Nachweise</i>	108
4.3	<i>Trotz ihres Potenzials sind Rezeptor-basierte Nachweise bisher unterrepräsentiert</i>	110
4.4	<i>Endogene Rezeptoren sowie oligoklonale Mischungen von mAk ermöglichen einen breitbandigen Nachweis</i>	112
4.5	<i>Alle toxinspezifischen mAk eignen sich für den Multiplex-Nachweis im pBDi</i>	114
4.6	<i>Vor-Ort-Nachweise schaffen die Entscheidungsgrundlage für die stationäre Analytik</i>	117
4.7	<i>Ausblick</i>	120

5	Literaturverzeichnis.....	122
6	Anhang.....	136
6.1	Rizin und Abrin	136
6.1.1	<i>Affinität von Asialofetuin und Asialo-GM1 an Rizin und Abrin.....</i>	<i>136</i>
6.1.2	<i>Vor-Ort-Nachweise für Rizin und Abrin</i>	<i>139</i>
6.2	Shigatoxine Stx1 und Stx2	140
6.2.1	<i>Bindung von Shigatoxinen an Globoside.....</i>	<i>140</i>
6.2.2	<i>Antikörpercharakterisierung</i>	<i>140</i>
6.2.3	<i>Bestimmung der Subtypenerkennung.....</i>	<i>142</i>
6.2.4	<i>Lagerstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks.....</i>	<i>145</i>
6.2.5	<i>Vor-Ort-Nachweis der Shigatoxine.....</i>	<i>146</i>
6.3	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin	147
6.3.1	<i>Immunisierungen</i>	<i>147</i>
6.3.2	<i>Charakterisierung CPE-spezifischer Antikörper.....</i>	<i>149</i>
6.3.3	<i>Vor-Ort-Nachweis von CPE.....</i>	<i>152</i>
6.4	Epsilon-Toxin aus <i>C. perfringens</i>	153
6.4.1	<i>Antigencharakterisierung.....</i>	<i>153</i>
6.4.2	<i>Untersuchung von MAL als Rezeptor für Etx.....</i>	<i>153</i>
6.4.3	<i>Immunisierungen</i>	<i>156</i>
6.4.4	<i>Charakterisierung Etx-spezifischer Antikörper.....</i>	<i>157</i>
6.4.5	<i>Vor-Ort-Nachweis von Etx</i>	<i>159</i>
	Danksagung.....	161

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differentialdiagnostisch zur Intoxikation mit Pflanzentoxinen relevante bakterielle Erreger.	4
Abbildung 2: Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridomtechnologie.	11
Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Asialo-GM1 und GM1.	13
Abbildung 4: Organisation der terminalen Galaktosereste in Asialofetuin.	14
Abbildung 5: Struktur der Globoside Gb3 und Gb4.	15
Abbildung 6: Bindung von CPE an Claudin-4.	16
Abbildung 7: Spontane Assemblierung von Nanodisks.	17
Abbildung 8: Ablauf der Analytik von potenziell toxischen Proben.	19
Abbildung 9: Aufbau und Funktionsweise des pTD/pBDi-Geräts.	20
Abbildung 10: Kurvenverlauf eines Epitopbinnings.	48
Abbildung 11: Entwicklung von Antikörper- und Rezeptor-basierten Nachweissystemen.	49
Abbildung 12: SPR-basierte Assays zur Bestimmung der Bindungskinetik am Beispiel von Rizin.	51
Abbildung 13: SPR-Bindungskinetik von Rizin und Abrin an Asialofetuin, Asialo-GM1-NDs und mAk.	52
Abbildung 14: Vergleich von Sandwich-ELISA und ELLA zur Detektion von Rizin und Abrin.	55
Abbildung 15: Matrixeinfluss von Milch auf den Nachweis von Rizin und Abrin im ELLA und ELISA.	56
Abbildung 16: Kreuzreaktivität von Asialofetuin gegenüber anderen Toxinen im ELLA.	57
Abbildung 17: Nachweis von Rizin und Abrin in der Vor-Ort-Detektionsplattform pTD.	58
Abbildung 18: Auftragung von Stx1a und Stx2a in SDS-PAGE.	59
Abbildung 19: Bindung von Shigatoxinen an Gb3/GalCer-Nanodisks und mAk im SPR.	61
Abbildung 20: Untersuchung Stx-spezifischer Antikörper im Western Blot.	63
Abbildung 21: Detektion der Shigatoxine mittels Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis.	67
Abbildung 22: Versuchsplan zur Testung der Lagerstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks.	70
Abbildung 23: Lagerstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks bei 4 °C über 6 Monate bestimmt im ELISA.	70
Abbildung 24: Spezifität von Gb3/GalCer Nanodisks als Fänger für Stx1 und Stx2.	71
Abbildung 25: Nachweis der Shigatoxine im pBDi.	72
Abbildung 26: Auftragung von CPE und Claudin-4 in SDS-PAGE.	74
Abbildung 27: Bindung von CPE an den Rezeptor Claudin-4 und an mAk CPE1 mittels SPR-Messungen.	75
Abbildung 28: Prozess zum Aufbau von immunologischen Assays zum Nachweis von CPE.	76
Abbildung 29: ELISA-Screening mit der Rezeptorbindungsdomäne von CPE als Antigen.	77
Abbildung 30: SPR-basiertes Screening mit der Rezeptorbindungsdomäne von CPE als Antigen.	78
Abbildung 31: ELISA-Screening mit CPE.	80
Abbildung 32: SPR-Screening mit CPE als Antigen.	81
Abbildung 33: Epitopbinning der gereinigten CPE-spezifischen Antikörper.	82
Abbildung 34: Vergleich von Antikörper- und Claudin-4-basiertem Nachweis von CPE.	84
Abbildung 35: Kreuzreaktivität von Claudin-4 gegenüber ausgewählten Toxinen.	87
Abbildung 36: Nachweis von CPE im pBDi.	88
Abbildung 37: Auftragung von Etx und MAL in SDS-PAGE.	90
Abbildung 38: Präsentation von MAL in Lipidumgebung.	92

Abbildung 39: ELISA-Screening auf Etx-spezifische Antikörper.....	93
Abbildung 40: SPR-Screening Etx-spezifischer Antikörper.....	94
Abbildung 41: Epitopbinning der gereinigten monoklonalen Antikörper gegen Etx.	95
Abbildung 42: Nachweis von Etx im Sandwich-ELISA.	97
Abbildung 43: Nachweis von Etx im pBDi.	99
Abbildung 44: Strategie zum Nachweis von Rizinintoxikationen samt Differentialdiagnostik.....	119
Abbildung 45: Untersuchung von Nanodisks in der Gelfiltration und im indirekten ELISA.....	136
Abbildung 46: SPR-Bindungskinetik von Cholera toxin an Gangliosid-haltige Nanodisks.....	137
Abbildung 47: Bindung der zu Rizin bzw. Abrin homologen Agglutinine an Asialo-GM1-Nanodisks.....	137
Abbildung 48: Bindung der zu Rizin bzw. Abrin homologen Agglutinine an Asialofetuin.	138
Abbildung 49: Bindung von TcdA und B an Asialofetuin im Vergleich zu Rizin.....	139
Abbildung 50: Chiplayout der pTD-Biochips zum Nachweis von Rizin und Abrin.	139
Abbildung 51: Bindung von Shigatoxinen an globosidhaltige Nanodisks.	140
Abbildung 52: SPR-Bindungskinetik Stx-spezifischer Antikörper.	140
Abbildung 53: Epitopbinning von Stx1-spezifischen Antikörpern.....	141
Abbildung 54: Epitop-Binning von Stx2-spezifischen Antikörpern.....	142
Abbildung 55: SPR-basierte Überprüfung der Lagerungsstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks.	145
Abbildung 56: Immobilisierungsdichte von NDs (versch. Lagerungstemperaturen und -zeiten).	145
Abbildung 57: Chiplayout der pBDi-Biochips für den Nachweis der Shigatoxine.....	146
Abbildung 58: Nachweis der Immobilisierung von Nanodisks auf Biochips.	146
Abbildung 59: Titer von Mäusen nach Immunisierung mit CPE-Domänen.....	148
Abbildung 60: Testung des Titers immunisierter Mäuse gegen CPE-Proteine.....	149
Abbildung 61: CPE-spezifische monoklonale Antikörper im Western Blot.	149
Abbildung 62: SPR-Bindungskinetik von CPE-spezifischen Antikörpern.....	150
Abbildung 63: Epitopbinning von CPE-spezifischen Antikörpern.....	151
Abbildung 64: Bindung von TcdA und B an Claudin-4.....	152
Abbildung 65: Chiplayout der pBDi-Chips zum Nachweis von CPE.....	152
Abbildung 66: Detektion von MAL im Western Blot.....	153
Abbildung 67: Assemblierung von Nanodisks mit ungekoppeltem MAL.	153
Abbildung 68: Assemblierung von NDs mit immobilisiertem MAL in variabler Lipidumgebung.....	154
Abbildung 69: Assemblierung von NDs mit immobilisiertem MAL unter Abspaltung des GST-Tags.....	154
Abbildung 70: Enzymatische Spaltung von MAL und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln.	155
Abbildung 71: Herstellung von SMALPs aus Etx-sensitiven MDCK-Zellen.....	155
Abbildung 72: Testung des Titers immunisierter Mäuse gegen Etx.....	156
Abbildung 73: Untersuchung Etx-spezifischer monoklonaler Antikörper im Western Blot.	157
Abbildung 74: SPR-Bindungskinetik von Etx-spezifischen Antikörpern.....	157
Abbildung 75: SPR-basiertes Epitopbinning Etx-spezifischer Antikörper.	158
Abbildung 76: Chiplayout von pBDi-Chips zum Nachweis von Etx.....	159

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Detektion relevante Eigenschaften der in dieser Arbeit adressierten Toxine.....	8
Tabelle 2: Gegenüberstellung verschiedener immunologischer Detektionsverfahren.....	10
Tabelle 3: Überblick über die Rezeptorinteraktionen der adressierten Toxine.	12
Tabelle 4: Geräte.	23
Tabelle 5: Software.	24
Tabelle 6: Kommerzielle Kits.....	24
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien.....	26
Tabelle 9: Zusammensetzung von Puffern.	27
Tabelle 10: Antikörper.	28
Tabelle 11: Sekundärreagenzien und weitere Enzyme.	30
Tabelle 12: Rezeptoren.	30
Tabelle 13: Toxine und toxinhaltige Bakterienüberstände.	31
Tabelle 14: Medienzusätze.	32
Tabelle 15: Zellkulturmedien.....	32
Tabelle 16: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele zur Durchführung der SDS-PAGE.	38
Tabelle 17: Stöchiometrische Verhältnisse zur Assemblierung von Nanodisks.	40
Tabelle 18: Immobilisierungs- und Regenerationsarten in SPR-Assays.....	45
Tabelle 19: Immobilisierung von Kontroll - und Messflusszellen.	46
Tabelle 20: Zusammensetzung der verwendeten Pflanzentoxine (Rizin, Abrin).	50
Tabelle 21: Bindungskinetik von Rizin und Abrin an verschiedene Fängerstrukturen.....	53
Tabelle 22: Eigenschaften der vorliegenden Rizin- und Abrin-spezifischen Antikörper.....	54
Tabelle 23: Nachweisgrenzen für den Nachweis von Rizin und Abrin mittels ELISA und ELLA.	55
Tabelle 24: Nachweisgrenzen von Rizin und Abrin im pTD.....	58
Tabelle 25: Bindung von Stx1a und Stx2a an globosidhaltige Nanodiskpräparationen.	60
Tabelle 26: Bindungskinetik von Stx1a und Stx2a an Gb3/GalCer-Nanodisks und mAk.....	62
Tabelle 27: Kombinierbarkeit der Antikörper mit Gb3/GalCer-Nanodisks.....	64
Tabelle 28: Eigenschaften Stx-spezifischer monoklonaler Antikörper.....	65
Tabelle 29: Sensitivitäten der mAk-mAk-Kombinationen für Stx1.....	65
Tabelle 30: Sensitivitäten der mAk-Kombinationen für Stx2.....	66
Tabelle 31: Nachweisgrenzen für die Detektion der Shigatoxine im Plattenformat.	67
Tabelle 32: Antikörper- und Rezeptor-basierter Nachweis von Stx1-Subtypen aus Bakterienlysaten.....	68
Tabelle 33: Antikörper- und Rezeptor-basierter Nachweis von Stx2-Subtypen aus Bakterienlysaten.....	69
Tabelle 34: Nachweisgrenzen für die Detektion von Stx1a und Stx2a im pBDi.	72
Tabelle 35: Übersicht zu rekombinanten CPE-Varianten und Claudin-4 (Quelle: A. Rummel, MHH).	74
Tabelle 36: Kinetische Parameter der Interaktion von CPE mit Claudin-4 und mAk CPE1.....	75
Tabelle 37: Eigenschaften der CPE-spezifischen monoklonalen Antikörper.....	83
Tabelle 38: Sensitivitäten der CPE-spezifischen mAk in Sandwich- und Claudin-4-ELISA.....	83

Tabelle 39: Nachweisgrenzen für den Nachweis von CPE mittels Sandwich- und Claudin-4-ELISA.....	84
Tabelle 40: Nachweis von CPE aus Bakterienüberständen verschiedener <i>C. perfringens</i> -Stämme.....	85
Tabelle 41: Nachweis von CPE im pBDi.....	88
Tabelle 42: Verwendete rekombinante Etx-Proteine und MAL (Quelle: A. Rummel, MHH).....	89
Tabelle 43: Zusammenfassung der zur Präsentation von MAL erprobten Lipidumgebungen.	91
Tabelle 44: Eigenschaften der Etx-spezifischen monoklonalen Antikörper.	96
Tabelle 45: Sensitivitäten der Etx-spezifischen mAk im Sandwich-ELISA.	96
Tabelle 46: Nachweis von Etx aus Bakterienüberständen verschiedener <i>C. perfringens</i> -Stämme.	98
Tabelle 47: Nachweisgrenzen für die Detektion von Etx im pBDi.	100
Tabelle 48: Ergebnisse zu den untersuchten endogenen Rezeptoren für Proteotoxine.	107
Tabelle 49: Vergleich der etablierten Assays.	116
Tabelle 50: Monoklonale Detektionsantikörper für den Nachweis von Abrin im ELLA.....	138
Tabelle 51: Testung der Erkennung verschiedener Stx1-Subtypen.	143
Tabelle 52: Testung der Erkennung verschiedener Stx2-Subtypen.	144
Tabelle 53: Immunisierung mit CPE RBD.	147
Tabelle 54: Immunisierung mit CPE ZD.....	147
Tabelle 55: Immunisierung mit CPE D48A.....	148
Tabelle 56: Immunisierung mit PEtx Y84A.....	156

Abkürzungsverzeichnis

AH	Azaserin/Hypoxanthin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASF	Asialofetuin
BALB/c	Mausstamm (Inzucht)
BSA	bovines Serumalbumin
β -PFT	β -Porenformende Toxine
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA</i>
Cer	Ceramid
Ch	Cholesterol
CLDN4	Claudin-4
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EC ₅₀	halbmaximale Effektorkonzentration
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELLA	<i>enzyme-linked lectin assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Etx	aktiviertes Epsilon-Toxin aus <i>Clostridium perfringens</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FLI	Friedrich Löffler-Institut
Gal	Galaktose
GalCer	Galaktosylceramid
GalNAc	Galaktosamin
Gb3	Globotriaosylceramid
Gb4	Globotetraosylceramid
Glc	Glukose
GPG	G-Protein gereinigt
GSL	Glykosphingolipide
HAVCR 1	<i>Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
i.g.	intrastral
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LFA	<i>Lateral Flow Assay</i>
LD ₅₀	halbmaximale letale Dosis
LOD	<i>limit of detection</i> (Detektionslimit)
LSPR	<i>localized surface plasmon resonance</i> (Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz)
mAk	Monoklonaler Antikörper

MAL	<i>Myelin and Lymphocyte Protein</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MS	Massenspektrometrie
MSP	<i>Membrane Scaffold Protein</i>
NDs	Nanodisks
NMRI	Mausstamm (Auszucht)
<i>p</i> -AGP	<i>p</i> -Aminophenyl- β -D-galaktopyranosid
pAk	polyklonaler Antikörper
<i>p</i> -AP	<i>p</i> -Aminophenol
<i>pBDi</i>	<i>portable BioDetector integrated</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
<i>p</i> -CI	<i>p</i> -Chinonimin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PEtx	Prototoxin des Epsilon-Toxin aus <i>Clostridium perfringens</i>
POD	Peroxidase
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin
pTD	portabler Toxindetektor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rek.	rekombinant
RIA	Radioimmunoassay
RIP-II	Ribosomen-inaktivierende Proteine der Klasse II
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RTB	Rizin B-Kette
RU	<i>resonance unit</i>
SA	Streptavidin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SEs	Staphylokokken Enterotoxine
SM	Sphingomyelin
SMA	<i>styrene maleic anhydride</i> (Styren-Maleinsäure-Copolymer)
SMALPs	<i>SMA lipid particles</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)
STEC	Shigatoxin-produzierende <i>E. coli</i>
<i>stx</i>	Shigatoxin-codierendes Gen
Stx	ursprünglich in <i>Shigella dysenteriae</i> entdecktes Shigatoxin
Stx1	Shigatoxin vom Toxintyp 1
Stx2	Shigatoxin vom Toxintyp 2
TcdA	Toxin A aus <i>Clostridioides difficile</i>

TcdB	Toxin B aus <i>Clostridioides difficile</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TPGY	Trypton-Pepton-Glukose-Hefe-Medium
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
ü. N.	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Rizin und Abrin als Auslöser blutiger Diarrhöen

Biologische Toxine werden von lebenden Organismen produziert und entfalten eine schädigende Wirkung auf andere Organismen [1]. Natürlicherweise können Erkrankungen im Menschen z.B. durch den Verzehr von mit Toxinen bzw. toxinproduzierenden Bakterien kontaminierten Lebensmitteln ausgelöst werden. Des Weiteren ist die akzidentelle Aufnahme von toxinhaltigen Samen des Wunderbaums (*Ricinus communis*) oder der Paternostererbse (*Abrus precatorius*) beschrieben [2, 3]. Die für die Intoxikation ursächlichen Inhaltsstoffe der Pflanzen sind die hochmolekularen Proteotoxine Rizin bzw. Abrin [4, 5]. Das klinische Bild oraler Intoxikationen mit den Pflanzentoxinen ist wenig differenziert. Milde Vergiftungen äußern sich innerhalb weniger Stunden nach Aufnahme in Übelkeit, Erbrechen und Durchfällen [6]. Bei schweren Intoxikationen entwickeln betroffene Patienten blutige Diarrhöen mit Leukozyten im Stuhl. In Einzelfällen führen Intoxikationen mit den Pflanzentoxinen zu Leber- und Nierenversagen und zum Tod [6, 7].

Unabhängig von akzidentellen Vergiftungen besitzen Rizin und Abrin aufgrund ihrer Toxizität und der einfachen Zugänglichkeit der Pflanzensamen ein hohes Gefahrenpotenzial als bioterroristische Agenzien. Intentionale Ausbringungsversuche sind für beide Toxine dokumentiert. Im Sommer 2018 gelang es, ein in Köln geplantes terroristisches Attentat zu vereiteln, bei dem ein Rizin-dotierter Sprengsatz zum Einsatz kommen sollte [8]. Der Verdächtige gewann das Toxin aus im Internet geordneten Rizinussamen mit einfachstem Equipment. In Indonesien wurden im Oktober 2019 Pläne für ein ähnliches Attentat mit Abrin aufgedeckt, das ebenfalls verhindert werden konnte [8]. Kriminell motivierte Einzeltäter versuchten mehrfach, mit Rizin-Briefen Anschläge auf politische Entscheidungsträger in den USA zu verüben [9, 10]. Der wohl bekannteste erfolgreiche Anschlag mit Rizin ereignete sich 1978 mit der Ermordung des bulgarischen Dissidenten Georgi Markow im Auftrag des sowjetischen Geheimdienstes [11, 12]. Durch die Spitze eines Regenschirmes wurde ein mit Rizin präpariertes Pellet in die Wade des Journalisten injiziert und führte zu dessen Tod.

Das von Rizin und Abrin ausgehende Gefahrenpotenzial spiegelt sich in ihrer Kategorisierung in der Liste der *select agents and toxins* durch die US-amerikanischen Bundesbehörden CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) und APHIS (*Animal and Plant Health Inspection Service*) wieder [9]. Von diesen Behörden aufgeführte Agenzien können eine große Gefahr für die öffentliche Gesundheit sowie für Tiere und Pflanzen darstellen [9]. Rizin ist zudem im Anhang 1 der Chemiewaffenkonvention (CWC, *Chemical Weapons Convention*) und in der Biowaffenkonvention (BWC, *Biological Weapons Convention*) erfasst [10]. Die Einhaltung und Umsetzung der CWC wird von der Organisation für das Verbot chemischer Waffen (*Organization for the Prohibition of Chemical Weapons*, OPCW) überwacht. Eine Verbreitung von Rizin und Abrin wird durch Exportkontrollen der *Australia Group* verhindert [11].

Im Falle eines bioterroristischen Anschlags mit Rizin oder Abrin muss der intentionale Charakter der Ausbringung schnellstmöglich identifiziert werden, um ein effektives Krisenmanagement zum Schutz der Bevölkerung einzuleiten. Dabei ist eine Abgrenzung zu natürlichen Krankheitsgeschehen mit ähnlicher Symptomatik wie z.B. gastrointestinalen Infektionen mit bestimmten bakteriellen Erregern [6] essentiell. Im Fokus einer Differentialdiagnostik stehen neben den Pflanzentoxinen Rizin und Abrin toxinproduzierende Bakterien, bei denen die biologischen Toxine als Hauptpathogenitätsfaktoren schwere Krankheitsverläufe verursachen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine zuverlässige Differentialdiagnostik für Rizinintoxikationen auf der Basis proteinbiochemischer Nachweise relevanter biologischer Toxine zu entwickeln. Zu diesem Zweck sollten mobile Schnellnachweisverfahren etabliert werden. Darüber hinaus erfordern bioterroristische Szenarien eine Bestätigungsanalytik in Form von stationären Detektionsverfahren, die eine präzise Bestimmung der Identität, Zusammensetzung und Konzentration der Analyten ermöglichen. In diesem Zusammenhang sollten Sandwich-ELISA etabliert werden, die klassischerweise auf dem Einsatz hochspezifischer monoklonaler Antikörper beruhen. Eine Herausforderung beim Nachweis biologischer Toxine kann das Auftreten von strukturell heterogenen Toxinvarianten sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein alternatives Detektionskonzept zum breitbandigen Toxinnachweis erprobt, das auf der Interaktion von Toxinen mit ihren endogenen Rezeptoren beruht. Technisch gesehen erfordert diese Erprobung die Funktionalisierung der endogenen Rezeptoren als Fängerstrukturen anstelle von monoklonalen Antikörpern.

1.2 Zu Rizinintoxikationen differentialdiagnostisch relevante biologische Toxine

Die Auswahl der in die Differentialdiagnostik einzuschließenden bakteriellen Erreger lässt sich anhand der beschriebenen Leitsymptomatik, der klinischen Relevanz und dem Missbrauchspotenzial für bioterroristische Zwecke auf folgende Bakterien und die von ihnen produzierten biologischen Toxine eingrenzen:

- die Shigatoxin-Produzenten *Shigella dysenteriae* (Stx) und *Echerischia coli* (Stx1 und Stx2)
- *Clostridium perfringens*, welches u.a. Epsilon-Toxin (Etx) und das *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) produziert
- *Clostridioides difficile* mit den Toxinen TcdA und TcdB
- Enterotoxin-produzierende *Staphylococcus aureus* (SEA bis SEV).

Die Detektion der produzierten biologischen Toxine war in ihrer Gesamtheit Gegenstand des SensTox-Projektes (Kapitel 1.6). Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich ausschließlich auf den Nachweis der Shigatoxine, Etx und CPE.

Über eine Differentialdiagnostik zu Rizinintoxikationen hinaus besitzen Shigatoxin-produzierende Bakterien und *Clostridium perfringens* eine hohe klinische Relevanz. In Abgrenzung zu anderen bakteriell oder viral bedingten Durchfallerkrankungen sind diese bakteriellen Erreger gerade aufgrund ihrer Eigenschaft, Toxine zu bilden, mit schweren Verläufen assoziiert und bergen die Gefahr fataler Komplikationen (wie z.B. das durch Shigatoxine verursachte hämolytisch-urämische Syndrom) [12, 13]. Die geringen Spontanheilungsraten der verursachten Gastroenteritiden erfordern in der Regel spezifische medizinische Interventionen. Eine eindeutige Diagnosestellung durch den Nachweis der produzierten biologischen Toxine als wesentliche Pathogenitätsfaktoren ist sowohl bei natürlichen Krankheitsgeschehen als auch innerhalb bioterroristischer Szenarien substantiell.

Abbildung 1 fasst den Ursprung, strukturellen Aufbau und die Funktionsweise der in dieser Arbeit adressierten biologischen Toxine zusammen. Während Rizin, Abrin und die Shigatoxine Lektine sind, die als RNA-Glykosidasen wirken (Kapitel 1.2.1 und 1.2.2), entfalten CPE und Etx nach Bindung an Proteorezeptoren ihre Wirkung als Porenbildner (Kapitel 1.2.3). Die folgenden Kapitel beleuchten die Relevanz der adressierten Toxine als Auslöser schwerer gastrointestinaler Symptomatiken und geben eine generelle einführende Darstellung.

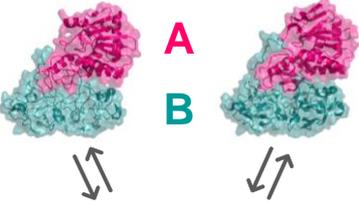
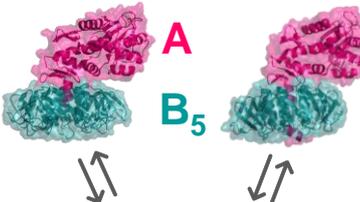
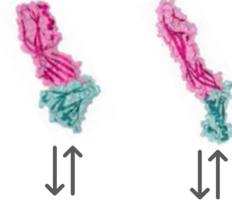
Intoxikation mit Pflanzentoxinen			Gastrointestinale Infektion mit bakteriellen Erregern				
<i>R.communis</i>	<i>A.precatorius</i>	Quelle	<i>S.dysenteriae</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.perfringens</i>		
							
Rizin	Abrin	Toxine	Stx	Stx1	Stx2	CPE	Etx
							
Terminale Galaktose		Rezeptor	Globoside Gb3/Gb4		Claudin-4	MAL	
RNA-N-Glykosidase		Zytotoxizität	RNA-N-Glykosidase		Porenbildner (β-PFT)		
Blutige Diarrhoe mit Leukozyten im Stuhl							

Abbildung 1: Differentialdiagnostisch zur Intoxikation mit Pflanzentoxinen relevante bakterielle Erreger.

Für eine Differentialdiagnose zur Intoxikation mit den Pflanzentoxinen Rizin und Abrin (links) mit der Leitsymptomatik blutige Diarrhöe mit Leukozyten im Stuhl kommen gastrointestinale Infektionen mit toxinproduzierenden Bakterien in Frage (rechts). Dazu gehören folgende Bakterien und die von ihnen produzierten Toxine: *Shigella dysenteriae* mit Stx, Shigatoxin-produzierende *E. coli* mit Stx1 und Stx2 sowie *Clostridium perfringens* mit CPE und Etx. Der strukturelle Aufbau aus Proteinabschnitten, die eine toxische Aktivität (pink) und die Rezeptorbindung (türkis) vermitteln, veranschaulicht die Funktionsweise der Toxine. Rizin, Abrin und die Shigatoxine wirken als RNA-N-Glykosidasen zytotoxisch, CPE und Etx schädigen Zellen durch Porenbildung. Für die Visualisierung der Proteinstrukturen dienen folgende PDB-Einträge: 2AAI (Rizin), 1ABR (Abrin-a), 1DM0 (Stx), 1R4Q (Stx2), 3AM2 (CPE), 1UYJ (Etx).

1.2.1 Rizin und Abrin wirken als RNA-N-Glykosidasen

Rizin und Abrin sind nah verwandte hochmolekulare Proteotoxine pflanzlichen Ursprungs. Rizin ist in den Samen des Wunderbaums (*Ricinus communis*) enthalten [4], aus dem im großen Maßstab das industriell und pharmazeutisch vielseitig verwendbare Rizinusöl gewonnen wird. Das aus den Samen der Paternostererbse (*Abrus precatorius*) stammende Abrin [5] weist mit einer Sequenzidentität von 48 % auf der Ebene der Aminosäuren eine hohe Ähnlichkeit zu Rizin auf und zählt wie dieses zu den Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (RIP-II) [14, 15]. Bezüglich der Proteinstruktur besitzen RIPs dieser Klasse zwei funktionell unterschiedliche Domänen: Eine katalytisch aktive A-Kette ist über eine Disulfidbrücke mit der als Lektin wirkenden B-Kette verbunden [16, 17]. Funktionell wird durch die Bindung der B-Kette an terminale Acetylglucosamin- und β-1,4-verknüpfte Galaktosereste auf der Zelloberfläche die Internalisierung und anschließende Endozytose der Toxine eingeleitet [18, 19]. Nachdem die Toxine das Trans-Golgi-Netzwerk erreicht haben, gelangen sie via retrogradem Transport zum endoplasmatischen Retikulum (ER)[20]. Von hier aus erfolgt die Freisetzung der A-Kette ins Zytosol, wo sie ihre RNA-N-Glykosidase-Aktivität entfaltet und unter Depurinierung der 28S rRNA (Adenin A₄₃₂₄) zur irreversiblen Inaktivierung der Ribosomen führt [21]. Dies führt zum Stopp der Proteinbiosynthese und induziert die Apoptose der intoxikierten Zellen und verursacht eine massive Schädigung des betroffenen Gewebes [22].

1.2.2 Shigatoxine als Pathogenitätsfaktoren von EHEC

Die von *Shigella dysenteriae* und *Escherichia coli* produzierten Shigatoxine werden wie Rizin und Abrin als Lektine klassifiziert [23]. Der Aufbau aller Shigatoxin-Holotoxine folgt einer AB₅-Konfiguration, bei der die A-Kette nicht kovalent mit dem Homopentamer der B-Untereinheiten verbunden ist [24]. Als endogene Rezeptoren der Shigatoxine fungieren die membranständigen Globoside Globotriaosylceramid (Gb3) und Globotetraosylceramid (Gb4) [25]. Nach der Rezeptorbindung schließt sich ein zu Rizin und Abrin analoger, molekularer Wirkmechanismus mit retrogradem Transport ins ER und Translokation der A-Kette ins Zytoplasma an [26]. Mit der proteolytischen Spaltung der A-Kette entsteht das katalytisch aktive A1-Fragment, welches die 28S-RNA der Ribosomen an exakt der gleichen Stelle (Adenin A₄₃₂₄) depuriniert wie die beiden Pflanzentoxine [27].

Neben den Shigatoxinen als maßgebliche Pathogenitätsfaktoren trägt das toxinproduzierende Bakterium selbst zum Krankheitsverlauf bei. Durch die Infektion mit Bakteriophagen können die zur Toxinproduktion notwendigen Shigatoxin-codierende Gene (*stx*) in das Genom von verschiedenen Enterobakterien, vor allem *Escherichia coli*, integriert werden [28]. Unter den Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC) befindet sich die Subklasse der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC). Diese erzeugen durch die Anheftung an das Darmepithel und die nachfolgende Ausschüttung bakterieller Effektorproteine charakteristische Läsionen (*attaching and effacing intestinal lesions*, A/E lesions) [29]. Die auf diese Weise gestörte Barrierefähigkeit des Epithels erleichtert es den Shigatoxinen, zu den Gb3-exprimierenden Zielgeweben wie dem intestinalen und renalen Endothel zu gelangen [30]. Im Gegensatz zu Shigellosen, deren Übertragung vor allem fäkal-oral durch kontaminiertes Trinkwasser erfolgt, sind EHEC-Infektionen in der Regel lebensmittelbedingt [31]. Etwa 60 % der infizierten Patienten entwickeln schwerwiegende Verläufe mit anhaltenden blutigen Durchfällen, bei 5-15 % kommt es zur Entwicklung des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS)[32]. Diese vor allem bei Kleinkindern auftretende Komplikation ist geprägt durch eine thrombotische Mikroangiopathie und kann zu akutem Nierenversagen führen [33].

1.2.3 Die Porenbildner CPE und Etx

Clostridium perfringens ist ein Bakterium, das zu intestinalen Infektionen führen kann. In den USA verursacht es eine Million Erkrankungen pro Jahr und ist somit nach Salmonellen der zweithäufigste bakterielle Erreger von Lebensmittelvergiftungen [34]. *C. perfringens* ist ein anaerober Endosporenbildner, der ubiquitär in der Umwelt vorkommt und Teil des humanen Mikrobioms sein kann [35]. Für die Entfaltung der Pathogenität ist das von *C. perfringens* gebildete Spektrum an mehr als 17 verschiedenen Toxinen entscheidend, zu denen CPE und Etx gehören.

Trotz geringer Sequenzähnlichkeit weisen sowohl CPE als auch Etx eine zu Aerolysin ähnliche Struktur auf [36, 37]. Es handelt sich bei der Aerolysin-Familie um β -porenbildende Toxine (β -PFT), die durch Bildung von Transmembranporen zur Schädigung von Zellen führen [36]. CPE und Etx bestehen jeweils aus einer länglich ausgedehnten Einzelstrangpolypeptidkette, welche sich in eine Rezeptorbindungsdomäne und ein

porenformendes Modul gliedert. Beide Proteotoxine werden von *C. perfringens* im Darm des Wirts als lösliche Monomere (30-35 kDa) sezerniert. Anschließend kommt es zur Bindung von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Für CPE ist die Interaktion mit Claudinen (v.a. Claudin-3 und -4 [38]) nachgewiesen, welche Teil der als *tight junctions* bezeichneten parazellulären Barriere von Epithelien sind [39]. Als Rezeptoren für Etx werden das Glykoprotein *Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1* (HAVCR1) [40, 41] und das *Myelin and Lymphocyte* Protein (MAL) [42] diskutiert. Nach der Rezeptorbindung assemblieren die Toxinmonomere zu Hexameren (CPE) bzw. Heptameren (Etx) und bilden so eine an der Zelloberfläche immobilisierte Präpore [36]. Eine nachfolgende Konformationsänderung ermöglicht es den β -hairpins (zwei antiparallel angeordneten β -Faltblättern) der einzelnen Monomere, eine amphiphatische β -Fass-Struktur zu formen. Dieses Strukturmotiv stellt die aktive Pore dar, welche sich in die Lipiddoppelschicht von Zellmembranen integriert. Nachfolgend kommt es zu einem Calcium-Influx und damit über verschiedene Transduktionswege zur Apoptose der Zelle.

Neben CPE und Etx produziert *C. perfringens* weitere krankheitsbestimmende Toxine (u.a. α -Toxin, β -Toxin, ι -Toxin und NetB), auf deren Grundlage *C. perfringens*-Stämme in die Toxinotypen A-G eingeteilt werden [43]. Für *C. perfringens*-Stämme des Typs F wurde durch umfangreiche epidemiologische Studien [44] sowie experimentelle Überprüfung der Koch-Postulate [45] der Nachweis erbracht, dass das Toxin CPE Auslöser der mit diesen Stämmen assoziierten Lebensmittelvergiftung ist. Außerhalb von *C. perfringens* Typ F-Stämmen lässt sich CPE in den Isolaten von Typ C- und D-Stämmen nachweisen [46]. Neben lebensmittelbedingten Erkrankungen ist CPE auch in die Ausbildung von Antibiotika-assoziierten Diarrhöen involviert. Das Toxin verursacht in der Regel milde Diarrhöen, aber auch schwere bis hin zu letalen Verläufen sind beschrieben [47, 48]. Anders als CPE besitzt das von den *C. perfringens*-Stämmen des Typs B und D produzierte Etx kaum Bedeutung in humanpathogenen Krankheitsgeschehen [49]. Es ist vielmehr veterinärmedizinisch relevant für die Pathogenese der Enterotoxämie bei Schafen, Ziegen und seltener bei Kälbern [50, 51]. Nach einer intestinalen Fehlbesiedlung mit Etx-produzierenden *C. perfringens* gelingt es dem Toxin, das Darmepithel zu überwinden und in die Zirkulation zu gelangen. Nachfolgend akkumuliert es präferenziell in der Niere und dem zentralen Nervensystem [52]. Betroffene Tiere zeigen histopathologisch nekrotische Läsionen in Niere und Gehirn, welche sich vor allem in Form neurologischer Symptome wie Krampfanfällen, Immobilität und Hyperästhesien manifestieren [53].

1.3 Herausforderungen beim immunologischen Nachweis der Toxine

Für die Etablierung einer Differentialdiagnostik hinsichtlich der Intoxikation mit den Pflanzentoxinen Rizin und Abrin sind diverse Methoden denkbar. Generell lassen sich molekularbiologische Verfahren zum Nachweis des Toxingens von proteinbiochemischen, auf die Detektion des Toxins abzielenden Methoden unterscheiden. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf den proteinbiochemischen Nachweis der biologischen Toxine. Aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität sind unter den proteinbiochemischen Methoden immunologische Nachweisverfahren weit verbreitet. Die nachfolgenden Ausführungen zeigen Gründe dafür auf, dass insbesondere bei den adressierten Toxinen die proteinbiochemische Detektion überlegen ist und welche Herausforderungen sich bei immunologischen Nachweisverfahren ergeben.

1.3.1 Limitationen von molekularbiologischen Verfahren

Konventionell kommt für den Nachweis bakterieller Infektionen auf Basis der Nukleinsäuren die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) zum Einsatz [54]. Aufgrund des enormen Amplifikationsfaktors gelingt mit der PCR innerhalb weniger Stunden ein hochsensitiver Nachweis [55]. Durch die gezielte Kombination von verschiedenen Primern können mehrere Einzel-PCR in einem Reaktionsansatz zu einer Multiplex-PCR (mPCR) zusammengeführt werden [56]. Die Entwicklung von mPCR-Ansätzen erfordert die *a priori* Festlegung auf bestimmte Zielgene, die mit der Pathogenese eines Krankheitsbildes zusammenhängen. Eine unverzerrte Analyse wird durch metagenomische Methoden wie dem *Next Generation Sequencing* (NGS) und dem *Whole Genome Sequencing* (WGS) gewährleistet. Mit diesen Ansätzen lässt sich sowohl die Erkennung von polymikrobiellen Infektionen, Antibiotikaresistenzen und neuen Pathogenen als auch die epidemiologische Surveillance realisieren [57]. Insbesondere für die hier betrachteten bakteriellen Erreger nehmen die genannten Methoden an Bedeutung zu [58-61], gehören aber aufgrund der anspruchsvollen bioinformatischen Auswertung, der hohen Kosten und des zeitlichen Aufwandes bisher nicht zur Routinediagnostik.

Trotz des hohen diagnostischen und epidemiologischen Potenzials der molekularbiologischen Verfahren weisen diese erhebliche Limitationen auf. Allein der Nachweis des Erregers genügt oft nicht für eine sichere Diagnose. Das Auftreten von bestimmten fakultativ oder opportunistisch pathogenen Bakterien im Gastrointestinaltrakt oder Stuhl kann ohne pathologischen Befund sein. So ist der Nachweis von *C. perfringens* im Stuhl insbesondere älterer Personen beschrieben [12]. Darüber hinaus bildet der Nachweis des Toxingens nur das Potenzial für die Bildung der Toxine ab. Oft unterliegt die Toxinproduktion komplexen Steuerungsprozessen sowie dem Einfluss externer Stimulanzen. Mit der Detektion des Toxingens ist somit nicht die Expression des Toxins selbst erwiesen. Beispiele hierfür sind die Freisetzung von Stx1 und/oder Stx2 aus EHEC nach Induktion der chromosomal integrierten Bakteriophagen [62] und die ausschließliche Bildung von CPE während der Sporulation des Bakteriums [63]. Zusätzlich ist in Betracht zu ziehen, dass biologische Toxine auch in Abwesenheit des genetischen Materials vorliegen können. Zum einen lässt sich bei bioterroristischen Szenarien die Ausbringung von Proteinpräparationen

nicht ausschließen, zum anderen können insbesondere Serumproben frei von bakteriellen Erregern sein. Letzteres tritt bei von *C. perfringens* ausgelösten Enterotoxämien ein [64]. Zuletzt besteht bei Plasmid-codierten Genen wie *cpe* und *etx* die Möglichkeit, dass die extrachromosomale DNA während der Kultivierung oder Isolierung verloren geht [65, 66]. Aufgrund der aufgezeigten Limitationen molekularbiologischer Detektionsverfahren stützt sich diese Arbeit auf den proteinbiochemischen Nachweis für die Etablierung einer Differentialdiagnostik von Rizinintoxikationen.

1.3.2 Anforderungen an den proteinbiochemischen Nachweis der Toxine

Im Fall eines bioterroristischen Szenarios muss die Differentialdiagnostik einen schnellen Nachweis der adressierten biologischen Toxine gewährleisten, um die Bevölkerung schnellstmöglich und effektiv zu schützen. Eine beträchtliche Zeitersparnis ermöglicht die simultane Detektion der in die Differentialdiagnostik eingeschlossenen Toxine. Trotz der kurzen Inkubationszeiten muss der Nachweis durch Schnelldetektionssysteme hochsensitiv erfolgen. Die erforderliche Nachweisempfindlichkeit resultiert aus der hohen Potenz der untersuchten Toxine (Tabelle 1) und den geringen Konzentrationen in potenziellen Proben.

Tabelle 1: Für die Detektion relevante Eigenschaften der in dieser Arbeit adressierten Toxine.

Eigenschaft		Rizin	Abrin	Stx1	Stx2	CPE	EtX
Toxizität LD ₅₀ (µg/kg)	i.v.	2-5 [67]	3,3 [68]	0,2 [69]	0,025 [70]	50 [71]	0,07 [72]
	i.p.	5-7 [73]	2-20 [74]	20 [75]	0,05 [75]	160 [76]	k.A.
	i.g.	2×10 ⁴ [6]	2×10 ⁴ [74]	n.n.* [77]	145 [77]	k.A.	~500 [78]
Subtypen/ Isoformen		D, E [79-81]	a-d [82, 83]	a, c-e [84, 85]	a-i, k [84, 86-88]	eine Variante [78, 89]	keine

i.v. = intravenös; i.p. = intraperitoneal; i.g. = intragastral; k.A. = keine Angaben in der Literatur; LD₅₀ = halbmaximale letale Dosis; n.n. = nicht nachweisbar

*bei oraler Gabe von 157 µg Stx1a konnte bei BALB/c-Mäusen keine Letalität festgestellt werden

Die Detektion der toxischen Agenzien aus komplexen Proben erfordert außerdem ein hohes Maß an Selektivität, um einen robusten Nachweis ohne Interferenzen mit der Probenmatrix zu garantieren. Bei bioterroristischen Anschlägen sind toxinkontaminierte Lebensmittel, Umweltproben oder klinische Proben denkbar. Im Rahmen akzidenteller Vergiftungsfälle mit Rizin und Abrin kommen oft klinische Proben in Frage. Gleiches gilt für gastrointestinale Infektionen mit *C. perfringens* oder EHEC, da die Shigatoxine, CPE und EtX erst im Darm gebildet werden und nicht präformiert im Lebensmittel vorliegen.

Die strukturelle Variabilität einiger adressierter Toxine verleiht der Thematik zusätzliche Komplexität. Eine sichere Differentialdiagnose lässt sich nur durch eine breitbandige Detektion mit Erfassung aller auftretender Subtypen bzw. Isoformen gewährleisten. In dieser Hinsicht bildet die Familie der Shigatoxine die strukturelle Diversität gut ab (Tabelle 1). Die immunologisch differenten Typen Stx1 und Stx2 sind nur etwa zu 50 - 60 % homolog zueinander. Stx1 und Stx2 selbst lassen sich aufgrund ihrer genetischen Diversität in Subtypen einteilen [84]. Für Stx1 sind die Subtypen Stx1a, c, d und e beschrieben [84, 85].

Stx1a, c und d sind mit Aminosäuresequenzidentitäten zwischen 95 und 98 % wenig variabel [84]. Mit etwa 13 % abweichender Sequenz auf Nukleinsäureebene zeigt der aus *Enterobacter cloacae* isolierte Subtyp Stx1e die geringste Homologie zu den anderen Stx1-Subtypen [90]. Stx2 untergliedert sich in zehn verschiedene Subtypen: Stx2a-i und k [84, 86-88]. Hohe Ähnlichkeit besteht dabei zwischen den Subtypen Stx2a, c und d. Sie sind in 97,5 - 98,8 % ihrer Aminosäuresequenz identisch [88]. Die anderen Subtypen teilen mindestens 89 % der Aminosäuresequenz untereinander. Eine Ausnahme stellt Stx2f dar. Mit 65,7 bis 72 % Identität in der Aminosäuresequenz weicht dieser Subtyp deutlich von den anderen ab und zeigt die größte Homologie zu Stx2e. Obwohl epidemiologische Studien zunächst vermuten ließen, dass vor allem Stx1a, Stx2a, Stx2c und Stx2d von größter Relevanz für humane Erkrankungen sind [23, 91, 92], wurden in den letzten Jahren zunehmend auch Stämme mit den Subtypen Stx2e und Stx2f isoliert [93-96]. Demensprechend ist eine breitbandige Detektion zwingend erforderlich, da potenziell alle Subtypen klinisch relevant sein können.

Auch die Pflanzentoxine Rizin und Abrin kommen in verschiedenen Isoformen vor. Rizin tritt in den Isoformen D und E auf, deren A-Ketten identisch und B-Ketten stark homolog (97 % Sequenzidentität) sind. Für Abrin sind die Isolektine Abrin-a bis -d beschrieben, welche eine Sequenzidentität von 78 % auf der Aminosäureebene aufweisen. Die bisherige Datenlage zu dem Porenbildnern CPE und Etx spricht dafür, dass es sich jeweils um strukturell homogene Toxingruppen handelt. Derzeit ist nur eine von *C. perfringens*-Typ-D-Stämmen produzierte CPE-Variante beschrieben, die um zehn Aminosäuren von dem klassischen CPE-Protein abweicht [89]. Für Etx liegen derzeit keine Hinweise vor, dass strukturelle Varianten des Toxins existieren.

1.3.3 Immunologische Nachweismethoden für biologische Toxine

Der proteinbiochemische Nachweis von biologischen Agenzien greift oft auf immunologische Nachweisverfahren zurück. Diese Verfahren beruhen auf der Antigen-Antikörper-Interaktion, bei der eine spezifische Bindungsregion des Antikörpers (Paratop) mit dem zugehörigen Epitop des Antigens in Wechselwirkung tritt. Zu diesem Zweck können sowohl polyklonale Antikörper mit heterogenen Epitopspezifitäten oder gegen ein Epitop gerichtete, monoklonale Antikörper eingesetzt werden. Ein weit verbreitetes Assayprinzip stellt der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dar, bei dem die Anwesenheit des Antigens kolorimetrisch durch den enzymatischen Umsatz eines Substrats nachgewiesen wird [97]. Im Falle eines Sandwich-ELISA immobilisiert ein Fängerantikörper dabei das lösliche Antigen aus der Probe und ein markierter, mit dem Enzym interagierender Detektionsantikörper dient zum Nachweis. Aufgrund der einfachen Durchführung und des verhältnismäßig geringen zeitlichen Aufwandes gelten ELISA-basierte Detektionsverfahren in vielen Laboren als Routinediagnostik. Insbesondere mit ELISA im Sandwich-Format lassen sich hervorragende Sensitivitäten erreichen (Tabelle 2). Die bisher publizierten Detektionslimits für den Nachweis der adressierten Toxine erreichen je nach verwendetem Antikörper den einstelligen pg/ml-Bereich [185-188].

Für einige der vorliegenden biologischen Toxine sind Methoden etabliert, die sich gegenüber dem Einzelnachweis im ELISA durch eine simultane Detektion verschiedener Toxine auszeichnen. Solche

Multiplex-Nachweise sind für Rizin, Abrin und die Shigatoxine in Form von Suspensionsarrays beschrieben, die auf der Luminex-Technologie basieren [98-100]. Bisher existieren keine Detektionssysteme, die den simultanen Nachweis aller hier untersuchten Toxine ermöglichen. Andere ELISA-basierte Verfahren bieten aufgrund alternativer Erfassung der Messsignale gesteigerte Sensitivitäten. So lassen sich mit dem Ansatz der Immuno-PCR aufgrund des hohen Amplifikationsfaktors z.B. für Rizin Detektionslimits von 10 fg/ml [101] und für Stx2 von 10 pg/ml [102] erzielen. Gegenüber dem ELISA zeichnen sich *Lateral Flow Assays* (LFA) durch niedrige Inkubationszeiten von maximal 20 Minuten und eine sehr leichte Handhabung aus. Insgesamt gehen die verkürzten Assayzeiten mit um den Faktor 10 bis 1000 verringerten Sensitivitäten einher. Für die etablierten LFAs zum Nachweis der vorliegenden Toxine wurden größtenteils gute Sensitivitäten von bis zu 0,1 ng/ml beschrieben [103-105]. Limitationen liegen in Form von Kreuzreaktivitäten z.B. beim Rizinnachweis gegenüber *Ricinus communis Agglutinin* [106] oder unvollständiger Subtyperkennung der Shigatoxine [104] vor.

Tabelle 2: Gegenüberstellung verschiedener immunologischer Detektionsverfahren.

Methode	ELISA	Suspensionsarray (Luminex)	iPCR, CLIA / RIA (altern. Readouts)	LFA
Vorteile zum ELISA:		Multiplex	Sensitivität, Schnelligkeit	Schnelligkeit, Einfachheit
Toxin	Publizierte Detektionslimits			
Rizin	2 - 300 pg/ml [98, 106-108]	0,01 - 2 ng/ml [98, 109]	10 fg/ml, 0,002 - 14 µg/ml [101, 110-113]	1 - 20 ng/ml [106, 114]
Abrin	0,01 - 1 ng/ml [115-117]	30 - 500 ng/ml [98, 99]	k.A. [118]	0,1 - 3 ng/ml [103, 119]
Stx1 & Stx2	10 - 50 pg/ml Stx1: [116], Stx2: [120] Stx1 und 2: [121, 122]	10⁴ - 10⁵ CFU/ 100 µl [100]	10 pg/ml (Stx2) [102]	0,1 - 75 ng/ml [104, 123, 124]
CPE	0,001 - 1 ng/ml [125, 126]	k.b.	1 pg/ml [127]	1 µg/ml [128]
Etx	0,005 - 2 ng/ml [105, 129, 130]	k.b.	k.b.	100 pg/ml [105]

CLIA = Chemilumineszenz-Immunoassay; ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*; k.A. = keine Angaben; k.b. = keine beschrieben; LFA = *Lateral Flow Assay*; RIA = Radioimmunoassay

1.3.4 Monoklonale Antikörper als unverzichtbare Nachweisreagenzien

Für die beschriebenen ELISA-Verfahren hat sich insbesondere der Einsatz von monoklonalen Antikörpern bewährt, da mit den zugrundeliegenden Immunoassays ein hochselektiver und hochsensitiver Nachweis gelingt. Die monospezifische Erkennung eines Epitops geht auf die Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach der Hybridomtechnologie [131] zurück (Abbildung 2).

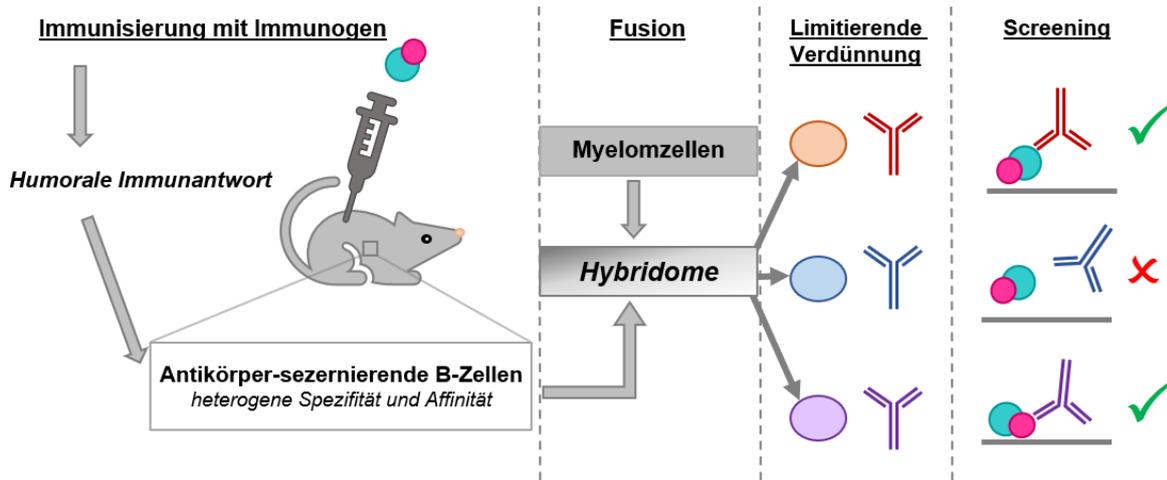


Abbildung 2: Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridomtechnologie.

Die Immunisierung von Mäusen mit einem definierten Antigen induziert eine humorale Immunantwort, bei der aktivierte B-Zellen Antikörper verschiedener Affinität und Spezifität gegen das applizierte Antigen produzieren. Die Fusion von B-Zellen mit Myelomzellen führt zu immortalisierten Hybridomen. Diese werden durch limitierende Verdünnung vereinzelt, sodass monospezifische Zellklone erhalten werden. Dabei kann es sich um Antikörper handeln, die verschiedene Epitope des Antigens binden (rot, lila) oder die nicht für das Antigen spezifisch sind (blau). Daraus resultiert eine Antigen-Antikörper-Bindung (✓) bzw. keine Bindung (×). Die Selektion von monoklonalen Antikörpern mit geeigneten Bindungseigenschaften erfolgt im Rahmen eines Screenings mit immunologischen und biochemischen Methoden.

Es erfolgt zunächst die Immunisierung von Mäusen mit einem definierten Immunogen, welches eine humorale Immunantwort hervorruft. Im Rahmen dieser Immunreaktion sezernieren aktivierte B-Zellen eine heterogene Mischung an Antikörpern, die verschiedene Epitopspezifitäten und Affinitäten gegenüber dem Antigen aufweisen. Aus der Milz des immunisierten Tiers entnommene Splenozyten werden anschließend mit Myelomzellen zu immortalisierten Hybridomen fusioniert. Die Fusion der Zellmembranen kann dabei mit Hilfe des stark hygroskopischen Polymers PEG (spontane Fusion durch engen Zellkontakt) oder durch Permeabilisierung mit elektrischen Pulsen (Elektrofusion) vorgenommen werden. Aufgrund ihrer natürlicherweise begrenzten Lebensfähigkeit sterben nichtfusionierte Milzzellen schnell ab. Den Myelomzellen fehlt dagegen die Fähigkeit, das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) zu exprimieren, welches die Wiederverwertung von Hypoxanthin (Purinderivat) und Guanin (Purinbase) ermöglicht (*salvage pathway*). Dieser Enzymdefekt verhindert ihr Überleben in einem Selektionsmedium. In dieser Arbeit kam das AH-Medium mit Azaserin und Hypoxanthin zum Einsatz [132]. Das enthaltene Azaserin blockiert dabei die de-novo-Synthese von Purinbasen. Dadurch müssen die Zellen über den *salvage pathway* das ebenfalls zugegebene Hypoxanthin für die Aufrechterhaltung ihres Purinstoffwechsels verwerten. Dies gelingt nur den Hybridomen, die das HGPRT-Gen während der Zellfusion von Milzzellen erhalten haben. Nach der selektiven Kultivierung der Hybridome werden diese durch limitierende Verdünnung vereinzelt und mit Hilfe immunologischer Methoden auf die erforderliche Antikörperspezifität hin ausgewählt. Am Ende dieses Prozesses steht jeweils ein Hybridom, das sich als Klon von einer einzigen B-Zelle ableitet und demnach Antikörper mit monospezifischer Epitoperkennung produziert.

1.4 Evaluation endogener Rezeptoren als alternative Fängerstrukturen für die breitbandige Detektion biologischer Toxine

Für Antigene mit geringer struktureller Diversität wie beispielsweise CPE und Etx eignen sich monoklonale Antikörper hervorragend als Nachweisreagenzien. Die Ausbildung von Subtypen mit Mutationen im Epitop kann zum Verlust der Bindungsfähigkeit monoklonaler Antikörper und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen. Eine breitbandige Erkennung verschiedener Toxin-Subtypen mit struktureller Variabilität könnte mit dem Einsatz der endogenen Rezeptoren adressiert werden. Diese Strategie baut darauf auf, dass alle Toxinvarianten unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz zur Entfaltung der *in vivo* Toxizität an ihren endogenen Rezeptor binden müssen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zielten darauf ab, die endogenen Rezeptoren für den Nachweis der adressierten Toxine einzusetzen. Zu diesem Zweck fungierten die Rezeptoren im Format eines Sandwich-ELISA anstelle des monoklonalen Fängerantikörpers als Fängerstrukturen. Die Detektion erfolgte mit einem markierten, monoklonalen Detektionsantikörper. Vergleichend zu dieser geplanten Rezeptor-basierten Nachweisstrategie wurden klassische, auf zwei monoklonalen Antikörpern basierende Sandwich-ELISA entwickelt.

Die Auswahl potenziell geeigneter Rezeptorstrukturen für den Nachweis der biologischen Toxine erfolgte auf der Basis von Literaturdaten. Tabelle 3 gibt eine Übersicht zu den endogenen Rezeptoren, die in dieser Arbeit als innovative Fängerstrukturen zum Nachweis der untersuchten Toxine analysiert wurden. Unter den endogenen Rezeptoren befinden sich sowohl Proteine als auch Glykosphingolipide und somit Moleküle mit höchst unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften. In der Literatur fanden sich Hinweise, dass sich die Lipidumgebung auf einige Rezeptor-Toxin-Interaktionen auswirkt. Zusätzlich sind die Konformation und Funktionalität von Transmembranproteinen oft an die Anwesenheit einer membranähnlichen Umgebung gekoppelt. Zur Modellierung einer solchen Membranumgebung eignen sich Nanodisks. Die verfügbare Datenlage zu den einzelnen Rezeptoren und das Prinzip von Nanodisks wird nachfolgend dargelegt.

Tabelle 3: Überblick über die Rezeptorinteraktionen der adressierten Toxine.

Toxin/e	Rezeptor/en	Klassifizierung des Rezeptors	Lipidumgebung	Referenzen
Rizin und Abrin	Asialo-GM1	GSL	k.A.	[133-135]
	Asialofetuin	Glykoprotein	k.A.	[19, 135, 136]
Stx1 und Stx2	Gb3 (und Gb4)	GSL	ähnlich zu <i>Lipid Rafts</i> , Zusatz von GSL wie Galaktosylceramid	[137-140]
CPE	Claudin-4	Transmembranprotein	k.A.	[141, 142]
Etx	MAL	Transmembranprotein	komplex, ähnlich zu <i>Lipid Rafts</i>	[42]

GSL = Glykosphingolipide; k.A. = keine Angaben; MAL = Myelin and Lymphocyte Protein

1.4.1 Rizin und Abrin binden terminale Galaktosereste

Rizin und Abrin weisen ein sehr ähnliches Bindungsmuster auf. Unter den Monosacchariden zeigen sie eine starke Präferenz für Galaktose (Gal) und Galaktosamin (GalNAc) [143], welche ubiquitär auf der Zelloberfläche vorkommen. Die Bindung kann sowohl an Glykoproteine als auch an Glykosphingolipide (GSL) erfolgen. Bei Letzteren handelt es sich um Bestandteile der Zellmembran, welche über ein in der Membran verankertes, hydrophobes Ceramid und ein daran glykosidisch verknüpftes Oligosaccharid verfügen (Abbildung 3). Das Ceramid setzt sich aus einem Sphingosin und einer variablen Fettsäure zusammen. Für Rizin wurde unter einer Bandbreite an GSL die stärkste Bindung an Asialo-GM1 festgestellt [133-135], welches ein Derivat des Gangliosids GM1 ohne Sialinsäurereste ist. Ganglioside zeichnen sich durch komplex zusammengesetzte Oligosaccharide aus, die mindestens eine Sialinsäure wie z.B. N-Acetylneuraminsäure enthalten. Diese Sialinsäuren verleihen den Kopfgruppen anionischen Charakter. Abgesehen von wenigen Ausnahmen binden Rizin und Abrin besser an nicht sialysierte Oligosaccharide, da Sialinsäuren zur Maskierung der erkannten Glykotope führen [143]. So ging aus den umfangreichen Untersuchungen zu Rizin hervor, dass eine Bindung des nicht sialysierten Oligosaccharids (Gal- β 1 \rightarrow 3-GalNAc- β 1 \rightarrow 4-Gal- β 1 \rightarrow 4-Glc-Cer) von Asialo-GM1 gegenüber der sialysierten Form von GM1 präferiert wird.

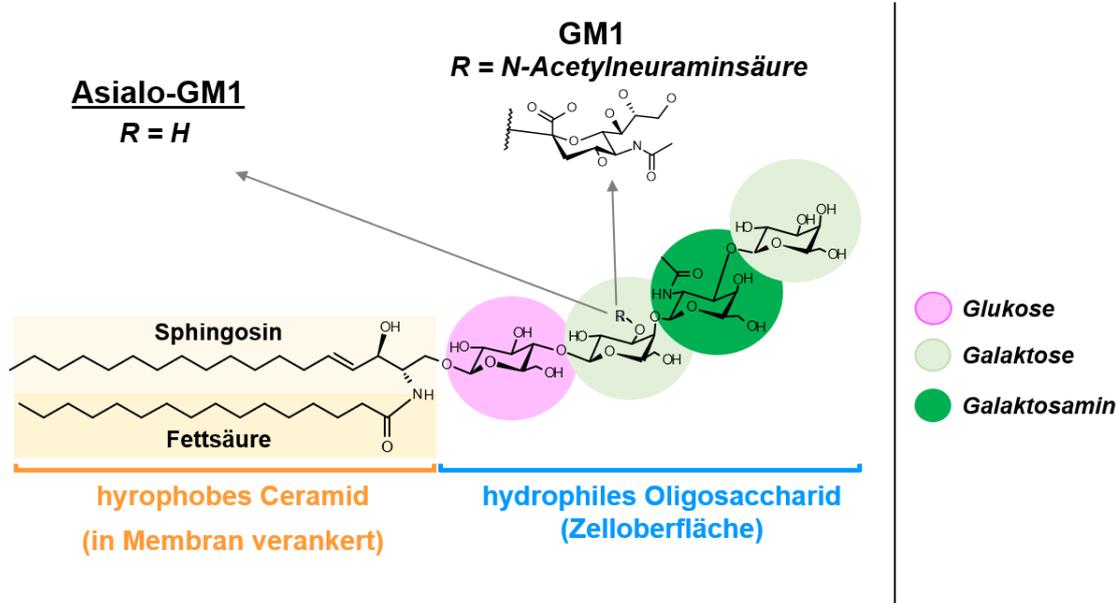


Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Asialo-GM1 und GM1.

Die Glykosphingolipide Asialo-GM1 und GM1 setzen sich aus einem hydrophoben Ceramid (orange) und komplexen Oligosacchariden zusammen und unterscheiden sich in einem Rest „R“. Die zum Oligosaccharid verknüpften Monosaccharide sind als farbige Kreise dargestellt. Die chemischen Strukturen wurden anhand der PubChem-Einträge CID 20057297 (GM1) und CID 6450363 (Asialo-GM1) mit der Software Accelrys Draw (Symyx Technologies, Santa Clara, USA) erstellt.

Rizin und Abrin besitzen jeweils zwei Kohlenhydratbindungstaschen [144-146]. Eine hochaffine Interaktion an Oligosaccharide ist nur möglich, wenn die Lektine unter Nutzung beider Bindungstaschen bivalent binden. Zu diesem Zweck muss der Abstand zwischen den Galaktoseresten genau so groß sein, dass beiden Bindungstaschen eine Interaktion ermöglicht wird. Diese Anforderung erfüllt das Glykoprotein Asialofetuin. Für Rizin und Abrin wurde eine starke Bindung an die o-glykosidisch verknüpften Kohlenhydrate des Proteins ermittelt [136, 143]. Bisher wurden nur für Rizin kinetische Bindungsdaten

ermittelt, in denen eine Affinität von etwa 30-50 nM zu Asialofetuin festgestellt wurde [135, 147]. Diese hohe Affinität ist auf die Verteilung der insgesamt 12 terminalen Galaktosereste auf der Oberfläche des Proteins zurückzuführen [148], von denen drei endständig verknüpft in Disacchariden (Abbildung 4, A) und weitere neun innerhalb von drei komplexen, triantennären Oligosacchariden vorliegen (Abbildung 4, B).

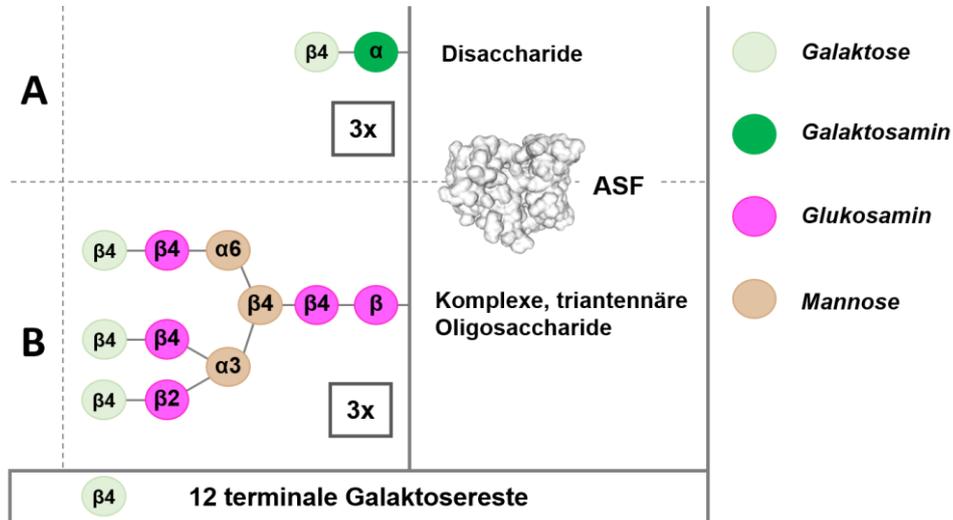


Abbildung 4: Organisation der terminalen Galaktosereste in Asialofetuin.

Das Glykoprotein Asialofetuin (ASF) besitzt insgesamt 12 terminale Galaktosereste, die in Disacchariden (**A**) und komplexen, triantennären Oligosacchariden (**B**) vorkommen. Die farbigen Kreise symbolisieren die jeweiligen Monosaccharide. Griechische Buchstaben mit Zahlen geben die glykosidische Verknüpfung der Zucker an (z.B.: steht β4 für eine β1→4-Verknüpfung zum rechts davon stehenden Monosaccharid). Die Abbildung ist angelehnt an Dill et al [147].

1.4.2 Globoside als gemeinsame Rezeptoren der Shigatoxine

Trotz ihrer genetischen Diversität zeigen Stx1 und Stx2 ähnliche Eigenschaften in der Rezeptorbindung. Die zu einem Homopentamer assemblierten B-Untereinheiten agieren in beiden Holotoxinen als Lektine und vermitteln die Bindung an die Globoside Gb3 und Gb4 [149-152]. Globoside gehören wie Asialo-GM1 zur Klasse der Glykosphingolipide und setzen sich aus einem Ceramid und neutralen Oligosacchariden zusammen (Abbildung 5). Gb3 wird vor allem auf der Oberfläche von intestinalen, renalen und neuronalen Endothelzellen exprimiert [153].

Das Ceramid in Gb3 ist β-glykosidisch mit einem als P^K-Antigen bezeichneten Trisaccharid (Gal-α1→4-Gal-β1→4-Glc-Cer) verbunden. Gb4 weist an Stelle des Trisaccharids ein um das Monosaccharid Galaktosamin erweitertes Tetrasaccharid (GalNac-β1→3-Gal-α1→4-Gal-β1→4-Glc-Cer) auf, welches auch P-Antigen genannt wird [154].

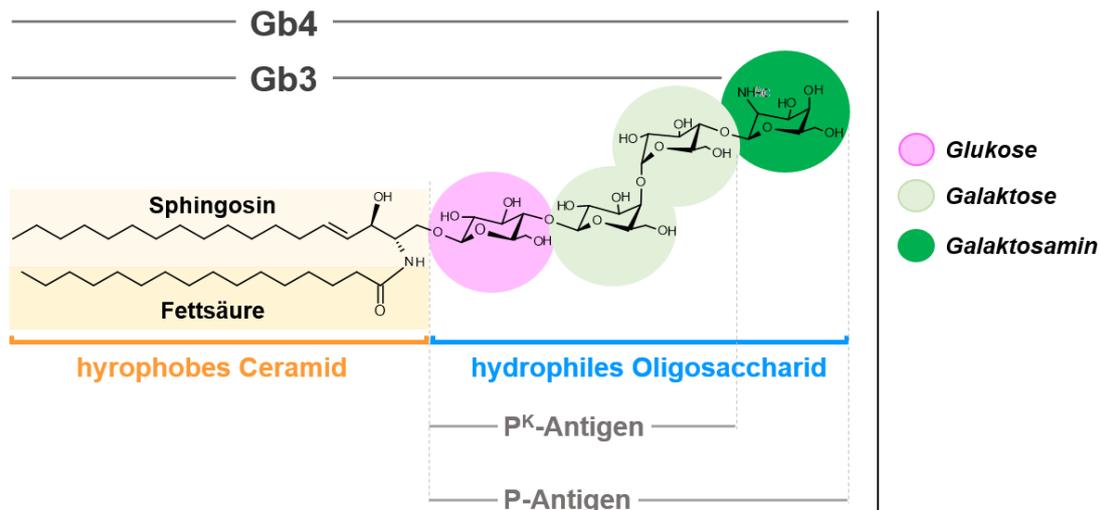


Abbildung 5: Struktur der Globoside Gb3 und Gb4.

Die Globoside Gb3 und Gb4 bestehen aus einem mit einem komplexen Oligosaccharid verknüpften hydrophoben Ceramid. Für Gb3 wird das Oligosaccharid als PK-Antigen und für Gb4 als P-Antigen bezeichnet. Die zum Oligosaccharid verknüpften Monosaccharide sind als farbige Kreise dargestellt. Die chemischen Strukturen wurden anhand der PubChem-Einträge CID 66616222 (Gb3) und CID 86583361 (Gb4) mit der Software Accelrys Draw (Symyx Technologies, Santa Clara, USA) erstellt.

Die Röntgenstrukturanalysen von Co-Kristallen der Shigatoxine mit PK-Derivaten verdeutlichten, dass drei Bindungsstellen pro B-Untereinheit und somit 15 potenzielle Lektinbindungsstellen innerhalb des Holotoxins für die Interaktion mit Gb3 bereitstehen [137, 138, 155]. Erst die Präsentation von Gb3 in einer geeigneten Lipidumgebung ermöglicht es den Shigatoxinen, multivalent und damit hochaffin an den Rezeptor zu binden [156]. Es wurde gezeigt, dass die Bindung und Internalisierung der Shigatoxine mit der Anwesenheit von detergentenresistenten Membran-Mikrodomänen (*lipid rafts*) assoziiert ist [157, 158]. *Lipid rafts* sind definiert als 10-200 nm große Membranabschnitte, die sich durch hohe Konzentrationen an Cholesterol, Glykosphingolipiden und Sphingomyelin auszeichnen [159].

1.4.3 CPE bindet spezifisch an Claudine aus *tight junctions*

Für CPE ist eine spezifische Bindung an die zellständigen Claudine beschrieben. Claudine sind Bestandteil der Zell-Zell-Verknüpfungen (*tight junctions*) und mitverantwortlich für die Barrierefunktion von Epithelien [160]. Es handelt sich um eine Familie von 21-27 kDa großen Proteinen, die die Membran mit vier Transmembrandomänen durchspannen [161, 162]. Außerhalb der Membran liegen die zwei extrazellulären Schleifen (EZS1 und EZS2) und die intrazellulär lokalisierten C- und N-Termini. Unter den 27 humanen Claudin-Isoformen [163] zeigt CPE die stärkste Interaktion mit Claudin-4 und eine etwas schwächere mit Claudin-3 [141, 142]. Zusätzlich sind Claudin-6, -7, -8, -9 und -14 als niedrigaffine CPE-Rezeptoren beschrieben [38]. Innerhalb der Transmembranproteine vermitteln die EZS1 und EZS2 Wechselwirkungen mit der Bindungstasche von CPE (Abbildung 6).

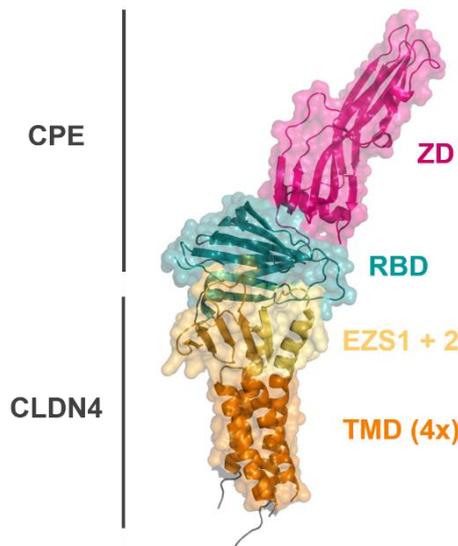


Abbildung 6: Bindung von CPE an Claudin-4.

CPE setzt sich aus einer zytotoxischen Domäne (ZD, pink) und einer Rezeptorbindungsdomäne (RBD, türkis) zusammen. Letztere interagiert über die RBD mit den extrazellulären Schleifen 1 und 2 (EZS1+2, gelb) des Transmembranproteins Claudin-4 (CLDN4). Dieses ist über seine vier Transmembrandomänen (TMD, orange) in der Membran verankert. Zur Visualisierung dienten folgende PDB-Einträge: 5B2G (CLDN4, RBD) & 3AM2 (CPE).

1.4.4 MAL als potenzieller Rezeptor für Etx

Für Etx liegen bisher nur wenige Daten zur Rezeptorbindung vor. Das Toxin zeigt charakteristische Bindungspräferenzen, die auf die gewebe- bzw. zellspezifische Expression eines Rezeptors zurückzuführen sein könnten. So überwindet es die Blut-Hirn-Schranke und schädigt spezifisch myelinhaltige, neuronale Zellen wie Oligodendrozyten [164-166]. In Analogie zu dem homologen Toxin Aerolysin wurde für Etx eine Bindung an *lipid rafts* beschrieben [167]. Diese spezielle Membranzusammensetzung mit hohen Konzentrationen an Cholesterol und Sphingomyelin verstärkt die Bindung von Etx an die Zelloberfläche. Weitere Untersuchungen bestätigten, dass die Zusammensetzung und die daraus resultierende Fluidität der Lipidumgebung komplexe Einflussfaktoren für die Rezeptorbindung von Etx sind [168-170].

Interessanterweise sind nur wenige Etx-sensitive Zelllinien beschrieben, die wiederum ausschließlich renalen Ursprungs sind [40, 171-173]. Die höchste Sensitivität weisen canine Epithelzellen aus dem distalen Nierentubulus (*Madin-Darby Canine Kidney*, MDCK) auf [173].

Aus diesen empirischen Beobachtungen leiten sich die beiden für Etx angenommenen Proteorezeptoren *Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1* (HAVCR1) [40] und *Myelin and Lymphocyte Protein* (MAL) ab [42, 174]. Da die Transfektion von HAVCR1 in natürlicherweise Etx-resistenten HEK-Zellen (HEK = *Human Embryonic Kidney*) keine Suszeptibilität gegenüber dem Toxin herstellte, bleibt die Rolle dieses Proteins als endogener Rezeptor fragwürdig. Für MAL gelang eine überzeugendere Darstellung: So überlebte eine MAL-Knockout-Maus eine um den Faktor 1000 gesteigerte Toxindosis, die beim Wildtyp Symptome verursachte [42]. Bei MAL handelt es sich um ein 17 kDa großes Proteolipid, das als Tetraspanin in *lipid rafts* vorkommt [175-178]. Es ist für die Organisation und Aufrechterhaltung dieser Glykosphingolipid-angereicherten Mikrodomänen zuständig und ist am Transport von Proteinen beteiligt [179]. Eine direkte Interaktion mit Etx konnte weder für MAL, noch für HAVCR1 gezeigt werden. Da in Vorversuchen eines Projektpartners innerhalb des SensTox-Projektes (Andreas Rummel, MHH) vielversprechende Ergebnisse

für die Interaktion von Etx mit MAL erhalten wurden, fokussieren sich hier die Untersuchungen auf MAL als potenziellem Rezeptor für Etx.

1.4.5 Funktionalisierung von Rezeptoren in Nanodisks

Unter den zuvor beschriebenen endogenen Rezeptoren (Kapitel 1.4.1 bis 1.4.4) der adressierten biologischen Toxine lagen mit den Glykosphingolipiden (Asialo-GM1, Globoside Gb3 und Gb4) sowie den Transmembranproteinen MAL und Claudin-4 biochemische Strukturen vor, die aufgrund ihrer Hydrophobizität eine eher mäßige Löslichkeit in wässrigen Lösungen und damit eine schlechte Handhabbarkeit aufweisen. Die Solubilisierung von Transmembranproteinen gelingt zwar auch mit Hilfe von Detergenzien, diese können aber eine artifizielle Proteinfaltung und so einen Aktivitätsverlust verursachen. Zusätzlich ist insbesondere für MAL bzw. die Globoside Gb3 als Rezeptoren von Etx bzw. den Shigatoxinen beschrieben, dass die Lipidumgebung einen wichtigen Beitrag zur Bindung an die entsprechenden Toxine leistet [156-158, 167]. Aus den aufgeführten Gründen war es wichtig, diese endogenen Rezeptoren in eine gut lösliche Form zu überführen und sie vor allem für eine optimale Funktionalität in einer membranähnlichen Lipidumgebung zu präsentieren. Zu diesem Zweck dienen in dieser Arbeit Nanodisks.

Nanodisks sind diskoidale Lipiddoppelschichten, die durch zwei Kopien des helikalen Gürtelproteins *Membran Scaffold Protein* (MSP) zusammengehalten werden. Die Herstellung dieser Modellmembranen (Abbildung 7) erfolgt durch die graduelle Entfernung eines Detergenzes aus einer solubilisierten Mischung von Phospholipiden, Rezeptoren und MSP [180, 181]. Aufgrund der Tendenz der Phospholipide, Doppelschichten zu formen, und des amphiphilen Charakters des Gürtelproteins kommt es zur spontanen Assemblierung der Nanodisks. Durch die starke Interaktion zwischen Lipiden und MSP entstehen stabile Lipoproteinpartikel von kontrollierter, homogener Größe [182]. Die Länge des Gürtelproteins MSP definiert dabei den Durchmesser der assemblierten Nanodisks, der 6-17 nm betragen kann [182].

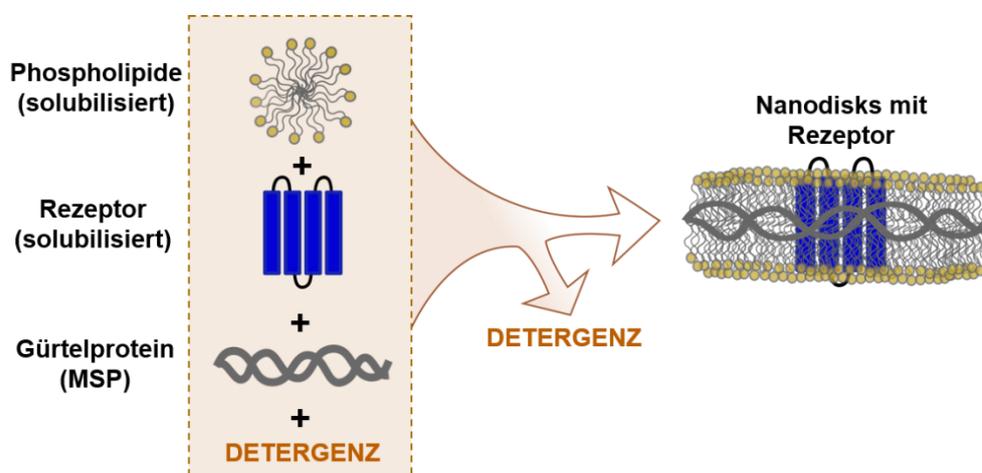


Abbildung 7: Spontane Assemblierung von Nanodisks.

Phospholipide, ein Rezeptor (blau) und das Gürtelprotein MSP (grau) werden zusammen durch ein Detergenz (braun) solubilisiert. Durch die graduelle Entfernung des Detergenzes kommt es zur spontanen Assemblierung von Nanodisks, in die der Rezeptor integriert ist.

Neben der besseren Handhabbarkeit und dem Funktionserhalt der endogenen Rezeptoren bieten Nanodisks den Vorteil, dass sie sich aufgrund der Gürtelproteine über deren Proteintags (z.B. His-Tag) immobilisieren lassen. Diese Eigenschaft ermöglicht insbesondere die Interaktionsanalyse von Glykosphingolipiden mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR). Borch *et al.* untersuchten zum Beispiel die Bindung von Cholera toxin an in Nanodisks integriertes GM1 mit Hilfe von SPR-Messungen [183]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Nanodisks dazu dienen, die Bindungskinetik der beschriebenen Glykosphingolipide und der Transmembranproteine an die entsprechenden Toxine mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte die Immobilisierung von in Nanodisks integrierten Fängerstrukturen auf Goldelektroden eines Vor-Ort-Detektionssystems und für stationäre ELISA auf Mikrotiterplatten erprobt werden.

1.5 Vor-Ort-Detektion biologischer Toxine

Die Etablierung der Rezeptor-basierten und Antikörper-basierten ELISA-Systeme erfolgte zunächst in Form konventioneller Platten-basierter, stationärer Nachweise. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die stationären Nachweise in eine Vor-Ort-Detektionsplattform zu überführen. Zu diesem Zweck war ein Schnelldetektionssystem mit einfacher Handhabung erforderlich, um im Falle eines bioterroristischen Anschlags eine erste Einschätzung der Gefahrenlage durch die zuständigen Einsatzkräfte zu ermöglichen. Obwohl die Vor-Ort-Detektionsverfahren in der Regel nur eine Ja-Nein-Aussage hinsichtlich der Exposition mit biologischen Toxinen liefern (Abbildung 8), müssen sie für einen Nachweis ausreichend sensitiv und spezifisch sein. Durch den Einsatz von Schnelldetektionsverfahren ist eine umgehende Einleitung von Schutzmaßnahmen möglich. Für eine weiterführende und umfassende Analytik werden die Verdachtsproben in ein Expertenlabor transportiert. Hier erfolgt eine präzise Charakterisierung des potenziell toxischen Materials mit Hilfe unterschiedlicher Methoden. Die Untersuchungen haben zum Ziel, die Probe qualitativ (Identität, Zusammensetzung, biologische Aktivität) und quantitativ zu analysieren. Mit Ergebnissen aus einer massenspektrometrischen Analytik (MS), funktionellen Testungen und hochsensitiven immunologischen Verfahren ergibt sich ein detailliertes Bild zu Art und Umfang der Exposition mit dem toxischen Agens. Eine solche Analytik wurde im Rahmen eines Leistungstests verschiedener Expertenlabore durchgeführt und beschreibt das exemplarische Vorgehen anhand von Rizin-Verdachtsproben [184]. In ihre Untersuchungen schlossen die Autoren auch die Prüfung von Vor-Ort-Detektionssystemen ein. Hier überzeugte der portable Toxindetektor (pTD, Analytik Jena; Bruker Daltonik, Leipzig) mit einer zuverlässigen Detektion der verblindeten Verdachtsproben. Diese robuste Schnelldetektionsplattform für den simultanen Nachweis biologischer Agenzien wurde daher auch für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

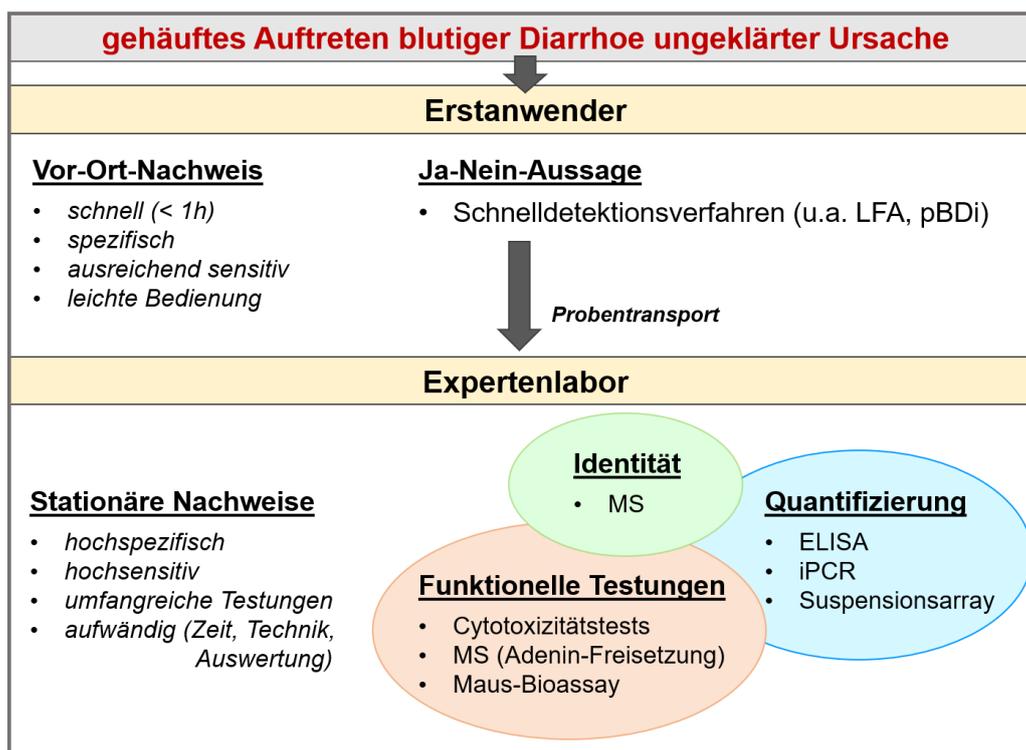


Abbildung 8: Ablauf der Analytik von potenziell toxischen Proben.

Dargestellt ist das Zusammenwirken von Vor-Ort- und stationären Nachweismethoden im Fall eines ungeklärten Auftretens von blutigen Diarrhöen, bei denen ein intentionaler Ausbringungsversuch mit biologischen Toxinen nicht ausgeschlossen werden kann.

Der pTD bzw. der weiterentwickelte, von der Firma Bruker Daltonik GmbH hergestellte *portable BioDetector integrated* (pBDi) ist eine elektrochemische, Biochip-basierte Detektionsplattform, mit der bis zu sechs Analyten in Doppelbestimmung simultan untersucht werden können. Die Messung kann u.a. im ELISA-Format ausgeführt werden. Aufgrund der vollautomatischen Probenprozessierung und Datenauswertung eignet sich die Plattform für die Anwendung durch Erstanwender ohne biologische oder chemische Ausbildung.

Das Gerät (A) und seine Funktionsweise (B, C) sind in Abbildung 9 dargestellt [185, 186]. Die Grundlage bildet ein Silizium-Chip mit 16 verschränkten Goldelektroden (Abbildung 9 B). Die Immobilisierung von Zielstrukturen auf den Elektroden erfolgt durch Physisorption, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Goldoberfläche und schwefelhaltigen Thiolgruppen des Proteins vermittelt wird. Es handelt sich um eine Plattform, in der sowohl Antikörper als auch endogene Rezeptoren (sofern sie cysteinhaltig sind) als Fängerstrukturen untersucht werden können. Neben der direkten Physisorption der Rezeptoren besteht die Möglichkeit, diese in Nanodisks integriert über eine cysteinhaltige MSP-Variante (siehe 1.4.5) zu immobilisieren. Letztere Option stellt die Basis für die Immobilisierung der GSL-Rezeptoren in diesem System dar, da bisher für die verwendeten Zielstrukturen keine Thiol-haltigen Varianten beschrieben sind. Zusätzlich zu den toxinspezifischen Positionen befinden sich auf jedem Biochip mindestens je zwei Positiv- und Negativkontrollen. Diese Kontrollpositionen dienen als Qualitätskontrolle für valide Messungen und ermöglichen eine Normalisierung der Messsignale (siehe Kapitel 2.6.5) und damit eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Chipmessungen.

Nach dem Einbringen des Sensorchips in das Gerät (Abbildung 9, A) werden alle für den Assay benötigten Reagenzien durch die Mikrofluidik des Systems sequenziell über die Chipoberfläche geleitet. In Abbildung 9 C ist der Ablauf der Nachweisreaktion am Beispiel eines rein Antikörper-basierten Nachweises illustriert. Zunächst erfolgt eine etwa zehnmünütige Inkubation mit der Probe. Bei Anwesenheit eines Toxins wird dieses an den Fängerantikörper gebunden. Der Nachweis selbst beruht auf dem Einsatz biotinylierter Detektionsantikörper in Kombination mit einer Streptavidin-gekoppelten β -D-Galaktosidase. Das Enzym führt zur Umsetzung des elektrochemisch inaktiven Substrats *p*-Aminophenyl- β -D-galaktopyranosid (*p*-APG) in das redox-aktive *p*-Aminophenol (*p*-AP). Durch die Elektrodenarchitektur in Form miteinander verschränkter Anoden und Kathoden tritt *p*-AP in einen Redoxzyklus mit *p*-Chinonimin (*p*-Cl) ein. Dieses Redoxcycling führt zu einer Signalamplifikation um etwa den Faktor zehn [187]. Der so generierte Anstieg des elektrischen Stroms wird bei gestoppter Fluidik ermittelt und mit Hilfe der inhärenten Kontrollpositionen als normalisiertes Signal ausgegeben. Für die in dieser Arbeit verwendeten Sensorchips dienten murines Immunglobulin (IgG) als Negativkontrolle und biotinylierte Kaninchen anti-Maus IgG als Positivkontrolle. Bei validen Messungen zeigen ausbleibende Signale auf der Negativkontrolle und die Bindung der β -D-Galaktosidase an die biotinylierten Kaninchenantikörper (Positivkontrolle) die Abwesenheit von Systemfehlern und Störfaktoren an. Ein abschließender Spülschritt mit detergenzhaltiger Natronlauge sorgt für die Dekontamination des Gerätes. Insgesamt nimmt die Messung einer Probe damit 25 Minuten in Anspruch.

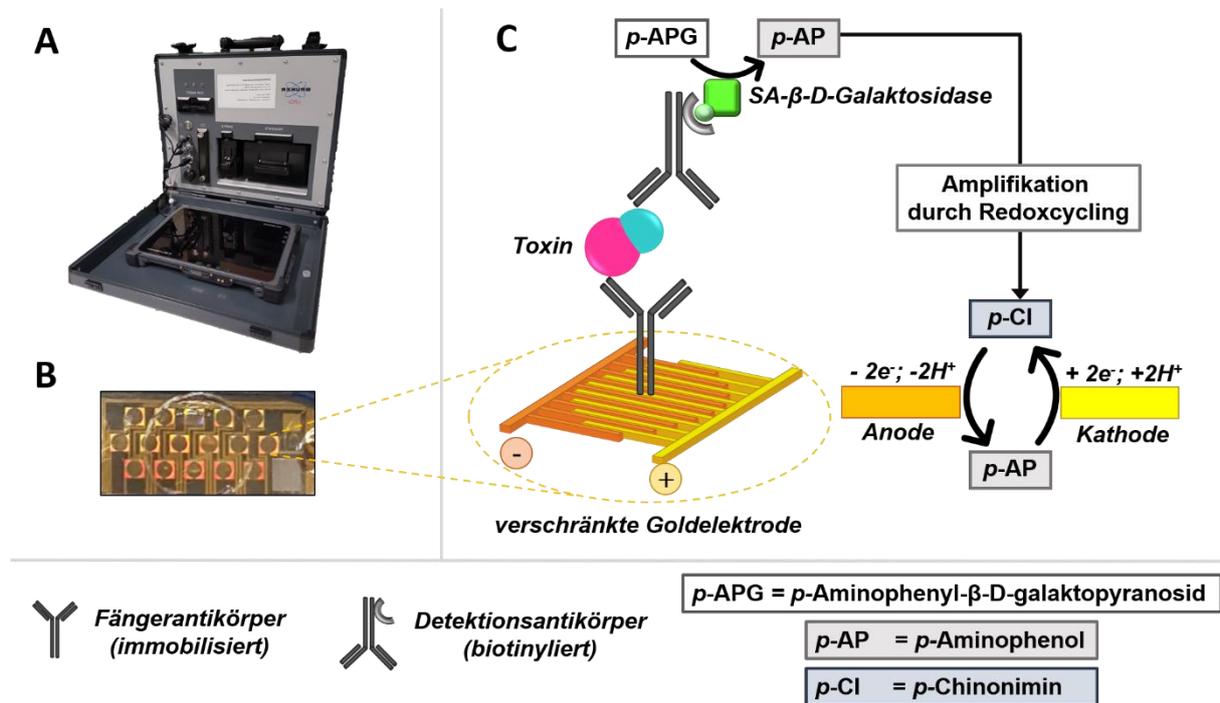


Abbildung 9: Aufbau und Funktionsweise des pTD/pBDi-Geräts.

Der portable Toxindetektor (pTD) bzw. *portable BioDetector integrated* (pBDi) ist ein mobiles Messgerät (A) zum Nachweis biologischer Agenzien. Herzstück des Geräts ist der elektrochemische Sensor (B) mit 16 verschränkten Goldelektroden. Das Messprinzip (C) entspricht dem eines Sandwich-ELISAs: Immobilisierte Fängerantikörper binden das Toxin, welches durch einen biotinylierten Detektionsantikörper nachgewiesen wird. Durch die Inkubation mit dem Enzym β -D-Galaktosidase (markiert mit Streptavidin) reagiert das zugegebene Substrat *p*-Aminophenyl- β -D-galaktopyranosid (*p*-APG) zu dem elektrochemisch aktiven Produkt *p*-Aminophenol (*p*-AP). Eine Signalamplifikation wird durch den Eintritt von *p*-AP in einen Redoxzyklus mit *p*-Chinonimin (*p*-Cl) erzielt. A. Außenansicht des Geräts pBDi. B. Goldelektroden des Sensorchips C. Ablauf der Messreaktion und der Signalamplifikation an einer verschränkten Goldelektrode. Diese Abbildung ist angelehnt an Schulz *et al.* [188].

Die Verwendung des Geräts ist in der Arbeitsgruppe etabliert. Im Rahmen der Dissertation von Eva-Maria Hansbauer wurde mit Asialofetuin bereits ein Glykoprotein als Fängerstruktur für Abrin untersucht [115]. Für Rizin lagen in dieser Hinsicht noch keine Daten vor. Des Weiteren ist die Immobilisierung von Nanodisks und komplex strukturierten Transmembranproteinen wie Claudin-4 auf Sensorchips bisher unerforscht. Ziel dieser Arbeit war, in der pBDi-Plattform den Vor-Ort-Nachweis von Abrin, Rizin, den Shigatoxinen, CPE und Etx mittels innovativen Fängerstrukturen vergleichend mit monoklonalen Toxin-spezifischen Fängerantikörpern zu untersuchen.

1.6 Zielsetzungen der Arbeit

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des SensTox-Projektes erstellt, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung von Dezember 2015 bis Mai 2019 unter dem Förderkennzeichen 13N13793 finanziert wurde. SensTox steht für „Sensor-basierte und automatisierte Detektion von hoch- und niedermolekularen biologischen Toxinen“. Im Teilprojekt des RKI zielten die Untersuchungen auf die Etablierung einer Differentialdiagnostik zu Intoxikationen mit den Pflanzentoxinen Rizin und Abrin ab, die mit der Leitsymptomatik blutige Diarrhöen mit Leukozyten im Stuhl einhergehen. Die Detektion war in Form eines Vor-Ort-Nachweises angelegt, um bioterroristische Ausbringungsversuche mit den Pflanzentoxinen schnellstmöglich zu erkennen und von natürlichen Krankheitsgeschehen mit ähnlicher klinischer Manifestation abzugrenzen. Zu diesem Zweck sollte in differentialdiagnostischer Betrachtung zu Rizin und Abrin ein simultaner Nachweis von hochmolekularen Proteotoxinen mit ähnlicher Symptomatik und klinischer Relevanz entwickelt werden. Zu diesen Toxinen zählen Stx1 und Stx2, CPE, Etx, TcdA, TcdB, und SET. Neben klassischen, auf monoklonalen Antikörpern basierenden ELISA wurden aufgrund der strukturellen Variabilität der Toxine (v.a. Stx1, Stx2, SET) innovative Nachweissysteme auf Basis der endogenen Rezeptoren erprobt. Diese Arbeit fokussierte sich dabei auf die Toxine Stx1, Stx2, CPE und Etx und hatte folgende Ziele:

- Generierung von CPE- sowie Etx-spezifischen monoklonalen Antikörpern und deren umfangreiche Charakterisierung, speziell auf ihre Eignung hin, in Kombination mit den endogenen Rezeptoren als Detektor zu fungieren.
- Etablierung von Sandwich-ELISA zum stationären Nachweis von CPE, Etx und den Shigatoxinen basierend auf den neu generierten (CPE, Etx) oder kommerziell verfügbaren Stx-spezifischen Antikörpern.
- Untersuchung der Rezeptorbindung von Rizin und Abrin (an Asialo-GM1, Asialofetuin), den Shigatoxinen (an Gb3, Gb4), CPE (an Claudin-4) und Etx (an MAL), je nach Toxin und Rezeptor unter Verwendung der Nanodisk-Technologie.
- Evaluation von hochaffinen Rezeptoren als Fängerstrukturen für den Nachweis aller Toxine und vergleichende Untersuchung mit den etablierten bzw. bestehenden (Rizin, Abrin) Antikörper-basierten Sandwich-ELISA.
- Implementierung aller Rezeptor-basierten und Antikörper-basierten Nachweise in die automatisierte Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi (Fa. Bruker Daltonik GmbH).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In Tabelle 4 sind die verwendeten Geräte aufgelistet. Standardlaborgeräte wie Zentrifugen, Vortexer, Kühlschränke und Pipetten sind nicht aufgeführt.

Tabelle 4: Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Anaerobier-Werkbank	Whitley A35	Meintrup DWS Laborgeräte, Herzlake
Biacore™ (SPR)	X100	GE Healthcare, Chicago, USA
	T200	
Brutschrank	HeraCell 240™	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	LSRII	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Elektrophoresegerät	Mini-PROTEAN® 3	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Flüssigchromatographieanlage	ÄKTAexplorer™100	GE Healthcare, Chicago, USA
Gasdichte Spritze	Gastight® 1710 RN, 22G, 100 µl	Hamilton, Bonaduz, CH
Geldokumentation	ChemiDoc™ MP	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Konzentrator	SpeedVac™	Savant Instruments, Hicksville, USA
Mikroplattenleser	Tecan Infinite® M200	Tecan, Männedorf, CH
Mikroplattenwascher	HydroSpeed™	Tecan, Männedorf, CH
Mikroskop	DMIL 090-135.001	Leica, Wetzlar
Photometer	NanoPhotometer® P300	Implen, München
Semi-Dry Blotter	TransBlot® Turbo™ V.102	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sicherheitswerkbank	HERASafe™	Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät	Sonifier 450	Branson, Danbury, USA
Vor-Ort-Detektionsplattform	pBDi	Bruker Daltonik, Leipzig
	pTD	Analytik Jena, Itzehoe

2.1.2 Software

Tabelle 5 gibt eine Übersicht zu der Software, die in dieser Arbeit zur Anwendung kam.

Tabelle 5: Software.

Software	Verwendung	Hersteller
Accelrys Draw 4.1	Visualisierung chemischer Strukturen	Symyx Technologies, Santa Clara, USA
Biacore™ X100 Control Software 2.0.1	Steuerung Biacore™ X100	GE Healthcare, Chicago, USA
Biacore™ T200 Control Software 2.0.1	Steuerung Biacore™ T200	GE Healthcare, Chicago, USA
Biacore™ X100 Evaluation Software 2.0.1	Datenanalyse SPR-Messungen	GE Healthcare, Chicago, USA
Biacore™ T200 Evaluation Software 3.0		GE Healthcare, Chicago, USA
EndNote X9.2	Literaturverwaltung	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
FlowJo 8.7	Datenanalyse FACS	FlowJo, Ashland, USA
GraphPad Prism 8.2.1	Datenanalyse und -darstellung	GraphPad Software, San Diego, USA
i-control™ 1.10	Steuerung Tecan Infinite®M200	Tecan, Männedorf, CH
Image Lab 5.2.1	Darstellung von Gelen und Blots	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Inkscape™ 0.92.4	Erstellung von Vektorgrafiken	Inkscape Community
pBDi Control 1.40	Steuerung pBDi	Bruker Optik, Leipzig
pTD control 1.30	Steuerung pTD	Analytik Jena, Itzehoe
UNICORN Control	Steuerung ÄKTAexplorer	GE Healthcare, Chicago, USA

2.1.3 Kommerzielle Kits

In Tabelle 6 finden sich die hier verwendeten kommerziell erhältlichen Kits. Diese wurden den Herstellerangaben entsprechend angewendet.

Tabelle 6: Kommerzielle Kits.

Kit	Anwendung	Hersteller
Amine Coupling Kit	Immobilisierung von Proteinen an CM5 Sensorchips	GE Healthcare, Chicago, USA
BIAmaintenance Kit	Instandhaltung Biacore™ Geräte	GE Healthcare, Chicago, USA
Gel Filtration Calibration Kit HMW	Kalibrierung der Gelfiltrationssäule	GE Healthcare, Chicago, USA
GST Capture Kit	Immobilisierung GST-getagter Proteine an CM5-Sensorchips	GE Healthcare, Chicago, USA
His Capture Kit	Immobilisierung His-getagter Proteine an CM5 Sensorchips	GE Healthcare, Chicago, USA
Isotyping Kit	Isotypisierung mAk	Roche, Basel, CH
Mouse Capture Kit	Immobilisierung von murinen mAk an CM5-Sensorchips	GE Healthcare, Chicago, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7 listet die benötigten Verbrauchsmaterialien auf. Nicht darin inbegriffen sind Standardmaterialien wie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße.

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien.

Material	Typ	Hersteller
Bio-Beads™	SM-2 Resin	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Cryoröhrchen	1,8 ml	Nunc, Roskilde, DK
Dialyseschlauch	MWCO 8–10 kDa	Spectrum Labs, Frankfurt/Main
Druckgasdose Stickstoff	HiQ® Minican 5.0	Linde, Dublin, IRL
ELISA-Platten	Nunc MaxiSorp™, 96-Well	Nunc, Roskilde, DK
Entsalzungssäulen	PD-10	GE Healthcare, Chicago, USA
Filterpapier	Whatman® 3 MM CHR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gelfiltrationssäule	Superdex™ 200 increase 10/300 gI	GE Healthcare, Chicago, USA
Glasvials mit PTFE-Kappe	2 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kanülen	Sterican® Kanülen	B. Braun, Melsungen
Klebefolien	für Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, DK
Kulturröhrchen aus Glas	6 ml	VWR International, Radnor, USA
Minikapillare	Minivette® POCT	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Immobilon®-P 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Protein A Säulen	HiTrap® MabSelect™ SuRe™	GE Healthcare, Chicago, USA
Protein G Säulen	HiTrap® Protein G HP	GE Healthcare, Chicago, USA
Rundbodenplatte	Nunc™ U-Well, 96-Well	Nunc, Roskilde, DK
Sensorchip (SPR)	CM5	GE Healthcare, Chicago, USA
Serologische Pipetten	1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	TPP, Trasadingen, CH
Spritzen	1 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun, Melsungen
Spritzen mit Luer-Lock Ansatz	1 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Spritzenvorsatzfilter	0,22 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuumfiltrationseinheit	0,2 µm	VWR International, Radnor, USA
Zellkulturflaschen, ventiliert	25, 75, 150 cm ²	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturplatten	6-, 12-, 24-, 48-Well	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturplatten	96-Well, Nunclon™ Delta	Nunc, Roskilde, DK
Zellschaber	Größe S, M, L	TPP, Trasadingen, CH
Zellsieb	70 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zentrifugen-Filtereinheiten	Amicon® Ultra MWCO 10, 50 kDa	Millipore, Billerica, USA

2.1.5 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 8 liefert einen Überblick über die Chemikalien und Reagenzien, die für die experimentellen Arbeiten benötigt wurden.

Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien.

Reagenz	Synonym/Spezifikation	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	ROTIPHORESE®Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	APS	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Biotin- <i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Biotin-NHS	Sigma-Aldrich, Seelze
Bovines Serumalbumin	BSA, Fraktion V, proteasefrei	Sigma-Aldrich, Seelze
Casein	gereinigt aus Kuhmilch	Sigma-Aldrich, Seelze
CDP-Star	-	Applied Biosystems, Foster City, USA
Chloroform	-	Sigma-Aldrich, Seelze
Cholesterol	-	Sigma-Aldrich, Seelze
Coomassie Brilliant Blue G-250	-	Serva, Heidelberg
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	EDC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Formalin	37 % (v/v) Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	p.a., wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	-	Carl Roth, Karlsruhe
GM1	aus bovinem Hirn	Sigma-Aldrich, Seelze
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	100 ×	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Inkomplettes Freund Adjuvans	0,85 % (v/v) Paraffinöl 0,15 % (v/v) Mannidmonooleat	Sigma-Aldrich, Seelze
Komplettes Freund Adjuvans	1 mg/ml hitzeinaktivierte <i>M. tuberculosis</i> 0,85 % (v/v) Paraffinöl 0,15 % (v/v) Mannidmonooleat	Sigma-Aldrich, Seelze
Laktose Monohydrat	-	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Blotting Grade	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	MgCl ₂ 5 × H ₂ O	Merck, Darmstadt
Membrane Scaffold Protein	MSP1D1, MSP1D1 D73C, MSP1E3D1, MSP1E3D1 D73C	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol	≥99,9 %, p.a., ROTIPURAN®	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	NaN ₃	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumcarbonat	wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat Monohydrat	-	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumdodecylsulfat	SDS	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Na ₂ S ₂ O ₃ 5 × H ₂ O	Sigma-Aldrich, Seelze

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 8

Reagenz	Synonym/Spezifikation	Hersteller
Natronlauge	NaOH, 32% (w/v)	Carl Roth, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10 bis 180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin	POPC, gelöst in Chloroform/Methanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Polyethylenglykol 1500	PEG 1500	Roche, Basel, CH
Saponin	Sapogenin ≥ 10 %	Sigma-Aldrich, Seelze
Schwefelsäure	2,5 M	Carl Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	AgNO ₃	Merck, Darmstadt
Sphingomyelin	aus porzinem Hirn	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Styren-Maleinsäureanhydrid-Copolymer	Lipodisq®, 3:1, Pre-hydrloyzed	Sigma-Aldrich, Seelze
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	TMB	Seramun Diagnostics, Heidesee
Tetramethylethylendiamin	TEMED	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Polysorbat 20	Merck, Darmstadt

Die Zusammensetzung der hergestellten Puffer findet sich in Tabelle 9.

Tabelle 9: Zusammensetzung von Puffern.

Puffer	Anwendung	Zusammensetzung	pH
ACK-Lysepuffer	Lyse von Erythrozyten	155 mM NH ₄ Cl 10 mM K ₂ CO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA	7,3
Assaypuffer	Western Blot	100 mM Diethanolamin 1 mM MgCl ₂ × 6 H ₂ O	10,0
Caseinpuffer	Blockpuffer in Sandwich-ELISA	0,05 M Tris, 0,625 % (w/v) Casein 0,005 % (w/v) 5-Bromo-5-Nitro-1,3-Dioxan 0,0025 % (v/v) Tween 20	7,3
Coomassie-Färbelösung	Proteinfärbung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 10 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 % H ₃ PO ₄ 20 % Ethanol	-
Elektrophoresepuffer	SDS-PAGE	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS	8,3
Elutionspuffer	Elution der mAk von der Protein-A-Säule	0,1 M Natriumcitrat	3,6
FACS-PBS	Durchflusszytometrie	PBS 2,5 % (w/v) FKS 0,1 % (w/v) NaN ₃	7,3

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 9

Puffer	Anwendung	Zusammensetzung	pH
HBS-N	Laufpuffer in SPR-Messungen	10 mM HEPES 150 mM NaCl	7,4
HBS-EP+		wie HBS-N, zusätzlich: 3 mM EDTA 0,025 % (v/v) Tween 20	7,4
mAk-Reinigungspuffer	Affinitätschromatographie zur mAk-Reinigung	20 mM Na ₃ PO ₄ 0,15 M NaCl	7,2
PBS	Standardpuffer	137 mM NaCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₂ 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄	7,3
PBS-T	Waschpuffer	PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20	7,3
PBS mit 0,1 % BSA	Antigenverdünnungspuffer in Sandwich-ELISA	PBS, 0,1 % (w/v) BSA	7,3
Lämmli-Probenpuffer (3x)	SDS-PAGE	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % (v/v) Glycerol 2 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol	6,8
Saponinpuffer	iFACS	PBS, 0,5 % (w/v) Saponin	7,3
SMA-Puffer	Herstellung von SMALPs	2 % (w/v) SMA (3:1) 20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 10 mM EDTA 10 mM MgCl ₂ 25 U Benzonase	8,2
Transferpuffer	Western Blot	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 0,037 % (w/v) SDS	9,2

2.1.6 Antikörper und Enzyme

Tabelle 10 listet alle Primärantikörper auf, die zum Einsatz kamen. Die für diese Arbeit verwendeten kommerziellen Sekundärreagenzien und Enzyme sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 10: Antikörper.

Antikörper	Abk.	Antigen	Isotyp	Ursprung	Quelle/Referenz
anti-Asialo-GM1	-	Asialo-GM1	IgG, pAk	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-GM1	-	GM1	IgG, pAk	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-GST	-	GST	IgG1, mAk	Maus	Genscript Biotech, Piscataway Township, USA
anti-6 × His Tag	anti-His	6 × His Tag	IgG2b, mAk	Maus	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-MAL	-	MAL	IgG, pAk	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AP10	-	Abrin, Rizin	IgG2a, mAk	Maus	Eva-Maria Hansbauer, RKI [115]

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 10

Antikörper	Abk.	Antigen	Isotyp	Ursprung	Quelle/Referenz
AP54	-	Abrin	IgG1, mAk	Maus	Eva-Maria Hansbauer, RKI, Berlin [115]
AP69	-	Abrin	IgG1, mAk	Maus	Eva-Maria Hansbauer, RKI, Berlin [115]
AP406	-	Abrin	IgG1, mAk	Maus	Sylvia Worbs, RKI, Berlin
AP430	-	Abrin	IgG2a, mAk	Maus	Sylvia Worbs, RKI, Berlin
AP3202	-	Abrin	IgG1, mAk	Maus	Eva-Maria Hansbauer, RKI, Berlin [115]
AP3659	-	Abrin	IgG2a, mAk	Maus	Eva-Maria Hansbauer, RKI, Berlin [115]
AP3808	-	Abrin	IgG2a, mAk	Maus	Eva-Maria Hansbauer, RKI, Berlin [115]
ATCC 11E10	11E10	Stx2	IgG1, mAk	Maus	American Type Culture Collection, Rockville, USA [189]
ATCC 11F11	11F11	Stx2	IgG2a, mAk	Maus	American Type Culture Collection, Rockville, USA [189]
ATCC 13C4	13C4	Stx1	IgG1, mAk	Maus	American Type Culture Collection, Rockville, USA [190]
CPE1	-	CPE	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
CPE58	-	CPE	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
CPE384	-	CPE	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
CPE526	-	CPE	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
CPE562	-	CPE	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
CPE639	-	CPE	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
CPE1339	-	CPE	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
Etx146	-	Etx	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
Etx212	-	Etx	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
Etx343	-	Etx	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
Etx444	-	Etx	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
Etx484	-	Etx	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
Etx755	-	Etx	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
Etx905	-	Etx	IgG1, mAk	Maus	diese Arbeit, RKI, Berlin
IgG	-	keine	IgG	Maus	Dianova, Hamburg
MBS311734	MBS34	Stx1	IgG1, mAk	Maus	MyBioSource, San Diego, USA [191]
MBS311736	MBS36	Stx2	IgG1, mAk	Maus	MyBioSource, San Diego, USA
R21	-	Rizin	IgG1, mAk	Maus	Diana Pauly, RKI, Berlin [98]
R18	-	Rizin	IgG1, mAk	Maus	Diana Pauly, RKI, Berlin [98]
SEA165	-	SEA	IgG1, mAk	Maus	Uwe Fiebig, RKI, Berlin
SLT1 II 2H3	2H3	Stx1	IgG1, mAk	Maus	Erwin Märtilbauer, LMU München [192]
SLT2 III 1B5	1B5	Stx2	IgG, mAk	Maus	Erwin Märtilbauer, LMU München [193]
SLT2 III 1E1	1E1	Stx2	IgG, mAk	Maus	Erwin Märtilbauer, LMU München [193]
STX1-10D11	10D11	Stx1	IgG2b, mAk	Maus	Toxin Technology, Sarasota, USA [191]
STX1-3C10	3C10	Stx1	IgG1, mAk	Maus	Toxin Technology, Sarasota, USA [191]
STX2-BB12	BB12	Stx2	IgG1, mAk	Maus	Toxin Technology, Sarasota, USA [194]
TcdA3211	-	TcdA	IgG1, mAk	Maus	Kristin Eichler, RKI, Berlin [195]
TcdB3322	-	TcdB	IgG2b, mAk	Maus	Kristin Eichler, RKI, Berlin [195]
VT 109/4-E9b	109/4	Stx1	IgG, mAk	Maus	Sifin Diagnostics, Berlin
VT 135/6-B9	135/6	Stx2	IgG, mAk	Maus	Sifin Diagnostics, Berlin
VT 136/8-H4	136/8	Stx2	IgG, mAk	Maus	Sifin Diagnostics, Berlin

Tabelle 11: Sekundärreagenzien und weitere Enzyme.

Enzym	Ursprung	Hersteller
anti-Kaninchen-IgG-Biotin	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-Biotin	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-Cy5	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-Peroxidase (Fcy-spezifisch)	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG-Peroxidase (H+L)	Ziege	Dianova, Hamburg
Avidin Alkalische Phosphatase	k.A.	Applied Biosystems, Foster City, USA
Benzonase® Nuclease	<i>S. marcescens</i>	Sigma-Aldrich, Seelze
Streptavidin Poly-HRP	k.A.	Diavita, Heidelberg
Thrombin Protease	Rind	GE Healthcare, Chicago, USA

k.A. = keine Angaben

2.1.7 GSL- und Proteorezeptoren

Die in dieser Arbeit als endogene Rezeptoren erprobten Glykosphingolipide (GSL) und Proteine finden sich in Tabelle 12.

Tabelle 12: Rezeptoren.

Rezeptor	Synonym/Spezifikation	Quelle
Asialofetuin	Glykoprotein, Typ 1	Sigma-Aldrich, Seelze
Asialo-GM1	Gangliotetraosylceramid	Matreya, State College, USA
Claudin-4	rek. Protein (humaner Ursprung)	Andreas Rummel, MHH Hannover
Galaktosylceramid	GalCer, aus bovinem Hirn	Matreya, State College, USA
Globotetrahexosylceramid	Gb4	Matreya, State College, USA
Globotriaosylceramid	Gb3	Matreya, State College, USA
Laktosylceramid	LacCer	Matreya, State College, USA
MAL	<i>Myelin and Lymphocyte Protein</i> , rek. Protein (muriner Ursprung)	Andreas Rummel, MHH Hannover

2.1.8 Toxine und Bakterienüberstände

Tabelle 13 listet die in dieser Arbeit verwendeten gereinigten und rekombinanten Toxine und toxinhaltigen Bakterienüberstände bzw. -lysate auf. Für die Herstellung von Bakterienüberständen aus den größtenteils extern bezogenen *C. perfringens*-Stämmen wurden die Bakterien zunächst für ein bis sieben Tage bei 32 °C in Trypton-Pepton-Glucose-Hefeextrakt-Medium (TPGY) unter anaeroben Bedingungen (Gaszusammensetzung: 6 % H₂, 10 % CO₂, 84 % N₂) kultiviert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert (10.000 × g, 10 min) und die Überstände abgenommen.

Tabelle 13: Toxine und toxinhaltige Bakterienüberstände.

Toxin	Spezifikation	Quelle/n
Abrin-a	gereinigt aus den Samen von <i>Abrus precatorius</i>	Sylvia Worbs, RKI, Berlin
Abrin Mischung		Sylvia Worbs, RKI, Berlin
<i>Abrus</i> Agglutinin		Sylvia Worbs, RKI, Berlin
Choleratoxin	gereinigtes Toxin aus <i>Vibrio cholerae</i> Typ Inaba 569B	List Biological Laboratories, Campbell, USA
<i>Clostridium perfringens</i> Bakterienüberstände	Bakterienstämme wurden größtenteils extern bezogen, Anzucht der Bakterien und Präparation der Überstände erfolgten am RKI	Dagmar Rimek, TLV, Bad Langensalza Frank Gessler, MHH Hannover PHE Culture Collection, Salisbury, UK Martin Dorner, RKI, Berlin Ute Messelhäuser, LGL Bayern, Erlangen
CPE	rek. Gesamttoxin (aa 1-319), basiert auf <i>C. perfringens</i> Stamm 61a	Andreas Rummel, MHH Hannover
CPE D48A	rek. Gesamttoxin (aa 1-319) mit Punktmutation D48A, basiert auf <i>C. perfringens</i> Stamm 61a	Andreas Rummel, MHH Hannover
CPE ZD	rek. zytotoxische Domäne (aa 26-202), basiert auf <i>C. perfringens</i> Stamm 61a	Andreas Rummel, MHH Hannover
CPE RBD	rek. Rezeptorbindungsdomäne (aa 26-202), basiert auf <i>C. perfringens</i> Stamm 61a	Andreas Rummel, MHH Hannover
Etx	rek. Gesamttoxin (aa 15-296), basiert auf <i>C. perfringens</i> Stamm 572c	Andreas Rummel, MHH Hannover
PEtx Y84A	rek. Prototoxin (aa 1-296), basiert auf <i>C. perfringens</i> Stamm 572c	Andreas Rummel, MHH Hannover
<i>R. communis</i> Agglutinin	gereinigt aus den Samen von <i>Ricinus communis</i> , Kultivar carmencita	Sylvia Worbs, RKI, Berlin [196]
Rizin		Sylvia Worbs, RKI, Berlin [196]
SEA	gereinigtes, natives Toxin	Toxin Technology, Sarasota, USA
Shigatoxin-haltige Bakterienlysate	zellfreie Lysate, Induktion und Anzucht erfolgten extern	Christian Menge, FLI Jena Angelika Fruth, RKI, Berlin
Stx1a	gereinigtes, natives Toxin	Toxin Technology, Sarasota, USA
Stx2a	gereinigtes, natives Toxin	Toxin Technology, Sarasota, USA
TcdA	rek. TcdA (aa 1-2710) aus <i>C. difficile</i> Stamm VPI10463	Ralf Gerhard, MHH Hannover
TcdB	rek. TcdB (aa 1-2366) aus <i>C. difficile</i> Stamm VPI10463	Ralf Gerhard, MHH Hannover

2.1.9 Zelllinien und Medien

Neben den selbst generierten Hybridomen wurden für die vorliegende Arbeit murine Myelomzellen (P3x63Ag8.653, American Type Culture Collection, Rockville, USA) und *Madin-Darby Canine Kidney* Zellen (MDCK.2 ATCC® CRL-2936™, American Type Culture Collection, Rockville, USA) kultiviert. Tabelle 14 führt die Medienzusätze auf, die für die Herstellung der Zellkulturmedien (Tabelle 15) verwendet wurden.

Tabelle 14: Medienzusätze.

Zusatz	Zusammensetzung	Hersteller
AH 50 ×	finale Konzentration: 5,7 µM Azaserin, 100 µM Hypoxanthin	Sigma-Aldrich, Seelze
β-Mercaptoethanol	β-ME	Serva, Heidelberg
DMSO	Dimethylsulfoxid, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Seelze
EMEM	Eagle´s Minimum Essential Media mit Glutamin	Carl Roth, Karlsruhe
FKS	Fötales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GPG-FKS	G-Protein gereinigtes FKS	wie FKS, selbst gereinigt
IL-6	Interleukin-6, 200.000 U/ml	Hiss Diagnostics, Freiburg im Breisgau
Pen/Strep 100 ×	10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin	Merck, Darmstadt
RPMI 1640	Roswell Memorial Park Institute Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau Lösung	-	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA	Biochrom, Berlin
Türks Lösung	-	Merck, Darmstadt

Tabelle 15: Zellkulturmedien.

Medium	Anwendung	Zusammensetzung
AH-Selektionsmedium	Selektionsmedium zum Ausplattieren der neu generierten Hybridome	RPMI 1640 20 % (v/v) FKS 50 µM β-Mercaptoethanol 50 U/ml IL-6 1 × AH
Einfriermedium	Einfrieren von Zellen	80 % (v/v) FKS 20 % DMSO
R10F ⁻	Kultivierung von Myelomzellen, Isolierung der Thymozyten	RPMI 1640 10 % (v/v) FKS 50 µM β-Mercaptoethanol
R10F ⁺	Kultivierung von Hybridomen	wie R10F ⁻ , mit 1 % (v/v) Pen/Strep
R10F ⁺ GPG	Expansion von Hybridomen zur Antikörperproduktion	wie R10F ⁺ aber mit GPG-FKS statt FKS
R20F ⁺	anfängliche Kultivierung der Hybridome, Subklonierungen	RPMI 1640 20 % (v/v) FKS 50 µM β-Mercaptoethanol 50 U/ml IL-6 1 % (v/v) Pen/Strep
EMEM F ⁺	Kultivierung von MDCK-Zellen	EMEM 10 % (v/v) FKS

2.1.10 Tiere

Zur Generierung von monoklonalen Antikörpern wurden Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Antigenen immunisiert. Hierzu wurden entweder Tiere des Inzuchtstammes BALB/c oder des Auszuchtstammes NMRI (beide bezogen von Charles River Laboratories, Sulzfeld) verwendet. Die Immunisierungen wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt

(Tierversuchsnummer: H0109/03). Die Tötung von Mäusen zur Entnahme der Thymozyten wurde unter der Nummer T0060/08 beim LAGeSo registriert. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG, 2006) durchgeführt. Die Tiere wurden dementsprechend *ad libitum* ernährt und in pathogenfreier Haltung versorgt.

2.2 Kultivierung von Zellen

2.2.1 Handhabung von Suspensionszellen und adhärennten Zellen

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und etwa 90 % relativer Luftfeuchte. Das Wachstum und die Viabilität der Zellen wurden generell mikroskopisch beurteilt. Die Kultivierung der Suspensionszellen (Hybridome, Myelomzellen siehe 2.1.9) erfolgte in Zellkulturflaschen. Zur Anpassung der Zelldichte wurden die Zellen resuspendiert, gezählt (siehe 2.2.2) und mit frischem Medium auf eine geeignete Dichte (ca. 2×10^5 pro ml) eingestellt. Adhärennte Zellen (MDCK, siehe 2.1.9) wurden ebenfalls in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium diente EMEM F⁺ (Tabelle 15). Zur Anpassung der Zelldichte wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zum Ablösen mit Trypsin-EDTA-Lösung (Tabelle 14) inkubiert (8 min, 37 °C) und die Reaktion mit 20 ml FKS-haltigem Medium abgestoppt. Nachdem die Zellen gewaschen wurden, erfolgte die Aussaat in frischem Medium (Dichte etwa 2×10^4 /cm²).

2.2.2 Vitalfärbung mittels Türks-Lösung und Trypanblau

In Vorbereitung auf eine Zellzählung wurden die Zellen resuspendiert (Suspensionszellen) bzw. mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und resuspendiert (adhärennte Zellen). Ein kleines Volumen wurde entweder mit Türks-Lösung (Zählung der Splenozyten, Verhältnis 1:10) oder mit einer 1 % (w/v) Trypanblau-Lösung in PBS (alle anderen Zellen, Verhältnis in der Regel 1:2) gemischt. Diese Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die Anzahl vitaler (ungefärbt, rund) Zellen bestimmt. Die Zellzahl konnte anhand des verwendeten Verdünnungsfaktors und des Kammerfaktors errechnet werden [197].

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zellen wurden diese kryokonserviert. Zu diesem Zweck wurden vitale Zellen (aus maximal 10 ml Zellsuspension) in der Wachstumsphase durch Zentrifugation ($350 \times g$, 6 min, RT) pelletiert, in 900 µl kaltem Kulturmedium resuspendiert und in ein Cryoröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 30 min bei 4 °C gekühlt. Danach wurden die Zellen mit 900 µl kaltem Einfriermedium (Tabelle 15) gemischt und für mindestens 24 h in einer Einfrierbox (Styropor) bei -80 °C gelagert. Nachfolgend erfolgte der Transfer in Flüssigstickstoff-Tanks (-196 °C, Gasphase). Zum schonenden Auftauen der Zellen wurden diese schnell erwärmt und in 10 ml Kulturmedium (gleiche Zusammensetzung

wie vor dem Einfrieren) überführt. Durch Zentrifugation (siehe oben) und Mediumwechsel wurden Reste des Einfriermediums entfernt. Anschließend wurden die Zellen wie in 2.2.1 beschrieben kultiviert.

2.3 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

2.3.1 Immunisierung und Testung der Serumaktivität

Die Immunisierung von weiblichen Mäusen (BALB/c oder NMRI, Kapitel 2.1.10) wurde durch intraperitoneale Applikation der Antigene im Abstand von mindestens drei Wochen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die in PBS vorliegenden Antigene (für Immunisierungsschemata siehe Anhang, Tabelle 53 für CPE ZD, Tabelle 54 für CPE RBD, Tabelle 55 für CPE, Tabelle 56 für Etx) zu gleichen Teilen mit Freund's Adjuvans gemischt (1. Immunisierung: Komplettes Freund-Adjuvans, danach: Inkomplettes Freund-Adjuvans). Nach 10-minütigem Mischen, erfolgte die Behandlung mit Ultraschall (2 min, 4 °C), um homogene Emulsionen zu erhalten. Für die Injektion wurde ein maximales Volumen von 200 µl appliziert.

Zur Bestimmung der Serumaktivität der immunisierten Tiere wurde diese punktiert und ihnen mit Hilfe einer Minikapillare Blut aus der Schwanzvene entnommen. Aus dem Blut wurde nach der Gerinnung (60 min, RT) durch Zentrifugation ($2.000 \times g$, 5 min, RT) Serum gewonnen, dessen Reaktivität gegenüber immobilisierten Antigenen im indirekten ELISA (Kapitel 2.6.1) untersucht wurde. Nachdem die Mäuse ausreichende spezifische Titer entwickelt hatten, wurden sie durch intraperitoneale Injektion des Antigens in PBS (ohne Freund's Adjuvans) jeweils an den drei Tagen vor der geplanten Hybridomfusion immunisiert.

2.3.2 Präparation von Splenozyten

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper kam die Hybridomtechnologie [131] zum Einsatz. Zu diesem Zweck wurde eine immunisierte Maus durch zervikale Dislokation getötet und die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen. Nachdem die Milz an einem Ende aufgeschnitten wurde, wurden die Splenozyten mit 10 ml PBS (Pen/Strep, siehe Tabelle 9) in eine Petrischale gespült. Die verbliebene Milz wurde in drei Teile geteilt, durch ein Metallsieb (Porengröße: 212 µm) gerieben und mit 10 ml PBS (Pen/Strep) zu der zuvor erzeugten Splenozyten-Suspension gespült. Das Metallsieb wurde mit 20 ml PBS (Pen/Strep) abgespült und die gepoolten Splenozyten wurden durch Zentrifugation ($380 \times g$, 8 min, RT) pelletiert. Nachdem die Zellen durch Zugabe von 20 ml PBS (Pen/Strep) resuspendiert wurden, erfolgte die Filtration durch ein Zellsieb (70 µm). Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet zur Lyse von Erythrozyten mit 4 ml ACK-Lysepuffer (Tabelle 9) inkubiert (1 min, RT). Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 28 ml PBS (Pen/Strep) abgestoppt. Die Zellen wurden wie zuvor filtriert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in warmem RPMI 1640 mit β -Mercaptoethanol aufgenommen, die Zellzahl mittels Türks-Zellzählung bestimmt (Kapitel 2.2.2) und bis zur Fusion bei 37 °C im Wasserbad gelagert.

2.3.3 Präparation von Thymozyten

Als Feederzellen für die späteren Hybridome wurden Thymozyten aus den Thymusdrüsen von zwei bis drei BALB/c-Mäusen (4-6 Wochen alt) pro Fusion isoliert. Hierzu wurden die Thymi steril entnommen und anschließend durch ein Metallsieb (212 μm) in 20 ml PBS (Pen/Strep) gerieben und mit weiteren 20 ml gespült. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (380 $\times g$, 8 min, RT), das Zellpellet in R10F⁻ (Tabelle 15) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Bis zur Fusion wurden die Thymozyten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

2.3.4 Präparation von Myelomzellen

Als Fusionspartner für die Splenozyten diente die murine Myelomzelllinie P3x63Ag8.653 (American Type Culture Collection, Rockville, USA). In Vorbereitung auf die Fusion wurden diese Zellen bereits zuvor in R10F⁻ kultiviert (Kapitel 2.2). Am Tag der Fusion wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert (380 $\times g$, 8 min, RT) und zweimal mit RPMI mit β -Mercaptoethanol gewaschen. Die Resuspension erfolgte in 30 ml RPMI. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufbewahrt.

2.3.5 Hybridomfusion und Aussaat der Hybridome

Für die Zellfusion der vorbereiteten Myelomzellen und Splenozyten wurden diese in einem Verhältnis der Zellzahlen von 1:2 gemischt und anschließend zentrifugiert (380 $\times g$, 8 min, RT). Alle nachfolgenden Angaben zur Durchführung beziehen sich jeweils auf eine Zellzahl von 100 $\times 10^6$ Splenozyten. Nachdem der Zellüberstand abgenommen wurde, erfolgte über einen Zeitraum von 1 min die Zugabe von 1 ml vorgewärmtes Polyethylenglykol 1500 (PEG 1500) unter Schwenken in einem 37 °C warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2 min bei 37 °C im Wasserbad geschwenkt. Danach wurde langsam über insgesamt 4 min verteilt ein Volumen von 4 ml warmes RPMI 1640 zugetropft. Es folgte die Zugabe von weiteren 10 ml (pro 100 $\times 10^6$ Splenozyten) RPMI 1640 und eine 5-minütige Inkubation der Zellen bei 37 °C.

Nach Zentrifugation der Zellen (500 $\times g$, 5 min, RT), wurde das Zellpellet in 20 ml R10F⁻ (Tabelle 15) resuspendiert. Die so generierten Hybridomzellen wurden in AH-Selektionsmedium (Tabelle 15) überführt und im Verhältnis 1:1 mit Thymozyten gemischt. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 1 $\times 10^5$ Hybridomzellen/ml eingestellt, in 96-Well-Zellkulturplatten ausplattiert (200 μl /Kavität) und im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Um zu verhindern, dass die von nichtfusionierten B-Zellen sezernierten Antikörper falsch positive Signale im nachfolgenden Screening erzeugen und um ein gutes Zellwachstum zu ermöglichen, wurde an Tag 7 und 8 nach der Fusion je 100 μl Zellüberstand pro Kavität entfernt und durch 150 μl frisches Selektionsmedium ersetzt. Ab Tag 10 erfolgte die Überprüfung der Hybridomüberstände auf Reaktivität gegenüber dem Antigen. Zu diesem Zweck wurden die Hybridomüberstände im indirekten ELISA (2.6.1), im Sandwich-ELISA (mit Claudin-4 als Fänger, sonst wie in 2.6.2 beschrieben) und mit Hilfe SPR-basierter Methoden (Kapitel 2.7) untersucht.

2.3.6 Subklonierung von Hybridomklonen

Zur Sicherstellung der Klonalität wurden die Hybridome mindestens zweimal subkloniert. Hierzu wurde die zuvor ausgezählte Zellsuspension so in R20F⁺ (Tabelle 15) auf fünf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät, dass sich rechnerisch je Platte 30, 10, 3, 1 oder 0,3 Zellen in 100 µl Medium pro Kavität befanden. Je nach Wachstum der Zellen wurden diese an Tag 6 bis 8 mikroskopisch auf Vorliegen einer Einzelzellkolonie pro Kavität hin geprüft. Die identifizierten vereinzelt wachsenden Klone wurden mit 150 µl (Pro Kavität) frischem R20F⁺ versorgt. An Tag 10 bis 12 wurden die Antikörper-haltigen Überstände der ausgewählten Hybridome im indirekten ELISA (Kapitel 2.6.1) auf ihre Spezifität gegenüber den entsprechenden Antigenen getestet. Nach der Auswahl der drei Subklone mit den besten Bindungseigenschaften wurden diese stufenweise entwöhnt (finales Medium ohne IL-6 und mit 10 % FKS) und für die Langzeitlagerung eingefroren (2.2.3). Der Klon mit den besten Eigenschaften (Reaktivität im ELISA, stabile Antikörperproduktion siehe 2.3.7, und gutes Wachstum) wurde schließlich für die Antikörperproduktion expandiert (Kapitel 2.3.8).

2.3.7 Durchflusszytometrische Untersuchung der intrazellulären Antikörperproduktion

Um Klone mit einer stabilen Antikörperproduktion zu identifizieren, wurde eine intrazelluläre Fluoreszenzfärbung der produzierten Antikörper und eine anschließende durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen durchgeführt. Hierzu wurde eine Zellsuspension mit ca. 1×10^6 vitalen Hybridomzellen durch Zentrifugation ($400 \times g$, 5 min, RT) pelletiert und zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl 2 % Formaldehyd-Lösung fixiert (20 min, RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS und einmal mit Saponinpuffer (Tabelle 9) gewaschen. Der Saponinpuffer führte zur Permeabilisierung der Zellmembranen, sodass bei der darauffolgenden Inkubation (20 min, RT, unter Lichtausschluss) mit einem Cy5-markierten anti-Maus-IgG (6 µg/ml in Saponinpuffer verdünnt) die intrazellulären Antikörper der Hybridome fluoreszenzmarkiert wurden. Als Negativkontrolle diente ein ebenso behandelter Hybridomklon, der nicht mit dem Cy5-markierten Antikörper inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl Saponinpuffer gewaschen und in 200 µl FACS-PBS (Tabelle 9) resuspendiert. Nachfolgend erfolgte die Messung in einem Durchflusszytometer (LSRII, Tabelle 4). Die Daten wurden mit Hilfe der Software CellQuest™Pro (Tabelle 5) aufgezeichnet. Zellpopulationen konnten anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung sowie des Fluoreszenzsignals unterschieden werden. Zur Auswertung der Daten diente das Programm FlowJo 8.7 (Tabelle 5).

2.3.8 Antikörperproduktion und -reinigung

Nachdem geeignete Klone mit stabiler Antikörperproduktion identifiziert und entwöhnt wurden, erfolgte die Expansion in R10F⁺ GPG. Dieses Medium enthielt FKS, aus dem durch eine Affinitätschromatographie

(Protein G Säule, Tabelle 7) bovine Antikörper entfernt wurden. Die Hybridomzellen wurden auf ein Volumen von 1,8 l in Glasflaschen expandiert und so lange unter Rotation inkubiert, bis etwa 90 % der Zellen gestorben waren. Anschließend wurde der Antikörper-haltige Hybridomüberstand durch zweimalige Zentrifugation ($2.000 \times g$ und $8.000 \times g$, jeweils 10 min, 10°C) von Zelltrümmern abgetrennt, durch Zugabe von 2 M Tris (pH 8,8) neutralisiert und mit einem Flaschenaufsatzfilter ($0,22 \mu\text{m}$) steril filtriert.

Die Reinigung der Antikörper erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Protein-A-Säule (HiTrap® MabSelect™ SuRe™) mit Hilfe der ÄKTAexplorer100 Anlage (Tabelle 4). Zu diesem Zweck wurde die Säule zunächst mit mAk-Reinigungspuffer (Tabelle 9) äquilibriert und danach mit dem Hybridomüberstand beladen. Es wurde solange mit dem Laufpuffer gespült, bis alle nicht gebundenen Proteine restlos entfernt waren. Nachfolgend wurden die Antikörper mit Elutionspuffer (Tabelle 9) von der Säule eluiert und die Antikörperlösung mit 3,6 M Tris/HCl (pH 9,0) neutralisiert. Antikörper-haltige Fraktionen wurden vereinigt und dreimal in einem Dialyseschlauch (MWCO 8 - 10 kDa) gegen PBS dialysiert (Zeitintervall je mind. 4 h, 4°C). Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung (NanoPhotometer® P300) wurde die Antikörperlösung unter sterilen Bedingungen filtriert ($0,22 \mu\text{m}$ Spritzvorsatzfilter) und bei -80°C (Langzeitlagerung) oder 4°C (Gebrauchsaliquots) gelagert.

2.3.9 Isotypbestimmung von Antikörpern

Für die Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Antikörper wurde ein kommerzielles Kit (Isotyping Kit, Tabelle 6) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben.

2.3.10 Biotinylierung von Antikörpern

Für die Kopplung von Antikörpern mit Biotin wurde die jeweilige Antikörperlösung mit Hilfe von PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt, sodass $500 \mu\text{g}$ des Antikörpers in $500 \mu\text{l}$ PBS vorlagen. Zu dieser Antikörperlösung wurden $50 \mu\text{l}$ frisch hergestelltes 1 M NaHCO_3 und $5 \mu\text{l}$ Biotin-NHS (entspricht molarem Kopplungsverhältnis von 1 mol Antikörper zu 20 mol Biotin) hinzugefügt und für eine Stunde rotiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $10 \mu\text{l}$ 10 % (w/v) NaN_3 abgestoppt und überschüssiges Biotin durch Gelfiltration (PD10-Säule) entfernt. Hierzu wurde die Säule mit 0,05 % NaN_3 in PBS äquilibriert und mit dem Reaktionsansatz beladen. Die bei der Gelfiltration gesammelten Fraktionen (je $250 \mu\text{l}$) wurden photometrisch (NanoPhotometer® P300) auf ihre Konzentration hin geprüft ($\lambda = 280 \text{ nm}$, ϵ_{280} für IgG = $1,37 [\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$). Fraktionen mit einer minimalen Konzentration von 0,1 mg/ml wurden gepoolt und die Konzentration dieser Mischung erneut bestimmt. Den biotinylierten Antikörpern wurde eine finale Konzentration von 0,2 % BSA zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C (Langzeitlagerung) oder 4°C (Gebrauchsaliquots).

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse wurde eine nach Laemmli [198] modifizierte Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Hilfe des Mini-PROTEAN® 3 Systems durchgeführt. Nachdem die Gelkammer nach den Herstellerangaben zusammengesetzt wurde, folgte das Einfüllen der Trenngellösung in entsprechender Konzentration (Tabelle 16). Für die Polymerisation des Trenngels waren ca. 60 min erforderlich. Anschließend wurde die Sammelgellösung (Tabelle 16) hinzugefügt und der Gelkamm positioniert. Nach weiteren 30 min war das Sammelgel polymerisiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele zur Durchführung der SDS-PAGE.

Angaben beziehen sich auf die Herstellung von zwei Gelen

Bestandteil	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (14 %)
dd H ₂ O	3,05 ml	3,4 ml	2,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	-	2,5 ml	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1.25 ml	-	-
10 % SDS	50 µl	100 µl	100 µl
Acrylamid/Bisacrylamid	650 µl	4 ml	4,7 ml
10 % APS	25 µl	100 µl	100 µl
TEMED	7 µl	10 µl	10 µl
<i>Summe</i>	5,032 ml	10,11 ml	10,11 ml

Die so hergestellten Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. In die innere und äußere Kammer der Apparatur wurde ausreichend Elektrophoresepuffer (Tabelle 9) eingefüllt. Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer (mit β-ME, Tabelle 9) versetzt, für 10 min bei 95 °C erhitzt, bei -20 °C abgekühlt und zentrifugiert (12.000 × g, 1 min). Die so vorbereiteten Proben und der Proteinmarker PageRuler Prestained Protein Ladder (10 -180 kDa) wurden in die Geltaschen übertragen. Durch Anlegen von Strom (Spannung: 50 V) wurde die Elektrophorese gestartet. Sobald die Proben das Trenngel erreichten (nach ca. 30 min), wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese war abgeschlossen, sobald die vor den Proteinen laufende Bromphenolblaubande nahezu das Ende des Gels erreicht hatte (ca. 1-2 h).

2.4.2 Proteinfärbungen

Die Anfärbung der in der SDS-PAGE getrennten Proteine erfolgte mit Hilfe einer kolloidalen Coomassie- oder einer Silberfärbung [199, 200]. Für die Anfärbung mit kolloidalem Coomassie wurden die Gele zunächst dreimal jeweils für 5 min mit Aqua bidest gewaschen. Nach der Zugabe der Coomassie-Färbelösung (Tabelle 9) verblieb das Gel unter leichtem Schütteln über Nacht in der Lösung. Die

Entfärbung des Gels erfolgte mit Aqua bidest für jeweils 15 min. Es wurden so viele Spülschritte ausgeführt, bis die Hintergrundfärbung des Gels im Vergleich zu den Proteinbanden vernachlässigbar war.

Falls höhere Sensitivitäten für die Färbung erforderlich waren, wurde eine Silberfärbung der Gele durchgeführt. Hierzu wurden die Gele dreimal á 20 min in 50 % Ethanol gewaschen und für 1 min mit 0,02 % Thiosulfatlösung behandelt. Es folgten drei Waschschrte á 20 s mit Aqua bidest. Anschließend erfolgte die eigentliche Färbung mit Silberlösung (0,2 % AgNO₃, 0,025 % Formalin) für 20 min. Es folgten zwei weitere Spülschritte á 20 s. Durch Zugabe der Entwicklerlösung (3 % K₂CO₃, 0,0004 % Na₂S₂O₃ × 5 H₂O, 0,05 % Formalin) wurden die Banden entwickelt und nach ausreichender Färbung (ca. 3-5 min) mit 1 % Glycin gestoppt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe des ChemiDoc™ MP Systems.

2.4.3 Enzymatische Spaltung und Extraktion von MAL

Mit der enzymatischen Spaltung von rekombinantem MAL (Tabelle 12) sollte erprobt werden, ob das rekombinante Protein nach Abspaltung des hydrophilen GST-Tags mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln extrahiert werden kann. Eine solche Extraktion war für das native MAL beschrieben [201]. Es wurde angestrebt, das gespaltene MAL anhand der Extraktion in ein organisches Lösungsmittel zu überführen und es dann zusammen mit Phospholipiden zu einem Lipidfilm einzutrocknen (Kapitel 2.5.1) und so in Nanodisks zu integrieren. Da zwar die Spaltung erfolgreich war, aber keine Extraktion von MAL gelang, werden hier nur die enzymatische Spaltung und das Vorgehen für die Extraktion beschrieben.

Zur Abspaltung des GST-Tags wurde MAL (etwa 650 µg) mit 7 Units Thrombin (Tabelle 11) inkubiert (16 h; 22°C). Zur Überwachung der Spaltung wurden Proben vor und nach der Inkubation genommen und die in der SDS-PAGE (Kapitel 2.4.1) aufgetrennten Spaltprodukte mittels Coomassie Blue (Kapitel 2.4.2) angefärbt. Zusätzlich wurde das gespaltene MAL mit Hilfe eines MAL-spezifischen Antikörpers (Tabelle 10) im Western Blot (Kapitel 2.6.4) nachgewiesen.

Nach der erfolgreichen enzymatischen Spaltung wurden Sediment (Glutathion-Matrix) und Überstand (ca. 400 µl) voneinander getrennt. Das Sediment wurde mit etwa 400 µl Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl) aufgeschlämmt. Sediment und Überstand wurden einer Extraktion mit einer Chloroform-Methanol-Mischung (2:1) unterzogen. Hierzu wurden jeweils 800 µl des Lösungsmittelgemisches zum Sediment bzw. zum Überstand hinzugefügt und unter Schütteln inkubiert (1 h, 4 °C). Nach Ende der Inkubation wurden die Phasen getrennt und jeweils Proben aus der organischen und wässrigen Phase genommen, um die Wiederfindung von gespaltenen MAL in den Phasen durch Auftragung in SDS-Gele (Kapitel 2.4.1) zu untersuchen. Die Proben aus der wässrigen Phase wurden direkt mit Lämmli-Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol (Tabelle 9) versetzt. Zur Aufkonzentrierung der in organischen Lösungsmitteln vorliegenden Proben wurden diese mit Hilfe eines SpeedVac™-Konzentrators (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingeengt und dann mit Probenpuffer versetzt. Nach Auftragung

in SDS-Gelen (Kapitel 2.4.1) erfolgten eine Coomassie-Färbung und anschließend eine Silberfärbung (Kapitel 2.4.2).

2.5 Herstellung von Nanodisks und SMALPs

2.5.1 Assemblierung von Nanodisks

Zur besseren Handhabung und Präsentation in einer Membranumgebung wurden endogene Rezeptoren (Glykosphingolipide bzw. MAL) in Nanodisks integriert. Dabei wurde nach einem Protokoll von Sligar vorgegangen [202]. Um bei der Assemblierung eine hohe Ausbeute an homogenen Nanodisks zu erhalten, musste das Verhältnis der Gürtelproteine MSP, der Phospholipide (in dieser Arbeit: POPC) und Rezeptoren aufeinander abgestimmt sein. Der verwendete Typ des MSP bestimmte dabei die Größe der Nanodisks und somit die molare Menge an Lipiden [203]. Tabelle 17 gibt die stöchiometrischen Verhältnisse zur Assemblierung leerer Nanodisks des jeweiligen MSP-Typs an.

Tabelle 17: Stöchiometrische Verhältnisse zur Assemblierung von Nanodisks.

MSP Typ	Durchmesser NDs (nm)	POPC (mol/mol MSP)
MSP1D1	10	32,5
MSP1E3D1	13	65

Bei der Insertion eines Rezeptors nahm dieser eine bestimmte Fläche in der Lipiddoppelschicht ein, sodass weniger Lipide zur Assemblierung notwendig waren. Das stöchiometrische Verhältnis von MSP:POPC wurde dabei so angepasst, dass eine möglichst homogene Größenverteilung in der Größenausschlusschromatographie (Kapitel 2.5.2) erhalten wurde. Für GSL-Rezeptoren wurde aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts angenommen, dass ein Molekül GSL genau ein Molekül POPC ersetzt.

Für die Assemblierung wurden zunächst die berechneten Mengen der in organischen Lösungsmitteln gelösten POPC (und GSL, falls als Rezeptor integriert) mit Hilfe einer gasdichten Spritze in Glasröhrchen überführt. Durch Drehen des Röhrchens wurden unter einem leichten Stickstoffstrom (HiQ® Minican) die organischen Lösungsmittel verdampft und so ein dünner Lipidfilm am Glasrand erzeugt. Zur restlosen Entfernung der Lösungsmittel wurden die Röhrchen über Nacht in einem unter Vakuum befindlichen Exsikkator gelagert. Die Rekonstitution der Lipide erfolgte durch Zugabe von Natriumdesoxycholat in PBS. Der rekonstituierte Lipidmix, das jeweilige MSP und falls nötig der Proteorezeptor wurden so gemischt, dass die finale Konzentration an Lipiden zwischen 5-7 mM und die Natriumdesoxycholat-Konzentration mindestens 15 mM betrug. Der Assemblierungsmix wurde 45 min bei 4 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden durch Methanol aktivierte, gewaschene Bio-Beads® abgewogen (1 mg Beads pro 1 µl des Assemblierungsmix), in 1 ml PBS aufgenommen und entgast. Nachdem der Puffer von den Beads abgesaugt wurde, wurde der vorinkubierte Assemblierungsmix auf die Bio-Beads gegeben und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Dieser Schritt entfernte das enthaltene Detergenz und führte zur spontanen Assemblierung von

Nanodisks. Zur Überwachung des Assemblierungsprozesses und zur Reinigung der Nanodisks wurde im Anschluss an die Assemblierung eine Größenausschlusschromatographie (SEC) vorgenommen.

2.5.2 Reinigung und Charakterisierung von Nanodisks

Zur Reinigung der Nanodisks wurde eine SEC-Säule (Superdex™ 200 increase 10/300 gI, Tabelle 7) an die ÄKTA-Anlage (Tabelle 4) angeschlossen und mit dem Laufpuffer PBS äquilibriert. Anschließend wurde der von den Bio-Beads abgetrennte Assemblierungsmix injiziert. Die Trennung erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,75 ml/min und wurde mit Hilfe des im ÄKTA-System integrierten UV/Vis-Detektors überwacht ($\lambda = 280 \text{ nm}$). Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Nanodisks diente die zuvor nach Herstellerangaben durchgeführte Kalibrierung der SEC-Säule mit Hilfe eines Kalibrierungskits (Tabelle 6). Die bei der Trennung anfallenden Fraktionen (je 0,5 ml) wurden mittels Fraktionssammler aufgefangen und zur Identifizierung Rezeptor-haltiger Fraktionen im indirekten ELISA (Kapitel 2.6.1) untersucht. Die dabei identifizierten Fraktionen wurden gepoolt und die Konzentration mit Hilfe eines Photometers bestimmt (Parameter MSP1D1 [204]: $\epsilon_{280} = 21,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MW = 24,7 kDa; Parameter MSP1E3D1 [205]: $\epsilon_{280} = 29,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MW = 32,6 kDa). Falls erforderlich (Stabilitätstests, Immobilisierung auf Biochips) wurden die so hergestellten Nanodisk-Präparationen durch Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon® Ultra, MWCO 10 kDa) aufkonzentriert.

2.5.3 Herstellung und Reinigung von SMALPs

Mit der Herstellung von *SMA lipid particles* (SMALPs) wurde angestrebt, den potenziellen Rezeptor von Etx aus Etx-sensitiven MDCK-Zellen (siehe 2.1.9) zusammen mit der natürlichen Lipidumgebung zu isolieren. Die Versuchsdurchführung entsprach den Angaben von Angelisová *et al.* [206]. Hierzu wurden MDCK-Zellen in EMEM F⁺ (Tabelle 15) kultiviert (siehe 2.2.1), bis eine Gesamtzellzahl von etwa 1×10^7 erreicht war. Nach Zentrifugation der Zellen ($250 \times g$, 6 min, RT), erfolgte die Inkubation des Zellpellets mit 1 ml SMA-Puffer (1 h, 20 °C). Dieser Schritt führte zur Lyse der Zellen. Nach Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$, 1 h, 4 °C) wurde der Überstand abgetrennt und per Größenausschlusschromatographie (Superdex200 increase 10/300 gI, analog zu 2.5.2) untersucht. Ausgewählte SEC-Fraktionen wurden auf Mikrotiterplatten (Nunc MaxiSorp™, Nunc, Roskilde, DK) immobilisiert und im Format eines Sandwich-ELISA (Kapitel 2.6.2) auf die Bindung von Etx bzw. CPE hin untersucht. CPE wurde als Positivkontrolle mitgeführt, da der Rezeptor Claudin-4 in MDCK-Zellen exprimiert wird [207] und entsprechende Detektionsantikörper zum Nachweis der Bindung (CPE562-Bio) vorhanden waren.

2.6 Immunoassays

2.6.1 Indirekter ELISA

Mit der Durchführung eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kann ein Antigen mit Hilfe von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern detektiert werden. Im indirekten ELISA wurde die Bindungsspezifität von Antikörpern an ein immobilisiertes Antigen bestimmt. Hierzu wurden Antigene (500 ng/ml) in PBS mit 1 µg/ml BSA auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert (50 µl/Kavität, ü. N., 4 °C). Nachdem viermal mit 300 µl PBS-T pro Kavität gewaschen wurde, erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungen mit 2 % Magermilchpulver in PBS-T (200 µl/Kavität, 1 h, RT). Darauf folgten ein weiterer Waschschriff und die Inkubation (50 µl/Kavität, 1 h, RT) mit den gereinigten Primärantikörpern in 2 % Magermilch/PBS-T (10 µg/ml) oder den Hybridomüberständen. Nachdem die Platten gewaschen wurden, schloss sich die Inkubation mit POD-gekoppelten Sekundärantikörpern an (50 µl/Kavität, 30 min, RT), die in 2 % Magermilch verdünnt vorlagen. Nachdem abschließend achtmal mit PBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Entwicklung mit TMB (100 µl/Kavität, 15 min, RT). Die Reaktion wurde mit 0,25 M H₂SO₄ (100 µl/Kavität) abgestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm) mit einem Mikroplattenleser gemessen.

2.6.2 Klassische und Rezeptor-basierte Sandwich-ELISA

Bei einem klassischen Sandwich-ELISA werden ein immobilisierter Fängerantikörper und ein Detektionsantikörper mit gleicher Antigenspezifität, aber distinkter Epitoperkennung miteinander kombiniert. Diese Assaykonfiguration wurde genutzt, um Toxine anhand einer Verdünnungsreihe eines Antigenstandards zu quantifizieren. Für Rezeptor-basierte Sandwich-ELISA wurden in dieser Arbeit anstelle der Fängerantikörper die jeweiligen endogenen Rezeptoren eingesetzt. Die weitere Durchführung entsprach für Claudin-4 einem klassischen ELISA. Bei der Verwendung von Gb3/GalCer-Nanodisks als Fänger wurde anstelle von Casein 3 % BSA/PBS als Blockpuffer verwendet.

Zunächst wurden Fängerantikörper (5-10 µg/ml), Claudin-4 (2,5 µg/ml) oder Gb3/GalCer-Nanodisks (5 µg/ml) in PBS verdünnt und auf Mikrotiterplatten immobilisiert (50 µl/Kavität, ü. N., 4 °C). Nachdem viermal mit PBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungen mit Caseinpuffer (Zusammensetzung: Tabelle 9, 200 µl/Kavität, 1 h, RT). Die gewaschenen Platten wurden anschließend mit dem in 0,1 % BSA/PBS verdünnten Antigen inkubiert (50 µl/Kavität, 2 h, RT). Nach einem Waschschriff folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Detektionsantikörper verdünnt (mindestens 1:100 oder niedrigste, in einer Titration ermittelte Konzentration mit optimalem Signal-Rausch-Verhältnis) in Caseinpuffer (50 µl/Kavität, 1 h, RT). Nachdem erneut gewaschen wurde, erfolgte die Entwicklung mit einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (50 µl/Kavität, 30 min, RT). Der finale Waschschriff (achtmal PBS-T), die Entwicklung und Messung erfolgten wie beim indirekten ELISA (Kapitel 2.6.1). Zur Auswertung wurden die Absorptionswerte in Abhängigkeit der logarithmierten Konzentrationen mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Tabelle 5) aufgetragen. Die Modellierung der Messkurve erfolgte anhand eines 4-Parameter-Fits (logistische Funktion). Am Wendepunkt dieser Kurven lagen die halbmaximalen

Effektorkonzentrationen (EC_{50}). Die Berechnung des Detektionslimits (LOD) erfolgte anhand des Mittelwertes aus mehreren Leerwertmessungen zuzüglich der 3,29-fachen Standardabweichung.

2.6.3 ELLA

Um Asialofetuin als endogenen Rezeptor von Rizin und Abrin für einen Toxinnachweis zu funktionalisieren, wurde ein zu Dawson *et al.* modifizierter *enzyme-linked lectin assay* (ELLA) durchgeführt [208]. Zu diesem Zweck wurde Asialofetuin (4 $\mu\text{g/ml}$) in 0,1 M Carbonat-Bicarbonatpuffer (pH 9,9) auf Mikrotiterplatten immobilisiert (50 $\mu\text{l/Kavität}$, ü. N., 4 °C). Nachdem die Platten viermal mit 300 μl PBS-T pro Kavität gewaschen wurden, folgte die Blockade unspezifischer Bindungen mit 3 % BSA/PBS-T (200 $\mu\text{l/Kavität}$, 2 h, RT). Nach einem Waschschrift wurden Rizin und Abrin mit 0,1 % BSA/PBS-T auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt und mit dem immobilisierten Asialofetuin inkubiert (50 $\mu\text{l/Kavität}$, 2 h, RT). Es folgte wiederum ein Waschschrift. Danach folgte die Inkubation mit toxinspezifischen biotinylierten Antikörpern in 3 % BSA/PBS-T (50 $\mu\text{l/Kavität}$, 1 h, RT). Nachdem erneut gewaschen wurde, erfolgte die Entwicklung mit einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase (50 $\mu\text{l/Kavität}$, 30 min, RT). Der finale Waschschrift, die Entwicklung und Messung erfolgten wie in Kapitel 2.6.1 und 2.6.2.

2.6.4 Western Blot

Die Durchführung eines Western Blots schloss sich an eine SDS-PAGE (Kapitel 2.6.4) an. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine PVDF-Membran zur Aktivierung für 2 s in Methanol geschwenkt, welches anschließend durch einen 2-minütigen Waschschrift in Wasser entfernt wurde. Nachfolgend wurden das entnommene Gel und die vorbereitete Membran jeweils für 20 min in Transferpuffer (Tabelle 9) äquilibriert. Die Durchführung des Elektrolots erfolgte mit Hilfe eines Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems, indem Gel, Membran und in Transferpuffer getränkte Filterpapiere den Herstellerangaben entsprechend in die Blotkassette aufgeschichtet wurden. Der Blot wurde für 30 min bei 1 A und 25 V durchgeführt. Nachdem die Proteine auf die Membran übertragen wurden, erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungen durch Inkubation der Membran in 2 % Magermilch in PBS-T (ü. N., 4 °C). Es schloss sich die Inkubation mit dem in 2 % Magermilch/PBS-T verdünnten Primärantikörper an (1 $\mu\text{g/ml}$, 1 h, RT). Nachfolgend wurde dreimal mit Blockpuffer gewaschen und mit einem biotinylierten anti-Spezies Antikörper (0,1 $\mu\text{g/ml}$) verdünnt in Blockpuffer inkubiert (30 min, RT). Nach drei weiteren Waschschriften wurde die Membran für 20 min mit dem in PBS-T verdünnten Avidin-AP-Konjugat (0,5 $\mu\text{g/ml}$, Tabelle 11) inkubiert. Es schlossen sich drei 10-minütige Waschschriften mit Blockpuffer und drei 5-minütige Waschschriften mit Assaypuffer (Tabelle 9) an. Die Membran wurde schließlich mit dem Substrat CDP-Star (Tabelle 8, nach Herstellerangaben 1:50 in Assaypuffer verdünnt) entwickelt (5 min, RT). Die resultierende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des ChemiDoc™ MP Systems (Tabelle 4) gemessen.

2.6.5 Messungen im pBDi/pTD

Für die Erprobung einer Schnelldetektion wurden die etablierten Nachweise in die Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi (Bruker Daltonik, Leipzig) bzw. der älteren Geräteversion pTD (Analytik Jena, Itzehoe) übertragen. Der Aufbau und das Messprinzip sind in Kapitel 1.5 beschrieben. Zunächst wurden die jeweiligen Fängerantikörper bzw. endogenen Rezeptoren durch die Projektpartner Bruker Daltonik bzw. Analytik Jena auf den Goldelektroden der Biochips immobilisiert. Standardmäßig wurde eine Konzentration von 0,5 mg/ml immobilisiert. Als Positivkontrolle wurden biotinylierte Kaninchen anti-Maus IgG (Bruker Daltonik, Leipzig bzw. Analytik Jena, Itzehoe) und als Negativkontrolle Maus IgG (Dianova, Hamburg) immobilisiert. Zuerst wurden alle Reagenzien und die Biochips auf Raumtemperatur vorgewärmt. Die vom Gerätehersteller bezogenen lyophilisierten Reagenzien (Substrat: *p*-Aminophenyl- β -D-galaktopyranosid, Enzym: Streptavidin-gekoppelte β -D-Galaktosidase) und der biotinylierte Antikörper (10 μ g/ml) wurden in pBDi-Assaypuffer (Bruker Daltonik, Leipzig) verdünnt. Antigene (1-100 ng/ml) wurden entweder in 0,1 % BSA/PBS oder pBDi-Assaypuffer verdünnt. Für die Messung wurden alle Reagenzien, der Laufpuffer (pBDi-Assaypuffer) und das Antigen nach den Herstellerangaben im Gerät positioniert. Nachdem der Biochip in das Gerät eingebracht und die Messung gestartet wurde, erfolgte diese vollautomatisch. Nach Abschluss einer Messung wurde ein Dekontaminationsschritt (Dekontaminationspuffer, Bruker Daltonik, Leipzig) eingeleitet. Die Gerätesoftware pBDi control bzw. pTD control (Tabelle 4) gab sowohl die gemessenen Realwerte (MW_{Real}) als auch die auf die Kontrollen (Positivkontrolle: PK, Negativkontrolle: NK) normalisierten Messwerte (MW_{Norm}) aus. Dieser Normwert berechnete sich wie folgt:

$$MW_{Norm} = \frac{MW_{Real} - NK}{PK - NK} \times 100 \%$$

Der Schwellenwert für die Abschätzung des Detektionslimits wurde anhand einer Leerprobe (Puffer ohne Antigen) bestimmt. Hierbei ergab sich der Schwellenwert in nA/min aus dem Mittelwert der Leerwertmessung der Doppelspots eines immobilisierten Fängers zuzüglich 3,29-facher Standardabweichung. Als Detektionslimit wurde die niedrigste gemessene Konzentration festgelegt, die über dem Schwellenwert lag.

2.7 SPR-basierte Methoden

Für die hier durchgeführten SPR-basierten Methoden wurden die Biacore™ Systeme X100 oder T200 (Tabelle 4) verwendet. Da das Biacore T200 mehr Flusszellen als das X100 besitzt, war der Einsatz dieses Geräts vor allem vorteilhaft, wenn ein hoher Probendurchsatz erforderlich war (z.B. Screenings). Um Interaktionen mittels SPR-Messungen zu untersuchen, muss zunächst ein Ligand auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert werden. Je nach verwendetem Sensorchip und den biochemischen Eigenschaften des Liganden kommen verschiedene Immobilisierungsformen in Frage. In der vorliegenden Arbeit wurden

ausschließlich CM5-Sensorchips verwendet (Tabelle 7), auf deren Goldoberfläche kovalent gebundene carboxymethylierte Dextrane vorliegen. Die Carboxylgruppen ermöglichten es, Proteine über die Aminogruppen kovalent an die Oberfläche zu binden (Tabelle 18). In der einfachsten Assaykonfiguration interagiert der Analyt direkt mit dem kovalent auf der Oberfläche gebundenen Liganden (Asialofetuin, siehe 2.7.1). Bei der zweiten hier angewandten Assayvariante immobilisierte zunächst ein auf der Chipoberfläche kovalent gekoppelter, gegen den Liganden (anti-Maus für mAks) bzw. seine Affinitätstags gerichteter Antikörper (anti-GST für GST-getaggtetes Claudin-4, anti-His für Nanodisks) den Liganden indirekt (siehe 2.7.2). Anschließend wurde die Bindung des Analyten an den indirekt immobilisierten Liganden untersucht. Um die Oberfläche für eine erneute Messung zu regenerieren, erfolgte die Injektion eines Regenerationspuffers. Dieser führte dazu, dass entweder die Interaktion zwischen Ligand und Analyt (Asialofetuin) oder Ligand und Fängerantikörper (Claudin-4, Nanodisks, mAks) gelöst wurde. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Als Laufpuffer dienten HBS-EP+ oder HBS-N (Tabelle 9).

Tabelle 18: Immobilisierungs- und Regenerationsarten in SPR-Assays.

Ligand	Immobilisierungsart	Laufpuffer	Regenerationspuffer
Asialofetuin	kovalent, NHS/EDC	HBS-EP+	Rizin, Abrin: 0,1 M Laktose/1 M NaCl Aggl.: 10 mM HCl, 10 mM Glycin-HCl (pH 2,1)
Claudin-4	GST Capture	HBS-EP+	10 mM Glycin-HCl (pH 2,1)
NDs	His Capture	HBS-N	10 mM Glycin-HCl (pH 1,5)
mAks	Mouse Capture	HBS-EP+	10 mM Glycin-HCl (pH 1,7)

Aggl. = Agglutinine, mAks = monoklonale Antikörper, NDs = Nanodisks

2.7.1 Direkte Immobilisierung von Asialofetuin

Die kovalente Bindung von Asialofetuin an die CM5-Chipoberfläche wurde analog zu der Dissertation von Matthew C. Blome durchgeführt [209]. Hierzu wurde Asialofetuin (5 µg/ml, Tabelle 12) in 10 mM Natriumacetat (pH 4,5) verdünnt und mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Amine Coupling Kit, Tabelle 6) über eine EDC/NHS-Kopplungschemie entsprechend den Herstellerangaben auf der Messflusszelle immobilisiert. Auf der Kontrollflusszelle wurde BSA (4 µg/ml) unter den gleichen Bedingungen wie Asialofetuin immobilisiert. Mit Hilfe des voreingestellten Programmes „Target level“ der Biacore Control Software (Tabelle 5) wurde für beide Flusszellen ein finales Immobilisierungslevel von 250 RU gewählt. Diese niedrige Immobilisierungssichte wurde gewählt, um die sterische Zugänglichkeit von Asialofetuin zu garantieren und um Massentransporteffekte zu vermeiden. Nach der Interaktion mit dem Analyten (siehe Bindungskinetik, 2.7.3), erfolgte die Regeneration der Oberfläche durch Injektion von 0,1 M Laktose in 1 M NaCl (60 s, 30 µl/min, für Rizin und Abrin) oder aufeinanderfolgende Injektionen von 10 mM HCl (90 s, 10 µl/min) und 10 mM Glycin/HCl (pH 2,1, 120 s, 10 µl/min, für *R. communis* Agglutinin und *Abrus* Agglutinin), sodass Asialofetuin und BSA für den nächsten Messzyklus bereitstanden.

2.7.2 Kovalente Kopplung von Fängerantikörpern zur Immobilisierung von Liganden

Für die Immobilisierung der Fängerantikörper wurde das jeweilige kommerziell verfügbare GST-Capture-, His Capture bzw. Mouse Capture-Kit (Tabelle 6) sowie das Amine Coupling Kit (Tabelle 6) verwendet und den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Hierzu wurden die im Kit enthaltenen Fängerantikörper mittels EDC/NHS-Kopplungschemie an die Sensoroberfläche des CM5-Chips gebunden. Bei dem GST Capture und dem Mouse Capture Kit kamen hier polyklonale Antikörper zum Einsatz, die jeweils in 10 mM Natriumacetat (pH 5,0) verdünnt wurden (30 µg/ml). Der im His Capture Kit enthaltene Antikörper war monoklonal und wurde in 10 mM Natriumacetat (pH 4,5) verdünnt (50 µg/ml). Kontroll- und Messflusszellen wurden jeweils gleich immobilisiert. Für die nachfolgende Durchführung der entsprechenden SPR-Assays (2.7.3 für Bindungskinetik, 2.7.4 für Epitopbinning), folgte die indirekte Immobilisierung von Liganden auf der Kontroll- und Messflusszelle.

2.7.3 Bestimmung der Bindungskinetik

Um die Bindungskinetik der entsprechenden Antigene an ihre endogenen Rezeptoren bzw. monoklonalen Antikörper zu bestimmen, mussten auf der Messflusszelle (Tabelle 19, Mess-Fc) die entsprechenden, spezifischen Liganden (Claudin-4, NDs mit Rezeptor oder toxinspezifische mAk) immobilisiert werden (Immobilisierungsdichte von 300 - 500 RU). Zur Kompensierung von Matrixeffekten des Puffers und unspezifischer Bindung des Analyten an die Chipoberfläche diente eine Kontrollflusszelle (Tabelle 19, Kontroll-Fc), die entweder mit einem unspezifischen, strukturell ähnlichen Liganden (GST, aus GST Capture Kit von GE Healthcare, Chicago, USA; leere NDs, selbst hergestellt, siehe 2.5.1) oder nicht immobilisiert wurde (Mouse Capture). Für das direkt immobilisierte Asialofetuin (2.7.1) diente eine mit BSA immobilisierte Flusszelle als Kontrolle.

Tabelle 19: Immobilisierung von Kontroll - und Messflusszellen.

Immobilisierung	Liganden auf Flusszellen		Anwendung/Antigene
	Mess-Fc	Kontroll-Fc	
GST Capture (indirekt)	Claudin-4	GST	Kinetik: CPE
His Capture (indirekt)	Asialo-GM1-NDs bzw. Gb3/GalCer-NDs	leere NDs	Kinetik: Rizin, Abrin, Agglutinine Kinetik: Shigatoxine
Mouse Capture (indirekt)	spezifischer mAk	keine	Kinetik: alle Antigene Epitopbinning: CPE, Etx, Shigatoxine
direkt	Asialofetuin	BSA	Kinetik: Rizin, Abrin, Agglutinine

Fc = Flusszelle, GST = Glutathion-S-Transferase, mAk = monoklonaler Antikörper, NDs = Nanodisks, pAk = polyklonaler Antikörper

Nachdem die entsprechenden Liganden immobilisiert wurden, konnten durch Injektion des Analyten (siehe Tabelle 19) die kinetischen Bindungsparameter der Ligand Analyt Interaktionen bestimmt werden. Die Durchführung dieser Kinetikassays erfolgte entweder in Form von seriellen Injektionen verschiedener Konzentrationen des Analyten innerhalb eines Messzyklus und anschließender Regeneration (single cycle)

oder durch sequentielle Injektion der verschiedenen Analytkonzentrationen in separaten Messungen mit jeweils einem Regenerationsschritt zwischen den Zyklen (multi cycle).

Für die Assoziation des Analyten wurden Kontaktzeiten zwischen 60 s und 180 s bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt. Die Dissoziation des Analyten vom Liganden wurde durch eine Pufferinjektion eingeleitet (300 s bis 1200 s, 30 $\mu\text{l}/\text{min}$). Längere Dissoziationszeiten dienten dabei der präziseren Bestimmung von hochaffinen Bindungen mit sehr geringen Dissoziationsgeschwindigkeiten. Die unspezifischen Bindungssignale der jeweiligen Kontrollflusszellen wurden anschließend von den Signalen der Messflusszelle subtrahiert.

Um eine mögliche Drift der Basislinie auszugleichen, wurden zusätzlich zu den eigentlichen Messzyklen nachfolgende Kontrollmesszyklen mit Pufferinjektionen statt Injektion des Analyten durchgeführt. Die Messzyklen (Injektion des Analyten) wurden anschließend auf die Kontrollmesszyklen (Pufferinjektion) referenziert. Die kinetischen Bindungsparameter der Interaktion wurden anhand der resultierenden, referenzierten Bindungskurven mit Hilfe der Software Biacore™ X100 Evaluation bzw. Biacore™ T200 Evaluation (Tabelle 5) bestimmt. Hierzu diente ein 1:1 Bindungsmodell (Langmuir) mit globalem R_{max} .

2.7.4 Bestimmung distinkter Epitoperkennung durch Epitopbinning

Für die Charakterisierung monoklonaler Antikörper wurde zusätzlich zur Bindungskinetik ein Epitopbinning durchgeführt. Anhand dieser Methode können monoklonale Antikörper mit distinkter Epitoperkennung und somit geeignete Sandwich-Kombinationen aus zwei monoklonalen Antikörpern identifiziert werden. Prinzipiell wird auf dem CM5 Chip ein Sandwich ELISA nachgestellt. Abbildung 10 zeigt einen exemplarischen Kurvenverlauf eines Epitopbinnings. Hierzu wurde ein Fängerantikörper (mAk1 in schwarz, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. unverdünnte Hybridomüberstände) via Mouse Capture Kit auf einem CM5 Chip immobilisiert (2.7.2). Der verzeichnete Signalanstieg entsprach dem Immobilisierungslevel des mAk1 (Level mAk1). Nachfolgend führte die Bindung des injizierten Antigens (rot, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durch den Fängerantikörper zu einem weiteren Signalanstieg (Level Antigen). Die durch die Injektion eines Detektionsantikörpers (mAk2 in grau, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. unverdünnte Hybridomüberstände) resultierende Signalentwicklung (Level mAk2), gab Aufschluss darüber, ob mAk1 und mAk2 distinkte Epitope erkennen (Signalanstieg bei distinkten Epitopen, kein Signalanstieg bei identischen Epitopen). Als Negativkontrolle (NK, gestrichelte Linie) erfolgte eine Injektion von mAk1 anstelle von mAk2.

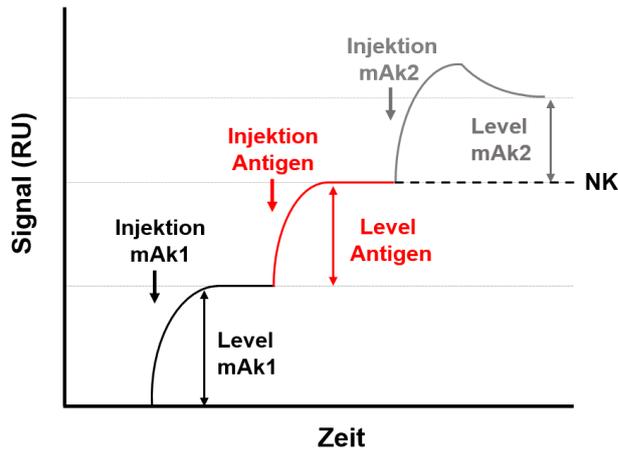


Abbildung 10: Kurvenverlauf eines Epitopbindungsassays.

Dargestellt ist ein Sensorgramm (Signal in Abhängigkeit der Zeit). Die Injektion eines Fängerantikörpers (mAk1, schwarz) führte zu einem Signalanstieg (Level mAk1). Es folgte die Injektion des Antigens (rot) und dessen Bindung an mAk1 (Level Antigen). Die Injektion eines zweiten, von mAk1 verschiedenen mAk2 (grau) erzeugte einen Signalanstieg (Level mAk2) bei distinkter Epitoperkennung der beiden mAk. Bei identischer Epitoperkennung lag das Signal konstant, wie bei der Negativkontrolle (NK, Injektion von mAk1). mAk = monoklonaler Antikörper.

Um die Kurvenverläufe beurteilen zu können, erfolgte eine rechnerische Auswertung. Hierzu wurde das Antigenlevel zunächst auf das Immobilisierungslevel des Fängerantikörpers (Level mAk1) bezogen:

$$\text{normalisiertes Level}_{\text{Antigen}} = \frac{\text{Level}_{\text{mAk1}}}{\text{Level}_{\text{Antigen}}}$$

Das um die Negativkontrolle (NK) bereinigte Level des mAk2 wurde anschließend mit dem normalisierten Antigenlevel ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{normalisiertes Level}_{\text{mAk2}} = \frac{\text{Level}_{\text{mAk2}} - \text{NK}}{\text{normalisiertes Level}_{\text{Antigen}}}$$

Dieses normalisierte Detektorlevel (Level mAk2) wurde wiederum auf das maximal erreichbare Level des mAk2 (in allen getesteten Kombinationen) bezogen. Die so erhaltenen unterschiedlichen relativen Bindungskapazitäten wurden miteinander korreliert. Daraus ergeben sich Werte zwischen -1 (unterschiedliches Bindungsverhalten) bis +1 (identisches Bindungsverhalten).

3 Ergebnisse

Eine Vielzahl von immunologischen Nachweissystemen basiert auf dem Einsatz monoklonaler Antikörper, welche aufgrund ihrer spezifischen Erkennung des Zielmoleküls in der Regel einen sicheren Nachweis ermöglichen (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.3.4). Aufgrund der strukturellen Heterogenität der untersuchten biologischen Toxine besteht die Gefahr, dass ein Nachweis mit monoklonalen Antikörpern nicht alle Subtypen bzw. Isoformen der Toxine erfasst. Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung breitbandiger Nachweissysteme basierend auf den endogenen Rezeptoren ausgewählter Toxine als Fängerstruktur in Kombination mit Detektionsantikörpern. Diese innovativen Nachweissysteme sollten vergleichend zu klassischen, rein Antikörper-basierten Sandwich-ELISAs charakterisiert werden. Für alle Toxine wurden Rezeptor- und Antikörper-basierte Nachweisverfahren parallel bearbeitet (Abbildung 11). Ausgangspunkt für beide Ansätze war die Charakterisierung der Bindung zwischen Antikörper und Antigen bzw. zwischen Rezeptor und Antigen. Nur bei hochaffinen Interaktionen ist bei der späteren Verwendung als Fänger mit einem sensitiven Nachweis zu rechnen.

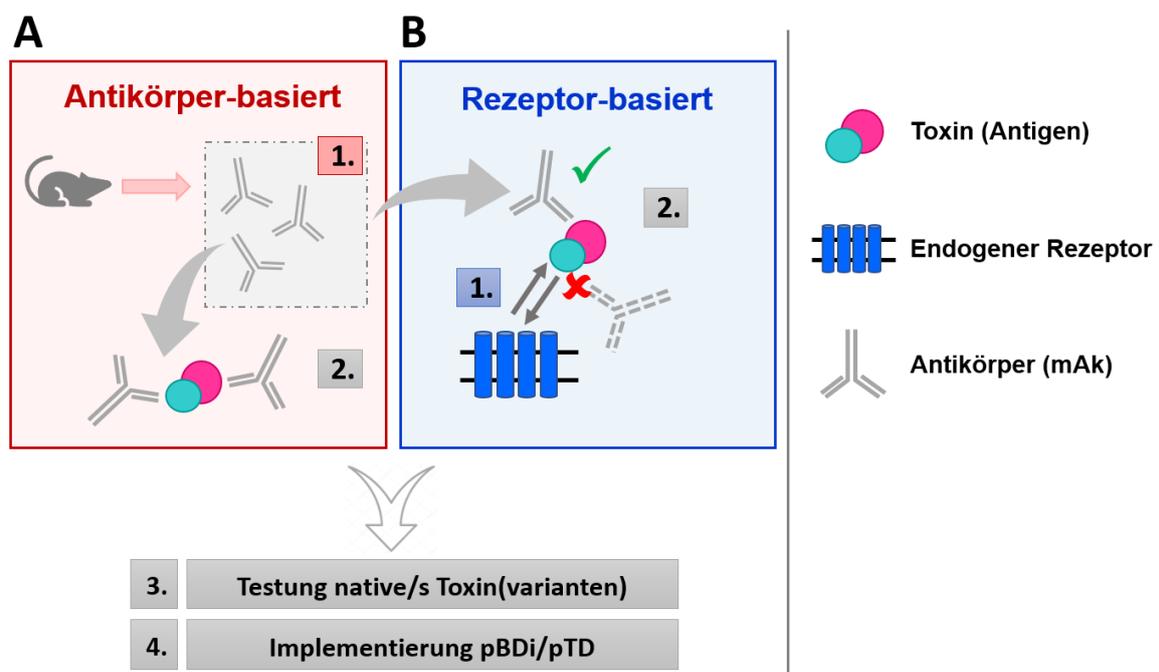


Abbildung 11: Entwicklung von Antikörper- und Rezeptor-basierten Nachweissystemen.

Die Entwicklung Antikörper-basierter (**A, rot**) und Rezeptor-basierter Nachweissysteme (**B, blau**) erfolgte parallel. Nach Auswahl erworbener oder generierter monoklonaler Antikörper wurden diese umfassend charakterisiert (**A 1**). Für den klassischen Sandwich-ELISA wurden Kombinationen aus Fänger- und Detektionsantikörper (**A 2**) etabliert. Für den Rezeptor-basierten Ansatz erfolgte zunächst die Charakterisierung der Interaktion zwischen Toxin und Rezeptor (**B 1**). Antikörper mit geeigneten Bindungseigenschaften fanden Verwendung als Detektionsantikörper (**B 2**) in Kombination mit dem endogenen Rezeptor. Die etablierten Nachweise aus A und B wurden zur Messung der nativen Toxine bzw. Toxinvarianten verwendet (**3**). Geeignete Nachweise wurden in die Vor-Ort-Plattform pBDi überführt (**4**).

In beiden Strategien (Rezeptor-basiert und Antikörper-basiert) werden monoklonale Antikörper benötigt, da der Nachweis des Toxins auch bei der Verwendung des Rezeptors mit geeigneten Detektionsantikörpern erfolgt, die breitbandig alle bekannten Toxinvarianten binden müssen. Diese Antikörper wurden entweder von kommerziellen Anbietern, Projektpartnern oder aus der eigenen Arbeitsgruppe bezogen. Falls keine

geeigneten Antikörper verfügbar waren, wurde die Generierung monoklonaler Antikörper nach der Hybridomtechnologie durchgeführt. Nach umfangreicher Charakterisierung der Antikörper konnten diese zum einen auf ihre Eignung als Detektionsantikörper in Kombination mit dem endogenen Rezeptor als Fängerstruktur geprüft und zum anderen für den Aufbau von klassischen Sandwich-ELISA-Kombinationen erprobt werden. Die sensitivsten Nachweise wurden anschließend mit nativen Toxinen bzw. soweit vorhanden verschiedenen Toxinvarianten auf ihre Nachweisbreite hin getestet. Abschließend erfolgte die Übertragung in die Vor-Ort-Detektionsplattform. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Gerätevarianten dieser Plattform verwendet: Das ältere Modell pTD (*portabler Toxindetektor*, Analytik Jena) und das im Kofferformat verfügbare pBDi (*portable BioDetector integrated*, Bruker Daltonik) (siehe 1.5). Die nachfolgenden Ergebnisse für die verschiedenen Toxine gliedern sich nach der hier beschriebenen Vorgehensweise bei der Entwicklung der Nachweissysteme.

3.1 Pflanzentoxine Rizin und Abrin

Die beiden Pflanzentoxine Rizin und Abrin binden über ihre B-Kette an terminale Galaktosereste auf der Zelloberfläche (1.4.1). Da die Bindungstaschen für Zucker zwischen beiden Toxinen hochkonserviert sind [210], liegt ein ähnliches Bindungsverhalten für Rizin und Abrin nahe. Es wurde daher angestrebt, die Pflanzentoxine über ihre Lektinbindung in den Nachweissystemen anzureichern. Zu diesem Zweck dienten verschiedene Rezeptorkonstrukte.

3.1.1 Antigencharakterisierung der verwendeten Pflanzentoxine

Standardmäßig werden Rizin und Abrin in der Arbeitsgruppe als Rohextrakt aus den Samen von *R. communis* bzw. *A. precatorius* nach einem zu [211] modifizierten Protokoll gereinigt. Durch die Kombination aus einer Lektin-Affinitätschromatographie und einer nachfolgenden Größenausschlusschromatographie können Rizin [196] bzw. Abrin in hoher Reinheit hergestellt werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Zusammensetzung der verwendeten Pflanzentoxine (Rizin, Abrin).

Bezeichnung	Ursprung	Reinigung	Zusammensetzung
Rizin	Rohextrakt (<i>R. communis</i> Kultivar <i>carmencita</i>)	Affinitätschromatographie, SEC	> 97 % Rizin Isoformen D und E [196]
Abrin Mischung	Rohextrakt (<i>A. precatorius</i>)	Affinitätschromatographie	Abrin-a, -b (ca. 50 %); <i>Abrus</i> Agglutinin (50 %)
Abrin-a		Affinitätschromatographie, SEC	> 90 % Abrin-a

SEC = Größenausschlusschromatographie

Alle Antigene wurden in der Arbeitsgruppe von Sylvia Worbs hergestellt und charakterisiert. Der Anteil der Toxine bzw. Agglutinine wurde durch Färbung in Proteingelen bestimmt. Die Identifizierung der Toxinisoformentypen erfolgte mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden. Rizin lag in ausreichender Menge als hochreines Material vor und wurde für alle hier durchgeführten Versuche verwendet. Da das Antigen

aus dem Kultivar *R. communis carmencita* stammte, handelte es sich um eine Mischung aus Rizin D und E. Für Abrin wurden aufgrund begrenzter Materialmengen nur einzelne Versuche mit dem gereinigten Toxin (Abrin-a) durchgeführt. Alternativ wurde eine Mischung aus den Isoformen Abrin-a und -b und *Abrus* Agglutinin verwendet.

3.1.2 Affinität von Asialofetuin und Asialo-GM1 als Rezeptoren für Rizin und Abrin

Die Grundvoraussetzung für die Implementierung des Rezeptors in einen Immunoassay zum Nachweis des Toxins ist eine ausreichend hohe Bindungsaffinität zwischen endogenem Rezeptor und Toxin. Für Rizin ist bekannt, dass es an das Glykoprotein Asialofetuin sowie das Glykosphingolipid Asialo-GM1 bindet. Um zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen Rizin bzw. Abrin und ihren zellulären Rezeptoren mit ausreichend hoher Affinität für den Nachweis der Toxine abgebildet werden kann, wurden Bindungskinetiken mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Surface Plasmon Resonance, SPR) bestimmt (Kapitel 2.7.3). Zu diesem Zweck wurden Asialofetuin und Asialo-GM1 auf der Oberfläche eines SPR-Sensorchips immobilisiert (Abbildung 12).

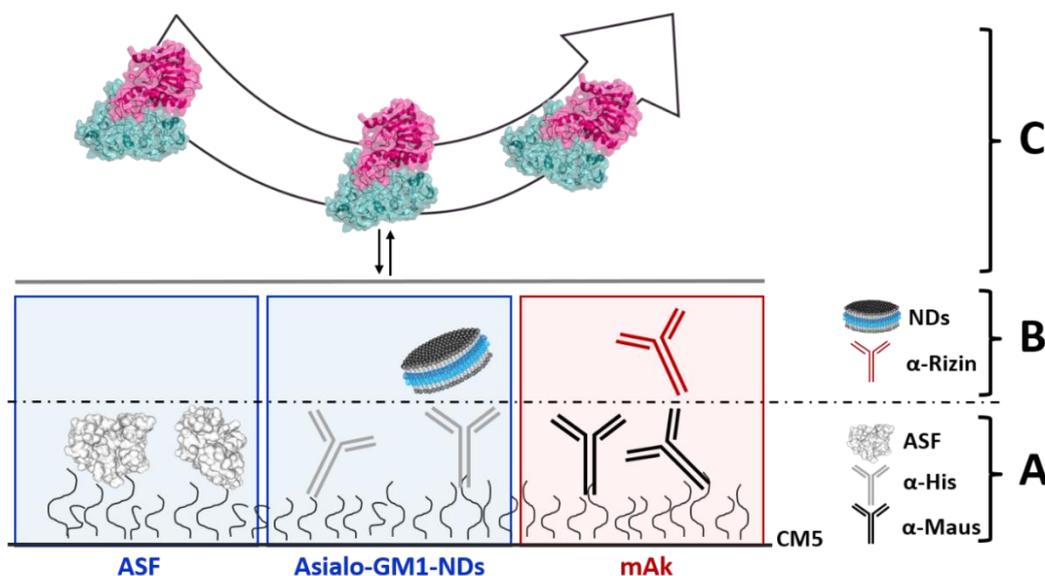


Abbildung 12: SPR-basierte Assays zur Bestimmung der Bindungskinetik am Beispiel von Rizin.

Dargestellt ist der Ablauf der Kinetikmessung für die Interaktion von Rizin mit den verschiedenen möglichen Fängern. **A.** Kovalente Kopplung über EDC/NHS-Chemie an die Carboxymethyl-dextran-Oberfläche des Sensorchips von Asialofetuin (ASF), anti-His und anti-Maus-Antikörper. **B.** Immobilisierung von Nanodisks (NDs) oder monoklonalem anti-Rizin-Antikörper (mAk) über die vorher kovalent gekoppelten Antikörper. **C.** Injektion von Rizin und anschließende Interaktion (Assoziation und Dissoziation) mit den in A (ASF) und B (Asialo-GM1-NDs; anti-Rizin mAk) immobilisierten Fängern. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Teil der gefangenen Strukturen innerhalb eines Messzyklus, die sich nach dem Regenerationsschritt von der Oberfläche lösen. Für die Visualisierung der Proteinstrukturen dienten folgende PDB-Einträge: 2AAI (Rizin) und 6HPV (Fetuin).

Asialofetuin kann als Protein über die Aminogruppen kovalent an die Carboxymethyl-dextranmatrix des Sensorchips gebunden werden (2.7.1). Für Asialo-GM1 erfolgte die Integration in Phospholipidnanodisks (2.5.1 und 2.5.2), um den Rezeptor in natürlicher Lipidumgebung zu präsentieren und um eine

Immobilisierung über den His-Tag des MSP zu ermöglichen. Die Integrität der hergestellten Nanodisks wurde anhand einer Gelfiltration kontrolliert (Chromatogramm siehe Anhang, Abbildung 45). Erhaltene Fraktionen wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers im indirekten ELISA (2.6.1) auf die Anwesenheit der Ganglioside überprüft (ELISA-Ergebnisse siehe Anhang; Abbildung 45). Als Positivkontrolle für die Interaktion mit Nanodisks in SPR-basierten Messungen diente die Bindung von Cholera-Toxin an in Nanodisks integriertes GM1 (siehe Anhang, Abbildung 46), da für diese Interaktion eine hochaffine Bindung in der Literatur beschrieben war [183].

Vergleichend zu den endogenen Rezeptoren wurde die Bindungskinetik jeweils eines murinen monoklonalen Rizin- (R21) bzw. Abrin-spezifischen Antikörpers (AP430) bestimmt, die bereits zu Beginn der Arbeit in der Arbeitsgruppe vorlagen. Die Immobilisierung dieser Antikörper erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Mouse Capture Kits (GE Healthcare, Kapitel 2.7.2). Unter Anwendung eines 1:1-Bindungsmodell nach Langmuir wurden anhand der Bindungskurven (Abbildung 13) die kinetischen Parameter ermittelt (Tabelle 21).

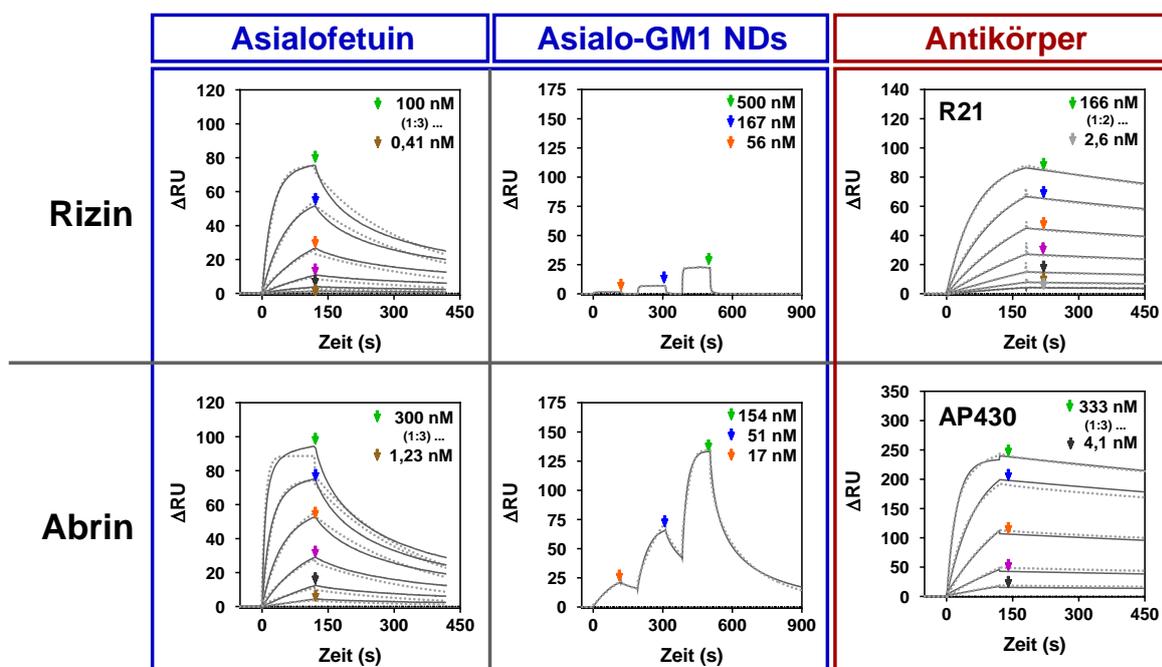


Abbildung 13: SPR-Bindungskinetik von Rizin und Abrin an Asialofetuin, Asialo-GM1-NDs und mAk.

Links: Asialofetuin wurde kovalent über eine EDC/NHS Kopplung auf die Messflusszelle eines CM5 Chip immobilisiert (Kontrollflusszelle: Immobilisierung von BSA). Die Toxine (Rizin, Abrin a) wurden in einer 1:3 Verdünnungsreihe in separaten Zyklen (multi-cycle) injiziert (120 s, 30 μ l/min). Mit der Injektion von Laufpuffer (HBS EP+) wurde die Dissoziation (300 s) eingeleitet. **Mitte:** Asialo-GM1-Nanodisks wurden durch Nutzung eines His Capture Kits immobilisiert (Kontrollflusszelle: leere Nanodisks). Eine 1:3 Verdünnungsreihe von Rizin bzw. Abrin-Mischung wurde jeweils in einem Zyklus (single-cycle) injiziert (120 s, 30 μ l/min). Die Dissoziation wurde für 400 s verfolgt. **Rechts:** Die Messergebnisse für die Antikörper R21 (α -Rizin) und AP430 (α -Abrin) wurden von Daniel Stern (RKI) zur Verfügung gestellt. Die Immobilisierung erfolgte mittels Mouse Capture Kit. Die Assoziation (180 s oder 120 s, 30 μ l/min) wurde durch Injektion einer 1:2 Verdünnungsreihe von Rizin bzw. Abrin-a in separaten Zyklen bestimmt. Die Messung der Dissoziation erfolgte für 600 s (dargestellt sind 270 bzw. 330 s). Messkurven sind in durchgezogenen, Fit-Kurven in gestrichelten Linien dargestellt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde ein 1:1 Bindungsmodell verwendet.

Tabelle 21: Bindungskinetik von Rizin und Abrin an verschiedene Fängerstrukturen.

Antigen	Ligand	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Rizin	Asialofetuin	$5,3 \times 10^5$	$5,2 \times 10^{-3}$	$9,9 \times 10^{-9}$
	Asialo-GM1-NDs	$2,2 \times 10^4$	$4,4 \times 10^{-1}$	$2,0 \times 10^{-5}$
	mAk R21	$9,0 \times 10^4$	$4,9 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-9}$
Abrin	Asialofetuin	$4,3 \times 10^5$	$4,2 \times 10^{-3}$	$9,7 \times 10^{-9}$
	Asialo-GM1-NDs	$7,0 \times 10^{8*}$	$3,1 \times 10^{1*}$	$4,5 \times 10^{-8*}$
	mAk AP430	$1,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-9}$

k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante; K_D = Affinitätskonstante; NDs = Nanodisks

*keine zuverlässige Ermittlung von k_a und k_d möglich, da Messwerte außerhalb des Messbereichs des verwendeten Geräts liegen (Biacore T200)

Rizin und Abrin wiesen ähnliche Assoziations- und Dissoziationsraten und damit ähnliche Affinitäten gegenüber dem Glykoprotein Asialofetuin auf. Im Vergleich hierzu ergab die Interaktion der Toxine mit monoklonalen Fängerantikörpern ähnliche Assoziationsgeschwindigkeiten und eine ca. zehnfach niedrigere Dissoziationskonstante. Insgesamt ist die Bindung an Asialofetuin mit K_D -Werten von 9,9 nM (Rizin) und 9,7 nM (Abrin) geringfügig niedrigaffiner als die Bindung an toxinspezifische monoklonale Antikörper mit K_D -Werten von 5,4 nM (Rizin) und 2,5 nM (Abrin).

Die Bindung an Asialo-GM1-Nanodisks lieferte für die beiden Toxine ein heterogeneres Bild. Für die niedrigaffine Bindung von Rizin an das Gangliosid ergab sich aufgrund der sehr schnellen Dissoziation eine Affinitätskonstante im hohen mikromolaren Bereich. Diese liegt etwa fünf Log-Stufen höher als bei der hochaffinen Bindung der Toxine an monoklonale Antikörper. Abrin band im Gegensatz zu Rizin jedoch deutlich besser an Asialo-GM1-Nanodisks. Da die ermittelten kinetischen Parameter dieser Interaktion außerhalb des Messbereichs lagen, können keine konkreten Aussagen zu den Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeiten gemacht werden. Anhand des Kurvenverlaufs lässt sich aber beurteilen, dass Abrin mit etwas niedrigerer Affinität an Asialo-GM1-Nanodisks bindet als an Asialofetuin.

Da für die zu Abrin bzw. Rizin homologen Lektine *Abrus* Agglutinin bzw. *Ricinus communis* Agglutinin in der Literatur eine ähnliche Kohlenhydratspezifität beschrieben ist [212], wurde die Interaktion dieser Lektine mit Asialofetuin bzw. Asialo-GM1 untersucht (SPR-Bindungskurven siehe Anhang: Abbildung 47, Abbildung 48). Dabei zeigte sich, dass *Ricinus communis* Agglutinin das gleiche Bindungsverhalten wie Rizin aufwies. Es band nur an Asialofetuin, aber nicht an Asialo-GM1. *Abrus* Agglutinin verhielt sich ebenfalls analog zu Abrin und band sowohl Asialofetuin als auch Asialo-GM1. Da für die Bindungskinetik von Abrin an Asialo-GM1 eine Mischung aus Abrin und *Abrus* Agglutinin als Antigen diente (Tabelle 20), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier beobachtete Bindung von Abrin an Asialo-GM1-Nanodisks auf das im Antigen enthaltene *Abrus* Agglutinin zurückzuführen ist.

Insgesamt war neben der hochaffinen Interaktion mit monoklonalen Antikörpern die Bindung von Asialofetuin gegenüber beiden Toxinen ausreichend affin, um als gemeinsamer Fänger in den zu entwickelnden Immunoassays eingesetzt zu werden. Prinzipiell konnte darüber hinaus Asialo-GM1 erfolgreich in Nanodisks integriert werden. Während Rizin hierbei keine hochaffine Bindung an die

Nanodisks aufwies, zeigte Abrin nahezu vergleichbare Affinitäten bezüglich der Bindung an Asialo-GM1-Nanodisks und Asialofetuin. Zusammenfassend zeigten sowohl die monoklonalen Antikörper als auch Asialofetuin vielversprechende Bindungseigenschaften und wurden daher in Assays zum Rizin- und Abrinnachweis implementiert.

3.1.3 Vergleich von Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis von Rizin und Abrin

Um den Nachweis von Abrin und Rizin mit Rezeptoranreicherung über Asialofetuin mit der Anreicherung über monoklonale Fängerantikörper zu vergleichen, wurden jeweils passende monoklonale Detektionsantikörper mit den Rezeptoren bzw. den monoklonalen Fängerantikörpern im Sandwich-ELISA kombiniert. Ziel war es, sowohl mit dem Rezeptor- als auch mit dem Antikörper-basierten Ansatz möglichst sensitive Assays zu etablieren. Zu diesem Zweck konnte auf ein Panel an bereits in der Arbeitsgruppe vorliegenden, monoklonalen Antikörpern zurückgegriffen werden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Eigenschaften der vorliegenden Rizin- und Abrin-spezifischen Antikörper.

Antigen	Antikörper	Affinität (nM)	Spezifität	Kombi mit ASF
Rizin	R21	5,4*	Rizin; A-Kette [98]	n.d.
	R18	0,43*	Rizin; A-Kette [98]	Ja
Abrin	AP430	2,5*	Abrin-a	nein
	AP3202	0,5 [115]	Abrin-a [115]	ja

ASF = Asialofetuin; n.d. = nicht durchgeführt

*Daten wurden freundlicherweise von D. Stern (RKI) zur Verfügung gestellt

Für den klassischen Sandwich-ELISA wurde in Vorarbeiten von Diana Pauly (RKI) ein sensitiver Nachweis für Rizin bestehend aus mAk R21 und biotinyliertem mAk R18 aufgestellt. Der Nachweis von Abrin durch AP430 als Fänger und AP3202 als Detektor wurde von Eva-Maria Hansbauer (RKI) beschrieben [115]. Des Weiteren wurde der Einsatz von Asialofetuin als Fänger im *enzyme-linked lectin assay* (ELLA) gut charakterisiert [115, 208]. Bei diesem Lektinbindungsassay kommt statt des im ELISA verwendeten Fängerantikörpers ein kohlenhydratbindendes Protein (Lektin) als Fänger zum Einsatz. Da Rizin über seine B-Kette an Asialofetuin bindet, eigneten sich zur Detektion am besten A-Ketten-spezifische Antikörper, die nicht mit der Lektinbindung interferieren. Dementsprechend fiel die Wahl auf R18-Bio. Für Abrin-spezifische Antikörper fehlten Informationen bezüglich der Kettenspezifität, sodass Vortestungen mit verschiedenen vorliegenden monoklonalen Antikörpern erfolgten. Hier erwies sich AP3202 als bester monoklonaler Detektionsantikörper in Kombination mit Asialofetuin als Fänger (für EC₅₀-Werte im ELLA siehe Anhang, Tabelle 50).

Die beschriebenen Kombinationen wurden jeweils für Rizin und Abrin in einen Sandwich-ELISA (2.6.2) bzw. ELLA (2.6.3) integriert und verglichen (Abbildung 14). Die ermittelten halbmaximalen Effektorkonzentrationen (EC₅₀) und Nachweisgrenzen sind in Tabelle 23 zu finden. Hierbei war ein hochsensitiver Nachweis von Rizin mit dem Antikörper- und dem Rezeptor-basierten Ansatz möglich. Für beide Systeme lag die Nachweisgrenze im unteren pg/ml Bereich.

Der Nachweis von Abrin fiel insgesamt weniger sensitiv aus als der Nachweis von Rizin. Mit einer halbmaximalen Effektorkonzentration von 24,6 ng/ml ist die Detektion von Abrin im ELLA um den Faktor acht weniger sensitiv als im klassischen ELISA. Da für den Nachweis im ELLA und im Sandwich-ELISA als Antigen die Abrin-Mischung zum Einsatz kam (Abrin und *Abrus* Agglutinin, Tabelle 20), ist die hier angegebene Sensitivität des Abrin-Nachweises nicht präzise. Es lässt sich aber beurteilen, dass der Nachweis im ELLA etwa um den Faktor 20 weniger sensitiv ist als der Nachweis im Sandwich-ELISA.

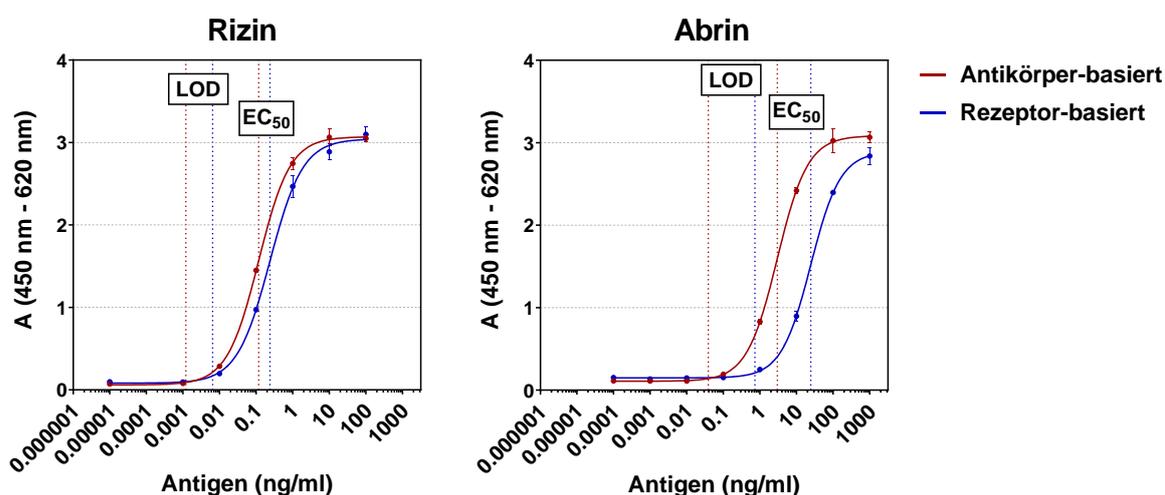


Abbildung 14: Vergleich von Sandwich-ELISA und ELLA zur Detektion von Rizin und Abrin.

Für den ELLA (blau) wurde Asialofetuin zu 4 µg/ml in Carbonatpuffer (pH 9,9) verdünnt und immobilisiert. Antikörper-basierte Nachweise (ELISA, rot) erfolgten unter Immobilisierung toxinspezifischer Antikörper (α-Rizin: R21; α-Abrin: AP430 je 10 µg/ml) in PBS (pH 7,3). Unspezifische Bindungen wurden geblockt und anschließend mit einer seriellen Verdünnungsreihe von 0,001 ng/ml bis 1 µg/ml Rizin (links) bzw. Abrin-Mischung (rechts) in 0,1 % BSA/PBS (bzw. 0,1 % BSA/PBS-T für ELLA) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit toxinspezifischen biotinylierten mAk (α-Rizin: R18-Bio; α-Abrin: AP3202-Bio je 1,5 µg/ml). Die Entwicklung wurde mit Poly-HRP und anschließender Zugabe von TMB vorgenommen. Gezeigt sind Ergebnisse in Triplikaten (n=3). LOD und EC₅₀-Werte sind in gestrichelten Linien in der Farbe des zugehörigen Nachweissystems markiert.

Tabelle 23: Nachweisgrenzen für den Nachweis von Rizin und Abrin mittels ELISA und ELLA.

Antigen	Assay	Fänger	Detektor-mAk	LOD (pg/ml)	EC ₅₀ (ng/ml)
Rizin	ELISA	mAk R21	R18-Bio	1,2	0,1
	ELLA	ASF		6,5	0,2
Abrin	ELISA	mAk AP430	AP3202-Bio	38,9	3,0
	ELLA	ASF		730,9	24,6

ASF = Asialofetuin; EC₅₀ = halbmaximale Effektorkonzentration; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; ELLA = enzyme-linked lectin assay; LOD = Detektionslimit; mAk = monoklonaler Antikörper

3.1.4 Matrixeinfluss von Milch auf den Nachweis mittels ELLA und ELISA

Die in Tabelle 23 gezeigten Sensitivitäten wurden unter idealen Bedingungen bei der Verwendung von Antigenverdünnungspuffer erzielt. Realproben liegen zumeist in komplexen Matrices vor, deren Bestandteile den Nachweis beeinflussen können. Um die beiden Systeme hinsichtlich ihrer Robustheit gegenüber Störfaktoren zu vergleichen, sollte die Sensitivität der zuvor beschriebenen Assays unter

Einfluss einer repräsentativen Matrix untersucht werden. Da für Rizin bereits gezeigt wurde, dass Milch den Nachweis stören kann [213, 214] wurde exemplarisch der Einfluss von Milch untersucht (Abbildung 15).

Hierzu wurden die Antikörper- und Rezeptor-basierten Nachweise wie zuvor durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Antigene mit einer finalen Konzentration von 0,2 bzw. 2 % Milch in 0,1 % BSA/PBS-T vorinkubiert wurden. Die Nachweise der beiden Toxine verschlechterten sich im ELLA drastisch unter dem Einfluss von Milch. Die Detektion mittels ELISA blieb dagegen selbst bei der höchsten untersuchten Matrixkonzentrationen (2 % Milch) stabil.

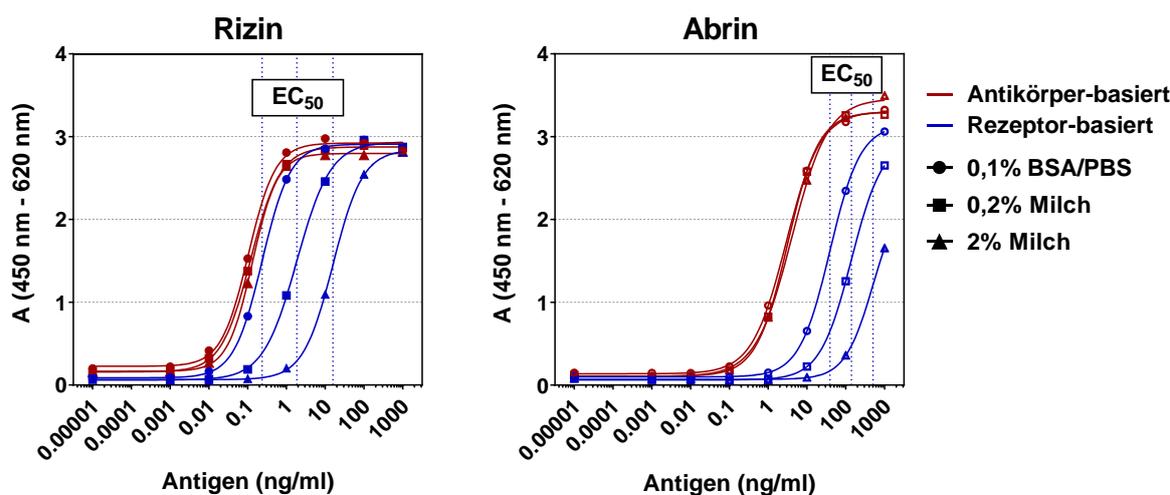


Abbildung 15: Matrixeinfluss von Milch auf den Nachweis von Rizin und Abrin im ELLA und ELISA.

Für den ELLA (blau) wurde 4 µg/ml Asialofetuin in Carbonatpuffer (pH 9,9) immobilisiert. Antikörper-basierte Nachweise (ELISA, rot) erfolgten durch Immobilisierung toxinspezifischer Antikörper (α Rizin: R21; α Abrin: AP430 je 10 µg/ml) in PBS (pH 7,3). Nach der Blockade unspezifischer Bindungen wurden zuvor für 40 min vorinkubierte Antigen-Verdünnungsreihen (1:10) von 0,001 ng/ml bis 1000 ng/ml in Milch (Magermilchpulver in 0,1 % BSA/PBS; ■ 0,2 % oder ▲ 2 %) oder 0,1 % BSA/PBS (Pufferkontrolle) zugegeben und für 2 h inkubiert. Die Detektion erfolgte mit toxinspezifischen biotinylierten mAk (α-Rizin: R18-Bio; α-Abrin: AP3202-Bio je 1,5 µg/ml). Es folgte die Entwicklung mit Poly-HRP und TMB. Gestrichelte Linien zeigen die Verschiebung der EC₅₀-Werte. Alle Werte wurden in Einzelbestimmung durchgeführt (n=1).

3.1.5 Spezifität von Asialofetuin als Fänger für Rizin und Abrin

Da die hier entwickelten Immunoassays einen schnellen Toxinnachweis ermöglichen sollten, wurden die untersuchten monoklonalen Antikörper und Asialofetuin in die pTD-Detektionsplattform übertragen. Die Zielsetzung des SensTox-Projektes (Kapitel 1.6), eine Differentialdiagnostik für Verdachtsfälle einer Rizinintoxikation bereitzustellen, machte es erforderlich, die Biochips so zu gestalten, dass mit der Messung einer Probe der gleichzeitige Nachweis aller adressierten Toxine realisierbar ist. Um sicherzustellen, dass bei diesem angestrebten Multiplex-Nachweis keine Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Nachweisreagenzien auftreten, wurde die Spezifität der Fängerstrukturen bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde die Bindung von im SensTox-Projekt adressierten Toxinen an Asialofetuin im ELLA untersucht (Kapitel 2.6.3). Die Detektion wurde mit für das jeweilige Antigen spezifischen biotinylierten Antikörpern vorgenommen. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, war für hohe Konzentrationen (100 ng/ml)

der Toxine TcdA und TcdB aus *C. difficile* eine deutliche Bindung an Asialofetuin nachweisbar. Eine genauere Untersuchung (für Messkurven ELLA siehe Anhang; Abbildung 49) ergab, dass der Nachweis von TcdA und TcdB mit Asialofetuin als Fänger weniger sensitiv ist als für Rizin. Dennoch sollte diese Kreuzreaktivität für den späteren Multiplex-Nachweis kritisch hinterfragt werden.

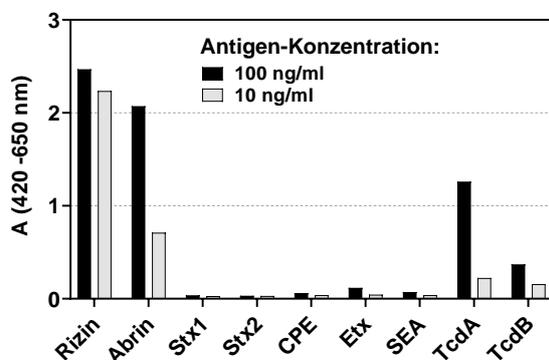


Abbildung 16: Kreuzreaktivität von Asialofetuin gegenüber anderen Toxinen im ELLA.

Asialofetuin wurde immobilisiert (4 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 9,9). Nach Blockade unspezifischer Bindungen erfolgte die Inkubation mit den angegebenen Antigenen in 0,1 % BSA/PBS-T in zwei verschiedenen Konzentrationen (100 und 10 ng/ml). Die Detektion wurde mit biotinylierten toxinspezifischen, monoklonalen Antikörpern (je 1 µg/ml): R18-Bio (Rizin); AP3202-Bio (Abrin); 13C4-Bio (Stx1); 11E10-Bio (Stx2); CPE562-Bio (CPE), Etx484-Bio (Etx); SEA165-Bio (SEA); TcdA3211-Bio (TcdA); TcdB3322-Bio (TcdB) durchgeführt. Die Entwicklung wurde mit Hilfe von Poly-HRP und TMB vorgenommen. Die Werte sind als Einfachbestimmung erhoben (n=1).

3.1.6 Vor-Ort-Nachweise von Rizin und Abrin

Zur Beurteilung der Nachweisempfindlichkeiten des Vor-Ort-Nachweises wurden sowohl ELLA als auch Sandwich-ELISA in die pTD-Detektionsplattform übertragen. Zu diesem Zweck nahm die Firma Analytik Jena die Immobilisierung von ausgewählten Fängerantikörpern und Asialofetuin in verschiedenen Konzentrationen auf elektrochemischen Biochips vor (siehe Anhang, Abbildung 50). Die Messung erfolgte als Einzelnachweis des jeweiligen Toxins (Messung eines Antigens in Kombination mit dem spezifischen biotinylierten Detektionsantikörper) mit Hilfe des pTD-Systems (Kapitel 2.6.5). Die Nachweisgrenzen (Tabelle 24) wurden anhand eines Schwellenwertes ermittelt, welcher sich aus dem Mittelwert der Leerwertmessung der Doppelspots eines immobilisierten Fängers zuzüglich 3,29-facher Standardabweichung errechnete. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse als Realwerte aufgetragen (Signalanstieg pro min).

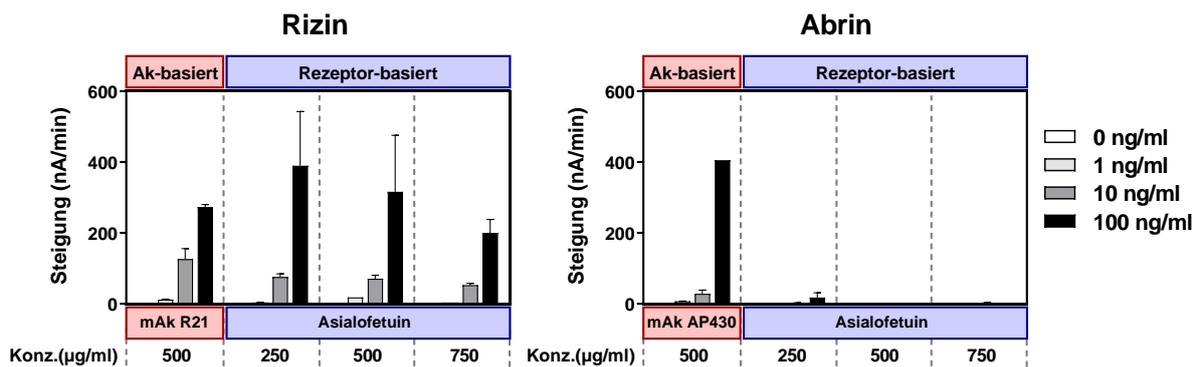


Abbildung 17: Nachweis von Rizin und Abrin in der Vor-Ort-Detektionsplattform pTD.

Die monoklonalen Antikörper R21 zum Nachweis von Rizin (links) und AP430 zum Nachweis von Abrin (rechts) wurden auf elektrochemische Biochips immobilisiert (je 500 µg/ml). Asialofetuin wurde in verschiedenen Konzentrationen (250; 500 und 750 µg/ml) ebenfalls auf diese Chips gebracht (Chiplayout siehe Anhang, Abbildung 50). Nach Einsetzen der Biochips in das Messgerät pTD (Analytik Jena AG) folgte die Inkubation von seriellen 1:10-Verdünnungen (1 ng/ml bis 100 ng/ml) von Rizin bzw. Abrin-Mischung in 0,1 % BSA/PBS, wobei je ein Chip pro Konzentration gemessen wurde. Zur Detektion wurden jeweils 10 µg/ml mAk R18-Bio (α-Rizin) bzw. AP3202-Bio (α-Abrin) verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit Streptavidin-gekoppelter β-Galaktosidase und Zugabe von 4-Aminophenyl-β-D-Galaktopyranosid. Anschließend wurde das elektrochemische Signal ausgelesen. Pro Konzentration wurde ein Biochip gemessen, aufgetragen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen Doppelspots.

Tabelle 24: Nachweisgrenzen von Rizin und Abrin im pTD.

Antigen	Fänger (Konz. in µg/ml)	Detektor-mAk	LOD (ng/ml)	Schwellenwert (nA/min)*
Rizin	mAk R21 (500)	R18	1	1,8
	ASF (250)		1	2,6
	ASF (500)		1	1,5
	ASF (750)		10	5,1
Abrin-Mischung	mAk AP430 (500)	AP3202	1	0,0
	ASF (250)		n.b.**	n.b.**
	ASF (500)		1	1,0
	ASF (750)		n.b.**	n.b.**

ASF = Asialofetuin; LOD = Nachweisgrenze; mAk = monoklonaler Antikörper; n.b. = nicht bestimmbar

*Mittelwert aus der Doppelbestimmung des Leerwerts der betreffenden Positionen zuzüglich der 3,29-fachen Standardabweichung

**Angabe der LOD nicht sinnvoll aufgrund negativer Steigungen für den Leerwert

Für Rizin ließen sich sowohl der Antikörper-basierte als auch der Rezeptor-basierte Nachweis gut in die Vor-Ort-Detektionsplattform übertragen. Verglichen mit den sehr guten Nachweisgrenzen (pg/ml-Bereich) beider Ansätze im Platten-basierten Format ergab sich zwar ein deutlicher Sensitivitätsverlust, dennoch gelang auch im pTD der sichere Nachweis ab einer Rizin-Konzentration von 1 ng/ml.

Der Vor-Ort-Nachweis von Abrin war Antikörper-basiert mit hoher Sensitivität möglich. Asialofetuin eignete sich als Fänger für Abrin im pTD nicht für einen sensitiven Nachweis des Toxins. Auch mit einer

Erhöhung der immobilisierten Menge an Asialofetuin ließ sich keine Verbesserung des Messsignals erreichen.

Zusammenfassend ermöglichten monoklonale Antikörper integriert in Sandwich-ELISA einen sensitiveren Nachweis von Rizin und Abrin als der Rezeptor-basierte Nachweis mit Asialofetuin. Prinzipiell eignete sich Asialofetuin aber für den Nachweis beider Toxine im Platten-basierten ELLA. Eine erste Untersuchung mit der Matrix Milch ergab, dass der ELLA anfälliger für enthaltene Störfaktoren ist als der Nachweis im Sandwich-ELISA. Der Vor-Ort-Nachweis im pTD-System war auf der Basis von Asialofetuin zwar für Rizin, aber nicht für Abrin realisierbar. Demgegenüber ließen sich mit den monoklonalen Antikörpern sowohl für Rizin als auch für Abrin sensitive Vor-Ort-Nachweise im pTD-System erzielen.

3.2 Shigatoxine Stx1 und Stx2

Aufgrund der hohen strukturellen Variabilität (siehe Kapitel 1.3.2) stellt die simultane Detektion aller Subtypen von Stx1 und Stx2 eine Herausforderung dar. Der Einsatz endogener Rezeptoren als gemeinsame Fängerstruktur schien hier vielversprechend, da für alle Shigatoxine eine Bindung an die Globoside Gb3 und Gb4 beschrieben ist (Kapitel 1.4.2).

3.2.1 Antigencharakterisierung von kommerziellen, nativen Shigatoxinen

Für die vorliegenden Untersuchungen dienten kommerziell verfügbare Toxine als Antigene. Bei diesen handelte es sich laut Herstellerangaben um die gereinigten, nativen Shigatoxine der Subtypen Stx1a und Stx2a (zugrundeliegende *E. coli* Stämme unbekannt). Massenspektrometrische Untersuchungen bestätigten die Identität des Materials. Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Antigene unter reduzierenden Bedingungen mittels Gelelektrophorese getrennt (Kapitel 2.4.1) und enthaltene Proteine mit Coomassie-Blue angefärbt (Abbildung 18).

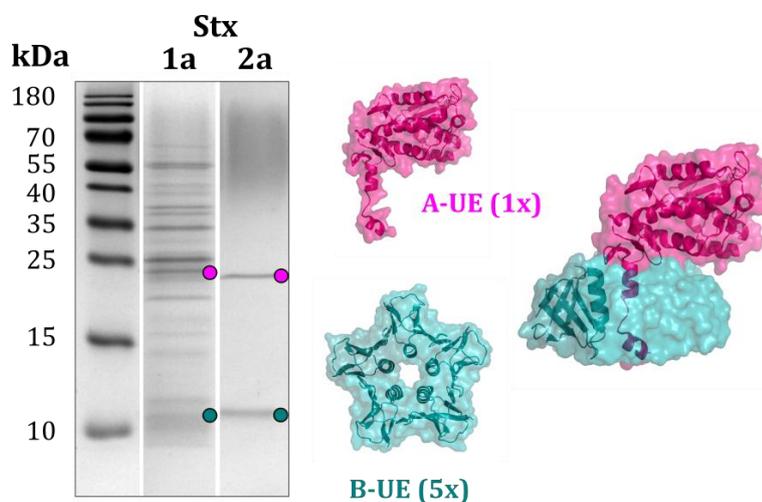


Abbildung 18: Auftragung von Stx1a und Stx2a in SDS-PAGE.

Von Stx1a und Stx2a wurden je 500 ng in reduzierendem Probenpuffer (mit β -Mercaptoethanol) auf 14 % SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blue. Als Marker wurde PageRuler Prestained Protein Ladder (Fa. Thermo Scientific) verwendet. Die A-Untereinheit (A-UE: 32 kDa, pink) und B-Untereinheit (B-UE: je 8 kDa, dargestellt als Pentamer in türkis) sind mit einem farbigen Punkt an der entsprechenden Proteinbande gekennzeichnet. Quelle des Bildes: PDB 1R4P (exemplarische Darstellung von Stx2a)

Für Stx2a ließen sich zwei Proteinbanden nachweisen, bei denen es sich um die A- und die monomere B-Untereinheit handelte. Diese Auftrennung ist auf die reduktive Spaltung der zwischen den Untereinheiten befindlichen Disulfidbrücke zurückzuführen. Es stand demnach hochreines Stx2a als Antigen zur Verfügung. Im Gegensatz dazu lieferte die Trennung von Stx1a diverse Proteinbanden. Unter diesen wurden Stx1-spezifische Banden massenspektrometrisch identifiziert.

3.2.2 Affinität von Globosiden als Rezeptoren für Shigatoxine

Generell deuteten die Literaturdaten darauf hin, dass sowohl Stx1 als auch Stx2 präferenziell an Gb3 binden. Da DeGrandis *et al.* für den Subtyp Stx2e eine stärkere Bindung an Gb4 als an Gb3 nachwiesen [152], wurden beide Globoside in die Untersuchungen eingeschlossen. Ziel war es, die Globosidrezeptoren so zu funktionalisieren, dass eine hochaffine Interaktion mit den Toxinen zustande kommt.

Aus ELISA-basierten Untersuchungen von Karve *et al.* und Gallegos *et al.* ging hervor, dass sowohl Stx1 als auch Stx2 durch den Zusatz von Cholesterol und Phosphatidylcholin eine deutlich stärkere Bindung an Gb3 und Gb4 zeigten [139, 140]. Positive Effekte ergaben sich außerdem, wenn die Globoside in 1:1-Mischungen mit anderen Glykosphingolipiden, insbesondere Galaktosylceramid und Laktosylceramid, eingesetzt wurden. Daher wurde die Präsentation der Globoside zusammen mit dem Phospholipid POPC und den genannten Ceramiden in Nanodisks erprobt. Zu diesem Zweck wurden Nanodisks mit variierender Zusammensetzung hergestellt (Kapitel 2.5.1 und 2.5.2). Diese Nanodisks enthielten entweder 10 bis 20 Moleküle der Globoside Gb3 und/ oder Gb4 (entspricht Gehalt von 4 bis 16 %, Zeilen „keine Additive“ in Tabelle 25) oder eine Mischung aus 5 bis 10 Molekülen Gb3 und 5 Molekülen der Ceramide (entspricht 4 bis 8 % Gb3 mit je 4 % Ceramiden, Tabelle 25). Diese Nanodiskpräparationen wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und die Bindung der Shigatoxine mit Hilfe toxinspezifischer Antikörper untersucht (Kapitel 2.6.2).

Tabelle 25: Bindung von Stx1a und Stx2a an globosidhaltige Nanodiskpräparationen.

Blau markiert ist die Nanodisk-Variante, die die beste Bindung für die beiden Shigatoxine zeigte.

Additive	Rezeptoren pro ND	Rezeptor		Bindung an*	
		Gb3	Gb4	Stx1a	Stx2a
Keine	20	16 %	–	+	–
	10	8 %	–	++	+
	10	4 %	4 %	+	+
	10	–	8 %	–	–
GalCer (4 %)	10	8 %	–	+++	+++
	5	4 %	–	+++	++
LacCer (4 %)	5	4 %	–	++	+

GalCer = Galaktosylceramid; LacCer = Laktosylceramid; ND = Nanodisk

*Bestimmung im Sandwich-ELISA mittels Detektion durch biotinylierte Antikörper 13C4 (Stx1a) und 11E10 (Stx2a); Einstufung der Sensitivität anhand der halbmaximalen Effektorkonzentration (EC₅₀): “–” = EC₅₀ > 50 ng/ml; “+” = 5 < EC₅₀ ≤ 50 ng/ml; “++” = 0,5 < EC₅₀ ≤ 5 ng/ml; “+++” = EC₅₀ < 0,5 ng/ml

Unter den Präparationen, die neben Phospholipiden nur Globoside enthielten, wiesen Gb3-haltige Nanodisks eine gute Bindung an beide Toxine auf. Im Gegensatz dazu war für rein Gb4-basierte Nanodisks im ELISA keine Bindung nachweisbar, sodass eine Verwendung als Fängerstruktur ausgeschlossen wurde (für exemplarische Messkurven, siehe Anhang Abbildung 51). Hinsichtlich der Rezeptordichte lieferten Nanodisks mit durchschnittlich 10 Molekülen Gb3 (entspricht 8 %) bessere Ergebnisse als solche mit einer Anzahl von 20 Rezeptormolekülen (entspricht 16 %). Obwohl bei einer reduzierten Rezeptordichte nicht alle 15 Bindungstaschen des Toxins für die Interaktion bereitstehen, scheint diese sterisch begünstigt zu sein. In Bezug auf die Lipidzusammensetzung ließ sich mit dem Zusatz von Laktosylceramid (LacCer) keine verstärkte Bindung der Gb3-Nanodisks an die Shigatoxine erzielen. Die Insertion von Gb3 in Kombination mit Galaktosylceramid (GalCer) führte zu einer deutlich verbesserten Rezeptorbindung. Ein Gehalt von 8 % Gb3 und 4 % GalCer erwies sich dabei für Stx1a und Stx2a als optimal (Tabelle 25, blaue Markierung).

Die Charakterisierung der kinetischen Bindungseigenschaften dieser Gb3/GalCer-Nanodisks an die Shigatoxine erfolgte mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR, Kapitel 2.7.3). Vergleichend wurde die Bindungskinetik zweier monoklonaler Fängerantikörper bestimmt. Abbildung 19 zeigt den Kurvenverlauf der Interaktionen. Tabelle 26 beinhaltet die kinetischen Parameter, denen eine 1:1-Modellierung der Bindung nach Langmuir zugrunde liegt.

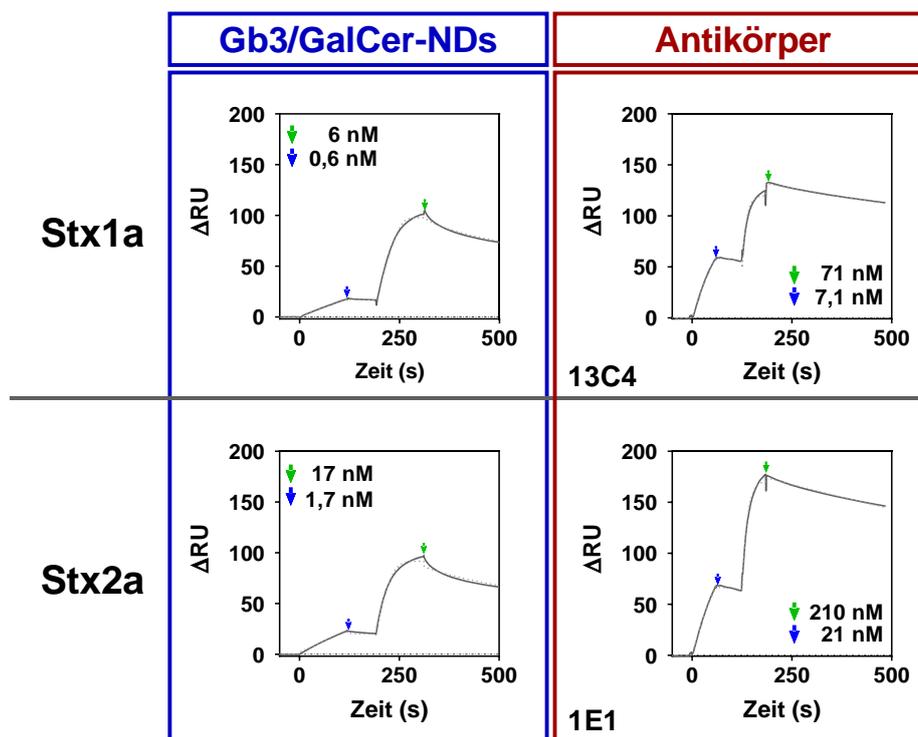


Abbildung 19: Bindung von Shigatoxinen an Gb3/GalCer-Nanodisks und mAk im SPR.

Gb3/GalCer-Nanodisks (links) wurden über ein His Capture Kit immobilisiert (Kontrollflusszelle: leere Nanodisks). Die Antigene Stx1a bzw. Stx2a wurden in den angegebenen Konzentrationen sequenziell (single-cycle) injiziert (120 s, 30 μ l/min). Die Dissoziation wurde durch Pufferinjektion eingeleitet und für 400 s verfolgt (gezeigt sind 200 s). Die Immobilisierung der monoklonalen Antikörper (rechts) 13C4 (α -Stx1) und 1E1 (α -Stx2) erfolgte mittels Mouse Capture Kit. Die Assoziation (60 s, 30 μ l/min) wurde durch sequenzielle Injektion von Stx1a bzw. Stx2a in je zwei Konzentrationen bestimmt. Die Messung der Dissoziation erfolgte für 300 s. Messkurven sind in durchgezogenen, Fit-Kurven in gestrichelten Linien dargestellt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde ein 1:1-Bindungsmodell verwendet.

Die Bindung von Stx1a und Stx2a an Gb3/GalCer-Nanodisks war hochaffin. Mit Affinitäten von 0,13 nM für Stx1a und 0,35 nM für Stx2a rangierten die Gangliosidrezeptoren in einem ähnlichen Bereich wie die Affinitäten von monoklonalen Fängerantikörpern. Mit den exzellenten Bindungseigenschaften der Gb3/GalCer-Nanodisks für Stx1a und Stx2a konnte ihre Eignung als gemeinsamer Fänger der Shigatoxine demonstriert werden.

Tabelle 26: Bindungskinetik von Stx1a und Stx2a an Gb3/GalCer-Nanodisks und mAk.

Antigen	Ligand	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Stx1a	Gb3/GalCer-NDs	$2,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-10}$
	mAk 13C4	$1,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-10}$
Stx2a	Gb3/GalCer-NDs	$5,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-10}$
	mAk 1E1	$3,8 \times 10^5$	$6,2 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-9}$

k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante; K_D = Affinitätskonstante; mAk = monoklonaler Antikörper; NDs = Nanodisks

3.2.3 Charakterisierung von kommerziellen Stx-spezifischen Antikörpern

Zum Aufbau immunologischer Nachweissysteme für die Shigatoxine mussten geeignete monoklonale Antikörper identifiziert werden, die in sensitive Sandwich-ELISA integrierbar sind. Des Weiteren waren Antikörper notwendig, die über Gb3/GalCer-Nanodisks immobilisierte Shigatoxine detektieren konnten. Hierzu erfolgte eine umfassende Charakterisierung von kommerziell verfügbaren und aus Kooperationen stammenden (Erwin Märtlbauer, LMU München) Stx1- und Stx2-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Insgesamt standen sechs gegen Stx1 und acht gegen Stx2 gerichtete Antikörper zur Verfügung (Tabelle 28).

Wichtiger Bestandteil dieser Charakterisierung war die Bestimmung der Subkettenspezifität der monoklonalen Antikörper. Diese Information half, die Kombinierbarkeit der monoklonalen Antikörper mit dem endogenen Rezeptor zu planen, da A-Ketten-spezifische Antikörper voraussichtlich mit der über die B-Kette vermittelten Rezeptorbindung kombinierbar waren. Zu diesem Zweck erfolgte die Untersuchung der Antikörper in einem Western Blot (Kapitel 2.6.4), bei dem eine gelelektrophoretische Trennung unter reduzierenden Bedingungen zur Spaltung der Shigatoxin-Holotoxine in ihre A- und B-Untereinheit führte (Abbildung 20 A und B).

Die Erkennung dieser deutlich voneinander getrennten Proteinbanden durch die monoklonalen Antikörper ließ Rückschlüsse auf ihre Subkettenspezifität zu. Alle gegen Stx1 gerichteten Antikörper waren spezifisch für die B-Kette (Abbildung 20 A). Unter den Stx2-spezifischen Antikörpern befanden sich drei mit eindeutiger Erkennung der A-Kette (Abbildung 20 B, Antikörper 11E10, 1E1 und 135/6-B9). Der Antikörper 1B5 detektierte neben einer Bande für die A-Untereinheit weitere Proteinbanden mit schwacher Intensität. BB12 wies eine deutliche Erkennung der B-Kette auf. Die Antikörper 11F11, 136/6 und MBS36 eigneten sich schlecht für den Einsatz im Western Blot. Unter den detektierten Proteinbanden war jedoch die der B-Kette von der höchsten Signalintensität, sodass angenommen wurde, dass diese Antikörper B-Ketten-spezifisch sind.

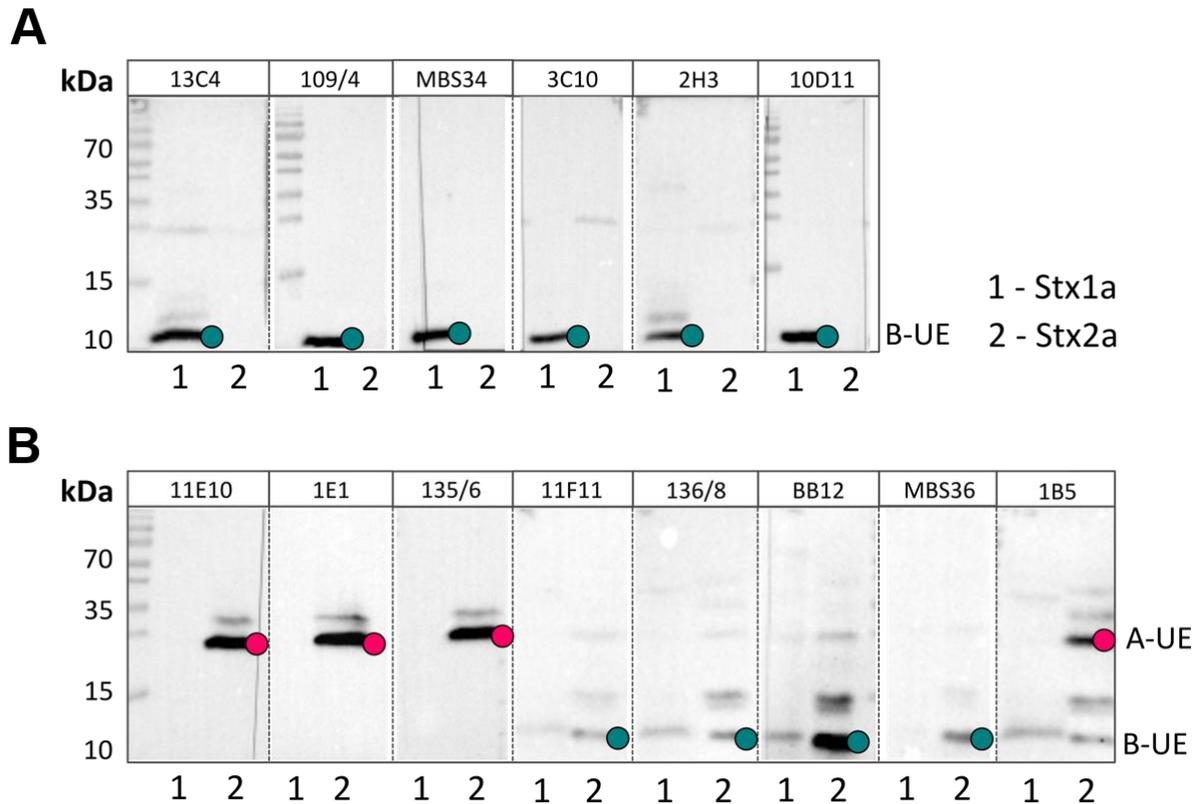


Abbildung 20: Untersuchung Stx-spezifischer Antikörper im Western Blot.

Monoklonale Antikörper wurden im Western Blot auf die Erkennung von Stx1a (1) und Stx2a (2) getestet. Dazu wurden je 250 ng Antigen in reduzierendem Probenpuffer auf 14 % SDS-PAGE-Gele aufgetragen und getrennt. Die Übertragung der Proteine auf aktivierte PVDF-Membranen erfolgte mittels Elektroblob. Nach Blockade unspezifischer Bindungen wurde **(A)** mit Stx1-spezifischen Antikörpern (1 µg/ml) bzw. **(B)** mit Stx2-spezifischen Antikörpern (1 µg/ml) inkubiert. Die Entwicklung wurde mit biotinyliertem Ziege anti-Maus-Antikörper, Avidin-alkalische Phosphatase und CDP-Star vorgenommen. Als Marker diente PageRuler Prestained Protein Ladder. Die Entwicklungszeiten waren 30 s (13C4; 2H3; 136/8), 600 s (109/4; MBS34; 3C10; 10D11; 11E10; 135/6; 1E1) und 660 s (11F11; BB12; MBS36; 1B5).

Weiteren Aufschluss über die Eignung der monoklonalen Antikörper als Nachweisreagenzien gab die Bestimmung der Bindungskinetik durch SPR-Messungen (Kapitel 2.7.3). Dazu erfolgte die Immobilisierung der murinen Antikörper auf einem CM5-Sensorchip über ein Mouse Capture Kit (Kapitel 2.7.2). Anhand der Bindungskurven (siehe Anhang, Abbildung 52) ließen sich die kinetischen Bindungsparameter ermitteln (Tabelle 28). Die Stx1-spezifischen Antikörper zeigten ausnahmslos sehr hohe Affinität zu ihrem Antigen. Sie zeichneten sich durch sehr niedrige Dissoziationsraten aus und erreichten damit subnanomolare Affinitätskonstanten K_D . Die Affinitäten der gegen Stx2 gerichteten Antikörper waren näherungsweise um den Faktor 10 geringer, aber trotzdem sehr hoch.

Mit dem Epitopbinning kam eine SPR-basierte Methode zum Einsatz (Kapitel 2.7.4), mit der sich ermitteln ließ, ob die Antikörper potenziell in einem Sandwich-ELISA miteinander kombinierbar sind. Da die Shigatoxine aufgrund ihrer fünf identischen B-Ketten repetitive Epitope innerhalb des Holotoxins aufweisen, blockieren sich bei dieser Assaykonfiguration zwei B-Ketten-spezifische Antikörper selbst bei identischen Epitopen nicht (siehe Anhang; Abbildung 53, Abbildung 54). Eine gegenseitige Blockade und demnach identische Epitoperkennung ließ sich nur für die A-Ketten spezifischen Antikörper 11E10 und

135/6 (Stx2) erkennen. Ein weiterer gegen die A-Kette gerichteter Stx2-spezifischer Antikörper 1E1 erkannte ein dazu distinktes Epitop und konnte daher mit 11E10 und 135/6 kombiniert werden.

Um geeignete Detektionsantikörper für den Rezeptor-basierten Ansatz zu identifizieren wurden Gb3/GalCer-Nanodisks im ELISA-Format (Kapitel 2.6.2) mit den verschiedenen Detektionsantikörpern kombiniert (Tabelle 27). Für die Detektion von Stx1a eigneten sich hierbei mit ansteigenden Sensitivitäten die mAk MBS34, 109/4 und 13C4. Diese B-Ketten-spezifischen Antikörper waren mit den Nanodisks kombinierbar, obwohl die Rezeptorbindung über die B-Untereinheit vermittelt wird. Der Nachweis von Stx2 nach Immobilisierung durch Gb3/GalCer-Nanodisks war dagegen nur mit A-Ketten-spezifischen Antikörpern möglich. 11E10 lieferte hier den Nachweis mit der höchsten Sensitivität.

Tabelle 27: Kombinierbarkeit der Antikörper mit Gb3/GalCer-Nanodisks.

Fänger: Gb3/GalCer-Nanodisks			
Detektor-mAk	Stx1a	Detektor-mAk	Stx2a
MBS34	+	1E1	++
13C4	+++	11E10	+++
109/4	++	135/6	+
3C10	–	11F11	+
2H3	–	1B5	–
10D11	n.b.	MBS36	–
		BB12	–
		136/8	–

Einstufung der Sensitivität anhand der halbmaximalen Effektkonzentration (EC_{50}): “–“ = $EC_{50} > 50$ ng/ml; “+“ = $5 < EC_{50} \leq 50$ ng/ml; “++“ = $0,5 < EC_{50} \leq 5$ ng/ml; “+++“ = $EC_{50} < 0,5$ ng/ml

Tabelle 28 gibt einen Überblick zu den Eigenschaften der monoklonalen Antikörper, die für die beschriebenen Untersuchungen verwendet wurden. Sowohl für Stx1 als auch für Stx2 lagen hochspezifische Antikörper mit ausgezeichneten Affinitäten vor. Unter den Stx1-spezifischen Antikörpern konnten 13C4 und unter den Stx2-spezifischen Antikörpern 11E10 und 1E1 als gute Detektoren in Kombination mit den Gb3/GalCer-Nanodisks als Rezeptor identifiziert werden.

Tabelle 28: Eigenschaften Stx-spezifischer monoklonaler Antikörper.

Name	Quelle	Spezifität (WB)	Isotyp	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Kombinierbarkeit mit Rezeptor nicht bestimmt						
10D11	Toxin Technology	Stx1, B-UE	IgG _{2b}	$1,6 \times 10^6$	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-10}$
nicht kombinierbar mit Rezeptor						
2H3	LMU München	Stx1, B-UE	IgG ₁	$1,5 \times 10^6$	$5,1 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-9}$
3C10	Toxin Technology	Stx1, B-UE	IgG ₁	$1,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-7*}$	$7,0 \times 10^{-14*}$
BB12	Toxin Technology	Stx2, B-UE	IgG ₁	$7,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-9}$
1B5	LMU München	Stx2, A-UE	k.A.	$3,4 \times 10^5$	$7,7 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-9}$
MBS36	MyBioSource	Stx2, B-UE	IgG ₁	$7,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-9}$
kombinierbar mit Rezeptor						
13C4	ATCC	Stx1, B-UE	IgG ₁	$1,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-10}$
109/4	SIFIN	Stx1, B-UE	k.A.	$2,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-10}$
MBS34	MyBioSource	Stx1, B-UE	IgG ₁	$2,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-4}$	$6,3 \times 10^{-11}$
11E10	ATCC	Stx2, A-UE	IgG ₁	$1,9 \times 10^5$	$2,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-9}$
11F11	ATCC	Stx2, B-UE	IgG _{2b}	$2,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-9}$
1E1	LMU München	Stx2, A-UE	k.A.	$3,8 \times 10^5$	$6,2 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-9}$
135/6	Sifin Diagnostics	Stx2, A-UE	k.A.	$1,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-9}$
136/8	Sifin Diagnostics	Stx2, B-UE	k.A.	$3,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-4}$	$4,9 \times 10^{-10}$

k.A. = keine Angaben; k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante; K_D = Affinitätskonstante

*aufgrund zu geringer Dissoziation (k_d) liegt K_D außerhalb des Messbereichs des verwendeten Geräts (Biacore, T200)

3.2.4 Vergleich von Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis der Shigatoxine

Um aus dem Panel der verfügbaren Antikörper die sensitivsten Kombinationen zu identifizieren, wurden die Antikörper paarweise im Sandwich-ELISA (Kapitel 2.6.2) miteinander kombiniert.

Unter den Stx1-spezifischen Antikörpern (Tabelle 29) befanden sich viele gute Sandwich-Kombinationen mit EC_{50} -Werten unter 5 ng/ml.

Tabelle 29: Sensitivitäten der mAk-mAk-Kombinationen für Stx1.

Detektor \ Fänger	MBS34	13C4	109/4	3C10	2H3
MBS34	++	++	+	+	-
13C4	+++	++	++	++	-
109/4	++	++	++	++	-
3C10	++	+++	++	+	-
2H3	++	++	++	++	-
10D11	++	+	+	+	-

Einstufung der Sensitivität anhand der halbmaximalen Effektorkonzentration (EC_{50}): “-“ = $EC_{50} > 50$ ng/ml; “+“ = $5 < EC_{50} \leq 50$ ng/ml; “++“ = $0,5 < EC_{50} \leq 5$ ng/ml; “+++“ = $EC_{50} < 0,5$ ng/ml

Mit den Kombinationen 13C4 mit MBS34-Bio und 3C10 mit 13C4-Bio ließen sich die besten Sensitivitäten für den Nachweis von Stx1a erzielen (weiße Felder). Der Antikörper 2H3 war nicht als Detektionsantikörper geeignet.

Die Etablierung sensitiver Nachweise war mit den vorhandenen Stx2-spezifischen Antikörpern ebenfalls gut realisierbar (Tabelle 30). Ausnahme ist die bereits durch Oberflächenplasmonenresonanzmessungen festgestellte gegenseitige Blockade von 11E10 und 135/6 (Kapitel 3.2.3). Hochsensitive Nachweise ergaben sich mit 13 Kombinationen. Insbesondere die Detektion mit 11E10-Bio lieferte hervorragende Ergebnisse. Für diesen Detektionsantikörper beliefen sich die EC_{50} -Werte für nahezu alle Fängerantikörper auf unter 0,5 ng/ml.

Tabelle 30: Sensitivitäten der mAk-Kombinationen für Stx2.

Detektor \ Fänger	1E1	11E10	135/6	11F11	1B5	MBS36	BB12	136/8
1E1	–	+++	++	+++	+	++	+++	+++
11E10	++	–	–	++	+	++	+++	+++
135/6	++	–	–	+++	+	++	+++	+++
11F11	++	+++	++	++	–	–	+	+
1B5	++	+++	++	++	–	+	+	++
MBS36	++	+++	++	+	–	–	+	+
BB12	++	++	++	+	–	–	+	–
136/8	++	+++	++	++	–	+	+	++

Einstufung der Sensitivität anhand der halbmaximalen Effektorkonzentration (EC_{50}): “–“ = $EC_{50} > 50$ ng/ml; “+“ = $5 < EC_{50} \leq 50$ ng/ml; “++“ = $0,5 < EC_{50} \leq 5$ ng/ml; “+++“ = $EC_{50} < 0,5$ ng/ml

Nachdem sowohl für Stx1 als auch für Stx2 Sandwich-Kombinationen mit ausgezeichneten Nachweisempfindlichkeiten identifiziert wurden, wurden die besten Antikörperkombinationen (Stx1: 13C4/MBS34-Bio; Stx2: 1E1/11E10-Bio) hinsichtlich ihrer Sensitivität mit den Rezeptor-basierten Nachweisen verglichen. Für Letztere fungierten Gb3/GalCer-Nanodisks als Fänger und die bestmöglich kombinierbaren monoklonalen Antikörper 13C4-Bio (Stx1) und 11E10-Bio (Stx2) als Detektoren (siehe 3.2.3, Tabelle 27). Abbildung 21 zeigt die Messkurven der Antikörper- und Rezeptor-basierten Nachweise der Shigatoxine. In Tabelle 31 sind die ermittelten Nachweisgrenzen zusammengetragen.

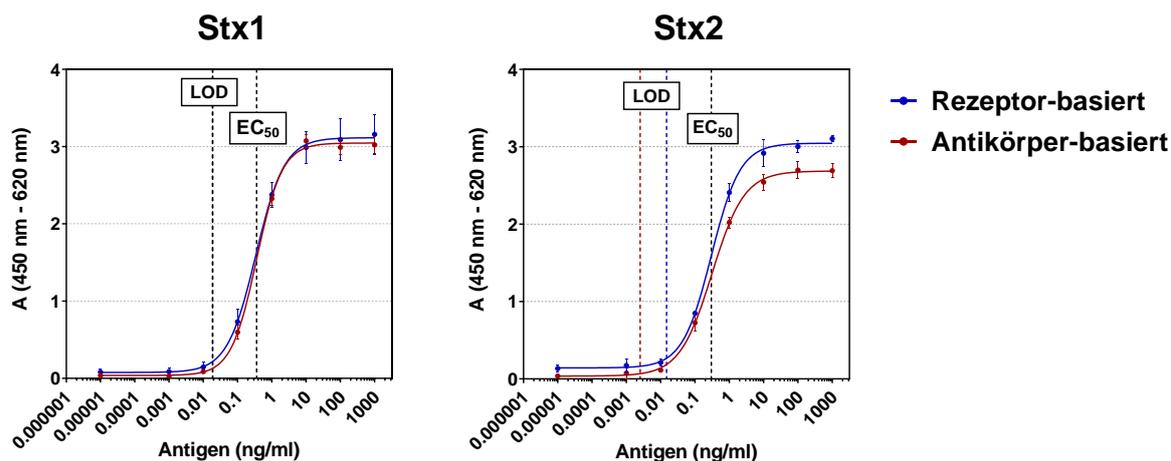


Abbildung 21: Detektion der Shigatoxine mittels Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis.

Für den Rezeptor-basierten Nachweis (blau) wurde die Kombination aus Gb3/GalCer-Nanodisks als Fänger und 13C4-Bio (Stx1) bzw. 11E10-Bio (Stx2) als Detektor eingesetzt. Für den Antikörper-basierten Nachweis (rot) erfolgte die Detektion mit den Kombinationen 13C4 und MBS34-Bio/3C10-Bio (Stx1) bzw. 1E1 und 11E10-Bio (Stx2). Nach Immobilisierung von Rezeptor (5 µg/ml) bzw. Fängerantikörpern (10 µg/ml) erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungen und anschließend die Inkubation mit einer seriellen 1:10-Verdünnungsreihe von 0,001 ng/ml bis 1 µg/ml Stx1a bzw. Stx2a in 0,1 % BSA/PBS. Die Detektion wurde mit biotinylierten mAk in einer Verdünnung von je 1 µg/ml vorgenommen. Es schloss sich die Entwicklung mit Poly-HRP und TMB an. Gezeigt sind Ergebnisse in Triplikaten als Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3). LOD und EC₅₀ sind in gestrichelten Linien in der Farbe des zugehörigen Nachweissystems markiert.

Tabelle 31: Nachweisgrenzen für die Detektion der Shigatoxine im Plattenformat.

Antigen	Fänger	Detektor	LOD (pg/ml)	EC ₅₀ (ng/ml)
Stx1a	mAk 13C4	MBS34/3C10-Bio	11,8	0,1
	Gb3/GalCer-NDs	13C4-Bio	18,7	0,3
Stx2a	mAk 1E1	11E10-Bio	2,5	0,3
	Gb3/GalCer-NDs		14,8	0,3

EC₅₀ = halbmaximale Effektorkonzentration; LOD = Detektionslimit; mAk = monoklonaler Antikörper

Sowohl für Stx1a als auch für Stx2a boten Antikörper- und Rezeptor-basierter Nachweis eine hochsensitive Detektion mit Nachweisgrenzen im niedrigen pg/ml-Bereich. Für Stx1a ergab sich mit dem klassischen Sandwich-ELISA eine geringfügig höhere Sensitivität (niedrigerer EC₅₀-Wert) als für die Kombination aus Nanodisks und monoklonalem Detektionsantikörper.

Die Subtypen Stx1a und Stx2a ließen sich hervorragend über den endogenen Rezeptor Gb3 präsentiert in der optimierten Lipidumgebung immobilisieren. Mit der Wahl geeigneter Detektionsantikörper gelang es, Gb3/GalCer-Nanodisks als alternative Fängerstruktur für den Nachweis der Shigatoxine im Plattenformat zu etablieren.

3.2.5 Nachweis diverser Stx-Subtypen aus Bakterienlysaten von *E. coli*

Wie in Kapitel 1.4.2 erläutert, handelt es sich bei den Shigatoxinen mit der Vielzahl beschriebener Subtypen um eine heterogene Toxinfamilie. Kernziel der Arbeit war, Testsysteme zu etablieren, die einen breitbandigen Nachweis aller Subtypen ermöglichen. Hierzu war die umfangreiche Testung nativer Toxine

verschiedenen Subtyps erforderlich, die in Form von toxinhaltigen, zellfreien *E. coli*-Lysaten zur Verfügung standen (Christian Menge, Friedrich-Löffler-Institut und Angelika Fruth, RKI). Für die von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten Lysate wurde die Information zur Toxinexpression laut PCR bereitgestellt (Tabelle 32, Tabelle 33).

Mit ausgewählten Lysaten erfolgte zunächst eine Vortestung (siehe Anhang, Tabelle 51 für Stx1, Tabelle 52 für Stx2). Die Reaktivität eines Antikörpers eingesetzt in diversen Sandwich-ELISA (Kapitel 2.6.2) ließ Rückschlüsse auf die Breitbandigkeit seiner Subtyperkennung zu. Dies führte zur Selektion der bestmöglichen Antikörperkombinationen und geeigneter Detektionsantikörper im Rezeptor-basierten Testformat für den Nachweis aller Subtypen. Mit diesen finalen Assays erfolgte die umfassende Testung aller verfügbaren Bakterienlysate (Tabelle 32 für Stx1, Tabelle 33 für Stx2).

Unter den Stx1-spezifischen Antikörpern befanden sich mit MBS34, 13C4 und 3C10 drei Antikörper, die einen breitbandigen Nachweis von Stx1 ermöglichen. Die sensitivste Kombination stellte dabei 13C4 als Fänger in Kombination mit 3C10 bzw. MBS34 als Detektoren dar. Die beste Rezeptor-basierte Detektion mit breiter Subtyperkennung lieferte die Kombination aus Gb3/GalCer-Nanodisks und 13C4 als Detektor. Mit beiden Systemen gelang es, alle Stx1-Subtypen aus den getesteten Lysaten nachzuweisen (Tabelle 32). Die Detektion von Stx1d ergab mit dem Rezeptor-basierten Ansatz deutlich niedrigere Signale. Diese Ergebnisse sind vermutlich auf die geringfügig höhere Sensitivität des Sandwich-ELISA aus 13C4 und MBS34-Bio gegenüber dem Rezeptor-basierten Assay (siehe Tabelle 31) zurückzuführen.

Tabelle 32: Antikörper- und Rezeptor-basierter Nachweis von Stx1-Subtypen aus Bakterienlysaten.

Stamm-bezeichnung	Quelle Bakterienlysate	Subtyp (PCR*)	ELISA basierend auf**		Konsens PCR ↔ ELISA
			mAk	Rezeptor	
13E0725	Christian Menge, FLI	Stx1a	+++	+++	✓
EDL933	Christian Menge, FLI	Stx1a, Stx2a	+++	++	✓
18E0122	Christian Menge, FLI	Stx1a, Stx2b	+++	++	✓
3560/96	Christian Menge, FLI	Stx1c	+++	++	✓
7139/96	Christian Menge, FLI	Stx1d	+++	+	✓
B2F1	Christian Menge, FLI	Stx2d	-	-	✓

mAk = monoklonaler Antikörper

*zur Verfügung gestellt von Christian Menge, FLI

**Antikörper-basiert: 13C4 und MBS34/ 3C10-Bio; Rezeptor-basiert: Gb3/GalCer-Nanodisks mit 13C4-Bio; Beurteilung anhand der Absorptionswerte (A): „-“ = $A \leq 0,2$; „+“ = $0,2 < A \leq 1,0$; „++“ = $1,0 < A \leq 2,0$; „+++“ = $A > 2,0$

Die Stx2-spezifischen Antikörper waren heterogen bezüglich ihrer Subtyperkennung (siehe Anhang; Tabelle 52). Einzelne Subtypen (Stx2b, Stx2d, Stx2e und Stx2f) wurden nicht von allen Antikörpern erkannt. Eine lückenlose Detektion aller Stx2-Subtypen war mit 1E1, 135/6, MBS36 und BB12 realisierbar, unter denen die Kombination aus 1E1 und BB12-Bio die höchste Sensitivität aufwies. Da in dieser Konstellation die Detektion von Stx2b mit niedrigerer Signalintensität ausfiel, wurde der Nachweis um den Detektor 11E10-Bio ergänzt. Dieser Antikörper erkannte zwar den Subtyp Stx2f nicht, lieferte aber für alle anderen Subtypen in Kombination mit 1E1 eine optimale Detektion. Durch diese synergistischen Effekte der

Detektoren BB12-Bio und 11E10-Bio stand in Kombination mit 1E1 als Fänger ein breitbandiger Nachweis aller Stx2-Subtypen zur Verfügung.

Für den Rezeptor-basierten Nachweis mit Gb3/GalCer-Nanodisks eigneten sich prinzipiell 1E1, 11E10, 135/6 und 11F11 als Detektoren (siehe Tabelle 27). Von diesen Antikörpern ließen sich mit einer Mischung aus 11E10-Bio und 1E1-Bio alle Stx2-Subtypen im Rezeptor-basierten Ansatz detektieren. Dabei bot 11E10-Bio den besten Nachweis der Subtypen Stx2a-e und Stx2g und 1E1 ergänzte die fehlende Abdeckung von Stx2f. Mit den ausgewählten Kombinationen ließen sich auch für Stx2 sowohl mit Hilfe des Antikörper- als auch des Rezeptor-basierten Nachweises alle getesteten Subtypen detektieren.

Tabelle 33: Antikörper- und Rezeptor-basierter Nachweis von Stx2-Subtypen aus Bakterienlysaten.

Stamm-bezeichnung	Quelle Bakterienlysat	Subtyp (PCR*)	ELISA basierend auf**		Konsens PCR \leftrightarrow ELISA
			mAk	Rezeptor	
EDL933	Christian Menge, FLI	Stx2a, Stx1a	+++	+++	✓
18E0122	Christian Menge, FLI	Stx2b, Stx1a	+++	++	✓
E32511/HSC	Christian Menge, FLI	Stx2c	+++	+++	✓
STEC 18-01077	Angelika Fruth, RKI	Stx2c	+++	+++	✓
B2F1	Christian Menge, FLI	Stx2d	+++	+++	✓
2771/97	Christian Menge, FLI	Stx2e	+++	++	✓
T4/97	Christian Menge, FLI	Stx2f	+++	++	✓
7V	Christian Menge, FLI	Stx2g	++	++	✓
STEC 17-00402	Angelika Fruth, RKI	Stx2g	++	+++	✓
13E0725	Christian Menge, FLI	Stx1a	-	-	✓

mAk = monoklonaler Antikörper

*Quelle der PCR-Daten entspricht der Quelle des jeweiligen Lysats

**Antikörper-basiert: 1E1 mit 11E10/BB12-Bio; Rezeptor-basiert: Gb3/GalCer-Nanodisks mit 1E1/11E10-Bio, Beurteilung anhand der Absorptionswerte (A): „-“ = $A \leq 0,2$; „+“ = $0,2 < A \leq 1,0$; „++“ = $1,0 < A \leq 2,0$; „+++“ = $A > 2,0$

Zusammenfassend gelang es, die hergestellten Gb3/GalCer-Nanodisks in ELISA zu integrieren, die mit den geeigneten Detektoren alle Subtypen von Stx1 und Stx2 erfassten. Dieses Ziel konnte auch mit klassischen Sandwich-ELISA bestehend aus monoklonalen Antikörpern erreicht werden.

3.2.6 Lagerstabilität der Gb3/GalCer-Nanodisks

Für den routinemäßigen Einsatz der Gb3/GalCer-Nanodisks als Nachweisreagenzien ist eine ausreichende Stabilität erforderlich. Zu diesem Zweck erfolgte eine Stabilitätstestung der Nanodisks über einen Zeitraum von sechs Monaten. Nach der Herstellung der Nanodisks und dem Zusatz des Konservierungsmittels Natriumazid wurde die gesamte Charge in neun Aliquots aufgeteilt. Eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Lagerungszeiten ließ sich durch die gemeinsame Erfassung aller Proben innerhalb einer Messung realisieren. Daher wurde die Durchführung des Lagerungsversuch wie in Abbildung 21 beschrieben vorgenommen. Ausgehend von einer erwiesenen Stabilität bei -80 °C wurden alle Aliquots tiefgefroren und verblieben bei dieser Temperatur, bis der Zeitraum zwischen dem Auftauen und der Messung der Probe der planmäßigen Lagerungsdauer (0,5 bis 6 Monate) entsprach. Für jede

Lagerungsdauer erfolgte eine Untersuchung der Stabilität nach einer Lagerung bei 4 °C und 20 °C. Als Referenzprobe dienten durchgehend bei -80 °C gelagerte Nanodisks. Die Stabilität aller Proben der verschiedenen Lagerungszeiten und -temperaturen wurden parallel mittels Sandwich ELISA (Kapitel 2.6.2) und SPR-Messungen (Kapitel 2.7.3) überprüft.

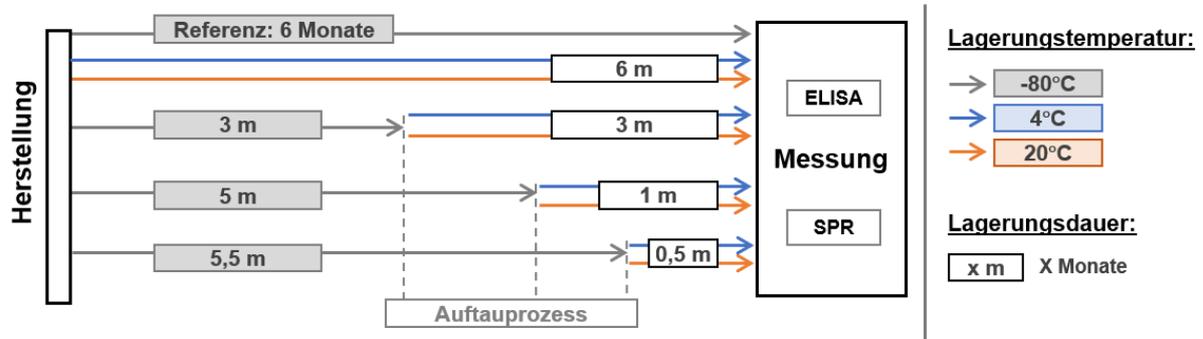


Abbildung 22: Versuchsplan zur Testung der Lagerstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks.

Nach Herstellung der Nanodisks wurden diese bei -80 °C (grau) tiefgefroren. Eine Referenzprobe wurde über den gesamten Lagerungszeitraum von 6 Monaten bei -80 °C belassen. Alle anderen Proben verblieben so lange bei -80 °C, bis die Lagerungsdauer bei der vorgesehenen Lagerungstemperatur von 4 °C (blau) bzw. 20 °C (orange) nach dem Auftauen noch 6; 3; 1 oder 0,5 Monate betrug. Nach Ende der Lagerung wurden alle Nanodisk-Proben parallel im Sandwich-ELISA und in SPR-Messungen auf ihre Stabilität und Funktionalität geprüft.

Unabhängig von der Lagerungsdauer bei 4 °C ergaben sich im ELISA (Abbildung 23) über den beobachteten Zeitraum von sechs Monaten keine Sensitivitätsverluste. Selbst die über sechs Monate gelagerten Nanodisks wiesen eine unveränderte halbmaximale Effektorkonzentration (EC_{50}) von 0,3 ng/ml auf.

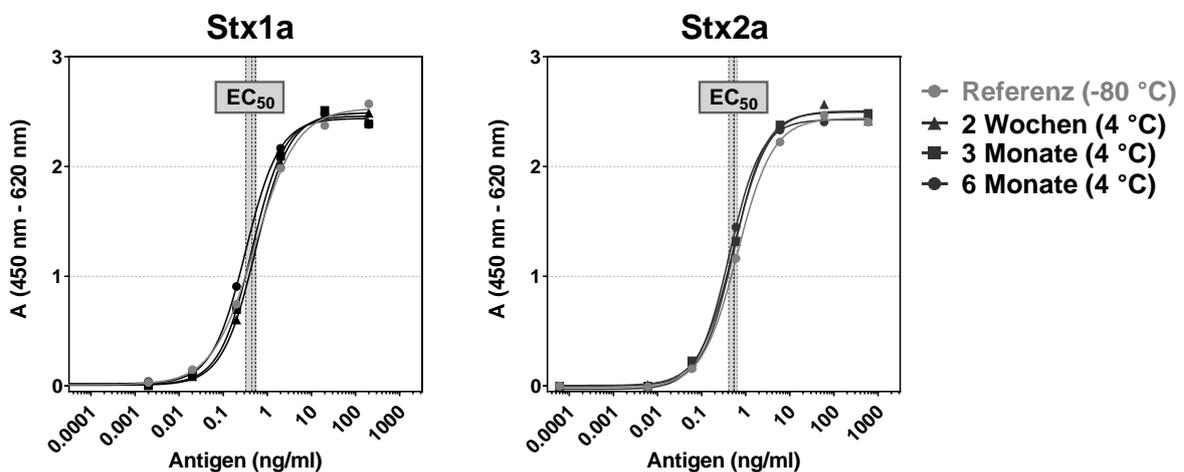


Abbildung 23: Lagerstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks bei 4 °C über 6 Monate bestimmt im ELISA.

Gb3/GalCer-Nanodisks wurden nach Herstellung für 2 Wochen, 3 Monate bzw. 6 Monate bei 4 °C gelagert. Als Referenzprobe (grau) dienten über 6 Monate bei -80 °C gelagerte Nanodisks. Alle Proben wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert (5 µg/ml, ausgehend von Konzentration nach Herstellung). Es folgte die Inkubation mit einer seriellen Verdünnungsreihe von 0,01 bis 1000 ng/ml Stx1a (links) bzw. Stx2a (rechts). Die Detektion wurde mit den biotinylierten Antikörpern 13C4 (Stx1) bzw. 11E10 (Stx2) vorgenommen. Es schloss sich die Entwicklung mit SA-Poly-HRP und TMB an. Dargestellt sind Ergebnisse eines repräsentativen Experiments (n=1). Gestrichelte Linien zeigen die EC_{50} -Werte.

Bei Analyse der Bindungskinetiken über den Lagerungszeitraum mittels SPR-Messungen zeigte sich, dass die Interaktion zwischen Nanodisks und Shigatoxinen stabil blieb (für Bindungskurven siehe Anhang,

Abbildung 55). Lediglich das Immobilisierungslevel der Nanodisks sank mit zunehmender Lagerungsdauer (siehe Anhang, Abbildung 56). Diese Abnahme lässt sich über einen geringfügigen Konzentrationsverlust über den Lagerungszeitraum erklären und hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Güte der Bindung. Insgesamt kam es über den beobachteten Zeitraum von sechs Monaten zu keiner Beeinträchtigung der Funktionalität der Gb3/GalCer-Nanodisks.

3.2.7 Spezifität der Globosid-Nanodisks als Fänger für die Shigatoxine

Um als Fänger für den Multiplex-Nachweis auf dem Biochip fungieren zu können, war eine hohe Spezifität der Gb3/GalCer-Nanodisks als Fänger erforderlich. Sie sollten dabei keine Kreuzreaktivitäten gegenüber den simultan nachzuweisenden Toxinen (Panel aus SensTox) aufweisen. Die Bestimmung der Spezifität erfolgte anhand eines Sandwich-ELISA (Kapitel 2.6.2) mit immobilisierten Gb3/GalCer-Nanodisks als Fänger und toxinspezifischen biotinylierten Antikörpern als Detektoren (Abbildung 24).

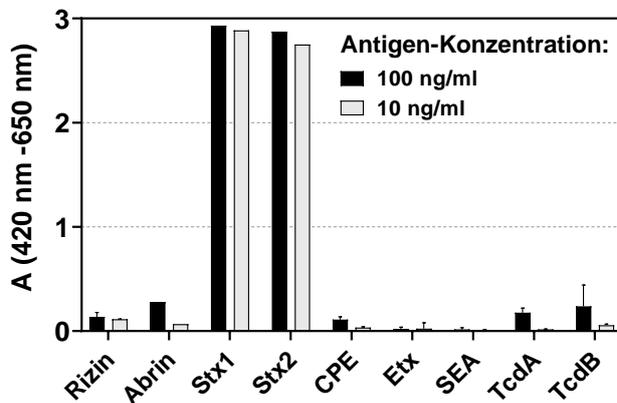


Abbildung 24: Spezifität von Gb3/GalCer Nanodisks als Fänger für Stx1 und Stx2.

Nanodisks (5 µg/ml) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach Blockade unspezifischer Bindungen erfolgte die Inkubation mit den angegebenen Antigenen in 0,1 % BSA/PBS-T in zwei verschiedenen Konzentrationen (100 und 10 ng/ml). Die Detektion wurde mit toxinspezifischen, monoklonalen biotinylierten Antikörpern (je 1 µg/ml) durchgeführt: R18-Bio (Rizin); AP3202-Bio (Abrin); 13C4-Bio (Stx1); 11E10-Bio (Stx2); CPE562-Bio (CPE), Etx484-Bio (Etx); SEA165-Bio (SEA); TcdA3211-Bio (TcdA); TcdB3322-Bio (TcdB); Die Entwicklung wurde mit Poly-HRP und TMB vorgenommen. Dargestellt sind Ergebnisse in Duplikaten als Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=2).

Mit den globosidhaltigen Nanodisks ließ sich ein hochspezifischer Nachweis von Stx1 und Stx2 erzielen. Gegenüber den ausgewählten Toxinen waren keine Kreuzreaktivitäten festzustellen. Diese Ergebnisse sprechen für einen spezifischen Nachweis der Shigatoxine unter Verwendung der Nanodisks selbst bei Anwesenheit anderer Toxine.

3.2.8 Vor-Ort-Nachweise von Stx1 und Stx2

Nachweissysteme, die sich in Kapitel 3.2.5 für die Detektion aller Stx1- bzw. Stx2-Subtypen auszeichneten, wurden für den Schnellnachweis in der Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi erprobt. Der für den breiten Nachweis von Stx2-Subtypen identifizierte Fänger 1E1 lag niedrig konzentriert vor und eignete sich daher nicht für die Immobilisierung auf die Goldelektroden der Biochips. Ein guter Ersatz war MBS36, der eine vollständige und vergleichbar sensitive Erkennung der Stx2-Subtypen sicherstellte. Um Gb3/GalCer-Nanodisks auf den Goldelektroden der Biochips zu immobilisieren, erfolgte die Herstellung der Nanodisks mit einer cysteinhaltigen MSP-Variante.

Zur Detektion im pBDi wurden die Detektionsantikörper nicht wie im Plattenformat als Mischung (MBS34/3C10-Bio für Stx1; 11E10/BB12-Bio für Stx2) sondern separat getestet, um den Beitrag des einzelnen Detektors zum gesamten Nachweis von Stx1 bzw. Stx2 beurteilen zu können (Abbildung 25).

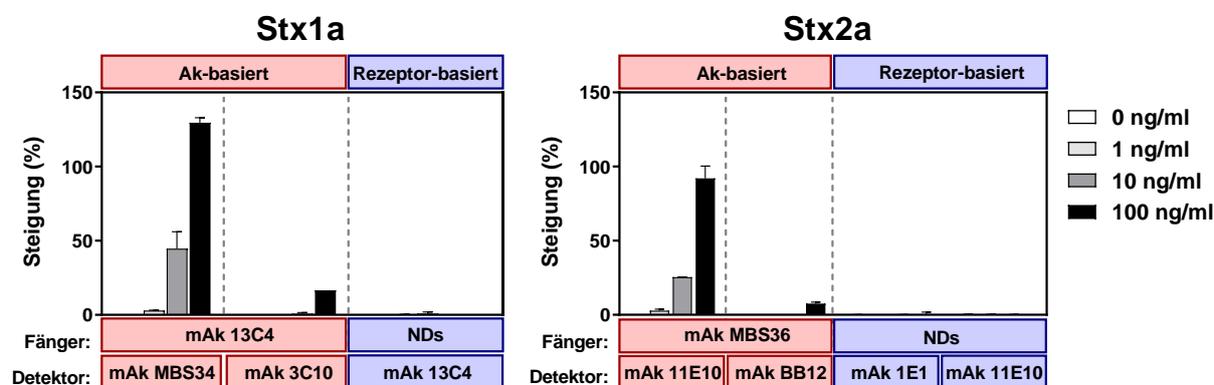


Abbildung 25: Nachweis der Shigatoxine im pBDi.

Für den Nachweis von Stx1a (**links**) wurde die Kombination aus immobilisiertem Fängerantikörper 13C4 (Chiplayout siehe Anhang, Abbildung 57) und den Detektionsantikörpern MBS34-Bio bzw. 3C10-Bio sowie immobilisierte Gb3/GalCer-Nanodisks (NDs) und 13C4-Bio als Detektor eingesetzt. Der Nachweis von Stx2a (**rechts**) wurde entweder mittels immobilisiertem mAk MBS36 und den Detektoren 11E10-Bio und BB12-Bio oder mit immobilisierten Nanodisks und 1E1-Bio bzw. 11E10-Bio vorgenommen. Nach Immobilisierung der Fängerstrukturen erfolgte die Inkubation mit Stx1a bzw. Stx2a (1 ng/ml bis 100 ng/ml) in 0,1 % BSA/PBS. Die Detektion wurde mit toxispezifischen biotinylierten Antikörpern vorgenommen (5 µg/ml). Es folgten die Entwicklung mit Streptavidin gekoppelter β-Galaktosidase und die Zugabe von 4-Aminophenyl-β-D-Galaktopyranosid. Anschließend wurde das elektrochemische Signal ausgelesen. Pro Konzentration wurde ein Biochip gemessen, aufgetragen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen Doppelspots. Rezeptor-basierte Nachweise sind rot, Antikörper-basierte Nachweise blau dargestellt.

Für Stx1a und Stx2a gelang die Übertragung der Antikörper-basierten, nicht aber der Rezeptor-basierten Nachweise in die pBDi-Plattform. Stx1a konnte mit 13C4 als Fängerantikörper und MBS34-Bio als Detektor bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml sicher nachgewiesen werden (Tabelle 34). Es ergab sich ein deutlich schlechterer Nachweis unter Verwendung von 3C10-Bio als Detektionsantikörper. Stx2a ließ sich am sensitivsten mit der Kombination aus MBS36 als Fänger und biotinyliertem 11E10 als Detektor nachweisen. Der Einsatz von BB12-Bio als Detektor lieferte dagegen erst ab Stx2a-Konzentrationen von 100 ng/ml Signale und zeigte damit keine ausreichende Sensitivität.

Tabelle 34: Nachweisgrenzen für die Detektion von Stx1a und Stx2a im pBDi.

Antigen	Fänger-mAk	Detektor-mAk	LOD (ng/ml)	Schwellenwert (%)*
Stx1a	13C4	MBS34	1	0,3
		3C10	10	0,6
Stx2a	MBS36	11E10	1	0,04
		BB12	n.b.**	n.b.**

LOD = Nachweisgrenze; n.b. = nicht bestimmbar

*Mittelwert aus der Doppelbestimmung des Leerwerts der betreffenden Positionen zuzüglich der 3,29-fachen Standardabweichung

**keine valide Messung des Nullwerts, daher Bestimmung der LOD nicht möglich

Trotz der hohen Sensitivität im Platten-basierten System war eine Bindung der Shigatoxine an Gb3/GalCer-Nanodisks im pBDi nicht nachweisbar. Durch den His-Tag des Gürtelproteins MSP ließ sich die

erfolgreiche Immobilisierung durch die Detektion mit einem anti-His-Antikörper demonstrieren (siehe Anhang, Abbildung 58). Es ist anzunehmen, dass die Nanodisks im Laufe des Spottingprozesses ihre Integrität und infolgedessen die Funktionalität verloren hatten.

Insgesamt konnte für die Shigatoxine der auf Antikörpern basierende Nachweis mit guten Sensitivitäten in die Vor-Ort-Detektionsplattform übertragen werden. Dieser Transfer gelang für die Gb3/GalCer-Nanodisks nicht, obwohl sie sich im stationären ELISA-Format als gemeinsamer, hochspezifischer Fänger für Stx1 und Stx2 verwenden ließen.

3.3 *Clostridium perfringens* Enterotoxin

3.3.1 Charakterisierung von CPE-basierten Antigenen und dem Rezeptor

Claudin-4

Die Etablierung immunologischer Nachweismethoden sollte idealerweise auf der Basis nativer statt rekombinanter Toxine erfolgen. Dies liegt darin begründet, dass mögliche strukturelle Fehlfaltungen des rekombinanten Materials dazu führen können, dass die gegen das rekombinante Toxin generierten monoklonalen Antikörper das native Toxin nicht erkennen. Der Einsatz des nativen Toxins zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper ist daher zwingend erforderlich.

Die Produktion von CPE erfolgt während der Sporulation von *C. perfringens* [63], sodass die Induktion der Toxinproduktion anspruchsvoll ist und trotz mehrfacher Versuche seitens des Projektpartners (Andreas Rummel, MHH) die Gewinnung ausreichender Mengen des nativen Toxins nicht gelang. Daher wurden alle hier als Antigen verwendeten CPE-Varianten (Tabelle 35) rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt (Andreas Rummel, MHH). Da die Expression von CPE in voller Länge (AS 1-319) zunächst aufgrund der starken Oligomerisierung und damit einhergehenden Aggregation nicht möglich war, wurden die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) und die zytotoxische Domäne (ZD) des Proteins getrennt hergestellt. Zu einem späteren Zeitpunkt gelang die Reinigung von CPE in Gesamtlänge. Zusätzlich wurde rekombinantes CPE mit der Punktmutation D48A (CPE D48A) mit verminderter Toxizität zur Immunisierung bereitgestellt. Im Projektplan vorgesehen war die Herstellung und Charakterisierung von CPE-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit diesen rekombinanten Proteinen sowie eine Testung der Reaktivität gegenüber nativem CPE aus Bakterienüberständen verschiedener *C. perfringens*-Stämme.

Das als CPE-Rezeptor beschriebene Membranprotein Claudin-4 wurde ebenfalls rekombinant hergestellt (Andreas Rummel, MHH), wobei das zugrunde liegende Gen humanen Ursprungs war. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe einer Tandemchromatographie bestehend aus einer immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und anschließender

Affinitätschromatographie an einer Glutathion-Sepharosematrix. Die Solubilisierung von Claudin-4 erfolgte mit dem Detergenz Triton X-100.

Tabelle 35: Übersicht zu rekombinanten CPE-Varianten und Claudin-4 (Quelle: A. Rummel, MHH).

Funktion	Protein*	As-Abschnitt	Proteintags	MW (kDa)
Antigen	CPE	1-319	StrepHis6, abgespalten	35
	CPE D48A	1-319	StrepHis6, abgespalten	35
	ZD	26-202	N-terminal: GST C-terminal: mCherry	73
	RBD	203-319	StrepHis6, abgespalten	13
Rezeptor	Claudin-4	1-209	N-terminal: GST; S C-terminal: H8	52

As = Aminosäure; ZD = zytotoxische Domäne; GST = Glutathion-S-Transferase; MW = Molekulargewicht; RBD = Rezeptorbindungsdomäne

Insbesondere für den Einsatz der Antigene zur Immunisierung ist eine hohe Reinheit erforderlich. Auch an den Rezeptor wurden diesbezüglich vor allem zur Bestimmung der Affinität durch SPR-Messungen gleiche Anforderungen gestellt. Um die Reinheit der Proteine zu überprüfen, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt (Kapitel 2.4.1 und 2.4.2).

Alle Proteine besaßen einen hohen Reinheitsgrad (Abbildung 26), der auf die chromatographische Reinigung mittels IMAC und Größenausschlusschromatographie (SEC) seitens der MHH zurückzuführen ist.

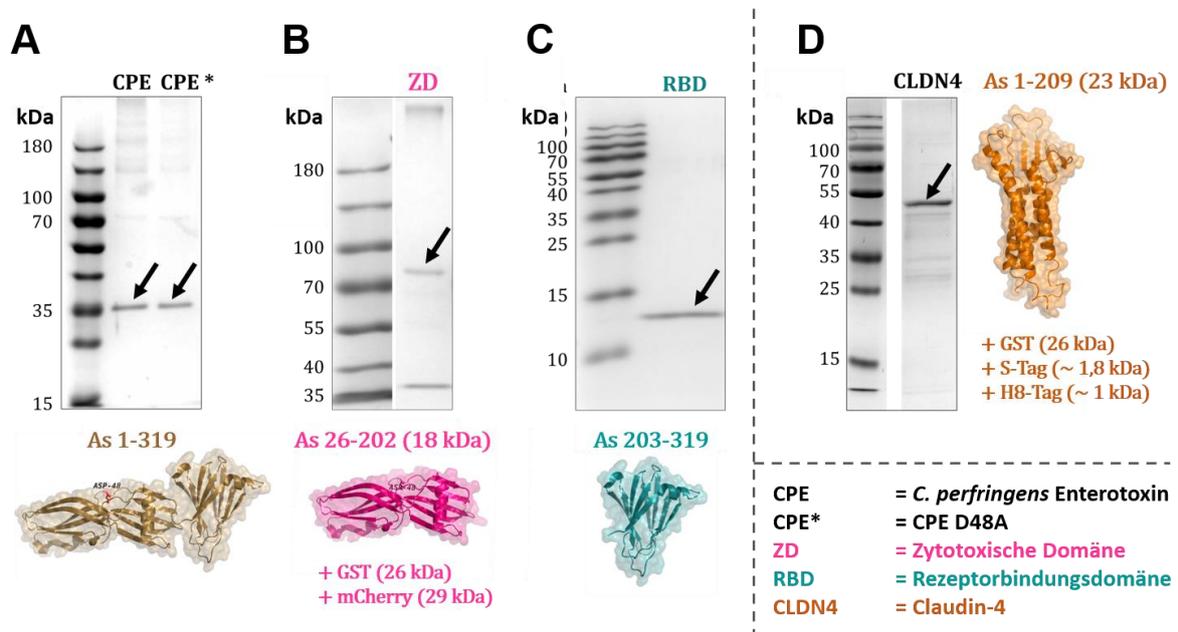


Abbildung 26: Auftragung von CPE und Claudin-4 in SDS-PAGE.

Von den Antigenen (A-C) und Claudin-4 (D) wurden je 500 ng in reduzierendem Probenpuffer (mit β -Mercaptoethanol) auf 12 % (A, C, D) bzw. 7,5 % SDS-PAGE-Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blue. **A.** *C. perfringens* Enterotoxin (CPE) und CPE D48A (CPE*) mit dem erwarteten Molekulargewicht (MW) von ca. 35 kDa **B.** Zytotoxische Domäne von CPE (ZD) mit dem erwarteten MW von 18 kDa zuzüglich MW der Proteintags (26 kDa für GST und 29 kDa für mCherry) **C.** Rezeptorbindungsdomäne von CPE (RBD) mit dem erwarteten MW von 13 kDa **D.** Claudin-4 mit dem erwarteten MW von 23 kDa zuzüglich MW der Proteintags (26 kDa für GST, ca. 1,8 kDa für S- und ca. 1 kDa für H8-Tag). Die dem jeweiligen Protein entsprechenden Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Bildquellen für die Strukturabbildungen: PDB 3AM2 (CPE) und PDB 5B2G (Claudin-4).

3.3.2 Affinität von Claudin-4 als Rezeptor für CPE

Um zu untersuchen, ob sich Claudin-4 als hochaffiner Rezeptor für den Einsatz in Nachweissystemen von CPE eignet, wurde die Affinität der Interaktion zwischen Rezeptor und Antigen vergleichend zur Affinität zwischen Antikörper und Antigen mittels SPR-Spektroskopie untersucht (Kapitel 2.7.3).

Schon anhand des Kurvenverlaufs (Abbildung 27) ist ersichtlich, dass Claudin-4 mit außerordentlich hoher Affinität bindet, die der von sehr guten monoklonalen Antikörpern wie CPE1 ähnlich ist (CPE1 ist einer von mehreren in dieser Arbeit hergestellten mAk gegen CPE, Kapitel 3.3.3.2). Sowohl die Rezeptor-CPE- als auch die mAk-CPE-Interaktion wiesen sehr niedrige Dissoziationsgeschwindigkeiten (Tabelle 36) auf, was einer starken Bindung der beiden Fänger an CPE entspricht. Durch seine höhere Assoziationsgeschwindigkeit ergab sich für den Antikörper CPE1 eine geringfügig bessere Affinität gegenüber CPE, als sie der Rezeptor aufwies.

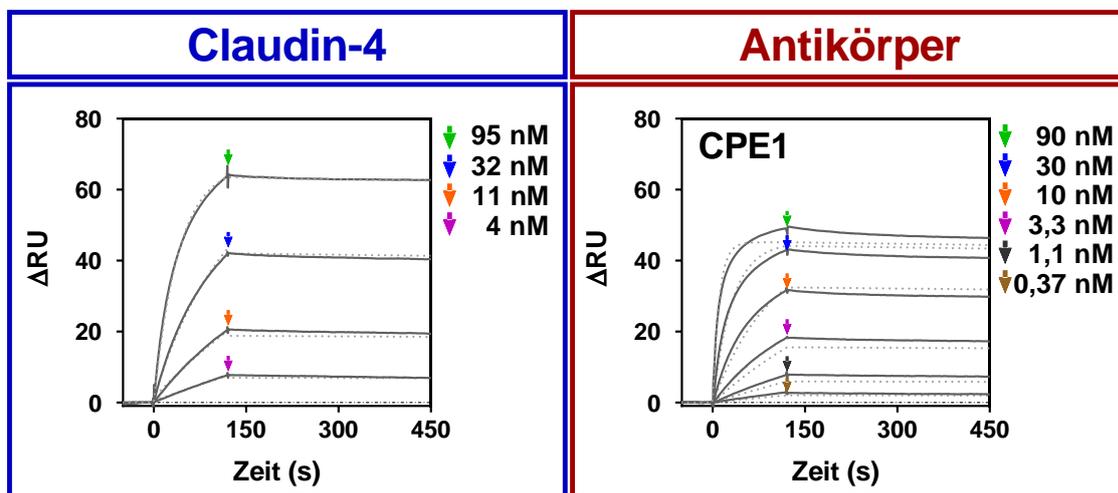


Abbildung 27: Bindung von CPE an den Rezeptor Claudin-4 und an mAk CPE1 mittels SPR-Messungen.

Claudin-4 (links; blau) wurde über ein GST Capture Kit, mAk CPE1 (rechts; rot) über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5 Sensorchip immobilisiert. Es erfolgte danach die Injektion (120 s, 30 μ l/min) von CPE in den angegebenen Konzentrationen in separaten Messzyklen (multi-cycle). Die durch Pufferinjektion eingeleitete Dissoziation wurde für 1200 s gemessen (gezeigt bis ca. 300 s). Messkurven sind in durchgezogenen, Fit-Kurven in gestrichelten Linien dargestellt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde ein 1:1-Bindungsmodell verwendet.

Tabelle 36: Kinetische Parameter der Interaktion von CPE mit Claudin-4 und mAk CPE1.

Antigen	Ligand	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
CPE	Claudin-4	$2,7 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-10}$
	mAk CPE1	$1,0 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-11}$

k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante; K_D = Affinitätskonstante

Anhand der ermittelten, hervorragenden Affinität erschien der Einsatz des Membranproteins Claudin-4 als alternativer Fänger zum Nachweis von CPE sehr aussichtsreich.

3.3.3 Generierung monoklonaler, CPE-spezifischer Antikörper

Um Claudin-4 in einen Sandwich-ELISA integrieren zu können, mussten geeignete Detektionsantikörper identifiziert werden, die die Rezeptorbindung nicht blockieren. Aufgrund dieser spezifischen Applikation und des geringen kommerziellen Angebots an CPE-spezifischen Antikörpern wurden im Rahmen dieser Arbeit monoklonale Antikörper mit Hilfe der Hybridomtechnologie hergestellt (Kapitel 2.3). In Abbildung 28 ist das allgemeine Vorgehen gezeigt. Die bei der Fusion entstandenen Hybridom-Klone wurden im ersten Schritt durch ein ELISA-basiertes Screening anhand ihrer spezifischen Erkennung von CPE und ihrem Einsatz als Detektionsantikörper in Kombination mit Claudin-4 bzw. als Fänger oder Detektor im klassischen Sandwich-ELISA selektiert. Durch den hohen Probendurchsatz im ELISA gelang es, schnell und gezielt Zellklone zu selektieren, die für das Antigen spezifische Antikörper bildeten. Anschließend wurden mit Hilfe SPR-basierter Methoden aus diesen Klonen diejenigen mit den besten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Bindungskinetik und Epitoperkennung ausgewählt. So konnten passgenau Antikörper für den Aufbau hochsensitiver und hochspezifischer Nachweissysteme identifiziert werden.

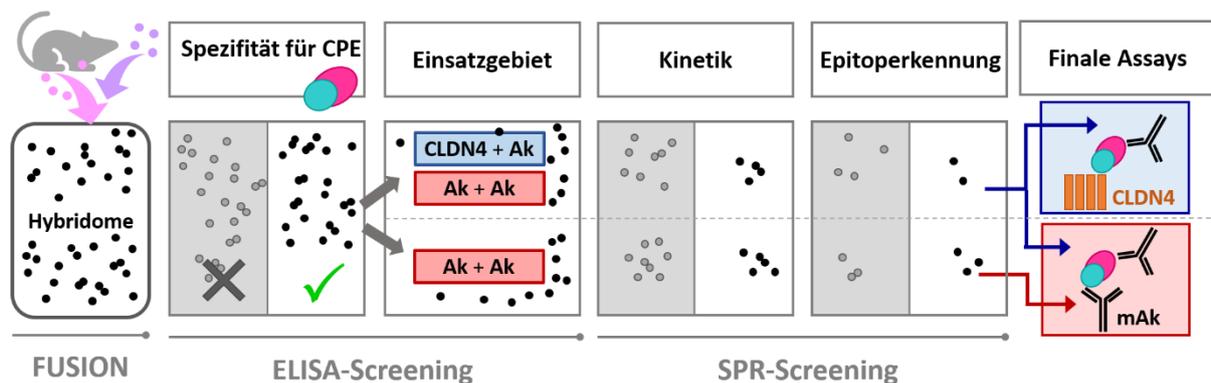


Abbildung 28: Prozess zum Aufbau von immunologischen Assays zum Nachweis von CPE.

Durch eine Hybridomfusion von Splenozyten (pink) einer zuvor immunisierten Maus mit Myelomzellen (lila) gehen Hybridomklone hervor, die Antikörper produzieren. Im ELISA-Screening wurden nur CPE-spezifische und für das Einsatzgebiet geeignete Antikörper selektiert (blau: „Claudin-4 + Ak = Antikörper kann mit Rezeptor Claudin-4 kombiniert werden; rot: „Ak + Ak“ = Einsatz des Antikörper im Sandwich-ELISA). Im SPR-Screening erfolgt die Auswahl von Antikörpern mit bester Bindungskinetik und unterschiedlicher Epitoperkennung, sodass mit den wenigen verbliebenen Antikörpern sensitive Assays aufgebaut werden können. Punkte symbolisieren Hybridomklone, wobei die antikörperhaltigen Überstände untersucht wurden. Graue Bereiche kennzeichnen von weiteren Untersuchungen ausgeschlossene Klone.

Die Verwendung der isolierten Toxindomänen als Immunogene ließ die Produktion von Antikörpern mit distinkter Epitoperkennung erwarten. Daher erfolgten erste Immunisierungen mit der Rezeptorbindungs- und der zytotoxischen Domäne des Toxins.

3.3.3.1 Verwendung von Toxindomänen als Immunogene

Die Funktionalität von CPE und damit seine Toxizität sind an das Zusammenwirken seiner Domänen gebunden: einer konzertierten Aktion aus Rezeptorbindung (RBD) und die durch Porenbildung vermittelte Zytotoxizität (ZD). Dementsprechend konnten die isolierten rekombinant hergestellten Domänen direkt

Für diesen Assay wurde Claudin-4 immobilisiert, gefolgt von der Inkubation mit dem Antigen RBD und der Zugabe der Hybridomüberstände und Detektion durch Spezies-spezifischen biotinylierten Antikörper (Kapitel 2.6.2). Mit dieser Art des Screenings und der Festlegung einer minimalen Absorption von 2,0 für die Bindung der Rezeptorbindungsdomäne im indirekten ELISA konnte die Anzahl der zu untersuchenden Klone von 819 auf 56 drastisch reduziert werden. Unter dieser Anzahl von 56 befanden sich 29 Klone, deren Antikörper im Claudin-4-basierten Sandwich-ELISA einsetzbar waren und die Rezeptorbindungsdomäne gut erkannten. Die restlichen 27 Klone produzierten Antikörper, die ebenfalls eine gute Erkennung der Rezeptorbindungsdomäne im indirekten ELISA aufwiesen, aber keine Kombination mit Claudin-4 ermöglichten und demnach nur für die finale Assay-Variante bestehend aus zwei monoklonalen Antikörpern geeignet waren.

Für eine weiterführende Charakterisierung der Klone wurden SPR-basierte Methoden angewandt, die sich aus einer Messung der Bindungskinetik (Abbildung 30; A) und einem Epitopbinning (Abbildung 30; B) zusammensetzten.

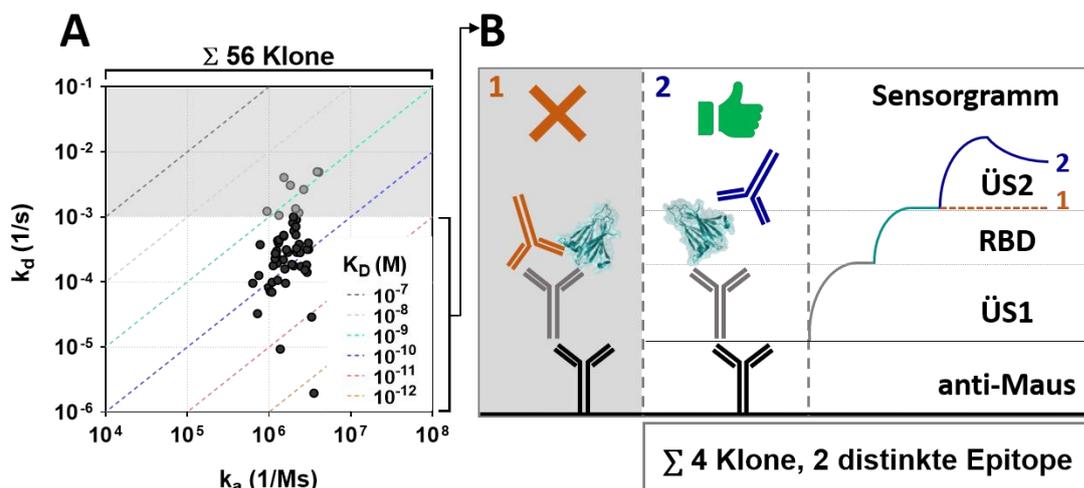


Abbildung 30: SPR-basiertes Screening mit der Rezeptorbindungsdomäne von CPE als Antigen.

A. SPR-Kinetik: Antikörper aus den Hybridomüberständen wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Chip immobilisiert. Es folgte die Injektion (120 s; 30 μ l/min) von RBD (1 und 10 μ g/ml) und eine Pufferinjektion zur Einleitung der Dissoziation (300 s). Aufgetragen sind die aus den Kurvenverläufen ermittelten Bindungskonstanten (k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante) bei Modellierung einer 1:1 Bindung. **B.** SPR-Binning: Immobilisierung von Hybridomüberstand 1 (ÜS1) erfolgte wie in A. Nach anschließender Injektion der RBD (2 μ g/ml, 120 s; 30 μ l/min) wurde Überstand 2 (ÜS2) injiziert. In (1) erkennen die Antikörper aus ÜS1 und ÜS2 das gleiche Epitop, in (2) sind die Epitope distinkt. Rechts sind die Kurvenverläufe der Messung für (1) und (2) schematisch gezeigt.

Für die Messung der Bindungskinetik wurden die Hybridom-Überstände injiziert und die enthaltenen Antikörper über ein Mouse Capture Kit immobilisiert (Kapitel 2.7.3). Nach Injektion der Rezeptorbindungsdomäne konnten anhand des Kurvenverlaufes die Bindungsparameter mit einem 1:1-Bindungsmodell bestimmt werden. Nahezu alle Antikörper wiesen eine hohe Affinität für die Rezeptorbindungsdomäne auf. Nur wenige Antikörper mussten aufgrund hoher Dissoziationsgeschwindigkeiten ausgeschlossen werden (grau markierter Bereich in Abbildung 30 A). Die finale Auswahl von Klonen erfolgte schließlich anhand eines SPR-basierten Epitopbinning (Kapitel 2.7.4), welches Rückschlüsse auf die Epitoperkennung der produzierten Antikörper gab (Abbildung 30 B). Insgesamt konnten bei dieser Fusion Antikörper gegen zwei distinkte Epitope generiert werden (CPE58,

CPE66, CPE281, CPE307). Die gegen Epitop 1 gerichteten Antikörper CPE58 und CPE281 erkannten im Gegensatz zu den Antikörpern gegen Epitop 2 in nachfolgenden Untersuchungen das Gesamttoxin. Da CPE58 und CPE281 nicht mit Claudin-4 kombinierbar waren und sich gegenseitig blockierten, war die Generierung weiterer monoklonaler Antikörper erforderlich.

Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit der zytotoxischen Domäne (ZD) immunisiert (siehe Anhang Tabelle 54 und Abbildung 59 B Maus 5 bis 7). Aus dieser Hybridomfusion gingen keine CPE-spezifischen, sondern nur gegen die Proteintags gerichtete Antikörper hervor. Um Antikörper gegen die ZD zu generieren, wurden Immunisierungen mit dem Gesamttoxin und eine dritte Hybridomfusion durchgeführt.

3.3.3.2 Verwendung von CPE D48A als Immunogen

Für die intraperitoneale Applikation von CPE (Aminosäuren 1-319) ist eine halbmaximale letale Dosis von 160 µg/ml für Mäuse beschrieben [76]. Um die zu immunisierenden Tiere nicht zu schädigen und dennoch eine Dosis im µg-Bereich verabreichen zu können, stellte der Projektpartner (MHH) eine in der Literatur als atoxisch beschriebene rekombinante Variante des Toxins mit einer Punktmutation (CPE D48A) [215] für die Immunisierung zur Verfügung. Die Mäuse (für das Immunisierungsschema siehe Anhang, Tabelle 55) wiesen nach der zweiten Immunisierung hohe Reaktivität gegen CPE D48A und das Wildtypotoxin auf (siehe Anhang, Abbildung 60). Somit konnte eine Hybridomfusion durchgeführt werden (Kapitel 2.3). Für das anschließende Screening zur Auswahl von Hybridomklonen mit geeigneten Antikörpern kamen erneut ELISA- und SPR-basierte Methoden (Abbildung 31; Abbildung 32) zum Einsatz.

Anders als bei dem zuvor vorgestellten Screening (Kapitel 3.3.3.1) wurden CPE-spezifische Hybridomüberstände nur durch die Bindung an CPE im indirekten ELISA (Kapitel 2.6.1) identifiziert (Abbildung 31, A1). Da nur wenige Klone aufgrund der Kreuzreaktivität gegenüber der Tag-Kontrolle beim vorherigen Selektionsprozess ausgeschlossen werden konnten, wurde diese Testung hier nicht durchgeführt. Parallel zur Spezifitätstestung der Hybridom-Klone wurde zusätzlich auf die Eignung der produzierten Antikörper als Detektor in Kombination mit Claudin-4 als Fänger für CPE gescreent (Abbildung 31, A2). Die Durchführung der Assays erfolgte wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass als Antigen CPE in voller Länge (Aminosäuren 1-319) verwendet wurde. Von den rund 1300 untersuchten Hybridomüberständen wiesen 4,4 % (55 Klone) die erforderlichen Eigenschaften auf. Die Absorptionen von 25 Hybridomüberständen lagen über dem hier festgelegten Grenzwert von 2,0 für beide verwendete ELISA-Formate. Weitere 30 Klone produzierten Antikörper, die CPE im indirekten ELISA mit hohen Signalintensitäten detektierten, aber nicht als Detektor für über Claudin-4 immobilisiertes Toxin einsetzbar waren. Um schon frühzeitig erste Hinweise auf die Diversität der erkannten Epitope zu erhalten, wurden die Hybridomüberstände auf die Bindung an die isolierten Domänen ZD und RBD (Abbildung 31, B) untersucht. Dazu wurden die Domänen auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit den Hybridomüberständen inkubiert (indirekter ELISA, Kapitel 2.6.1). Von den Antikörpern der untersuchten Klone wiesen 20 eine Spezifität für die ZD und 13 für die RBD auf (Absorptionen > 0,8). Für die restlichen 22 Hybridomüberstände ließ sich keine eindeutige Domänenspezifität ermitteln. Aus diesen

Daten konnte abgeleitet werden, dass verschiedene Epitope von den Antikörpern erkannt werden und somit die erfolgreiche Kombination von Antikörpern zu einem Sandwich-ELISA aussichtsreich schien. Zusätzlich dienten die Ergebnisse zur Entscheidungsfindung beim anschließenden SPR-basierten Screening.

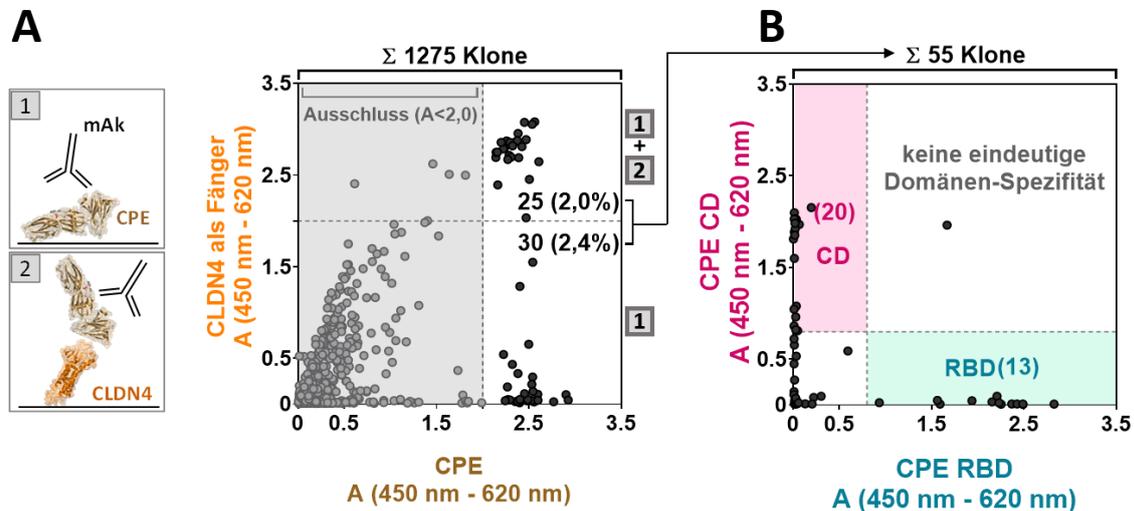


Abbildung 31: ELISA-Screening mit CPE.

A. Spezifität für CPE und Reaktivität im indirekten ELISA **(1)** und im Sandwich-ELISA **(2)** mit Claudin-4 als Fänger. **B.** Domänenkennung im indirekten ELISA. Für indirekte ELISAs wurden 500 ng/ml CPE bzw. Domänen (ZD; RBD) immobilisiert und nach Blockade unspezifischer Bindungen mit antikörperhaltigen Hybridomüberständen inkubiert. Es wurde mit Fc γ -spezifischer anti-Maus-POD und TMB entwickelt. Für Sandwich-ELISAs wurde Claudin-4 (2 μ g/ml) immobilisiert, die Platten geblockt, mit RBD (200 ng/ml) und anschließend mit Hybridomüberständen inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit SA-Poly-HRP und TMB. Aufgetragen sind jeweils die gemessenen Absorptionen. Grau markierte Bereiche/Punkte geben ausgeschlossene Klone an.

Für das SPR-basierte Screening wurde zunächst wieder die Bindungskinetik (Kapitel 2.7.3) der aus dem Überstand immobilisierten Antikörper an CPE bestimmt (Abbildung 32 A). Die Durchführung war analog zum vorherigen Unterkapitel (3.3.3.1). Insgesamt zeigten die meisten Antikörper hohe Affinitäten, die im niedrigen nanomolaren Bereich angesiedelt waren. Aufgrund hoher Dissoziationskonstanten ($> 10^{-3}$ 1/Ms) wurden 20 Klone von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die verbliebenen 35 Klone wurden in einem Epitopbinning (Kapitel 2.7.4) mit CPE als Antigen untersucht. Hier kristallisierten sich schließlich sechs Klone mit sechs distinkten Epitopen heraus: CPE1; CPE384; CPE526; CPE562; CPE639 und CPE1339.

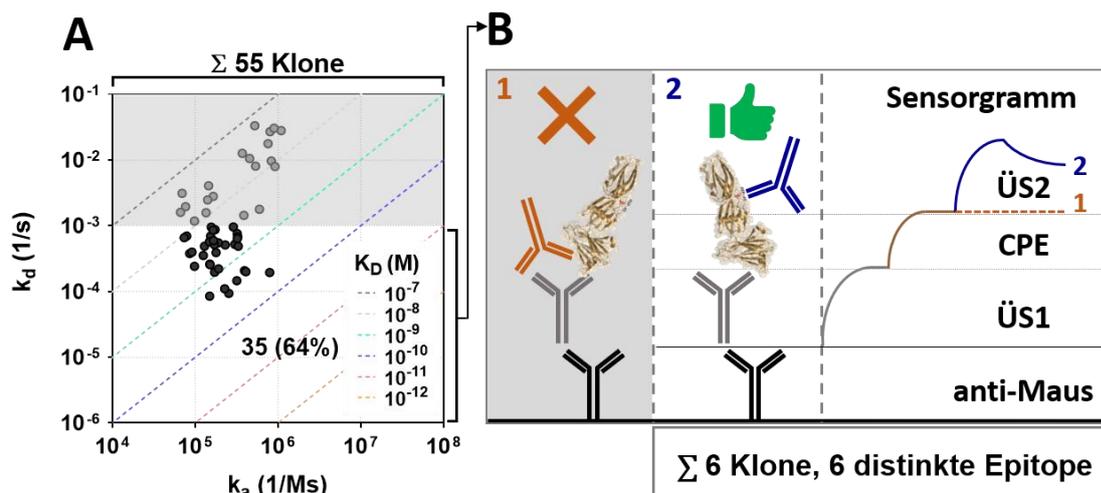


Abbildung 32: SPR-Screening mit CPE als Antigen.

A. SPR-Kinetik: Die Antikörper aus den Hybridomüberständen wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Chip immobilisiert. Es folgte die Injektion (120 s; 30 μ l/min) von CPE (1 und 10 μ g/ml) und eine Pufferinjektion zur Einleitung der Dissoziation (300 s). Aufgetragen sind die aus den Kurvenverläufen ermittelten Bindungskonstanten (k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante) bei Modellierung einer 1:1-Bindung. **B.** SPR-Binning: Immobilisierung von Hybridomüberstand 1 (ÜS1) erfolgte wie in A. Nach anschließender Injektion von CPE (2 μ g/ml, 120 s; 30 μ l/min) wurde Überstand 2 (ÜS2) injiziert. In (1) erkennen die Antikörper aus ÜS1 und ÜS2 das gleiche Epitop, in (2) sind die Epitope distinkt. Rechts sind die Kurvenverläufe der Messung für (1) und (2) schematisch gezeigt.

3.3.4 Charakterisierung monoklonaler, CPE-spezifischer Antikörper

Nachdem geeignete monoklonale Antikörper identifiziert worden waren, erfolgte die Subklonierung der Hybridome und ihre Expansion (Kapitel 2.3.6 und 2.3.8). Nach der chromatographischen Reinigung des mit Antikörpern angereicherten Zellüberstandes der Hybridome standen acht CPE-spezifische monoklonale Antikörper bereit: CPE1, CPE58, CPE281, CPE384, CPE526, CPE562, CPE639 und CPE1339, von denen vier (CPE384, CPE562, CPE639, CPE1339) mit Claudin-4 kombinierbar waren. Um die Antikörper hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens zu analysieren, kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Eine Untersuchung im Western Blot gab Hinweise auf die Spezifität der Antikörper (Kapitel 2.6.4). Aufgrund des ähnlichen modularen Aufbaus von CPE und Epsilon-Toxin (Etx) [216] wurden die Antikörper auf die Erkennung beider *C. perfringens*-Toxine hin im Western Blot getestet (siehe Anhang, Abbildung 61). Alle monoklonalen Antikörper detektierten CPE im Western Blot. Die gegenüber Etx festgestellte Reaktivität konnte auf eine CPE-Kontamination der verwendeten Etx-Charge zurückgeführt werden (persönliche Kommunikation Andreas Rummel, MHH).

Um die präliminär im Screening ermittelten Affinitäten genauer zu bestimmen, wurden die gereinigten Antikörper erneut durch SPR-Messungen untersucht (siehe Anhang, Abbildung 62). Diese final ermittelten kinetischen Bindungsparameter finden sich in Tabelle 37.

Die Bindungsepitope der Antikörper auf CPE wurde im indirekten ELISA (Kapitel 2.6.1) durch Verwendung der Subdomänen eingegrenzt. Hierzu wurden die ZD und RBD auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit den Antikörpern inkubiert. CPE1, CPE58, CPE281 und CPE1339 erwiesen sich als spezifisch für die

Rezeptorbindungsdomäne (Tabelle 37). Die Antikörper CPE384, CPE562 und CPE639 wiesen eine Spezifität für die ZD auf und ließen sich erwartungsgemäß in Kombination mit dem Rezeptor als Detektor einsetzen. CPE526 zeigte im indirekten ELISA für keine der beiden Domänen eine Bindung, wodurch eine Bestimmung der Domänenspezifität für diesen Antikörper nicht möglich war.

Um die Kombinierbarkeit der gereinigten Antikörper zu überprüfen, wurde analog zum Screening ein SPR-basiertes Epitopbinning durchgeführt (Kapitel 2.7.4). In einer komplexen Berechnung wurde die Ähnlichkeit der erkannten Epitope auf einer Skala von -1 bis +1 bestimmt. Bei einem Wert von -1 handelt es sich um maximal distinkte Epitope. Ein Wert von +1 liegt bei identischen Epitopen vor. Wie in Abbildung 33 ersichtlich ist, sind CPE1, CPE58 und CPE281 gegen das gleiche Epitop 1 gerichtet. Das heißt, sie blockieren sich gegenseitig in der Bindung an CPE. CPE526 weist zu den genannten Antikörpern eine hohe Ähnlichkeit im Bindungsverhalten auf und erkennt vermutlich ein sich mit Epitop 1 überlappendes Epitop 2. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der übereinstimmenden Domänenspezifität (CPE1; CPE58, CPE281) und der reduzierten Detektion bei Rezeptorbindung. Die Antikörper CPE384, CPE562, CPE639 und CPE1339 erkennen jeweils distinkte Epitope, wobei Überschneidungen zwischen CPE639 und CPE562 sowie zwischen CPE384 und CPE1339 erkennbar sind. Insgesamt konnten somit in den beiden erfolgreichen Fusionen acht Antikörper gegen sechs verschiedene, teils überlappende Epitope generiert werden.

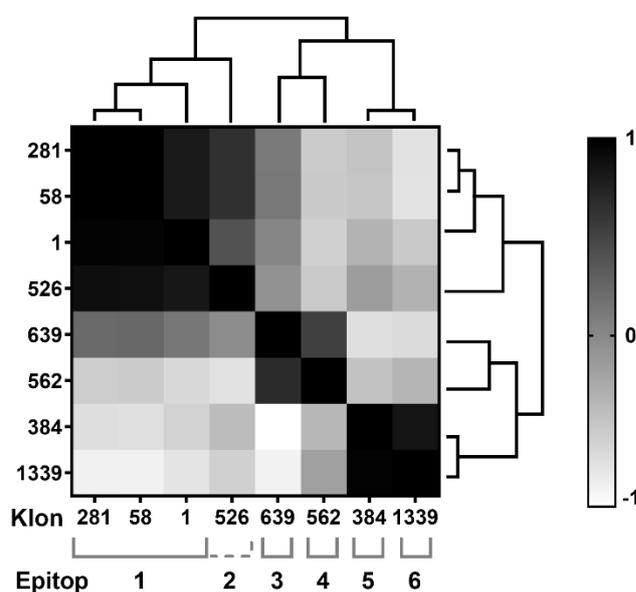


Abbildung 33: Epitopbinning der gereinigten CPE-spezifischen Antikörper.

Es wurde ein Epitopbinning durchgeführt. Die monoklonalen Antikörper wurden jeweils in Konzentrationen von 10 µg/ml eingesetzt. Als Antigen diente CPE in einer Konzentration von 2 µg/ml. Die dargestellte Heatmap stellt die rechnerische Auswertung des Versuches dar. Die Bewertung der Epitoperkennung erfolgt auf einer Skala von -1 (weiß, unterschiedliches Bindungsverhalten) bis +1 (schwarz, identisches Bindungsverhalten).

Tabelle 37 fasst die Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit generierten CPE-spezifischen Antikörper zusammen. Es stehen vier Antikörper mit einer identischen bzw. ähnlichen Epitopabdeckung zur Verfügung, die das Rezeptorbindungsepitop binden (Epitop 1 und 2). Weitere vier Antikörper erkennen vier distinkte Epitope (Epitope 3 bis 6), die eine gleichzeitige Bindung des Rezeptors Claudin-4 ermöglichen.

Tabelle 37: Eigenschaften der CPE-spezifischen monoklonalen Antikörper.

Epitop	Name	Spezifität	Isotyp	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
nicht kombinierbar mit Rezeptor						
1	CPE1	CPE, RBD	IgG1	$1,0 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-11}$
	CPE58	CPE, RBD	IgG1	$6,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-9}$
	CPE281	CPE, RBD	IgG1	$7,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-9}$
2	CPE526	CPE	IgG1	$1,9 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-9}$
kombinierbar mit Rezeptor						
3	CPE384	CPE, (ZD)*	IgG1	$2,7 \times 10^5$	$4,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-9}$
4	CPE562	CPE, ZD	IgG1	$3,1 \times 10^5$	$6,8 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-10}$
5	CPE639	CPE, ZD	IgG1	$4,1 \times 10^5$	$8,6 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-9}$
6	CPE1339	CPE, RBD	IgG1	$2,0 \times 10^6$	$7,9 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-11}$

k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante; K_D = Affinitätskonstante; ZD = zytotoxische Domäne; RBD = Rezeptorbindungsdomäne

*geringe Absorption (0,15) im indirekten ELISA

3.3.5 Vergleich von Antikörper- und Rezeptor-basiertem Nachweis von CPE

Die neu generierten hochspezifischen Antikörper wurden in Antikörper- und Rezeptor-basierte Nachweissysteme integriert. Dazu wurden alle Antikörper zunächst mit Biotin gekoppelt (Kapitel 2.3.10), um sie als Detektionsreagenz in Verbindung mit Streptavidin-gekoppeltem Enzym einsetzen zu können. Es erfolgte die Immobilisierung von Fängerantikörpern für den Sandwich-ELISA und Claudin-4 für den Rezeptor-basierten Ansatz auf Mikrotiterplatten (Kapitel 2.6.2). Nach der Inkubation mit einer seriellen Verdünnungsreihe von CPE wurden die Detektionsantikörper zugegeben. Die Sensitivitäten der gemessenen Kombinationen zum Nachweis von CPE wurden anhand der halbmaximalen Effektorkonzentrationen bestimmt (Tabelle 38).

Tabelle 38: Sensitivitäten der CPE-spezifischen mAk in Sandwich- und Claudin-4-ELISA.

Detektor Fänger	CPE281	CPE58	CPE1	CPE526	CPE639	CPE562	CPE384	CPE1339
CPE281	-	-	-	-	++	+++	++	+++
CPE58	-	-	-	-	++	+++	++	+++
CPE1	-	-	-	++	+++	+++	++	+++
CPE526	-	-	+	-	+	+	+	+
CPE639	++	+	+++	+	-	+	++	+++
CPE562	+++	++	+++	+	+	-	+++	+++
CPE384	++	+	+++	+	++	+++	-	+
CPE1339	++	+	+++	+	++	+++	+	-
CLDN4	-	-	-	-	+	+++	+	+

Einstufung der Sensitivität anhand der halbmaximalen Effektorkonzentration (EC_{50}): “-“ = $EC_{50} > 10$ ng/ml; “+“ = $0,5 < EC_{50} \leq 10$ ng/ml; “++“ = $0,2 < EC_{50} \leq 0,5$ ng/ml; “+++“ = $EC_{50} < 0,2$ ng/ml

Um Ergebnisse aus Epitopbinning und Sandwich-ELISA besser vergleichen zu können, wurden die Antikörper in Tabelle 38 wie in Abbildung 33 angeordnet. Insgesamt waren die Ergebnisse der beiden Methoden in guter Übereinstimmung. Antikörper mit überschneidenden oder identischen Epitopen (dick umrandet) im SPR-Binning waren auch im ELISA schlecht bzw. nicht kombinierbar. Die Antikörper CPE1, CPE562 und CPE1339 mit den höchsten Affinitäten zu CPE ermöglichten auch den sensitivsten Nachweis von CPE im Sandwich-ELISA. Unter Verwendung von CPE562 als Detektionsantikörper konnte mit dem Rezeptor-basierten Ansatz eine ebenso gute Sensitivität wie mit den besten Sandwich-ELISA-Kombinationen erreicht werden. Einen genauen Vergleich der beiden Nachweissysteme zeigt Abbildung 34. Hier wurden CPE1 bzw. Claudin-4 als Fänger immobilisiert und nach Inkubation des Antigens mit biotinyliertem CPE562 detektiert.

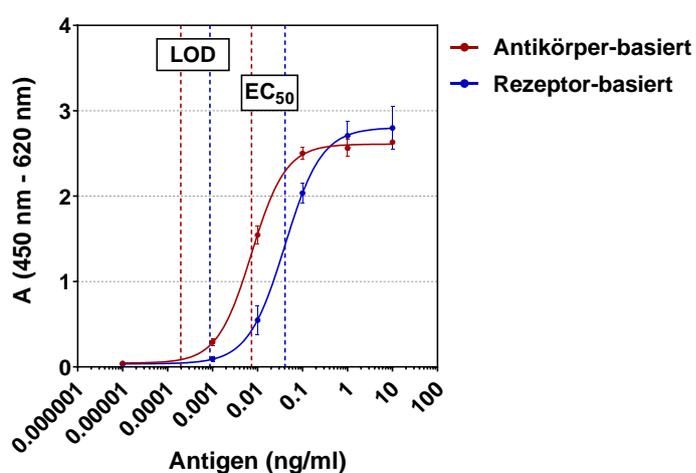


Abbildung 34: Vergleich von Antikörper- und Claudin-4-basiertem Nachweis von CPE.

Nach der Immobilisierung von CPE1 (5 µg/ml; rot) und Claudin-4 (2,5 µg/ml, blau) wurden unspezifische Bindungen blockiert. Es folgte die Inkubation mit einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) von CPE. Die Detektion wurde mit biotinyliertem CPE562 (0,2 µg/ml) vorgenommen. Durch Zugabe von SA-Poly-HRP und TMB wurde entwickelt. Aufgetragen sind jeweils die Ergebnisse von 4 repräsentativen Versuchen (Mittelwerte mit Standardabweichungen, n=4). Gestrichelte Linien in den Farben des jeweiligen Ansatzes geben Nachweisgrenzen und halbmaximale Effektorkonzentrationen an.

Mit 0,2 pg/ml für den Antikörper-basierten und 0,9 pg/ml für den Rezeptor-basierten Nachweis wiesen beide Detektionssysteme im Plattenformat sehr niedrige Nachweisgrenzen auf (Tabelle 39). Insbesondere für die bloße Immobilisierung des Membranproteins Claudin-4, welches mit vier Transmembranspannen [162] eine komplexe Konformation hat, war eine solche Sensitivität unerwartet. Die Übertragung der neu entwickelten Assays zum Nachweis von CPE in die Vor-Ort-Detektionsplattform war anhand der vorliegenden Ergebnisse erfolgsversprechend.

Tabelle 39: Nachweisgrenzen für den Nachweis von CPE mittels Sandwich- und Claudin-4-ELISA.

Antigen	Fänger	Detektor-mAk	LOD (pg/ml)	EC ₅₀ (ng/ml)
CPE	mAk CPE1	CPE562-Bio	0,2	0,01
	Claudin-4		0,9	0,04

LOD = Nachweisgrenze; EC₅₀ = halbmaximale Effektorkonzentration

3.3.6 Nachweis von nativem CPE aus Bakterienüberständen

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen wurden mit rekombinant hergestelltem CPE durchgeführt, welches auf die DNA des *C. perfringens*-Stammes 61a zurückging. Um zu überprüfen, ob die etablierten Antikörper- und Rezeptor-basierten ELISA einen breitbandigen Nachweis von nativem CPE ermöglichen, wurden Bakterienüberstände des Stammes 61a sowie 65 weiterer *C. perfringens*-Stämme untersucht (Tabelle 40). Diese umfangreiche Sammlung an Stämmen ging im Wesentlichen aus der Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Ute Messelhäuser) und dem Landesamt für Verbraucherschutz in Thüringen (Dagmar Rimek) hervor. Das RKI erhielt die im Rahmen von Ausbruchsgeschehen isolierten *C. perfringens*-Stämme für die Validierung der etablierten Assays. Zusätzlich wurden kommerziell erhältliche Stämme aus der PHE Culture Collection (Salisbury, UK) erworben. Nach anaerober Kultivierung der Stämme und Pelletierung der Bakterien wurden zellfreie Bakterienüberstände hergestellt (Kapitel 2.1.8), welche auf die Anwesenheit von CPE getestet wurden. Für den Nachweis von CPE dienten die sensitivsten Kombinationen mit CPE562 bzw. Claudin-4 als Fänger und CPE1-Bio bzw. CPE562-Bio als Detektionsantikörper (Sandwich-ELISA, Kapitel 2.6.1). Die erhaltenen Ergebnisse der ELISA-basierten Testung wurden zur Prüfung der Richtigkeit mit der Anwesenheit des Toxins abgeglichen. Die PCR-Daten wurden jeweils von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

Tabelle 40: Nachweis von CPE aus Bakterienüberständen verschiedener *C. perfringens*-Stämme.

Stammbezeichnung	Quelle	CPE ELISA*		PCR	Konsens PCR ↔ ELISA
		mAk	CLDN4		
61a	MHH (Ursprung rek. CPE)	+++	+++	pos.	✓
572c	MHH (Ursprung rek. Etx)	-	-	neg.	✓
11-13136	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
21638/07-L574	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
HF 2109	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
HF 2110-2	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
11-44702	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
10-70639	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
3570/08	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
S02253/1	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
11-30379-03	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
KV3 29.05	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
12-45390	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
12-45681	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
SO 21002	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
11.-2294	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
BWA 204	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
PP 42138-15	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
12-102988	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
SO 221	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
15-0273682	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
11-4999/1	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
11-18210	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
S 726	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
E 728	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 40

Stammbezeichnung	Quelle	CPE ELISA*		PCR	Konsens PCR ↔ ELISA
		mAk	CLDN4		
L 443/05	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
21439/07 - G 1144	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
6466/08	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
10-0058087-1	Ute Messelhäuser, BY	++	++	pos.	✓
6682/1	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
10-0029262-001-01 L93	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
10-70711/4	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
11-162672	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
12-45390	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
12-105747 L362	Ute Messelhäuser, BY	+++	++	pos.	✓
P V4 8.7.	Ute Messelhäuser, BY	-	-	pos.	✓
A202	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
14-130465	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
17-52183-001	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
17-52386-001	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
12-73336_G737/1	Ute Messelhäuser, BY	+++	+	pos.	✓
E730	Ute Messelhäuser, BY	++	+++	pos.	✓
PS8150/07	Ute Messelhäuser, BY	++	+	pos.	✓
9166/67-G407	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
175-8/97	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
MB30 o.H.	Ute Messelhäuser, BY	++	+++	pos.	✓
11 1331	Ute Messelhäuser, BY	+++	+++	pos.	✓
E732	Ute Messelhäuser, BY	++	+++	pos.	✓
12-134928_L457	Ute Messelhäuser, BY	+	+	pos.	✓
PS10950/07	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
F436	Ute Messelhäuser, BY	-	-	neg.	✓
19-041-01	Dagmar Rimek, TH	+++	+++	pos.	✓
19-042-01	Dagmar Rimek, TH	+++	+++	pos.	✓
19-043-01	Dagmar Rimek, TH	+++	+++	pos.	✓
NCTC 8239-01	PHE Culture Collections, UK	+++	++	pos.	✓
NCTC 8798-01	PHE Culture Collections, UK	+++	+++	pos.	✓
NCTC8346	PHE Culture Collections, UK	-	-	neg.	✓
NCTC13110	PHE Culture Collections, UK	-	-	neg.	✓
NCTC3110	PHE Culture Collections, UK	-	-	neg.	✓
NCTC6121	PHE Culture Collections, UK	-	-	neg.	✓
NCTC8084	PHE Culture Collections, UK	-	-	neg.	✓
NCTC8238	PHE Culture Collections, UK	++	+	pos.	✓
NCTC8504	PHE Culture Collections, UK	-	-	neg.	✓
NCTC8533	PHE Culture Collections, UK	-	-	neg.	✓
NCTC9851	PHE Culture Collections, UK	+++	+++	pos.	✓

BY = Bayern; CLDN4 = Claudin-4; mAk = monoklonaler Antikörper; neg. = negativ; pos. = positiv; rek. = rekombinant; TH = Thüringen

*unter Verwendung von CPE562 (mAk) bzw. Claudin-4 (CLDN4) als Fänger, Detektion mit CPE1-Bio (antikörperbasiert) bzw. CPE562-Bio (rezeptorbasiert), Beurteilung anhand der Absorptionswerte (A): „-“ = $A \leq 0,2$; „+“ = $0,2 < A \leq 1,0$; „++“ = $1,0 < A \leq 2,0$; „+++“ = $A > 2,0$

Für alle getesteten Stämme stimmten ELISA- und PCR-Daten überein. Die Testung der 35 CPE-negativen Stämme ergab keinerlei Kreuzreaktivität der verwendeten Nachweisreagenzien gegenüber weiteren Bestandteilen der Bakterienüberstände. Es gelang sowohl mit dem Antikörper-basierten als auch mit dem Rezeptor-basierten Ansatz ein hochspezifischer Nachweis von nativem CPE.

3.3.7 Spezifität von Claudin-4 als Fänger für CPE

Analog zu den anderen Toxinnachweisen (Kapitel 3.1.5 und 3.2.7) wurde für Claudin-4 die Bindung an die im SensTox-Projekt adressierten Toxine untersucht, um Kreuzreaktivitäten beim simultanen Toxinnachweis auf den Biochips auszuschließen. Nach Inkubation der entsprechenden Toxine auf immobilisiertem Claudin-4 und toxinspezifischem Nachweis mittels monoklonaler Detektionsantikörper zeigten sich für TcdA und TcdB hohe Signale (Abbildung 35). Eine detailliertere Untersuchung mit seriellen Verdünnungsreihen der Toxine aus *C. difficile* ergab, dass TcdB, aber vor allem TcdA bei Konzentrationen über 1 ng/ml eine deutliche Bindung an Claudin-4 zeigten (siehe Anhang, Abbildung 64). Diese Kreuzreaktivität (unter 1 %) muss in späteren Entscheidungen bezüglich des Multiplex-Nachweises im pBDi Berücksichtigung finden.

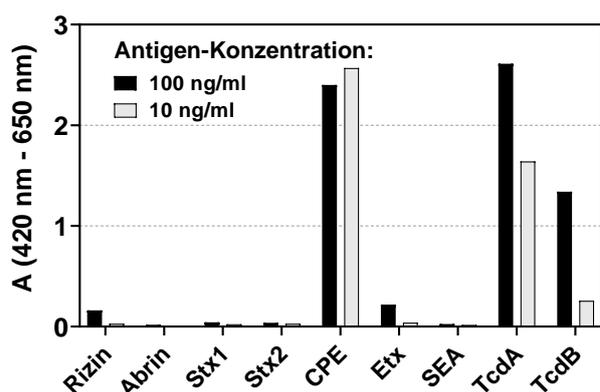


Abbildung 35: Kreuzreaktivität von Claudin-4 gegenüber ausgewählten Toxinen.

Claudin-4 wurde auf Mikrotiterplatten immobilisiert (2 µg/ml). Nach Blockade unspezifischer Bindungen erfolgte die Inkubation mit den angegebenen Antigenen in 0,1 % BSA/PBS-T in zwei verschiedenen Konzentrationen (100 und 10 ng/ml). Die Detektion wurde mit toxinspezifischen, biotinylierten mAk (je 1 µg/ml): R18-Bio (Rizin); AP3202-Bio (Abrin); 13C4-Bio (Stx1); 11E10-Bio (Stx2); CPE562-Bio (CPE), Etx484-Bio (Etx); SEA165-Bio (SEA); TcdA3211-Bio (TcdA); TcdB3322-Bio (TcdB) verdünnt durchgeführt. Die Entwicklung wurde mit Hilfe von Poly-HRP und TMB vorgenommen. Die Werte sind als Einfachbestimmungen erhoben (n=1).

3.3.8 Vor-Ort-Nachweis von CPE

Für die Untersuchung des Vor-Ort-Nachweises erfolgte die Implementierung der Antikörper- und Rezeptor-basierten Detektionssysteme für den CPE-Nachweis in die pBDi-Plattform (Abbildung 36). Dazu wurden CPE1 und Claudin-4 auf Biochips immobilisiert (Kapitel 2.6.5). Die Immobilisierung von Claudin-4 als Membranprotein war aufgrund der notwendigen Solubilisierung durch Detergenzien anspruchsvoll, da oberflächenaktive Substanzen je nach Konzentration (Triton X-100 > 0,0025 %, CHAPS > 0,5 %; persönliche Kommunikation Andreas Rummel, MHH und Christopher Pöhlmann, Bruker) eine stärkere Spreitung der zu immobilisierenden Proteinlösung verursachen und damit ein präzises Aufbringen auf den Spot verhindern. Deshalb nahm die MHH die Herstellung von Claudin-4 unter Verwendung von CHAPS (statt Triton X-100) vor, welches mit einer kritischen Mizellkonzentration von weniger als 10 mM [217]

eine Solubilisierung von Claudin-4 bei niedrigen Detergenzkonzentrationen erlaubt. Mit diesem optimierten Immobilisierungspuffer gelang es, den Rezeptor an die Goldelektroden der Biochips zu koppeln. Der für Antikörper gezeigte Zusatz von BSA als Stabilisator [188] wurde für die Immobilisierung von Claudin-4 ebenfalls erprobt.

Die Übertragung des CPE-Nachweises in die Vor-Ort-Detektionsplattform ist sowohl unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers CPE1 als auch des endogenen Rezeptors Claudin-4 als Fänger mit guten Sensitivitäten möglich (Abbildung 36, Tabelle 41). Aufgrund sehr niedriger Schwellenwerte von unter 1 % normalisierten Signals kann unabhängig vom immobilisierten Fänger eine Nachweisgrenze von 1 ng/ml CPE im pBDi erreicht werden. Der Zusatz von BSA für die Immobilisierung von Claudin-4 führte zu leicht erhöhten Signalintensitäten, aber keiner deutlichen Verbesserung des CPE-Nachweises.

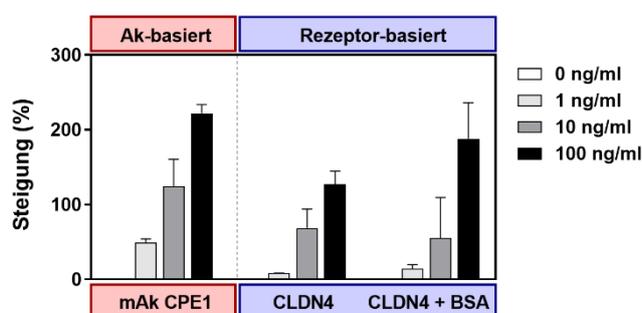


Abbildung 36: Nachweis von CPE im pBDi.

CPE1 (rot) wurde auf Biochips immobilisiert (500 µg/ml). Für Claudin-4 (blau) wurde die Immobilisierung ohne und mit Zusatz von BSA realisiert (Chiplayout siehe Anhang, Abbildung 65). Die Messung der Biochips im pBDi erfolgte durch Inkubation mit CPE (1 ng/ml bis 100 ng/ml) in Assaypuffer und anschließender Detektion mit CPE562-Bio (10 µg/ml). Es wurde mit SA-β-Galaktosidase und 4-Aminophenyl-β-D-Galaktopyranosid entwickelt und das elektrochemische Signal ausgelesen. Pro Konzentration wurde ein Biochip gemessen, aufgetragen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen Doppelspots. CLDN4 = Claudin-4

Tabelle 41: Nachweis von CPE im pBDi.

Antigen	Fänger	Detektor-mAk	LOD (ng/ml)	Schwellenwert (%)*
CPE	mAk CPE1	CPE562-Bio	1	0,1
	Claudin-4		1	0,1
	Claudin-4 + BSA		1	0,6

LOD = Nachweisgrenze

*Mittelwert des normalisierten Leerwerts der betreffenden Doppelspots zuzüglich der 3,29-fachen Standardabweichung

3.4 Epsilon-Toxin aus *Clostridium perfringens*

3.4.1 Charakterisierung von Etx-basierten Antigenen und MAL

Für die Antikörperherstellung für das Epsilon-Toxin und Untersuchungen seiner Rezeptorbindung wurden wie für CPE rekombinant in *E. coli* hergestellte Antigene verwendet (Andreas Rummel, MHH). Zur Verfügung standen eine aktive Wildtyp-Variante des Toxins und eine zur Immunisierung von Mäusen geeignete atoxische Variante des Toxins mit einer Punktmutation Y84A (Tabelle 42). Beide rekombinanten Proteine wurden zunächst als Prototoxin (PEtx, Aminosäuren 1-296) mit C-terminalem Affinitätstag (StrepHis6) exprimiert, der die Reinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglichte und anschließend durch Thrombinverdau abgespalten wurde. Das so hergestellte tagfreie PEtx Y84A wies eine um den Faktor 10.000 reduzierte Toxizität gegenüber dem aktiven Etx auf (persönliche Kommunikation Andreas Rummel, MHH). Die Prozessierung des Wildtyp-Prototoxins PEtx erforderte zusätzlich zum Thrombinverdau eine Trypsinspaltung, die unter Entfernung des Propeptids (Aminosäuren 1-14) zum aktiven Etx (Aminosäuren 15-296) führte. Die Zytotoxizitäten aller Antigene wurden extern durch Messung des transepithelialen Widerstandes von exponierten MDCK-Zellen überprüft (Andreas Rummel, MHH).

Das als Rezeptor für Etx beschriebene murine Protein MAL (*Myelin and Lymphocyte*) wurde in *E. coli* exprimiert (Andreas Rummel, MHH) und dem RKI zur Verfügung gestellt. Zur Isolierung durch Affinitätschromatographie (IMAC) wurde MAL als Fusionsprotein mit drei Proteintags produziert (Tabelle 42). Der eingefügte GST-Tag verbesserte die Löslichkeit des sehr hydrophoben Proteins und ermöglichte die Immobilisierung an einer Glutathion-Sepharose-Matrix. Für die Untersuchungen am RKI wurde das rekombinante MAL gekoppelt an diese Matrix oder nach Elution von der Matrix in freier Form zur Verfügung gestellt.

Tabelle 42: Verwendete rekombinante Etx-Proteine und MAL (Quelle: A. Rummel, MHH).

Funktion	Protein	As-Abschnitt	Proteintags	MW (kDa)
Antigen	Etx (Wildtyp)	15-296	StrepHis6, abgespalten	32
	PEtx Y84A	1-296	StrepHis6, abgespalten	34
Rezeptor	MAL	1-153	N-terminal: GST; S; C-terminal: H8	45 (ohne Tags 17)

As = Aminosäure; MAL = Myelin and Lymphocyte Protein; MW = Molekulargewicht

Zur Prüfung der Proteinreinheit erfolgte in Analogie zu vorherigen Kapiteln (3.2.1, 3.3.1) eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und nachfolgend die Anfärbung mit Coomassie-Blue (Kapitel 2.4.1 und 2.4.2.)

Wie in Abbildung 37A dargestellt ist, waren die Etx-Antigene von sehr hoher Reinheit. Außer den für Etx erwarteten Proteinbanden zwischen 30 und 35 kDa waren keine weiteren Proteine nachweisbar. Trotz Reinigung von MAL durch Tandemchromatographie (IMAC und Glutathion-Sepharose) waren Verunreinigungen mit GST und GST-getaggten Teilabschnitten von MAL (Abbildung 37 B und für Western

Blot siehe Anhang, Abbildung 66) vorhanden. Das frei vorliegende MAL war von höherer Reinheit als an Glutathion-Sepharose gebundenes MAL.

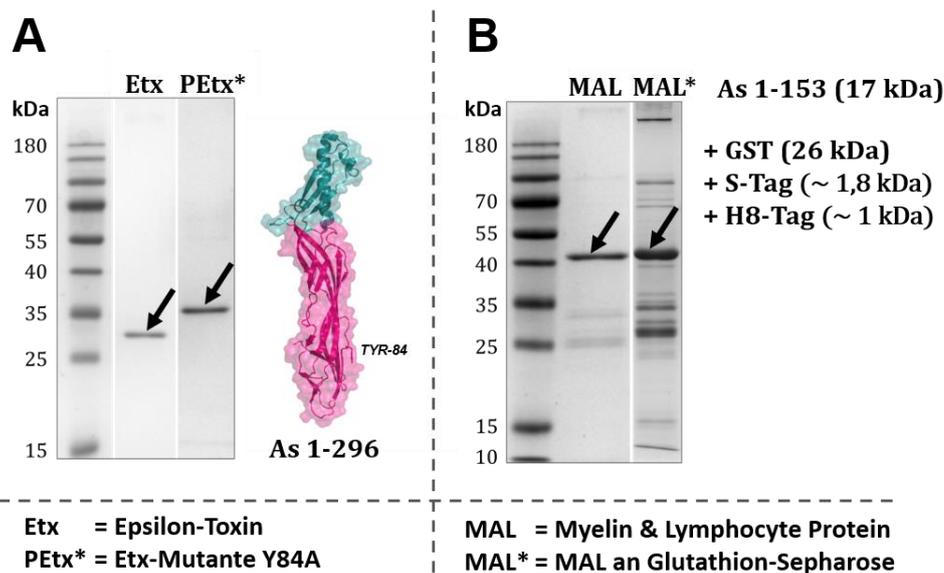


Abbildung 37: Auftragung von Etx und MAL in SDS-PAGE.

Je 500 ng der Epsilon-Toxine und des Proteolipids MAL wurden in reduzierendem Probenpuffer auf 12 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blue. **A:** Wildtyp Etx (As 15-296) mit dem erwarteten Molekulargewicht (MW) von ca. 32 kDa und mutierte Variante PEXt* (As 1-296) mit MW von ca. 34 kDa. **B:** Frei vorliegendes MAL und an Glutathion-Sepharose gebundenes MAL* mit einem MW von jeweils 17 kDa zuzüglich des MW der Proteintags (GST: 26 kDa, S-Tag: 1,8 kDa, H8-Tag: 1 kDa). Die dem jeweiligen Protein entsprechenden Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Strukturabbildung des Epsilon-Toxins: PDB 1UYJ.

3.4.2 Erprobung von MAL als Rezeptor für Etx

Wie in Kapitel 1.4.4 beschrieben wurde, sind für Etx bisher nur wenige Daten zur Rezeptorbindung verfügbar. Gegenstand dieser Arbeit war, eine mögliche direkte Interaktion zwischen dem Proteolipid MAL und Etx zu untersuchen und den potenziellen Rezeptor als Fängerstruktur für Detektionssysteme zu evaluieren.

Ähnlich wie bei Claudin-4 handelt es sich bei MAL um ein Membranprotein mit vier Transmembranspannen [176]. Da Claudin-4 in Abwesenheit einer Lipidumgebung hochaffin an CPE bindet (Kapitel 3.3.1), wurde dieser Ansatz auch für MAL erprobt. Hier war keinerlei Interaktion mit Etx nachweisbar, sodass die Präsentation von MAL zusammen mit geeigneten Lipiden notwendig schien. Zu diesem Zweck wurden verschiedenste Methoden getestet (Abbildung 38, Ansätze 1-4). In ersten Versuchen wurden MSP-basierte Nanodisks (Kapitel 2.5.1) mit in Lösung befindlichem MAL hergestellt (Ansatz 1). Aufgrund der ausgeprägten Lipophilie von MAL konnte dieses nur als niedrig konzentrierte Lösung bereitgestellt werden. Infolgedessen war die Assemblierung der Nanodisks nur mit großem Überschuss des Gürtelproteins MSP möglich. Unter diesen Bedingungen entstanden etwa 25-mal mehr leere Nanodisks als die gewünschten MAL-Nanodisks (für Chromatogramm der Gelfiltration siehe Anhang, Abbildung 67). Um dieses Verhältnis besser einstellen zu können, wurde MAL über seinen GST-Tag an einer Glutathion-Matrix immobilisiert und die Assemblierung der Nanodisks nicht in Lösung, sondern an der Matrix vorgenommen (Ansatz 2). Das Freisetzen der Nanodisks in Lösung wurde sowohl über Elution mit reduziertem Glutathion (Ansatz 2a), als

auch unter Entfernung des GST-Tags via Thrombinverdau (Ansatz 2b) getestet. Den zuvor beschriebenen Ansätzen war gemeinsam, dass bei der Untersuchung in der Größenausschlusschromatographie ein hoher Anteil von früh eluierenden hochmolekularen Bestandteilen beobachtet wurde (siehe Anhang, Abbildung 67 für Ansatz 1, Abbildung 68 für Ansatz 2a, Abbildung 69 für Ansatz 2b). Wenn MAL erfolgreich in Nanodisks integriert vorliegt, sind dagegen Elutionsvolumina ähnlich zu leeren Nanodisks zu erwarten. Um den Gehalt an MAL in den gesammelten Fraktionen zu ermitteln, wurden diese auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit einem MAL-spezifischen Antikörper detektiert. MAL ließ sich ausnahmslos in den früh eluierenden Fraktionen nachweisen. Auch das Variieren der Lipidumgebung blieb ohne Erfolg. Unter der Annahme, dass der GST-Tag (26 kDa) die Insertion des verhältnismäßig kleinen MAL (17 kDa) sterisch verhindert, wurde die enzymatische Spaltung vor Assemblierung erprobt (Ansatz 3). Nach erfolgreicher Abspaltung des GST-Tags (Kontrolle der Spaltung per SDS-PAGE und Western Blot siehe Anhang, Abbildung 70) wurde die Extraktion von MAL mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch vorgenommen (Kapitel 2.4.3). Obwohl es sich um ein Proteolipid handelt, war MAL in der organischen Phase wider Erwarten nicht nachweisbar. Die geplante Methode war somit nicht umsetzbar. Zusammenfassend gelang die Insertion von MAL trotz umfassender Versuche in MSP-basierte Nanodisks nicht, sodass die Bindung an Etx nicht untersucht werden konnte (Tabelle 43).

Die Durchführung der zuvor beschriebenen Versuche erfolgte mit rekombinant hergestelltem MAL murinen Ursprungs. Bei der Isolierung des Transmembranproteins aus der Zellwand des exprimierenden Bakteriums kamen Detergenzien zum Einsatz. Diese können eine vom nativen Zustand abweichende Konformation des Proteins verursachen. Um MAL ohne Detergenzien zu isolieren, wurde die Herstellung von *SMA Lipid Particles* (SMALPs) aus Etx-sensitiven, caninen MDCK-Zellen erwogen (Kapitel 2.5.3). Die Zugabe des oberflächenaktiven Co-Polymers bestehend aus Styrol und Maleinsäureanhydrid (SMA) führte zur Lyse der MDCK-Zellen und nachfolgend zur Bildung von Lipidpartikeln. So hergestellte SMALPs können sämtliche Proteine aus Zytoplasma, Zellmembran und Zellkern enthalten. Diese komplexe Mischung wurde via Größenausschlusschromatographie untersucht und die gesammelten Fraktionen im ELISA auf ihre Bindung an Etx sowie als Kontrolle an CPE hin getestet (siehe Anhang, Abbildung 71). Nur für CPE, nicht aber für Etx konnte in geringem Maß eine Bindung an die immobilisierten SMALPs nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von MAL in den SMALPs konnte aufgrund fehlender spezifischer Antikörper gegen canines MAL nicht untersucht werden. Demnach lässt sich keine abschließende Beurteilung zum Ausbleiben der Bindung von Etx an SMALPs aus MDCK-Zellen abgeben.

Tabelle 43: Zusammenfassung der zur Präsentation von MAL erprobten Lipidumgebungen.

Nr.	Versuchsparameter				Insertion*	Bindung
	Format	MAL	Tags	Lipidumgebung		
1	Nanodisks	rek. (murin), frei	GST, S, H8	POPC	nein	n.n.
2 a	Nanodisks	rek. (murin), immobilisiert	GST, S, H8	POPC/ POPC; SM; Ch	nein	n.n.
2 b	Nanodisks	rek. (murin), immobilisiert	S, H8	POPC	nein	n.n.
3	Nanodisks	rek. (murin), immobilisiert	S, H8	POPC	nein	n.n.
4	SMALPs	nativ (canin)	keine	komplex	n.n.	n.n.

Ch = Cholesterol; n.n. = nicht nachweisbar; rek. = rekombinant; SM = Sphingomyelin

*bezieht sich auf SEC-Fraktionen, die bei einem der Größe von 13 nm entsprechenden Volumen eluiert wurden

Zusammenfassend war eine weiterführende Charakterisierung der Rezeptorbindung von Etx mit den beschriebenen Methoden nicht möglich. Eine Bindung von Etx konnte weder an rekombinant hergestelltes, murines MAL noch an natives, canines MAL gezeigt werden, da die Präsentation in einer geeigneten Lipidumgebung nicht realisierbar war.

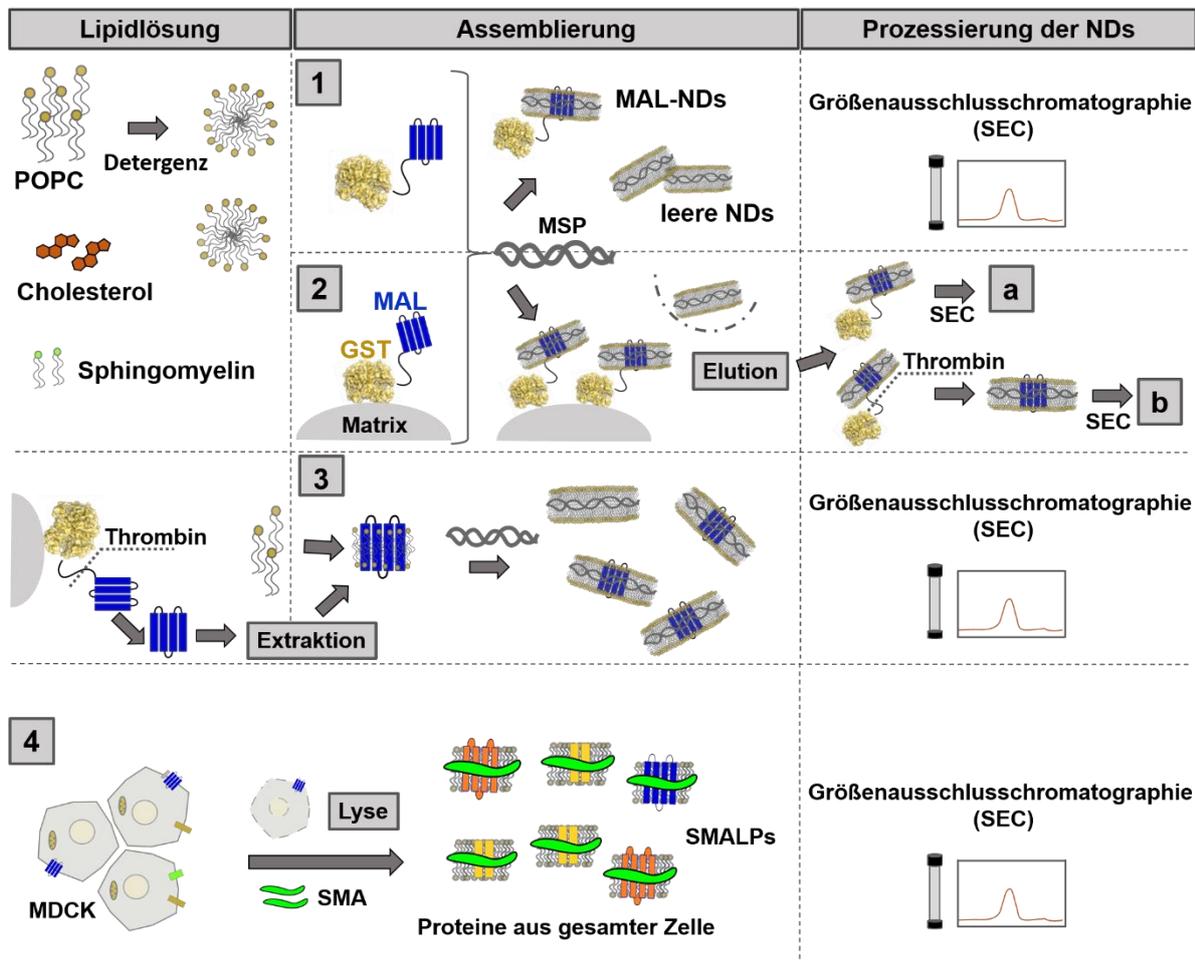


Abbildung 38: Präsentation von MAL in Lipidumgebung.

1-3. Herstellung von MSP-basierten Nanodisks. Für die Herstellung von Nanodisks nach Ansatz **(1)** wurde ungekoppeltes, rekombinantes MAL (mit GST-Tag) verwendet. Nach dem Eintrocknen von Lipiden und der Rekonstitution mit dem Detergenz Natriumdesoxycholat erfolgte die Inkubation mit MSP1E3D1 und MAL. Durch Zugabe von Bio-Beads wurde das Detergenz entfernt und die Assemblierung zu Nanodisks eingeleitet. Hierbei entstanden neben MAL-Nanodisks auch leere Nanodisks des gleichen Durchmessers, die bei der anschließenden Reinigung durch Größenausschlusschromatographie (SEC) nicht abgetrennt werden. Für Ansatz **(2)** erfolgte die in 1 beschriebene Assemblierung mit MAL, welches an eine Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert war. Assemblierte MAL-Nanodisks blieben über den GST-Tag an der Glutathion-Matrix gebunden. Erst durch Elution mit reduziertem Glutathion **(2a)** bzw. Abspaltung durch Thrombin **(2b)** wurden diese freigesetzt. Bei Methode **(3)** wurde an die Matrix immobilisiertes MAL zunächst durch enzymatische Abspaltung des GST-Tags eluiert. Es folgte die Extraktion des freigesetzten MAL mit organischen Lösungsmitteln. Als Proteolipid sollte es zusammen mit Phospholipiden in eine Mizellare Lösung überführt und für die Assemblierung zu Nanodisks mit MSP inkubiert werden. **4. Herstellung von SMALPs aus MDCK-Zellen.** Nach Kultivierung von MDCK-Zellen wurden diese durch Trypsinierung von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst. Die Zugabe des oberflächenaktiven Polymeres SMA führte zur Lyse der Zellen. Es bildeten sich durch SMA gestützte Nanopartikel (SMALPs), in die Lipide und Proteine der gesamten Zellen inkorporiert wurden. Nach Ultrazentrifugation erfolgte auch bei diesem Ansatz eine Reinigung durch Größenausschlusschromatographie.

3.4.3 Generierung von Etx-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Nachdem die Bindung von Etx an MAL nicht für den Toxinnachweis funktionalisierbar war, fokussierten sich die weiteren Arbeiten auf die Generierung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von Etx. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit einer rekombinanten Etx-Variante (Punktmutation Y84A; reduzierte Toxizität [218]) im Abstand von vier Wochen immunisiert (Immunisierungsschema siehe Anhang, Tabelle 56). Die immunisierten Tiere blieben nach intraperitonealer Injektion (Kapitel 2.3.1) von 20 µg der Etx-Variante symptomfrei. Nach der zweiten Immunisierung wiesen drei der vier behandelten Mäuse einen hohen Etx-spezifischen Titer auf (siehe Anhang, Abbildung 72). Es schloss sich die Durchführung einer Hybridomfusion (Kapitel 2.3.2 bis 2.3.5) mit Maus 15 an. Aus dieser Fusion gingen 960 Hybridomklone hervor, deren Selektion anhand ELISA- und SPR-basierter Methoden erfolgte. Im indirekten ELISA (Kapitel 2.6.1) wurden Hybridomüberstände mit spezifischer Bindung an immobilisiertes Etx identifiziert (Abbildung 39 A). Parallel wurde die Reaktivität gegenüber immobilisiertem CPE als Kontrolle untersucht: Da CPE wie Etx aus dem bakteriellen Expressionssystem *E. coli* stammte und die gleichen durch Thrombinverdau abgespaltenen Tags besaß, ließen sich so unspezifisch reagierende Klone erkennen. Hybridomüberstände, die eine Bindung an CPE aufwiesen (Absorption > 0,2), waren für spätere Anwendungen ungeeignet. Spezifische Klone zeichneten sich dagegen durch eine gute Bindung an Etx (Absorption > 1,4) und fehlende Kreuzreaktivität gegenüber CPE aus (Abbildung 39 B). Insgesamt führte das ELISA-Screening unter Anwendung der genannten Ausschlussgrenzen zur Selektion von 24 Etx-spezifischen Hybridomen.

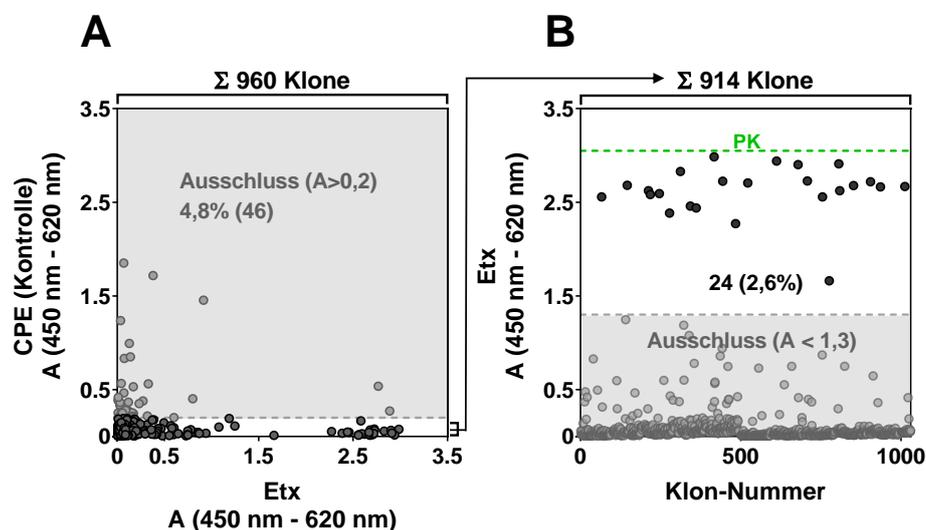


Abbildung 39: ELISA-Screening auf Etx-spezifische Antikörper.

Im indirekten ELISA wurden Hybridome mit spezifischer Reaktivität gegen Etx selektiert. Nach Immobilisierung von je 500 ng/ml der Antigene und Blockade unspezifischer Bindungen folgte die Inkubation mit Hybridomüberständen. Anti-Maus-POD und TMB dienen zur Entwicklung. **A.** Reaktivität der Hybridomüberstände gegenüber Etx und CPE. **B.** Signalintensitäten Etx-spezifischer Überstände im Vergleich zur Positivkontrolle (Mausserum). Aufgetragen sind die gemessenen Absorptionen. Grau markierte Bereiche/Punkte geben ausgeschlossene Klone an.

Um die Hybridomüberstände mit den besten Bindungseigenschaften gegenüber Etx zu identifizieren, erfolgte die Bestimmung der Bindungskinetiken (Abbildung 40 A) der im Überstand dieser 24 ausgewählten Klone enthaltenen Antikörper durch SPR-Messungen (Kapitel 2.7.3). Nahezu alle untersuchten Antikörper erzielten Affinitäten im subnanomolaren Bereich und wiesen somit exzellente Bindungseigenschaften auf. Die selektierten Hybridome wurden in einem Epitopbinning untersucht (Kapitel 2.7.4), mit dem Ziel, kombinierbare Antikörper mit unterschiedlicher Epitoperkennung zu identifizieren (Abbildung 40 B). Insgesamt konnten sieben Antikörper gegen sechs distinkte Epitope identifiziert werden. Die finale Auswahl von sieben Klonen (Etx146, Etx212, Etx343, Etx444, Etx484, Etx755 und Etx907) beruhte auf ihrem stabilen Wachstum und den festgestellten optimalen Bindungseigenschaften der Antikörper in SPR-Messungen und ELISA.

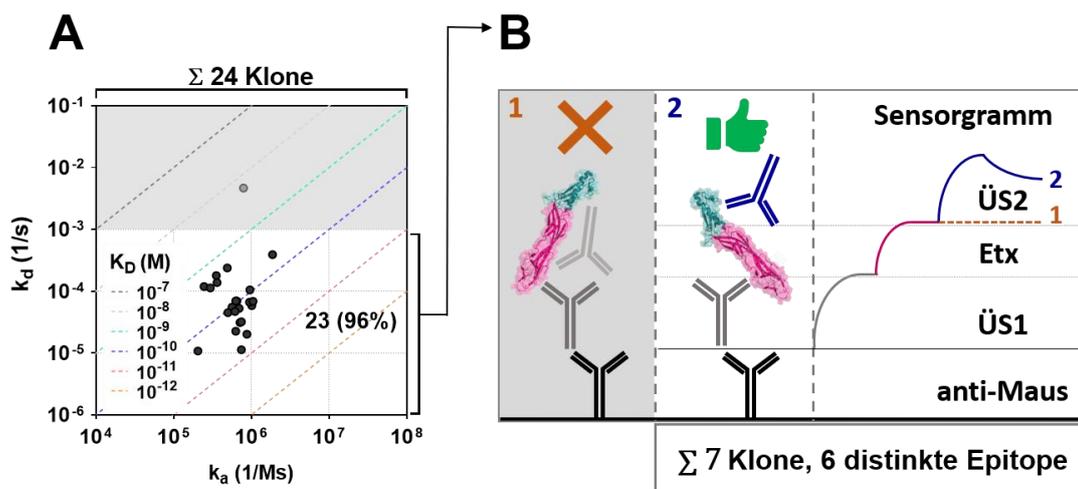


Abbildung 40: SPR-Screening Etx-spezifischer Antikörper.

A. SPR-Kinetik: Antikörper aus Hybridomüberständen wurden über anti-Maus-Antikörper (Mouse Capture Kit) auf einem CM5-Chip immobilisiert. Es folgte die Injektion (120 s; 30 μ l/min) von Etx (1 und 10 μ g/ml) und eine Pufferinjektion zur Einleitung der Dissoziation (300 s). Aufgetragen sind die aus den Kurvenverläufen ermittelten Bindungskonstanten (k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante) bei Modellierung einer 1:1 Bindung. **B.** SPR-Binning: Immobilisierung von Hybridomüberstand 1 (ÜS1) erfolgte wie in A. Nach anschließender Injektion von Etx (2 μ g/ml; 120 s; 30 μ l/min) wurde Überstand 2 (ÜS2) injiziert. In (1) erkennen die Antikörper aus ÜS1 und ÜS2 das gleiche Epitop, in (2) sind die Epitope distinkt. Rechts sind exemplarische Kurvenverläufe der Messung für (1) und (2) gezeigt.

3.4.4 Charakterisierung der generierten monoklonalen Antikörper

In Analogie zu Kapitel 3.3.4 wurden die ausgewählten Hybridome zweimal subkloniert, anschließend expandiert und durch Affinitätschromatographie an einer Protein A-Säule gereinigte monoklonale Antikörper gewonnen (Kapitel 2.3.6, 2.3.8). Insgesamt standen damit nach Abschluss der beschriebenen Fusion sieben Antikörper zum Nachweis von Etx zur Verfügung, deren umfangreiche Charakterisierung folgte.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wiesen alle neu generierten Antikörper eine spezifische Erkennung von Etx im Western Blot auf (Kapitel 2.6.4) und zeigten keine Kreuzreaktivität gegenüber CPE (siehe Anhang, Abbildung 73). Neben der Spezifität des Nachweises werden hohe Anforderungen an die Nachweisempfindlichkeit von Etx-spezifischen Tests gestellt, da Etx in kleinsten Mengen toxisch wirkt. Einen guten Anhaltspunkt, ob sich die monoklonalen Antikörper in sensitive Sandwich-ELISA integrieren

lassen, liefert die Affinität der Antikörper, die mit Hilfe von SPR-Messungen ermittelt wurden (für die Bindungskurven siehe Anhang, Abbildung 74). Die final bestimmten kinetischen Parameter der gereinigten monoklonalen Antikörper finden sich in Tabelle 44. Alle Antikörper wiesen ähnlich hohe Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich auf. Die Spanne zwischen dem Antikörper mit der schlechtesten (Etx755 mit $K_D = 6,8$ nM) und dem mit der besten Affinität (Etx905 mit $K_D = 0,22$ nM) war dabei sehr gering.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob diese hochaffinen monoklonalen Antikörper distinkte Epitope erkennen und somit in Sandwich-ELISA-Kombinationen einsetzbar sind, wurde ein Epitopbinning durchgeführt (Kapitel 2.7.4). Die Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der gezeigten Heatmap (Abbildung 41) und den gemessenen Kurvenverläufen (siehe Anhang, Abbildung 75).

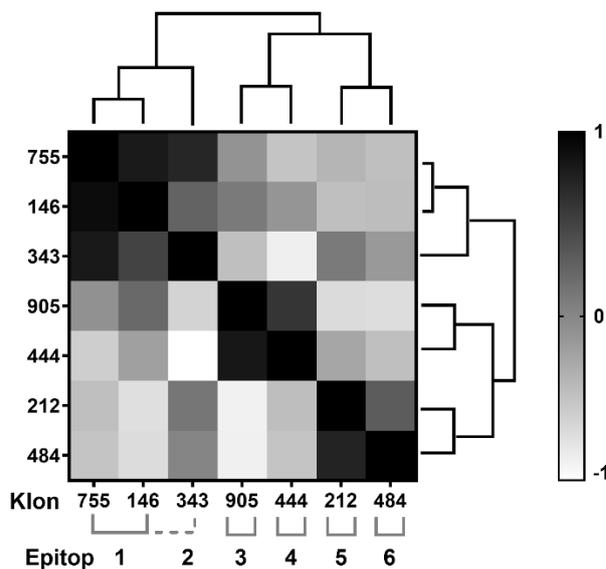


Abbildung 41: Epitopbinning der gereinigten monoklonalen Antikörper gegen Etx.

Die prinzipielle Durchführung eines Epitopbinnings ist in Kapitel 2.7.4 beschrieben. Die monoklonalen Antikörper wurden jeweils in Konzentrationen von 10 µg/ml eingesetzt. Als Antigen diente Etx in einer Konzentration von 2 µg/ml. Die dargestellte Heatmap stellt die rechnerische Auswertung des Versuches dar. Die Bewertung der Epitoperkennung erfolgte auf einer Skala von -1 (weiß, unterschiedliches Bindungsverhalten) bis +1 (schwarz, identisches Bindungsverhalten).

Dunkle Bereiche in Abbildung 41 kennzeichnen Kombinationen von Antikörpern mit ähnlicher bzw. gleicher Epitoperkennung. Helle Felder symbolisieren dagegen distinkte Epitope. Daraus war abzuleiten, dass Etx755 und Etx146 das gleiche Epitop 1 erkennen. Etx343 bindet an ein Epitop 2, das sich mit Epitop 1 teilweise überschneidet. Laut Heatmap müssten sich Etx905 und Etx444 in ihrer Bindung an Etx blockieren. Die Beurteilung der Bindungskurven ließ aber auf distinkte möglicherweise überlappende Epitope schließen, sodass Etx905 Epitop 3 und Etx444 Epitop 4 zugeordnet wurde. Die gleiche Diskrepanz zwischen Heatmap und Bindungskurven trifft auf die Antikörper Etx212 und Etx484 zu. Sie erkennen die Epitope 5 (Etx212) bzw. 6 (Etx484). Die sechs ermittelten Epitope können somit in drei Übergruppen eingeteilt werden, die deutlich abgrenzbare Epitopgruppen darstellen (1: Etx755, Etx146, Etx343; 2: Etx905, Etx444 und 3: Etx212, Etx484).

Tabelle 44 gibt eine Übersicht zu den neu generierten Etx-spezifischen Antikörpern geordnet nach den zuvor beschriebenen Epitopen.

Tabelle 44: Eigenschaften der Etx-spezifischen monoklonalen Antikörper.

Epitop	Name	Spezifität	Isotyp	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
1	Etx755	Etx	IgG1	$3,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{-3}$	$6,8 \times 10^{-9}$
	Etx146	Etx	IgG1	$1,6 \times 10^5$	$5,9 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-10}$
2	Etx343	Etx	IgG1	$2,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-9}$
3	Etx905	Etx	IgG1	$3,9 \times 10^5$	$7,8 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-10}$
4	Etx444	Etx	IgG1	$4,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-10}$
5	Etx212	Etx	IgG1	$1,3 \times 10^5$	$5,2 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-10}$
6	Etx484	Etx	IgG1	$1,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-10}$

k_a = Assoziationskonstante; k_d = Dissoziationskonstante; K_D = Affinitätskonstante

3.4.5 Antikörper-basierter Nachweis von Etx im Sandwich-ELISA

Nachdem die Eignung der generierten monoklonalen Antikörper für einen spezifischen Etx-Nachweis durch eine umfangreiche Charakterisierung untersucht worden war, wurden die Antikörper im Format eines Sandwich-ELISA getestet (Kapitel 2.6.2). Für den Einsatz als Detektor wurden alle Antikörper mit Biotin markiert (Kapitel 2.3.10). Nach Immobilisierung eines Fängerantikörpers und der Inkubation mit einer seriellen Antigenverdünnungsreihe war der Nachweis von Etx mit den biotinylierten Detektionsantikörpern möglich. Tabelle 45 gibt eine Übersicht zu den halbmaximalen Effektorkonzentrationen (EC_{50}) der einzelnen Antikörper-Kombinationen. Die EC_{50} stellt dabei ein Maß für die Sensitivität des Etx-Nachweises dar.

Tabelle 45: Sensitivitäten der Etx-spezifischen mAk im Sandwich-ELISA.

Detektor Fänger	Etx755	Etx146	Etx343	Etx905	Etx444	Etx212	Etx484
Etx755	-	-	-	++	++	++	++
Etx146	-	-	++	+++	+++	+++	+++
Etx343	-	++	-	+++	+++	+++	++
Etx905	++	++	++	-	++	+++	++
Etx444	++	++	+++	+	-	+++	+++
Etx212	++	++	++	+++	+++	-	++
Etx484	++	++	++	+++	+++	+++	-

Einstufung der Sensitivität anhand der halbmaximalen Effektorkonzentration (EC_{50}):
 “-“ = $EC_{50} > 10$ ng/ml; “+“ = $1,0 < EC_{50} \leq 10$ ng/ml; “++“ = $0,1 < EC_{50} \leq 1,0$ ng/ml; “+++“ = $EC_{50} < 0,1$ ng/ml

Die im Epitopbinning vorgenommene Zuordnung der Antikörper zu distinkten Epitopen bzw. Epitopgruppen bestätigte sich überwiegend im Sandwich-ELISA. Die Zugehörigkeit von Etx755 und Etx146 zu einem identischen Epitop 1 sowie dessen Überschneidung mit Epitop 2 (Etx343) war auch im ELISA ersichtlich. Anders als nach den Ergebnissen des Epitopbinning zu erwarten war (Abbildung 41), ermöglichten Etx146 und Etx343 kombiniert einen sensitiven Nachweis für Etx. Die angemerkte ähnliche Epitoperkennung von Etx905 und Etx444 durch SPR-Messungen war im Einklang mit den verhältnismäßig geringen Sensitivitäten im Plattenformat. Nach den ELISA-Daten zu urteilen erkannten Etx212 und Etx484

distinkte Epitope. Eine Überschneidung der zugehörigen Epitope 5 und 6 ist anhand der sehr niedrigen halbmaximalen Effektorkonzentrationen nicht anzunehmen.

Insgesamt gelang mit dem vorhandenen Panel an Etx-spezifischen Antikörpern ein sehr sensitiver Nachweis, der für 16 Kombinationen unterhalb einer halbmaximalen Effektorkonzentration von 0,1 ng/ml lag. Abbildung 42 zeigt den im Sandwich-ELISA ermittelten Kurvenverlauf der sensitivsten Antikörperkombination bestehend aus Etx444 als Fänger und biotinyliertem Etx484 als Detektor. Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte anhand der modellierten Messkurve.

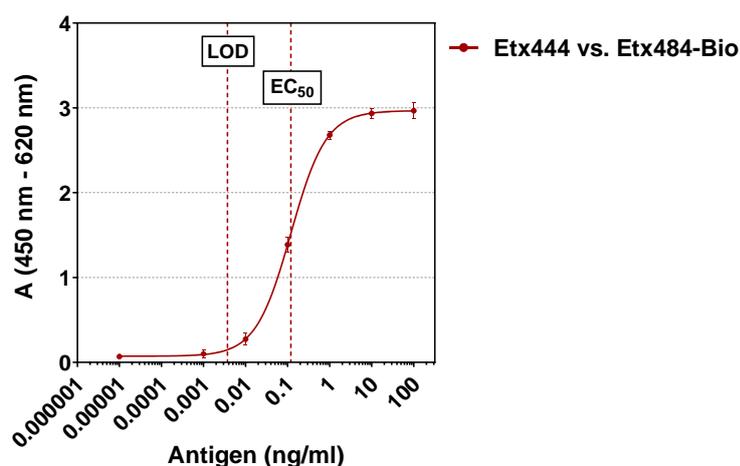


Abbildung 42: Nachweis von Etx im Sandwich-ELISA.

Nach der Immobilisierung von Etx444 (10 µg/ml) wurden unspezifische Bindungen blockiert. Es folgte die Inkubation mit einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) von Etx. Die Detektion wurde mit biotinyliertem Etx484 (1 µg/ml) vorgenommen. Durch Zugabe von SA-Poly-HRP und TMB wurde entwickelt. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf Wiederholungen (n=5). Gestrichelte Linien geben die Nachweisgrenze (LOD) und halbmaximale Effektorkonzentration an (EC₅₀).

Das Detektionslimit der gezeigten Antikörperkombination lag mit 4 pg/ml äußerst niedrig, sodass mit diesem Sandwich-ELISA kleinste Mengen des hochtoxischen Etx nachweisbar waren.

3.4.6 Nachweis von nativem Etx aus Bakterienüberständen

Für die bisherigen Untersuchungen diente rekombinant hergestelltes Etx als Antigen. Die DNA zur Klonierung des Toxins ging dabei auf den *C. perfringens*-Stamm 572c zurück. Um sicherzustellen, dass der etablierte Sandwich-ELISA aus Etx444 und biotinyliertem Etx484 den Nachweis des nativen Toxins ermöglicht, wurden die in 3.3.6 beschriebenen Bakterienüberstände der 65 *C. perfringens*-Stämme auf die Anwesenheit von Etx hin untersucht (Tabelle 46). Das Vorliegen des Toxingens wurde mittels PCR überprüft (externe Daten von der jeweiligen angegebenen Quelle).

Die im ELISA ermittelten Ergebnisse stimmten ausnahmslos mit den erhobenen PCR-Daten überein. Mit der gewählten Antikörperkombination gelang der spezifische Nachweis des nativen Etx aus einer Bandbreite von *C. perfringens*-Stämmen verschiedensten Ursprungs.

Tabelle 46: Nachweis von Etx aus Bakterienüberständen verschiedener *C. perfringens*-Stämme.

Stammbezeichnung	Quelle	ELISA*	PCR	Konsens ELISA ⇔ PCR
61a	MHH (Ursprung rek. CPE)	-	neg.	✓
572c	MHH (Ursprung rek. Etx)	+++	pos.	✓
11-13136	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
21638/07-L574	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
HF 2109	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
HF 2110-2	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
11-44702	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
10-70639	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
3570/08	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
SO2253/1	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
11-30379-03	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
KV3 29.05	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
12-45390	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
12-45681	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
SO 21002	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
11-2294	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
BWA 204	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
PP 42138-15	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
12-102988	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
SO 221	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
15-0273682	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
11-4999/1	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
11-18210	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
S 726	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
E 728	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
L 443/05	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
21439/07 - G 1144	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
6466/08	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
10-0058087-1	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
6682/1	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
10-0029262-001-01 L93	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
10-70711/4	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
11-162672	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
12-45390	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
12-105747 L362	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
P V4 8.7.	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
A202	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
14-130465	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
17-52183-001	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
17-52386-001	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
12-73336_G737/1	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
E730	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
PS8150/07	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
9166/67-G407	Ute Messelhäußer, BY	+++	pos.	✓
175-8/97	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
MB30 o.H.	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
11 1331	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
E732	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
12-134928_L457	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
PS10950/07	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
F436	Ute Messelhäußer, BY	-	neg.	✓
19-041-01	Dagmar Rimek, TH	+++	pos.	✓
19-042-01	Dagmar Rimek, TH	+++	pos.	✓

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 46

Stammbezeichnung	Quelle	ELISA*	PCR	Konsens ELISA \Leftrightarrow PCR
19-043-01	Dagmar Rimek, TH	+++	pos.	✓
NCTC 8239-01	PHE Culture Collections, UK	-	neg.	✓
NCTC 8798-01	PHE Culture Collections, UK	-	neg.	✓
NCTC8346	PHE Culture Collections, UK	+++	pos.	✓
NCTC13110	PHE Culture Collections, UK	+++	pos.	✓
NCTC3110	PHE Culture Collections, UK	+++	pos.	✓
NCTC6121	PHE Culture Collections, UK	+++	pos.	✓
NCTC8084	PHE Culture Collections, UK	-	neg.	✓
NCTC8238	PHE Culture Collections, UK	-	neg.	✓
NCTC8504	PHE Culture Collections, UK	+++	pos.	✓
NCTC8533	PHE Culture Collections, UK	+++	pos.	✓
NCTC9851	PHE Culture Collections, UK	-	neg.	✓

BY = Bayern; mAk = monoklonaler Antikörper; neg. = negativ; pos. = positiv; rek. = rekombinant; TH = Thüringen

*unter Verwendung von Etx444 als Fänger, Detektion mit Etx484-Bio, Beurteilung anhand der Absorptionswerte (A):
 „-“ = $A \leq 0,2$; „+“ = $0,2 < A \leq 1,0$; „++“ = $1,0 < A \leq 2,0$; „+++“ = $A > 2,0$

3.4.7 Vor-Ort-Nachweis von Etx

Die vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass mit den monoklonalen Antikörpern Etx444 und Etx484-Bio ein sensitiver Sandwich-ELISA aufgebaut werden konnte. Ziel der Arbeit war es, den im Plattenformat etablierten Nachweis für eine schnelle Vor-Ort-Detektion in die pBDi-Plattform zu übertragen. Die Immobilisierung auf den Goldelektroden der Biochips kann bei einigen Fängerantikörpern zu einem Sensitivitätsverlust führen. Daher wurde sowohl Etx444 als auch Etx484 auf die Biochips gespottet und die Detektion mittels Etx484-Bio bzw. Etx444-Bio im pBDi durchgeführt (Abbildung 43, für das Biochip-Layout siehe Anhang, Abbildung 76).

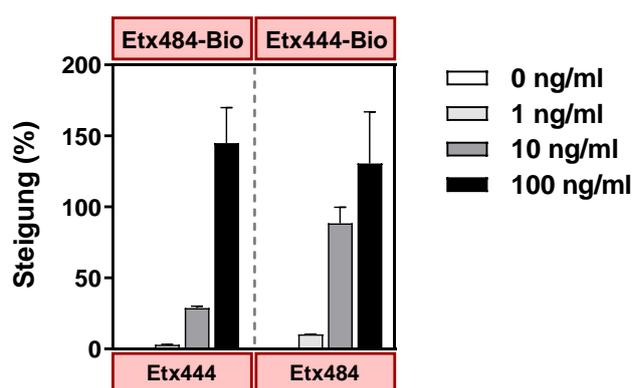


Abbildung 43: Nachweis von Etx im pBDi.

Etx444 bzw. Etx484 (je 500 $\mu\text{g/ml}$) wurden auf Biochips immobilisiert (Chiplayout siehe Anhang, Abbildung 76). Die Messung der Biochips im pBDi erfolgte durch Inkubation mit rek. Etx (1 ng/ml bis 100 ng/ml) in Assaypuffer und anschließender Detektion mit Etx484-Bio bzw. Etx444-Bio (10 $\mu\text{g/ml}$). Es wurde mit SA- β -Galaktosidase und 4-Aminophenyl- β -D-Galaktopyranosid entwickelt und das elektrochemische Signal ausgelesen. Pro Konzentration wurde ein Biochip gemessen, aufgetragen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der gemessenen Doppelspots.

Unabhängig von der Orientierung der Antikörperkombination war ein sensitiver Nachweis im pBDi mit Nachweisgrenzen von etwa 1 ng/ml Etx realisierbar (Tabelle 47). Die Messung niedriger Etx-Konzentrationen führte bei Immobilisierung von Etx484 und Detektion mit Etx444-Bio zu höheren Signalintensitäten. Trotz gleicher rechnerischer Nachweisgrenzen sollte der Assay deshalb in der aufgeführten Orientierung eingesetzt werden. Verglichen mit dem äußerst sensitiven Nachweis im

Plattenformat ergab die Vor-Ort-Detektion einen Sensitivitätsverlust um etwa Faktor 25. Der Etx-Nachweis wurde erfolgreich in ein Nachweissystem transferiert, mit dem innerhalb kürzester Zeit Etx-haltige Proben analysiert werden können.

Tabelle 47: Nachweisgrenzen für die Detektion von Etx im pBDi.

Antigen	Fänger	Detektor	LOD (ng/ml)	Schwellenwert (%)
Etx	Etx444	Etx484-Bio	1	0,4
	Etx484	Etx444-Bio	1	0,6

LOD = Detektionslimit

Zusammenfassend gelang es für alle adressierten Toxine hochsensitive Sandwich-ELISA auf der Basis von toxinspezifischen monoklonalen Antikörpern zu etablieren. Diese Antikörper-basierten Nachweise ließen sich ausnahmslos in die Detektionsplattform pBDi implementieren. Die Funktionalisierung der Rezeptorbindung gelang für CPE mit Hilfe seines Rezeptors Claudin-4 sowohl in Platten-basierten ELISA als auch im pBDi. Asialofetuin als hochaffiner Rezeptor von Rizin und Abrin eignete sich prinzipiell für einen Nachweis der Toxine im ELLA und im pBDi, wobei ein sensitiverer Nachweis von Abrin mit monoklonalen Antikörpern zu realisieren war. Auch wenn eine Übertragung des Shigatoxin-Nachweises mit Gb3/GalCer-Nanodisks als Fänger im pBDi nicht umsetzbar war, konnte dieser endogene Rezeptor erfolgreich für einen breitbandigen Nachweis der Shigatoxine in Form eines stationären ELISA funktionalisiert werden.

4 Diskussion

Szenarien wie die geplante Ausbringung von Rizin im Sommer 2018 in Köln machten deutlich, dass die Vorbereitung auf zukünftige bioterroristische Gefahrenlagen von hoher Bedeutung ist. Im Fokus von Ausbringungsversuchen stehen nach Erkenntnissen aus offenen Quellen die leicht zugänglichen Pflanzentoxine Rizin und Abrin. Orale Intoxikationen mit diesen biologischen Toxinen verursachen eine unspezifische Symptomatik in Form blutiger Diarrhöen. Differentialdiagnostisch relevant sind aufgrund einer ähnlichen klinischen Manifestation eine Reihe von behandlungsbedürftigen, gastrointestinalen Infektionen mit bakteriellen Erregern und den von ihnen produzierten Proteotoxinen. Dazu gehören enterohämorrhagische *E. coli* und *C. perfringens*, die Shigatoxine (Stx1 und Stx2) respektive CPE und Etx bilden. Die genannten Bakterien bzw. die zugehörigen Toxine sind sowohl innerhalb natürlicher Krankheitsausbrüche (z.B. EHEC, 2011 [219]) als auch unter bioterroristischen Aspekten von Relevanz (Stx1 und Stx2, Etx [220]). Die Abgrenzung von intentionalen und natürlichen Krankheitsgeschehen erfordert das schnelle Erkennen einer bioterroristischen Lage, möglichst bereits durch Einsatzkräfte vor Ort. Bisher fehlten entsprechende Vor-Ort-Detektionssysteme, mit denen ein zuverlässiger Nachweis der genannten Toxine mit geringem zeitlichem und apparativem Aufwand realisierbar ist. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, einerseits Reagenzien und innovative Nachweissysteme für den stationären Labornachweis und andererseits für die Vor-Ort-Detektion zu etablieren.

Der Nachweis von biologischen Toxinen ist vor allem aufgrund ihrer hohen Toxizität und des Auftretens strukturell heterogener Subtypen bzw. Isoformen herausfordernd. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit vergleichend zu dem Nachweis mit klassischen, Antikörper-basierten ELISA die breitbandige Detektion auf der Basis von endogenen Rezeptoren als alternative Fängerstrukturen anstelle von Fängerantikörpern erprobt. Wesentlicher Teil der Untersuchung war der Nachweis, dass die etablierten Detektionssysteme alle nativen Toxinvarianten erfassen können.

Für die Shigatoxine und CPE gelang die Etablierung von äußerst sensitiven Antikörper- und Rezeptor-basierten Nachweisverfahren mit Detektionslimits im pg/ml-Bereich. Aufgrund fehlender bzw. niedrigaffiner Rezeptorinteraktion wurde für die Detektion von Etx, Rizin und Abrin auf den hochspezifischen Nachweis mit monoklonalen Antikörpern zurückgegriffen. Alle Toxineinzelnachweise wurden in die Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi implementiert, sodass mit Abschluss dieser Arbeit erstmals eine Differentialdiagnostik zu Rizinintoxikationen in Form einer leicht durchführbaren Schnelldetektion bereitsteht.

4.1 Evaluation von mAk und endogenen Rezeptoren für den Nachweis von Proteotoxinen

Für das vorliegende Forschungsanliegen verglichen wir den Einsatz von monoklonalen Antikörpern und endogenen Rezeptoren als Nachweisreagenzien ausgewählter biologischer Toxine in stationären ELISA und der Detektionsplattform pBDi. Ziel war es, die in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen endogenen Rezeptoren als Fängerstrukturen für ELISA-basierte Nachweisverfahren zu funktionalisieren und zu bewerten, wie praktikabel die Etablierung Rezeptor-basierter gegenüber konventionellen Antikörper-basierten Systemen ist.

Zum Aufbau dieser Detektionssysteme mussten zunächst geeignete monoklonale Antikörper und ausreichend affine endogene Rezeptoren identifiziert werden. Toxinspezifische monoklonale Antikörper lagen teilweise vor (eigene Arbeitsgruppe: Rizin [98], Abrin [115], kommerziell/Kooperationspartner: Shigatoxine [189-194]) oder mussten im Rahmen dieser Arbeit neu generiert und charakterisiert werden (CPE, Etx). Die Proteorezeptoren Claudin-4 und MAL stellten uns Kooperationspartner von der Medizinischen Hochschule Hannover (Andreas Rummel) bereit, die Expertise in der Expression von rekombinanten Proteinen besitzen. Das Glykoprotein Asialofetuin und die Glykosphingolipide Gb3, Gb4 und Asialo-GM1 waren kommerziell erhältlich. Die Beurteilung der Bindungseigenschaften dieser endogenen Rezeptoren erfolgte mit SPR-basierten Verfahren, teilweise unter Verwendung der Nanodisk-Technologie [180].

4.1.1 Der Herstellungsprozess von mAks führt zu maßgeschneiderten Nachweisreagenzien

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern stellt die Hybridomtechnologie eine etablierte Methode dar [131]. Generell ist die Generierung von monoklonalen Antikörpern ein zeitlich als auch apparativ aufwändiger Prozess, dessen Durchführung von den ersten Immunisierungen bis zum fertigen gereinigten Antikörper mehrere Monate in Anspruch nimmt. Da für die *C. perfringens*-Toxine CPE und Etx keine monoklonalen und nur wenige polyklonale Antikörper von ungenügender Qualität kommerziell verfügbar waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen beide Toxine generiert. Die durchgeführten Hybridomfusionen verdeutlichten, dass die erfolgreiche und effiziente Generierung geeigneter, monoklonaler Antikörper maßgeblich von den verwendeten Immunisierungs- und Screenigstrategien abhängen.

Die Immunisierungen wurden nach zwei Strategien durchgeführt. Zum einen dienten die isolierten Domänen von CPE als Immunogene (3.3.3.1), zum anderen kamen sowohl rekombinante CPE- als auch Etx-Varianten mit Punktmutationen (CPE D48A; PEtx Y84A) zum Einsatz (3.3.3.2, 3.4.3). Obwohl die Immunisierung mit der Rezeptorbindungsdomäne und der zytotoxischen Domäne von CPE zu spezifischen, hohen Titern führte (Abbildung 59), waren die sich anschließenden Hybridomfusionen von mäßigem

Erfolg. Grund dafür waren die geringe Immunogenität der Rezeptorbindungsdomäne (Identifizierung von zwei distinkten Epitopen, Abbildung 30) bzw. die hohe Reaktivität gegenüber den verhältnismäßig großen Affinitätstags der zytotoxischen Domäne (GST: 26 kDa, mCherry: 29 kDa; gegenüber 18 kDa für die Toxindomäne). Darüber hinaus gingen aus der Immunisierung mit der Rezeptorbindungsdomäne monoklonale Antikörper hervor, die ein in der Domäne existierendes Epitop erkannten, welches im Gesamtoxin nicht vorlag (Antikörper gegen Epitop 2, Abbildung 30). Deutlich zielführender waren die Hybridomfusionen, denen eine Immunisierung mit atoxischen rekombinanten Gesamtoxinvarianten zugrunde lag (Kapitel 3.3.3.2, 3.4.3). Diese Immunisierungsstrategie erwies sich schon in vorhergehenden Projekten als erfolgreich [115]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Hybridomfusionen brachten insgesamt ein Panel an acht CPE-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit fünf distinkten Epitopen (Tabelle 37) und sieben Etx-spezifischen monoklonalen Antikörper mit sechs distinkten Epitopen hervor (Tabelle 44). Es gelang, monoklonale Antikörper mit hohen Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich herzustellen, die sich für die Etablierung von Sandwich-Kombinationen eigneten (Tabelle 38 für CPE, Tabelle 45 für Etx). Zusätzlich identifizierten wir CPE-spezifische Antikörper, die als Detektoren in Kombination mit dem endogenen Rezeptor Claudin-4 kombinierbar waren (für EC_{50} -Werte im ELISA, Tabelle 38).

Die erfolgreiche und hocheffiziente Selektion von Antikörpern beruhte auf der Kombination von ELISA- und SPR-basierten Screeningverfahren (Abbildung 31 und Abbildung 32 für CPE, Abbildung 39 und Abbildung 40 für Etx). Dies lässt sich gut am Beispiel der Screeningstrategien zur Auswahl CPE-spezifischer Antikörper veranschaulichen. Klassischerweise erfolgen Screenings auf der Basis von indirekten ELISA, da die Durchführung einen hohen Durchsatz an Hybridomen gewährleistet. Zusätzlich zu einem indirekten ELISA mit immobilisiertem CPE und CPE-Domänen führten wir einen Rezeptor-basierten Assay durch, bei dem der endogene Rezeptor Claudin-4 als Fängerreagenz das Toxin CPE aus Lösung immobilisierte (Abbildung 31). So wurden gleichzeitig Antikörper selektiert, die generell im Format des Sandwich-ELISA und als Detektor in Kombination mit Claudin-4 als Fängerreagenz einsetzbar waren. Das nachfolgende SPR-Screening (Abbildung 32) identifizierte CPE-spezifische Antikörper von höchster Affinität (Kinetik-Assay, Abbildung 32 A) und distinkter Epitoperkennung (Epitopbinning, Abbildung 32 B). Somit trugen die SPR-basierten Methoden entscheidend dazu bei, gezielt Antikörper für die späteren Applikationen (Detektionsantikörper für Claudin-4 als Fänger, Sandwich-ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern) zu selektieren. Das Screening gewann so gegenüber rein ELISA-basierten Strategien an Effizienz. Wnek *et al.* gaben in einer Arbeit aus den 1980er Jahren beispielsweise an, dass acht Hybridomfusionen nötig waren, um mit Hilfe eines indirekten ELISAs sieben CPE-spezifische monoklonale Antikörper mit vier distinkten Epitopen zu identifizieren [221]. Wir konnten hingegen mit der Durchführung einer einzigen Hybridomfusion ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl an Antikörpern und ihrer Epitoperkennung erzielen. Der Screeningprozess könnte noch weiter optimiert werden, indem möglichst früh für den Hochdurchsatz geeignete Epitopbinnings herangezogen werden. Entsprechende SPR-Plattformen mit bis zu 384 simultan durchführbaren Interaktionsanalysen sind mittlerweile etabliert [222]. Dieser Ansatz erhöht die Wahrscheinlichkeit, Antikörper zu generieren, die eine hohe Anzahl an distinkten Epitopen auf dem Antigen abdecken. Anwendung finden solche Hochdurchsatzbinnings z. B. bei

der Entwicklung therapeutischer Antikörper gegen klinisch relevante Epitope mit geringer Abundanz unter den isolierten Klonen [223].

Generell sind die Herstellung und das Screening nach geeigneten monoklonalen Antikörpern mit hohem Aufwand verbunden. Bei selbst generierten monoklonalen Antikörpern ist aber langfristig ein Zugang zu diesen Nachweisreagenzien gesichert. Aus dem Panel an neu generierten und extern bezogenen monoklonalen Antikörpern konnten für alle adressierten Toxine Sandwich-ELISA etabliert (Detektionslimits siehe Tabelle 23 für Rizin und Abrin, Tabelle 31 für die Shigatoxine, Tabelle 39 für CPE, Tabelle 45 für Etx) und erfolgreiche Nachweise in die Detektionsplattform pBDi übertragen werden (Sensitivitäten im pBDi siehe Tabelle 24 für Rizin und Abrin, Tabelle 34 für die Shigatoxine, Tabelle 41 für CPE, Tabelle 47 für Etx). Insgesamt lassen sich mit gut charakterisierten monoklonalen Antikörpern zielgerichtet sensitive und spezifische immunologische Assays aufbauen.

4.1.2 Die Verwendung endogener Rezeptoren erfordert ein individuelles Maß an Anpassung

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass die Herstellung von monoklonalen Antikörpern ein langwieriger Prozess ist, dessen Erfolg maßgeblich von den gewählten Screeningstrategien abhängt. Für die Integration von endogenen Rezeptoren in ELISA-basierte Detektionsverfahren sind ebenfalls eine Reihe von kritischen Parametern für die Entwicklung solcher Systeme in Betracht zu ziehen. Generell ist es erforderlich, dass vielversprechende endogene Rezeptoren des nachzuweisenden Toxins bekannt sind. Nur auf der Basis dieser Daten kann ein Rezeptor-basierter Nachweis in Erwägung gezogen werden. Zusätzlich erfordert der Einsatz als Fängerstruktur, dass die Rezeptoren in stabiler Form dargestellt und in geeigneter Weise immobilisiert werden können. In dieser Arbeit zeichnete sich für die verschiedenen endogenen Rezeptorstrukturen ein heterogenes Bild hinsichtlich der Verwendung für den Nachweis von biologischen Toxinen ab.

Die erfolgreiche Funktionalisierung der Rezeptorbindung der biologischen Toxine war entscheidend von der Qualität der publizierten Literaturdaten abhängig. Das Potenzial eines endogenen Rezeptors, als Fänger in Nachweissystemen fungieren zu können, lässt sich am besten anhand seiner Affinität zum biologischen Toxin bewerten. Dementsprechend waren vor allem solche Daten interessant, die einer Ermittlung der kinetischen Bindungsdaten zum Ziel hatten. Sehr detaillierte Daten (inklusive einer Röntgenstrukturanalyse) lagen in dieser Hinsicht zu der Interaktion von CPE mit seinem endogenen Rezeptor Claudin-4 vor [141, 161, 224]. In unseren SPR-Interaktionsanalysen mit immobilisiertem Claudin-4 und in Lösung befindlichem CPE konnten wir eine hervorragende Affinität von 0,2 nM feststellen (Abbildung 27 für die Bindungskurven, Tabelle 36 für die kinetischen Parameter). Takahashi *et al.* ermittelten für die Interaktion von rekombinantem, kovalent an einen SPR Sensorchip gekoppelten Claudin-4 und einem CPE-Fragment eine Affinität von etwa 0,5 nM [225], was mit unseren Messungen übereinstimmt. Eine ähnliche Affinität fanden auch Shinoda *et al.* [226]. Interessanterweise war diese hochaffine Bindung von Claudin-4 als Membranprotein mit vier Transmembranspannen sowohl in unseren Untersuchungen, als auch der erwähnten Autoren ohne die Präsentation in einer adäquaten

Membranumgebung möglich. Die bloße Immobilisierung auf Mikrotiterplatten bzw. Goldoberflächen des pBDis war in unseren Untersuchungen zielführend, um CPE mit Hilfe seines endogenen Rezeptors nachzuweisen (Nachweise mit Claudin-4 als Fänger: Abbildung 34 für ELISA, Abbildung 36 für pBDi).

Gleichfalls in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten war die Bindung der beiden Pflanzentoxine Rizin und Abrin an die terminalen Galaktosereste des hochglykosylierten Proteins Asialofetuin. Affinitätsmessungen lagen bisher nur für Rizin vor, aus denen eine hochaffine Interaktion des Pflanzentoxins zu Asialofetuin hervorging [135]. Wir bestätigten mit unseren SPR-Messungen die ermittelte Affinität von 10^{-8} M und konnten zusätzlich eine ebenso hohe Affinität für die Interaktion zwischen Abrin und Asialofetuin nachweisen (Abbildung 13 für Bindungskurven, Tabelle 21 für kinetische Parameter). Das Bindungsverhalten von Rizin und Abrin gegenüber dem Glykoprotein Asialofetuin entsprach unseren Erwartungen. Diese Annahmen beruhten auf den publizierten Strukturanalysen von Rizin und Abrin, die eine hohe Sequenzhomologie in den B-Ketten der Lektine und eine nahezu identische Proteinfaltung belegten [144, 145, 210]. Prinzipiell eignete sich Asialofetuin in unseren Untersuchungen für den Einsatz als gemeinsamer Fänger von Rizin und Abrin (Nachweis im ELLA: Abbildung 14, Nachweis im pBDi: Abbildung 17). Für Abrin war der Rezeptor-basierte Nachweis nur im Plattenformat möglich (Abbildung 14). Rizin konnte sowohl im ELLA als auch in der Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi mit Hilfe von Asialofetuin nachgewiesen werden (Abbildung 17).

Claudin-4 und Asialofetuin waren in der vorliegenden Arbeit die einzigen endogenen Rezeptoren, die intrinsisch ohne zusätzliche Anpassung z.B. durch Einbindung in eine Membranumgebung hohe Affinitäten gegenüber den entsprechenden Toxinen aufwiesen. Sie verhielten sich hinsichtlich ihrer Affinität und ihrer Funktionalisierung für immunologische Assays wie monoklonale Antikörper. Demgegenüber lagen mit den Glykosphingolipiden und dem Proteolipid MAL endogene Rezeptoren vor, deren Einsatz als Fänger in Detektionssysteme nicht ohne weiteres möglich war.

So mussten die Glykosphingolipide in Nanodisks integriert werden, um später als immobilisierter Fänger auf Goldelektroden in der Detektionsplattform pBDi zu fungieren. Dies ergab sich daraus, dass die untersuchten Glykosphingolipide nicht als thiolhaltige Varianten verfügbar waren und somit eine Immobilisierung nur in Form von GSL-haltigen Nanodisks über das cysteinhaltige Gürtelprotein MSP zu realisieren war. Im Fall des Globosids Gb3 ermöglichte die Präsentation in Nanodisks zusammen mit dem Phospholipid POPC und Galaktosylceramid (GalCer) eine hochaffine Bindung ($K_D \approx 0,1-0,4$ nM) an Stx1a und Stx2a (Abbildung 19 für SPR-Bindungskurven, Tabelle 26 für kinetische Parameter). Die Gb3/GalCer-Nanodisks interagierten erheblich stärker mit Stx1a und Stx2a als Nanodisks, die nur Gb3 enthielten (EC_{50} -Werte im ELISA, Tabelle 25). Unsere diesbezüglichen Erkenntnisse sind in guter Übereinstimmung mit ELISA-basierten Versuchen, in denen immobilisierte Mischungen von Gb3 und Galaktosylceramid deutlich höhere Sensitivitäten für die Bindung der Shigatoxine lieferten als Gb3 ohne Zusätze [139, 140]. In der Literatur wird angenommen, dass andere Glykosphingolipide wie Galaktosylceramid durch laterale Interaktionen innerhalb der Lipiddoppelschicht dazu beitragen, dass das P^k-Antigen von Gb3 (Aufbau siehe Abbildung 5) optimal für eine multivalente Rezeptorbindung an die

Shigatoxine bereitsteht [156, 227]. Die hochaffine Bindung der Shigatoxine an die Gb3/GalCer-Nanodisks konnte zwar nicht für den Nachweis im pBDi funktionalisiert werden (Abbildung 25), aber steht nun in Form eines Rezeptor-basierten ELISA bereit (Abbildung 21 für Messkurven, Tabelle 31 für Detektionslimits im ELISA).

Für das Glykosphingolipid Asialo-GM1 als weiterer untersuchter Rezeptor für Rizin und Abrin war dagegen die Funktionalisierung in Form von Nanodisks nicht erfolgreich. Wir konnten keine Interaktion zwischen Rizin und Asialo-GM1 und eine fragliche Bindung von Abrin an Asialo-GM1-Nanodisks durch SPR-Messungen feststellen (Abbildung 13). Unsere Ergebnisse weisen damit eine Diskrepanz zu publizierten Daten auf, in denen durch SPR-basierte Messungen eine Affinität von 10^{-7} M für die Interaktion der B-Kette Rizins (RTB) an Asialo-GM1 in Liposomen ermittelt wurde [133]. Da die bivalente Bindung von Rizin und Abrin aufgrund der 70 Å voneinander entfernten Kohlenhydratbindungstaschen sterisch anspruchsvoll ist [228], liegen die Gründe für diese gegensätzlichen Beobachtungen möglicherweise in der andersartigen Immobilisierung und Präsentation von Asialo-GM1 (Immobilisierung von Nanodisks über His Capture: diese Arbeit; Immobilisierung von Liposomen auf L1-Sensorchip: Gustafson *et al.* [133]). Die Immobilisierung von Asialo-GM1-haltigen Liposomen auf einem L1-Sensorchip führt zur Ausbildung einer Lipidmonoschicht auf der Sensoroberfläche. In dieser Lipidmonoschicht liegt Asialo-GM1 über die gesamte Oberfläche verteilt vor und ist daher gut zugänglich für eine bivalente Interaktion. Wir vermuten, dass die Asialo-GM1-Moleküle in unseren Messungen hingegen durch den limitierten Umfang der Nanodisks (13 nm) in einer Anordnung präsentiert waren, die keine bivalente, sondern lediglich eine monovalente Bindung von Rizin und Abrin ermöglichten. Diese Annahme stützt sich darauf, dass die von uns ermittelten Affinitäten ($K_D \approx 20 \mu\text{M}$ für Rizin, Tabelle 21) in einem ähnlichen Größenbereich liegen wie die publizierte mikromolare Affinität für die monovalente Interaktion von Rizin mit Laktose [229]. Unabhängig davon ist eine Affinität im Bereich von 10^{-7} M [133] nicht ausreichend, um hochsensitive Nachweisverfahren zu etablieren.

Während die Rezeptorbindung des Transmembranproteins Claudin-4 selbst ohne Anwendung der Nanodisk-Technologie realisiert werden konnte, war trotz umfangreicher Testungen keine Bindung von Etx an den postulierten Rezeptor MAL nachweisbar (siehe Kapitel 3.4.1). Dies ist insofern in Übereinstimmung mit bisher publizierten Literaturangaben, dass trotz zahlreicher Korrelationen zwischen der Rezeptorbindung von Etx und der Anwesenheit von MAL keine direkte Interaktion zwischen MAL und Etx nachgewiesen werden konnte [42]. Das Ausbleiben der von uns untersuchten Bindung von murinem MAL an Etx kann vielfältige Gründe haben. Denkbar ist, dass wir mit unseren Versuchsparametern keine für die Interaktion präferentielle Membrenumgebung für MAL herstellen konnten (Tabelle 43 für getestete Lipidzusammensetzungen der Nanodisks, Abbildung 68 für Chromatogramme der Gelfiltrationen). Darüber hinaus könnte das verwendete rekombinante MAL generell eine gegenüber dem nativen Transmembranprotein artifizielle Proteinfaltung einnehmen, da es mehrere Proteintags besaß (Tabelle 42). Weiterführende Versuche mit sogenannten *SMA lipid particles* (SMALPs) könnten hier aufschlussreich sein. Mit Hilfe dieser, durch ein Styren-Maleinsäure-Copolymer (SMA) gestützten Lipidpartikel ist die Isolierung von MAL zusammen mit seiner nativen Lipidumgebung direkt aus der Zellmembran von natürlicherweise

Etx-sensitiven Zellen oder MAL-transfizierten Zellen möglich. Hier würden auch eventuelle Korezeptoren zusammen mit MAL isoliert werden, deren Abwesenheit bei den bisherigen Versuchen für die fehlende Interaktion zwischen MAL und Etx verantwortlich sein könnte. Erste Versuche zur Isolierung des nativen MAL aus MDCK-Zellen waren bisher nicht erfolgreich (Abbildung 71 für Bindungsdaten im ELISA). Zielführender ist vermutlich die Herstellung von SMALPs auf der Basis von MAL-transfizierten Zellen, bei denen über die angefügten Affinitätstags eine Affinitätsreinigung von MAL-haltigen SMALPs möglich wäre. Am Beispiel von MAL wird deutlich, dass endogene Rezeptoren nur für den Einsatz in Nachweissystemen funktionalisiert werden können, wenn sich aus zuvor publizierten Daten eine gut charakterisierte Bindung zum biologischen Toxin ableiten lässt. Darüber hinaus bestätigen Untersuchungen zu anderen biologischen Toxinen, dass eine Rezeptorbindung an Transmembranproteine oft von sehr komplexer Natur ist. So zeigten Mahrhold *et al.* und Yao *et al.*, dass die hochaffine Bindung von Botulinum-Neurotoxin A (BoNT/A) an die N-Glykosylierung seines Rezeptors SV2C und somit an die Herstellung in einem eukaryotischen Expressionssystem gekoppelt ist [230, 231]. Stern *et al.* wiesen für die Rezeptorbindung verschiedener Botulinum-Neurotoxine nach, dass neben dem eigentlichen Proteorezeptor und einem Gangliosid-Korezeptor zusätzlich exponierte Lipidschleifen des Antigens modellierend auf die Affinität der Interaktion wirken [232].

Insgesamt schließen wir aus unseren Ergebnissen, dass die Verwendung der untersuchten endogenen Rezeptoren in Nachweissystemen in unterschiedlichem Maß realisierbar war (Tabelle 48).

Tabelle 48: Ergebnisse zu den untersuchten endogenen Rezeptoren für Proteotoxine.

Rezeptor	Claudin-4	ASF	Gb3/GalCer	Asialo-GM1	MAL
Antigen/e	CPE	Rizin & Abrin	Stx1 & Stx2	Rizin & Abrin	Etx
Klassifizierung des Rezeptors	TM-Protein	Glykoprotein	GSL	GSL	TM-Protein
Umfang Literaturdaten	sehr gut			gering	keine direkte IA
Funktionalisierung der Bindung	ohne Anpassung möglich		Insertion in NDs	✗	✗
Assayformate	ELISA und pBDi		ELISA	✗	✗

ASF = Asialofetuin; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; GalCer = Galaktosylceramid; GSL = Glykosphingolipid; IA = Interaktion; MAL = Myelin and Lymphocyte Protein; pBDi = portable BioDetector integrated; NDs = Nanodisks; TM-Protein = Transmembranprotein

In der Literatur gut charakterisierte Rezeptorbindungen (CPE an Claudin-4, Rizin an Asialofetuin, Shigatoxine an Gb3) waren besser zu funktionalisieren als solche, zu denen kaum Daten verfügbar waren (Rizin an Asialo-GM1, Etx an MAL). Bei einer unzureichenden Datenlage fehlen Anhaltspunkte, welche Versuchsparameter kritisch für den Nachweis der Interaktion sind. Zusätzlich können Informationen zu dem Einfluss der Membrenumgebung auf die Rezeptorbindung entscheidend für die erfolgreiche Funktionalisierung sein (z.B. Zusatz von GalCer zu Gb3, Tabelle 25). Insbesondere für

Transmembranproteine ist in dieser Hinsicht mit einem erhöhten Maß an erforderlichen Anpassungen zu rechnen, da sie in der Regel außerhalb einer Lipidumgebung aufgrund der hohen Neigung zur Aggregation instabil sind (siehe MAL, 3.4.1). Entgegen unseren initialen Erwartungen war die Funktionalisierung von Claudin-4, einem 4-Transmembranprotein, dennoch problemlos in Abwesenheit einer Lipiddoppelschicht möglich. Allgemeingültige Aussagen zum Potenzial Transmembranproteine für den Einsatz in Rezeptor-basierten Nachweisverfahren zu funktionalisieren, lassen sich auf Basis der hier erzielten Erkenntnisse nicht ableiten.

4.2 Hochaffine endogene Rezeptoren ermöglichen hochsensitive Nachweise

Nachdem geeignete endogene Rezeptoren und monoklonale Antikörper identifiziert worden waren, etablierten wir ELISA-basierte Nachweissysteme und verglichen sie hinsichtlich ihrer Sensitivität untereinander. Eine ausreichende Sensitivität ist insofern kritisch, dass falsch negative Ergebnisse von niedrig konzentrierten Verdachtsproben vermieden werden müssen. In realen Proben liegen teilweise geringste Mengen der biologischen Toxine vor. So wurden im Rahmen von Ausbruchsgeschehen CPE-Konzentrationen von wenigen ng/ml im Stuhl erkrankter Patienten nachgewiesen [233]. Einen ähnlichen Konzentrationsbereich ermittelten Yamasaki *et al.* für Shigatoxin-haltige Stuhlproben aus einem EHEC-Ausbruch [234]. Die Sensitivität eines Detektionssystems hängt maßgeblich von den Affinitäten der verwendeten Nachweisreagenzien zum Antigen ab. Die untersuchten monoklonalen Antikörper wiesen ausschließlich hohe Affinitäten zwischen 0,04 und 6,8 nM zu ihrem spezifischen Antigen auf (Affinitäten der monoklonalen Antikörper siehe Tabelle 22 für Rizin und Abrin, Tabelle 28 für Stx1 und Stx2, Tabelle 37 für CPE, Tabelle 44 für Etx). Diese hohen Affinitäten ($K_D \approx 10^{-10}$ M, [235, 236]) sind häufig für monoklonale Antikörper zu beobachten, die aus der Isolierung von aktivierten B-Zellen eines immunisierten Organismus hervorgingen. Im Rahmen der humoralen Immunantwort des Tieres entstehen durch den Vorgang der Affinitätsreifung vermehrt hochaffine Antikörper, die nach der Hybridomfusion der entsprechenden B-Zellen durch geeignete Screeningverfahren identifiziert werden können (siehe 4.1.1).

Asialofetuin und Claudin-4 waren in dieser Hinsicht ähnlich wie monoklonale Antikörper zu handhaben, da ihre Interaktionen zu den zugehörigen Antigenen natürlicherweise hoch waren (SPR-Bindungskurven siehe Abbildung 13 für Asialofetuin, Abbildung 27 für Claudin-4). Zusammen mit monoklonalen Detektionsantikörpern, die sich mit der Rezeptorbindung kombinieren ließen, gelang die Etablierung von hochsensitiven Rezeptor-basierten Nachweisen für Rizin und CPE. Die Detektionslimits lagen für beide Toxine sowohl mit dem Rezeptor-basierten, als auch dem Antikörper-basierten Ansatz im ELISA im pg/ml- und im pBDi im niedrigen ng/ml-Bereich (Nachweise im ELISA siehe Tabelle 23 für Rizin und Tabelle 39 für CPE, Nachweise im pBDi siehe Tabelle 24 für Rizin und Tabelle 41 für CPE). Obwohl wir auch für Abrin eine hohe Affinität zu Asialofetuin ermittelten (SPR-Bindungskinetik siehe Abbildung 13), fiel hier der Rezeptor-basierte Nachweis ($LOD \approx 730$ pg/ml) weniger sensitiv aus als der Antikörper-basierte Nachweis ($LOD \approx 40$ pg/ml, Tabelle 23). Aufgrund des Sensitivitätsverlust im ELLA gelang im pBDi ausschließlich ein Abrin-Nachweis auf der Basis monoklonaler Antikörper ($LOD \approx 1$ ng/ml).

Möglicherweise lag mit AP3202 kein geeigneter Detektionsantikörper für den Rezeptor-basierten Nachweis von Abrin vor. Zu bevorzugen sind in dieser Hinsicht A-Ketten-spezifische Antikörper, da sie im Gegensatz zu B-Ketten-spezifischen Antikörpern nicht mit der Lektinbindung interferieren. Anders als für Rizin lagen keine isolierten A- und B-Ketten von Abrin für eine Testung im Western Blot vor, sodass eine diesbezügliche Spezifität von AP3202 nicht bekannt war.

Am Beispiel von Gb3 zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass Informationen zu bindungsmodulierenden Substanzen wie Korezeptoren oder der Lipidumgebung essentiell für die Entwicklung sensitiver Rezeptor-basierter Nachweise sind. Der Einsatz von rein Gb3-haltigen Nanodisks als Fängerstrukturen mündete vor allem für Stx2a in deutlich geringeren Sensitivitäten gegenüber den Gb3/GalCer-Nanodisks (Tabelle 25). Erst diese final ausgewählten Gb3/GalCer-Nanodisks ermöglichten sowohl für Stx1a, als auch Stx2a hochsensitive ELISA (LOD = 19 bzw. 15 pg/ml für Stx1a bzw. Stx2a, Tabelle 31). Insgesamt gelang für die Shigatoxine auf der Basis der Gb3/GalCer-Nanodisk zwar keine Detektion im pBDi (Abbildung 25), aber es stehen nun stationäre ELISA mit hervorragenden Detektionslimits bereit. Ähnliche Detektionslimits erhielten wir auch für den rein Antikörper-basierten Nachweis der Shigatoxine im ELISA (LOD = 12 bzw. 3 pg/ml für Stx1a bzw. Stx2a, Tabelle 31). Der Antikörper-basierte Vor-Ort-Nachweis im pBDi von Stx1a und Stx2a ist ab Konzentrationen von 1 ng/ml möglich (Abbildung 25, Tabelle 34).

Aufgrund der fehlenden Rezeptorinteraktion etablierten wir für Etx Antikörper-basierte Nachweise mit exzellenten Detektionslimits von 4 pg/ml (Tabelle 45, Abbildung 42). Der Nachweis von Etx im pBDi war wie für die anderen Toxine ab Konzentrationen von 1 ng/ml möglich (Abbildung 43, Tabelle 47).

Zusammenfassend ließen sich alle toxinspezifischen monoklonalen Antikörper in hochsensitive, klassische Sandwich-ELISA integrieren. Die Detektionslimit lagen ausnahmslos im pg/ml-Bereich. Zusätzlich waren alle Antikörper-basierten Nachweise gut in die Detektionsplattform pBDi übertragbar und stellen einen Toxinnachweis ab jeweils 1 ng/ml sicher. Ähnliche Ergebnisse waren unter den Rezeptor-basierten Nachweisen für Rizin und CPE auf der Grundlage von Asialofetuin bzw. Claudin-4 im ELISA (LOD = 7 bzw. 1 pg/ml) sowie im pBDi (LOD \approx 1 ng/ml) möglich. Die Interaktionen von den Shigatoxinen an Gb3/GalCer-Nanodisks und Abrin an Asialofetuin konnten zwar nicht bzw. nicht mit ausreichender Sensitivität ins pBDi übertragen werden, im Platten-basierten ELISA gelangen aber auch hier sensitive Nachweise der Toxine (LOD für Stx1 bzw. Stx2: 19 bzw. 15 pg/ml; LOD für Abrin: 730 pg/ml).

4.3 Trotz ihres Potenzials sind Rezeptor-basierte Nachweise bisher unterrepräsentiert

In der wissenschaftlichen Literatur sind für die adressierten Toxine sowohl stationäre als auch mobile Nachweisverfahren publiziert, die überwiegend auf dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern beruhen. Die in dieser Arbeit etablierten (CPE, Etx, Shigatoxine) und die bereits beschriebenen (Rizin, Abrin) klassischen Sandwich-ELISA (siehe 4.2) sind hinsichtlich ihrer Sensitivität gleichwertig zu den besten bisher publizierten ELISA zum Nachweis der biologischen Toxine [105, 107, 121, 126, 237]. Hervorzuheben ist das Detektionslimit von 0,2 pg/ml für den von uns entwickelten Nachweis von CPE mit Hilfe der monoklonalen Antikörper (Abbildung 34, Tabelle 39). Während kommerzielle und publizierte ELISA zum Nachweis der Shigatoxine auf die Erkennung der nativen Subtypen aus Bakterienüberständen hin untersucht wurden [121, 122], zeichnen sich die von uns neu entwickelten Sandwich-ELISA zum Nachweis von Etx und CPE gegenüber den publizierten Nachweisverfahren durch eine umfangreiche Testung der nativen Toxine aus einem Panel an Bakterienüberständen aus, die aus Ausbruchsgeschehen stammen. Zu den kommerziell verfügbaren ELISA-Kits zum Nachweis von CPE [221] und Etx (Bio-X Diagnostics, Jemelle, BEL) waren keine Daten zur Validierung publiziert, sodass die Bewertung dieser Systeme nur eingeschränkt möglich ist. Mit den Erkenntnissen hinsichtlich der Qualität und Kombinierbarkeit der kommerziellen Stx-spezifischen monoklonalen Antikörpern und den gut charakterisierten, neu generierten CPE- und Etx-spezifischen monoklonalen Antikörpern stehen der Arbeitsgruppe wertvolle Nachweisreagenzien mit gesichertem Zugang zur Verfügung.

Als mobile Detektionsverfahren auf Basis monoklonaler Antikörper sind LFAs sehr verbreitet und für alle adressierten Toxine beschrieben, unter denen Abrin, Etx und die Shigatoxine auf diese Weise mit guten Sensitivitäten ($LOD \approx 0,1$ ng/ml) nachgewiesen werden können [103-105]. Kommerzielle LFAs sind für Rizin, Abrin, die Shigatoxine und CPE verfügbar. Aus externen Evaluierungen ging eine stark variable Qualität der Rizin- und Abrin-spezifischen LFAs hervor. Die Sensitivitäten lagen zwar im niedrigen ng/ml-Bereich, aber insbesondere die unspezifische Erkennung des jeweils homologen Agglutinins muss im Einzelfall geprüft werden [238, 239]. Für den Schnellnachweis der Shigatoxine stehen diverse LFAs oder ähnliche Testsysteme bereit, von denen besonders der *SHIGA TOXIN QUICK CHECK™* der Firma Abbott breite, klinische Anwendung findet. Laut Hersteller erreicht der Test Detektionslimits von 0,04 ng/ml [240] und ist damit deutlich sensitiver als der hier etablierte Nachweis im pBDi ($LOD \approx 1$ ng/ml, Tabelle 34). Die Plattform pBDi zeichnet sich gegenüber diesen zum Einzelnachweis geeigneten LFAs ganz klar durch ihre Multiplexfähigkeit aus. Vergleichbare, zur simultanen Detektion geeignete Antikörper-basierte Systeme sind für Rizin und Stx1 publiziert.

Aufgrund seines großen Missbrauchspotenzial ist die Bandbreite an Vor-Ort-Detektionssystemen insbesondere für Rizin mannigfaltig. Ein zum pBDi vergleichbares Gerät stützt sich auf einen Antikörpermikroarray, in dem bisher drei Agenzien mittels Fluoreszenzmessung nachweisbar waren [241]. Das Detektionslimit für den Nachweis von Rizin betrug 0,5 ng/ml und ist damit ähnlich gut, wie der hier beschriebene Nachweis im pBDi ($LOD = 1$ ng/ml, Tabelle 24). Weitere portable, aber deutlich weniger

sensitive Systeme beruhen auf der Faseroptik [242], Chemilumineszenz [243] oder der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie [244]. Ein innovatives System, das neben zwei weiteren Toxinen Stx1 nachweist, basiert auf einer mikrofluidischen Scheibe mit abgetrennten Reaktionskammern [245]. An Beads immobilisierte toxinspezifische Antikörper werden dabei durch Zentrifugation sequentiell mit anderen Assaykomponenten in Verbindung gebracht. Signale werden in Form einer Fluoreszenzmessung erfasst und ermöglichen ein Detektionslimit für den Stx1-Nachweis von 1,7 ng/ml, was etwa mit unseren Sensitivitäten des pBDi-gestützten Nachweises übereinstimmt (LOD = 1 ng/ml, Tabelle 34). Insgesamt existieren wenige konkurrenzfähige Multiplex-Systeme, für die ähnlich gute Sensitivitäten erreicht werden. Des Weiteren liegen nach unseren Erkenntnissen keine Nachweissysteme vor, die den simultanen Nachweis von Rizin, Abrin, Stx1/2, CPE und Etx auf Proteinebene adressieren. Das heißt, das hier etablierte System ermöglicht erstmals eine Differentialdiagnostik von Toxinen, die blutige Diarrhöe mit Leukozyten im Stuhl induzieren.

Rezeptor-basierte Nachweise sind nur für die Shigatoxine (stationäre und mobile Verfahren) und Rizin (mobile Verfahren) beschrieben. Für den Nachweis der Shigatoxine in Form Platten-basierter ELISA sind drei verschiedene Rezeptor-basierte Verfahren publiziert, von denen zwei auf der Immobilisierung der reinen Globoside Gb3 [246] bzw. Gb4 [247] in organischen Lösungsmitteln beruhen. Diese beiden Detektionsverfahren sind nur für den Nachweis einzelner Shigatoxine geeignet. So gaben Ashkenazi *et al.* an mit ihrem Gb3-basierten ELISA Stx1 mit einem Detektionslimit von 0,2 ng/ml nachweisen zu können [246]. Togashi *et al.* entwickelten ihren Gb4-basierten ELISA dagegen speziell zur Detektion des mit porzinen Enterotoxämien assoziierten Subtyps Stx2e (LOD < 20 ng/ml). Gegenüber diesen Assays zeichnet sich der von uns etablierte ELISA mit Gb3/GalCer-Nanodisks als Fängerstruktur durch ein breiteres Anwendungsspektrum (Erkennung von Stx1a, c, d und Stx2a-g), eine leichtere Handhabung der Nanodisks gegenüber organischen Lösungsmitteln und einer höheren Sensitivität (LOD \approx 18 bzw. 15 pg/ml für Stx1 bzw. Stx2, Tabelle 31) aus. Ein weiteres publiziertes Verfahren verwendet als Fängerreagenz eine P1-Glykoprotein-haltige Hydatidenflüssigkeit, welche aus parasitär befallenen Schafen stammte [248]. Dieser Assay erfasst zwar sowohl Stx1 als auch Stx2 mit zufriedenstellenden Sensitivitäten (LOD \approx 1 ng/ml), gegenüber den von uns verwendeten Gb3/Gal-Nanodisks ist die Hydatidenflüssigkeit weder gut zugänglich, noch klar definiert in ihrer Zusammensetzung. Rezeptor-basierte Nachweise sind bei den mobilen ähnlich wie bei den stationären Detektionsverfahren bisher wenig erforscht. Uns gelang im pBDi ein erfolgreicher Nachweis von Rizin und CPE mit Hilfe der endogenen Rezeptoren (Abbildung 17 für Rizin-Nachweis, Abbildung 36 für CPE-Nachweis), wohingegen Gb3/GalCer-Nanodisks nicht zum Nachweis der Shigatoxine im pBDi geeignet waren (Abbildung 25). Nagatsuka *et al.* präsentierten ein vielversprechendes System, welches sich auf die lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (LSPR) stützt [249]. Bei dieser Technologie werden die optischen Phänomene nicht wie beim klassischen SPR an der Oberfläche eines durchgängigen Goldfilms, sondern an Goldnanopartikeln gemessen. Zum Nachweis von Rizin werden dazu β -Laktosid beschichtete und zum Nachweis von Stx1 Gb3-beschichtete Goldnanopartikel eingesetzt. Die Nachweisgrenzen lagen bei 30 ng/ml (Rizin) bzw. 10 ng/ml (Stx1). Bei einem weiteren System dient ein immobilisiertes Laktosederivat als Fängerstruktur für Rizin [250]. Der Nachweis beruht auf der automatisierten Auslesung eines erzeugten Chemilumineszenzsignals und besitzt

ein Detektionslimit von 80 ng/ml. Kritisch für einen durch die Lektinbindung vermittelten Nachweis von Rizin ist die Selektivität gegenüber anderen zuckerbindenden Proteinen (z.B. Cholera-toxin [249], *R. communis* Agglutinin), die ebenfalls an Galaktose binden und die limitierte Sensitivität dieses Systems.

Zusammenfassend gelang es mit den von uns entwickelten Antikörper-basierten Detektionsverfahren die adressierten Toxine sowohl im stationären, als auch im mobilen Nachweis mit gleicher oder deutlich höherer Sensitivität nachzuweisen, wie es durch bereits publizierte Verfahren möglich war. Die von uns anvisierte Multiplex-Detektion im pBDi wird in dieser Konstellation erstmals eine sensitive Differentialdiagnostik mit Hilfe einer Vor-Ort-Detektionsplattform darstellen. Nachweise auf der Basis von endogenen Rezeptoren sind bisher generell in der Literatur unterrepräsentiert. Der von uns etablierte ELISA mit Gb3/GalCer-Nanodisks als Fänger war zwar nicht im pBDi einsetzbar, zeichnete sich aber im Vergleich zu beschriebenen Platten-basierten Immunoassays durch eine extrem hohe Sensitivität aus und ist damit gleichwertig zu klassischen Sandwich-ELISA. Mit der Integration von Claudin-4 als Fängerstruktur gelang uns erstmals ein höchst sensibler Rezeptor-basierter Nachweis von CPE, der für den Einsatz in stationären ELISA und dem pBDi geeignet war.

4.4 Endogene Rezeptoren sowie oligoklonale Mischungen von mAk ermöglichen einen breitbandigen Nachweis

Die breitbandige Erkennung von strukturell heterogenen Varianten eines Toxins war das entscheidende Argument, welches für die Integration von endogenen Rezeptoren als Fängerstrukturen anstelle von monoklonalen Antikörpern sprach. Die vorliegende Arbeit sollte beantworten, ob sich mit dem Einsatz von „universellen“ Rezeptorstrukturen im Gegensatz zu hochspezifischen monoklonalen Antikörpern ein breitbandiger Nachweis von Toxinvarianten realisieren lässt. Von den untersuchten Toxinen war diese Fragestellung insbesondere für die Shigatoxine und die Pflanzentoxine Rizin und Abrin von Interesse, da sie in Form verschiedener Subtypen bzw. Isoformen auftreten. Nach bisherigen Erkenntnissen spielt die strukturelle Diversität für Etx und CPE keine Rolle.

Die Familie der Shigatoxine stellte mit vier beschriebenen Stx1- und zehn Stx2-Subtypen in dieser Arbeit die Toxingruppe mit der größten strukturellen Variabilität dar. Um die Gb3/GalCer-Nanodisks und die kommerziellen monoklonalen Antikörper auf ihre Eignung in Bezug auf einen breitbandigen Nachweis aller Subtypen zu prüfen, führten wir ELISA-basierte Testungen mit Bakterienlysaten verschiedener *E. coli*-Stämme durch, die unterschiedliche Stx1- und/oder Stx2-Subtypen (Stx1a, c, d siehe Tabelle 32 und Stx2a-g siehe Tabelle 33) produziert hatten. Wir konnten zeigen, dass die getesteten monoklonalen Antikörper nicht alle Subtypen erkannten (Ergebnisse aus Vortestungen, siehe Tabelle 51 für Stx1 und Tabelle 52 für Stx2). Allerdings ließen sich diese Lücken durch gezielte Kombination verschiedener monoklonaler Antikörper kompensieren (Tabelle 32, Tabelle 33). Die Gb3/GalCer-Nanodisks waren zum Nachweis aller Subtypen geeignet, aber auch hier waren Kombinationen aus monoklonalen Detektionsantikörpern notwendig, um eine Detektion aller Subtypen der Shigatoxine zu realisieren (Tabelle 52).

Bisher untersuchten wir die Subtyperkennung nur qualitativ, da Quantifizierungen aufgrund des Fehlens der jeweiligen gereinigten Subtypen als Standards nicht möglich waren. Dementsprechend können negative bzw. schwach positive Ergebnisse im ELISA bedeuten, dass der betreffende monoklonale Antikörper entweder tatsächlich kein unter den Subtypen konserviertes Epitop erkannte oder dass er aufgrund niedrigaffiner Bindung des Epitops lediglich geringe Sensitivitäten erzielte. Insgesamt wiesen wenige monoklonale Antikörper eine gute Detektion der Subtypen Stx1d, Stx2b, Stx2d und Stx2f auf (Tabelle 51 für Stx1 und Tabelle 52 für Stx2). Da alle monoklonalen Antikörper jeweils durch Immunisierung mit dem prototypischen Stx1a bzw. Stx2a erhalten wurden (Tabelle 10), lassen sich diese Beobachtungen vermutlich auf die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Subtypen zurückführen. Insbesondere Stx2f unterscheidet sich mit nur 68 % Homologie stark von Stx2a [251]. Stx1d, Stx2b und Stx2d sind mit etwa 95 %, 92 % bzw. 98 % deutlich ähnlicher zu Stx1a bzw. Stx2a [84, 251]. Trotzdem könnte auch hier ein in Stx1a bzw. Stx2a vorliegendes, vom monoklonalen Antikörper erkanntes Epitop im jeweiligen Subtyp mutiert sein und somit nicht gebunden werden. Da uns für das Bakterienlysat des Subtyps Stx1d Daten vorlagen (persönliche Kommunikation S. Barth, FLI), aus denen eine geringe Reaktivität im zellbasierten Zytotoxizitätsassay hervorging, nehmen wir an, dass die Toxinproduktion des betreffenden Stammes nicht ausreichend induziert wurde und somit nur geringste Mengen Toxin im Lysat vorlagen. Eine mangelnde Induzierbarkeit von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC) findet sich auch in der Literatur [252]. Anhand unserer bisherigen Daten schließen wir auf eine breitbandige Subtyperkennung durch die Gb3/GalCer-Nanodisks (Tabelle 32, Tabelle 33). Der Subtyp Stx2e, welcher laut Literatur präferenziell Gb4, aber auch Gb3 bindet [152], ließ sich ebenfalls im ELISA durch Gb3/GalCer-Nanodisks immobilisieren (Tabelle 33).

Unsere Daten deuten zwar darauf hin, dass sowohl die etablierten Antikörper- als auch Rezeptor-basierten Nachweissysteme eine breitbandige Erkennung der Subtypen Stx1a, c und d (Tabelle 32) sowie Stx2a-g ermöglichen (Tabelle 33), für eine höhere Aussagekraft sind aber umfassendere Untersuchungen zwingend erforderlich. Zum einen sollten weiterführende Versuche eine größere Bandbreite an STEC einschließen, da aus der Evaluierung von Scheutz *et al.* hervorgeht, dass einzelne Subtypen sich aufgrund ihrer genetischen Variabilität in distinkte Varianten aufsplitten [84]. Zum anderen müssen nachfolgende Testungen die neu publizierten und daher bisher nicht untersuchten Subtypen Stx1e, Stx2h, Stx2i und Stx2k [85-88] beinhalten. Es liegen vielversprechende Ergebnisse vor, die eine Bindung von Stx1e und Stx2k an Gb3 nachwiesen [88, 90]. Diese Daten bestärken uns darin, den Rezeptor-basierten Ansatz zum breitbandigen Nachweis der Shigatoxine weiterzuverfolgen. Für zukünftige Untersuchungen ließen sich wertvolle Informationen mit rekombinant hergestellten oder gereinigten Subtypen (z.B. mittels Lektinaffinitätsreinigung an immobilisiertem Gb3) gewinnen. Insbesondere geben SPR-Messungen Aufschluss über die Affinität der Gb3/GalCer-Nanodisks und der monoklonalen Antikörper gegenüber den einzelnen Subtypen. Anhand dieser Ergebnisse könnten die Gb3/GalCer-Nanodisks in ihrer Zusammensetzung bezüglich einer umfassenderen Subtyperkennung optimiert werden. Gb4 wurde aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeit für Stx1a und Stx2a (Tabelle 25) zwar in unseren bisherigen Untersuchungen nicht näher charakterisiert, dieses Globosid könnte sich aber zum sensitiven Nachweis einzelner Subtypen (v.a. Stx2e [152]) bewähren.

Neben den Shigatoxinen ist auch für Rizin und Abrin eine strukturelle Variabilität beschrieben [79-83]. Zunächst strebten wir an, die Umsetzbarkeit einer breitbandigen Erkennung der beschriebenen Isoformen (Rizin D und E; Abrin-a, -b, -c und -d) der Pflanzentoxine durch Asialofetuin zu untersuchen. Wir stellten jedoch durch SPR-Messungen fest, dass Asialofetuin hochaffin an die zu den Toxinen homologen Agglutinine bindet (*Ricinus communis* Agglutinin, *Abrus* Agglutinin, für SPR-Bindungskurven siehe Anhang, Abbildung 48). Zusätzlich sind die verwendeten Detektionsantikörper AP3202 und R18 in geringem Maß kreuzreaktiv gegenüber den Agglutininen [98, 115]. Zusammen mit der Erkenntnis, dass andere Lektine eine ähnliche Bindungspräferenz wie Rizin und Abrin aufweisen [212], kamen wir zu dem Schluss, dass der Nachweis mit Asialofetuin als Fänger zu unspezifisch ist. Zumindest für den stationären, breitbandigen Nachweis der Rizin- bzw. Abrin-Isoformen haben sich geeignetere, MS-basierte Methoden etabliert, die nach einem tryptischen Verdau anhand spezifischer Peptidsequenzen eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Isoformen und den Agglutininen ermöglichen [196, 253].

Aus unseren Beobachtungen leiten wir ab, dass endogene Rezeptoren ein vielversprechendes Konzept für den breitbandigen Nachweis von biologischen Toxinen darstellen. Trotz ihrer hochspezifischen Erkennung können prinzipiell auch oligoklonale Mischungen monoklonaler Antikörper zu diesem Zweck eingesetzt werden. Am Beispiel der Shigatoxine wird deutlich, dass in beiden Fällen eine umfangreiche Charakterisierung hinsichtlich der Subtyperkennung obligatorisch ist. Zusätzlich zeigten wir, dass eine breitbandige Detektion auf der Basis endogener Rezeptoren nur zielführend ist, wenn die Rezeptorbindung hochspezifisch für das betreffende Toxin ist. Das Vorliegen von Toxinen mit ähnlichem Bindungsverhalten kann zu Kreuzreaktivitäten und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen. In diesen Fällen ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern zum Nachweis der biologischen Toxine zu bevorzugen.

Demgegenüber zeichnen sich die Stärken eines auf einer hochkonservierten Rezeptorbindung beruhenden Nachweises (z.B. für Shigatoxine) insbesondere bei neu auftretenden Subtypen ab. Alle Toxinvarianten, die *in vivo* toxisch sind, müssen an einen endogenen Rezeptor binden. Daher scheint die Etablierung eines stationären Nachweises allein auf der Grundlage der endogenen Rezeptoren ohne Detektion durch monoklonale Antikörper erstrebenswert. Diese Nachweisstrategie ließe sich unkompliziert durch die Immobilisierung von in Nanodisks integrierten Rezeptoren in einem SPR-Assay umsetzen (Assayprinzip siehe Abbildung 12). Allerdings stellt sich die Frage, ob ein solcher Nachweis ohne „Sandwich-Prinzip“ ausreichend sensitiv und spezifisch ist.

4.5 Alle toxinspezifischen mAk eignen sich für den Multiplex-Nachweis im pBDi

Neben der Entwicklung stationärer ELISA hatte diese Arbeit zum Ziel, einen mobilen Multiplex-Nachweis im pBDi-System zu etablieren. Für die Immobilisierung auf den Goldelektroden der Biochips und für den Einsatz in der Routinediagnostik müssen Nachweisreagenzien ausreichend stabil sein. Da diesbezüglich insbesondere wenig Erkenntnisse für Nanodisks vorlagen, testeten wir ihre Lagerstabilität über 6 Monate. Der geplante simultane Nachweis der Toxine im pBDi erforderte darüber hinaus eine geringe

Kreuzreaktivität der eingesetzten Fängerstrukturen. Zu diesem Zweck untersuchten wir die Spezifität aller Fängerstrukturen.

Nach unseren bisherigen Erkenntnissen weisen alle verwendeten Nachweisreagenzien eine hohe Stabilität auf. Aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraumes sind für die endogenen Rezeptoren diesbezüglich weitere systematische Stabilitätstests erforderlich, wie sie für die Gb3/Gal-Cer-Nanodisks vorgenommen wurden (Untersuchung der Lagerstabilität siehe Abbildung 23 für ELISA-Messkurven, siehe Abbildung 55 für SPR-Bindungskurven). Die Nanodisks zeigten über den beobachteten Zeitraum von sechs Monaten eine gute Stabilität, die sie besonders gegenüber anderen Modellmembranen, wie z.B. Liposomen auszeichnet. Letztere neigen zur Aggregation und Phasentrennung und sind dementsprechend instabil [182]. Insgesamt waren die untersuchten endogenen Rezeptoren ähnlich stabil und gut zu handhaben wie monoklonale Antikörper. Schwieriger gestaltete sich hingegen die Verwendung der Rezeptoren für einen Nachweis in der Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi. Von den untersuchten Fängerstrukturen ließen sich alle ausgewählten monoklonalen Antikörper (Abbildung 17 für Rizin und Abrin, Abbildung 25 für Stx1 und Stx2, Abbildung 36 für CPE und Abbildung 43 für Etx) sowie Asialofetuin (Abbildung 17) und Claudin-4 (Abbildung 36) als Fänger ins pBDi-System integrieren. Für die Übertragung von Claudin-4 waren zu diesem Zweck Anpassungen hinsichtlich der Art und der Konzentration des Detergenzes erforderlich (siehe 3.3.8). Die Immobilisierung intakter Gb3/GalCer-Nanodisks auf den Goldelektroden der pBDi-Chips war hingegen trotz ihrer guten Bindungseigenschaften im ELISA (Abbildung 21) und ihrer guten Lagerstabilität (Abbildung 23) nicht realisierbar (Abbildung 25).

Für den angedachten Multiplex-Nachweis im pBDi ist eine hohe Spezifität der eingesetzten Fängerstrukturen dringend erforderlich. In dieser Hinsicht zeichnete sich bei den untersuchten endogenen Rezeptoren eine problematische Kreuzreaktivität gegenüber anderen biologischen Toxinen bzw. Lektinen ab. Vor allem Asialofetuin wies ein unspezifisches Bindungsverhalten auf. Die Bindung an die homologen Agglutinine (Abbildung 48 für SPR-Bindungskurven) ist zwar auch für die verwendeten Rizin-bzw. Abrin-spezifischen monoklonalen Antikörper in geringem Maße beschrieben [98, 115], darüber hinaus interagiert der Rezeptor allerdings noch mit anderen Toxinen wie TcdA (Untersuchung im ELLA, Abbildung 49), Komplexproteinen von Botulinum Neurotoxin [254] und vermutlich weiteren Lektinen mit ähnlicher Kohlenhydratspezifität wie Rizin und Abrin [212]. Zusätzlich wiesen wir für Claudin-4 eine Bindung an TcdA nach (Untersuchung im ELISA, Abbildung 64), sodass die Immobilisierung dieser endogenen Rezeptoren auf verschiedenen Positionen ein und desselben Biochips nicht zum simultanen Nachweis der biologischen Toxine geeignet ist. Insgesamt bergen diese Kreuzreaktivitäten ein erhebliches Risiko für falsch positive Ergebnisse.

Die Entwicklung Rezeptor-basierter Nachweissysteme voranzutreiben, lag maßgeblich in der Annahme begründet, dass strukturell verschiedene Subtypen aufgrund der konservierter Bindungstaschen zwar von ihren endogenen Rezeptoren, nicht aber von hochspezifischen monoklonalen Antikörpern erkannt werden (Kapitel 1.4). In unserem speziellen Fall stellte sich für die verschiedenen Subtypen der Shigatoxine heraus,

dass sowohl oligoklonale Mischungen monoklonaler Antikörper als auch Gb3/GalCer-Nanodisks einen breitbandigen Nachweis gewährleisten (siehe 4.4).

Basierend auf den erläuterten Eigenschaften der Antikörper- und Rezeptor-basierten Nachweise (Tabelle 49) kamen wir deshalb zu dem Schluss, dass für eine zuverlässige Differentialdiagnostik von Rizintoxikationen in Form einer Multiplex-Detektion der Einsatz von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegenüber den endogenen Rezeptoren zu bevorzugen ist. Auf diese Weise gelang für alle adressierten Toxine ein sensitiver und spezifischer Vor-Ort-Nachweis, der trotzdem eine breitbandige Detektion gewährleistet. Diese Antikörper-basierte Detektion im pBDi-System liefert innerhalb von 20 Minuten Messzeit pro Probe die nötigen Informationen, um gezielt die etablierten stationären Rezeptor- und Antikörper-basierten Nachweise einzusetzen.

Tabelle 49: Vergleich der etablierten Assays.

Assay Kriterium	mAk-basiert	Rezeptor-basiert		
Toxin/e	Rizin (R), Abrin (A), Stx1, Stx2, CPE, Etx	CPE	Rizin & Abrin	Stx1 & Stx2
Fänger	R: R21 A: AP430 Stx1: 13C4 Stx2: 1E1* CPE: CPE1 Etx: Etx444	Claudin-4	Asialofetuin	Gb3/GalCer-NDs
Detektor-mAk	R: R21 A: AP430 Stx1: MBS34 + 3C10 Stx2: 11E10 + BB12 CPE: CPE562 Etx: Etx484	CPE562	R: R18 A: AP3202	Stx1: 13C4 Stx2: 1E1 + 11E10
Stabilität	gut	gut	gut	gut in NDs
Immobilisierung	in Lsg. und auf Biochips	in Lsg. und auf Biochips mit angepasstem Detergenz	in Lsg. und auf Biochips	nur in NDs
Plattform	ELISA, pBDi	ELISA, pBDi	ELISA, pBDi	ELISA
Kreuzreaktivität	R, A: Agglutinine	TcdA	Agglutinine, weitere Lektine**	keine
Breitbandigkeit	R; A: n.b. Stx1, Stx2: gut	nicht relevant	n.b.	gut
ELISA Sensitivität pBDi	0,2-38 pg/ml	1 pg/ml	R: 7 pg/ml A: 730 pg/ml	Stx1: 19 pg/ml Stx2: 15 pg/ml
	1 ng/ml	1 ng/ml	R: 1 ng/ml A: n.n.	n.n.

A = Abrin; pBDi = portable BioDetector integrated; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; GalCer = Galaktosylceramid; Lsg. = Lösung; mAk = monoklonaler Antikörper; n.b. = nicht bestimmt; NDs = Nanodisks; n.n. = nicht nachweisbar; R = Rizin; RKI = Robert Koch-Institut

*für den Nachweis im pBDi-System diente MBS36 als Fängerantikörper

**TcdA (Abbildung 49), Komplexproteine von Botulinum Neurotoxin [254], weitere Lektine angenommen aufgrund ähnlicher Bindungsmotive [212]

4.6 Vor-Ort-Nachweise schaffen die Entscheidungsgrundlage für die stationäre Analytik

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, sowohl Antikörper- als auch Rezeptor-basierte Nachweissysteme zu etablieren. Über den stationären Einsatz in Form Platten-basierter ELISA wurden die Nachweise auch in der Vor-Ort-Detektionsplattform pBDi erprobt. Nachdem sich monoklonale Antikörper trotz ihrer hohen Spezifität nach einer umfassenden Evaluation auf einer Palette an Subtypen für eine breitbandige Detektion der adressierten Toxine (insbesondere der Shigatoxine) als Fängerstrukturen bewährten (Detektion im ELISA, Tabelle 32 für Stx1 und Tabelle 33 für Stx2), soll auf Basis dieser monoklonalen Antikörper ein zukünftiger Multiplex-Nachweis für die Differentialdiagnostik von Rizinintoxikationen etabliert werden. Zurückliegende intentionale Ausbringungsversuche mit biologischen Toxinen zeigten, dass bioterroristische Szenarien ein planmäßiges Vorgehen hinsichtlich der Analytik von Verdachtsproben erfordern. Eine fundierte Beurteilung stützt sich auf eine schnelle Einschätzung der Gefahrenlage durch Vor-Ort-Nachweise und eine umfangreiche stationäre Bestätigungsanalytik. Abbildung 44 beschreibt ein solches Vorgehen und zeigt auf, welche Fortschritte mit der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Differentialdiagnostik von Rizinintoxikationen erzielt worden sind (grüne Kästen).

Kommt es in der Bevölkerung zu einem gehäuften Auftreten von blutigen Durchfällen mit Leukozyten im Stuhl, muss schnellstmöglich die Ursache dafür gefunden werden. Insbesondere gilt es zu unterscheiden, ob ein natürliches Krankheitsgeschehen oder ein bioterroristischer Anschlag mit Ausbringung von Rizin in Betracht zu ziehen ist. Für eine erste Einschätzung der Gefahrenlage vor Ort erfolgt zunächst eine Vorauswahl der relevantesten, zu messenden Verdachtsproben durch die zuständigen Einsatzkräfte. Hier kommen z.B. klinische Proben von Patienten mit starken Symptomen oder im Fall eines bioterroristischen Szenarios verdächtige, potenziell stark kontaminierte Proben in Frage. Für diese erste Einordnung des Geschehens könnte zukünftig der Antikörper-basierte Biochip für den simultanen Nachweis von Rizin, Abrin, Stx1, Stx2, CPE und Etx zum Einsatz kommen. Bislang stehen auf Basis dieser Arbeit im pBDi-System die Nachweise der adressierten Toxine als Einzelnachweise zur Verfügung. Diese Einzelnachweise müssen zukünftig in einen Multiplex-Nachweis überführt und dieser validiert werden.

Mit dem pBDi steht technisch ein robustes Vor-Ort-Detektionssystem zur Verfügung. Diese Multiplex-Detektion ermöglicht es, unter Einsatz geringer Probenvolumen innerhalb von 20 Minuten eine breitbandige, sensitive Differentialdiagnostik von Rizinintoxikationen durchzuführen. Das pBDi zeichnet sich insbesondere durch seine Multiplexfähigkeit gegenüber anderen Testsystemen zum Einzelnachweis wie z.B. LFAs [255] aus. Konkurrenzfähige Systeme liegen nach unseren Erkenntnissen nur in Form von mikrofluidischen Messscheiben [245] vor, die allerdings nicht für die Diagnostik des für uns relevanten Panels an Toxinen etabliert wurden.

Nachdem eine Verdachtsprobe mit Hilfe von Vor-Ort-Nachweissystemen geprüft wurde und erste Hinweise auf das krankheitsauslösende Agens vorliegen, können von einem Expertenlabor zielgerichtet stationäre Nachweise zur Verifizierung durchgeführt werden. Zu diesem Zweck kommen die stationären

Nachweismethoden zum Einsatz, mit denen eine sichere Bestätigung der Ergebnisse möglich ist. Hier eignen sich vor allem hochsensitive Verfahren, die geringste Mengen der biologischen Toxine detektieren. Des Weiteren müssen diese Methoden einen breitbandigen Nachweis ermöglichen, um alle Subtypen/Isoformen zu erfassen. Rizin und Abrin könnten durch die schon existierenden Sandwich-ELISA zuverlässig detektiert werden (Tabelle 23 und [98, 115]). Für die Shigatoxine und CPE stellen in dieser Hinsicht die in dieser Arbeit etablierten, breitbandigen Rezeptor-basierten Nachweise auf der Grundlage von Gb3/GalCer-Nanodisks bzw. Claudin-4 eine gute Alternative zu klassischen Sandwich-ELISA dar (Tabelle 31 für Stx1 und Stx2, Tabelle 39 für CPE). Für Etx gelang es, klassische hochsensitive Sandwich-ELISA zu entwickeln (Tabelle 45). Nach diesen ersten Ergebnissen folgt eine umfassende Charakterisierung der Verdachtsprobe. Um das Ausmaß der Exposition abzuschätzen, ist eine Quantifizierung der enthaltenen Toxine notwendig. Hierzu eignen sich zum Beispiel Sandwich-ELISA. Neben den Rezeptor-basierten ELISA stehen für den Nachweis der Shigatoxine und CPE die hier etablierten Sandwich-ELISA auf der Basis der kommerziellen (Stx1 und Stx2) bzw. der selbst generierten monoklonalen Antikörper (CPE) bereit (Tabelle 31 für Stx1 und Stx2, Tabelle 39 für CPE). Die biologische Aktivität des ausgebrachten Toxins kann mit Hilfe funktioneller Methoden ermittelt werden. Zu diesem Zweck können alle adressierten Toxine in zellbasierten Zytotoxizitätsassays untersucht werden [98, 173, 256, 257]. Für Rizin, Abrin und die Shigatoxine stehen zudem funktionelle MS-basierte Methoden bereit [258, 259]. Abschließend kann die Probe auf ihre Zusammensetzung bzw. weitere Bestandteile geprüft werden. Aufschluss kann hier eine gelelektrophoretische Trennung des Materials geben. Für eine Differenzierung der Rizin- bzw. Abrin-Isoformen und eine Abgrenzung von den homologen Agglutininen kommt eine MS-basierten Analytik in Frage [196, 253]. Nicht zuletzt können die Verdachtsproben auch mit molekularbiologischen Verfahren wie PCR analysiert werden.

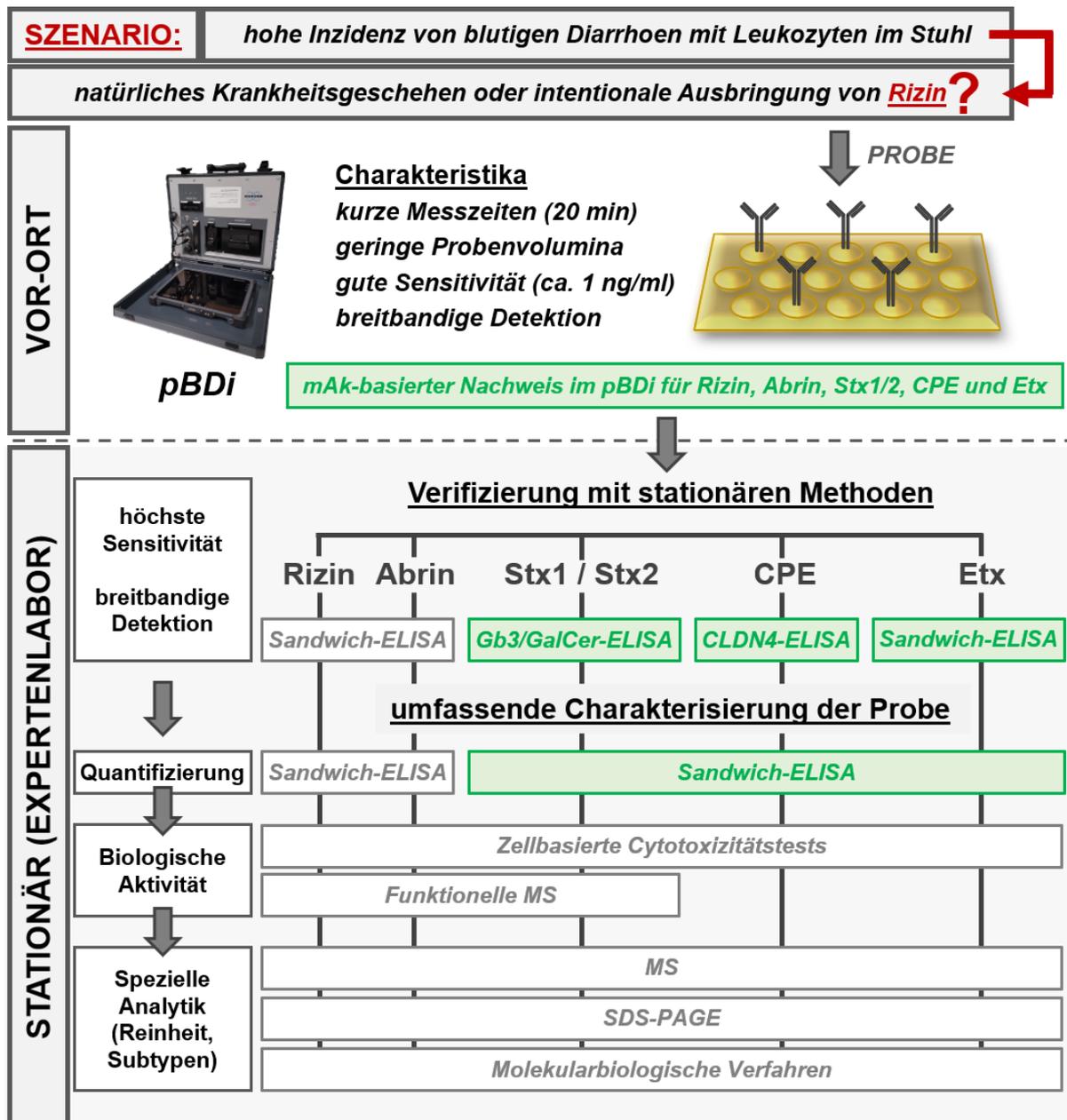


Abbildung 44: Strategie zum Nachweis von Rizinintoxikationen samt Differentialdiagnostik.

Nach einem gehäuftem Auftreten von blutigen Diarrhöen mit Leukozyten im Stuhl führen Einsatzkräfte mit ausgewählten, repräsentativen Proben einen Vor-Ort-Nachweis mit Hilfe des pBDi durch. Hierzu dient der etablierte Biochip mit toxinspezifischen monoklonalen Antikörpern. Nach diesen ersten Ergebnissen wird die Probe in ein Expertenlabor transportiert. Hier können auf der Grundlage der Ergebnisse des Vor-Ort-Nachweises gezielt stationäre Nachweismethoden für die Verifizierung durchgeführt werden. Anschließend erfolgt eine weiterführende Charakterisierung der Verdachtsprobe. Diese haben zum Ziel, enthaltene Agenzien zu quantifizieren, ihre biologische Aktivität zu bestimmen und die genaue Zusammensetzung der Probe zu ermitteln. Grüne Kästen markieren die in dieser Arbeit neu etablierten Nachweissysteme zur Differentialdiagnostik von Rizinintoxikationen.

4.7 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit implementierten Vor-Ort-Nachweise der adressierten biologischen Toxine wurden bisher in Form von Einzelnachweisen durchgeführt. Die Umsetzung des auf toxinspezifischen monoklonalen Antikörpern basierenden Multiplex-Nachweises in der pBDi-Plattform steht noch aus. Da in vorherigen Forschungsprojekten die Entwicklung von Biochips zum simultanen Nachweis von SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin [115] bzw. SEB, BoNT/A, /B, /F und Rizin [260] auf der Basis von monoklonalen Antikörpern gelang, wird erwartet, dass auch hier ein Multiplex-Nachweis umsetzbar sein wird.

In der Etablierungsphase erfolgte der Nachweis der Toxine sowohl in stationären als auch mobilen Detektionssystemen aus Puffer. Trotz ihrer hohen Spezifität sind Matrixinterferenzen auch für monoklonale Antikörper denkbar. So kann zum Beispiel Serum, welches humane anti-Maus Antikörper (HAMA) enthält, den Nachweis mit murinen Antikörpern stören (Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe). Der Rezeptor-basierte Nachweis von Rizin und Abrin auf der Basis der Lektinbindung an Asialofetuin verliert dagegen deutlich an Sensitivität, wenn die Toxine in glykanhaltigen Matrices wie Milch vorliegen (diese Arbeit: Abbildung 15, Literatur: [213, 214]). Diese Beispiele zeigen, dass sowohl Rezeptor-basierte als auch Antikörper-basierte Nachweise auf die Interferenz mit Matrixbestandteilen hin überprüft werden müssen. Zu diesem Zweck sollten neben Umwelt- und Lebensmittelproben auch klinische Proben wie Serum und für die angestrebte Differentialdiagnostik insbesondere Stuhl getestet werden.

Zur Breitbandigkeit von Nachweissystemen konnten im Rahmen dieser Arbeit erste Erkenntnisse hinsichtlich der Detektion von Shigatoxinen gewonnen werden. Ein wichtiger Schritt für weiterführende Untersuchungen ist die rekombinante Herstellung bzw. die Reinigung der einzelnen Shigatoxin-Subtypen aus nativen Bakterienlysaten. Hiermit können sowohl die Gb3/GalCer-Nanodisks als auch die monoklonalen Antikörper in Bezug auf ihre Affinitäten zu den einzelnen Subtypen charakterisiert werden. Mit diesen Informationen ließe sich die Zusammensetzung der Nanodisks so optimieren, dass möglichst viele Subtypen hochaffin gebunden werden. Eine breitbandigere Subtyperkennung von monoklonalen Antikörpern könnte zum Beispiel mit Hilfe einer Affinitätsreifung gegenüber verschiedenen Subtypen im Rahmen des Hefe-Displays erzielt werden. Eine derartige Optimierung von Antikörpern zeigten Garcia-Rodriguez *et al.* für die Detektion der Subtypen A1 und A2 der Botulinum Neurotoxine [261]. Darüber hinaus könnte die Generierung von panreaktiven Antikörpern angestrebt werden, indem Mäuse parallel mit verschiedenen Subtypen der Shigatoxine immunisiert werden. Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich im Rahmen der Dissertation von Melanie Schulz für die Herstellung panreaktiver Antikörper gegen ein hochkonserviertes Epitop der nichttoxischen Nicht-Hämagglutinin Proteine (NTNH) eingesetzt, die Teil der Botulinum Neurotoxin Komplexe sind [262]. Nicht zuletzt wäre auch der Einsatz von polyklonalen Antikörpern theoretisch denkbar, da diese im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern nicht monospezifisch sind und eine große Bandbreite an Epitopen abdecken können. Allerdings zeigen Erfahrungen aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass polyklonale Antikörper in der Regel viele Kreuzreaktivitäten zu realen Probenmatrices zeigen, sodass falsch positive Ergebnisse resultieren können.

Abgesehen von einem breiteren Detektionsspektrum könnten sich endogene Rezeptoren für die Erforschung funktioneller Nachweismethoden bewähren. Der in dieser Arbeit etablierte ELISA mit Claudin-4 als Fängerstruktur wurde bisher nicht dahingehend geprüft, ob eine Korrelation mit der biologischen Aktivität von CPE besteht. In weiterführenden Testungen sollte analysiert werden, ob Claudin-4 ausschließlich aktives CPE bindet und ob in dieser Hinsicht Vorteile gegenüber monoklonalen Antikörpern bestehen. Darüber hinaus ließen sich auf der Basis endogener Rezeptoren bifunktionelle Assays entwickeln. Bei diesen Verfahren erfolgt zunächst eine Anreicherung des Toxin über seinen endogenen Rezeptor und anschließend wird die enzymatische Aktivität des Toxins für den Nachweis untersucht. Solche Assays waren zum Beispiel Gegenstand der Dissertation von Laura von Berg, in der auf dieser Basis ein bifunktionaler Nachweis für die Botulinum Neurotoxine A und B etabliert wurde [263]. Sun *et al.* wiesen aktives Rizin nach, indem sie die Lektinbindung der B-Kette und die Depurinierung durch die enzymatisch aktive A-Kette funktionalisierten [264]. Aufgrund ihrer identischen Funktionsweise könnten auch Abrin und die Shigatoxine mit Hilfe bifunktionaler Assays nachgewiesen werden.

Insgesamt gelang es im Rahmen dieser Arbeit, sowohl Antikörper- als auch Rezeptor-basierte Nachweise für eine Palette an differentialdiagnostisch zu Rizinintoxikationen relevanten Toxinen zu etablieren. Auf der Basis von monoklonalen Antikörpern wird zukünftig ein Vor-Ort-Nachweis bereitstehen, der eine differentialdiagnostische Abgrenzung von Intoxikationen mit Rizin zu den hier adressierten Toxinen Abrin, Stx1, Stx2, CPE und Etx ermöglicht. Des Weiteren gelang die Entwicklung innovativer Detektionsverfahren auf der Basis von endogenen Rezeptoren.

5 Literaturverzeichnis

1. Dorner, B.G., et al., *Biological toxins of potential bioterrorism risk: Current status of detection and identification technology*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **85**: p. 89-102.
2. Ghorani-Azam, A., et al., *Plant toxins and acute medicinal plant poisoning in children: A systematic literature review*. Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, 2018. **23**: p. 26-26.
3. Alhamdani, M., B. Brown, and P. Narula, *Abrin poisoning in an 18-month-old child*. The American journal of case reports, 2015. **16**: p. 146-148.
4. Stillmark, H., *MD Thesis*. University of Dorpat, 1888.
5. Olsnes, S., *The history of ricin, abrin and related toxins*. Toxicon, 2004. **44**(4): p. 361-370.
6. Audi, J., et al., *Ricin poisoning: a comprehensive review*. Jama, 2005. **294**(18): p. 2342-51.
7. Dickers, K.J., et al., *Abrin poisoning*. Toxicological reviews, 2003. **22**(3): p. 137-142.
8. Arianti, V. *Biological Terrorism in Indonesia*. 2019; Available from: <https://thediplomat.com/2019/11/biological-terrorism-in-indonesia/>.
9. *Federal Select Agent Program*. 2017; Available from: <https://www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html>.
10. Weapons, O.f.t.P.o.C. *Annex on Chemicals, Schedule 1*. Available from: <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annexes/annex-chemicals/schedule-1>.
11. Group, T.A. *List of Human and Animal Pathogens and Toxins for Export Control*. 2017; Available from: https://australiagroup.net/en/human_animal_pathogens.html.
12. Brynestad, S. and P.E. Granum, *Clostridium perfringens and foodborne infections*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **74**(3): p. 195-202.
13. Palermo, M.S., R.A. Exeni, and G.C. Fernández, *Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions*. Expert review of anti-infective therapy, 2009. **7**(6): p. 697-707.
14. Lin, J.-Y., et al., *Effect of Crystalline Ricin on the Biosynthesis of Protein, RNA, and DNA in Experimental Tumor Cells*. Cancer Research, 1971. **31**(7): p. 921-924.
15. Lin, J.-Y., et al., *Effect of Crystalline Abrin on the Biosynthesis of Protein, RNA, and DNA in Experimental Tumors*. Cancer Research, 1970. **30**(9): p. 2431-2433.
16. Olsnes, S. and A. Pihl, *Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis*. Biochemistry, 1973. **12**(16): p. 3121-6.
17. Olsnes, S. and A. Pihl, *Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains*. European journal of biochemistry, 1973. **35**(1): p. 179-185.
18. van Deurs, B., et al., *The ways of endocytosis*. International review of cytology, 1989. **117**: p. 131-177.
19. Wu, J.H., et al., *Recognition intensities of submolecular structures, mammalian glyco-structural units, ligand cluster and polyvalency in abrin-a-carbohydrate interactions*. Biochimie, 2010. **92**(2): p. 147-156.
20. van Deurs, B., et al., *Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex*. The Journal of cell biology, 1986. **102**(1): p. 37-47.

21. Endo, Y., et al., *The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins.* The Journal of biological chemistry, 1987. **262**(12): p. 5908-5912.
22. Olsnes, S., K. Refsnes, and A. Pihl, *Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin.* Nature, 1974. **249**(458): p. 627-631.
23. Melton-Celsa, A.R., *Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function.* Microbiology spectrum, 2014. **2**(4): p. 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013-2013.
24. Fan, E., et al., *AB(5) toxins: structures and inhibitor design.* Current opinion in structural biology, 2000. **10**(6): p. 680-686.
25. Legros, N., et al., *Shiga toxin-glycosphingolipid interaction: Status quo of research with focus on primary human brain and kidney endothelial cells.* Int J Med Microbiol, 2018. **308**(8): p. 1073-1084.
26. Sandvig, K., et al., *Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum.* Nature, 1992. **358**(6386): p. 510-512.
27. Endo, Y., et al., *Site of action of a Vero toxin (VT2) from Escherichia coli O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins.* European journal of biochemistry, 1988. **171**(1-2): p. 45-50.
28. Kruger, A. and P.M. Lucchesi, *Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities.* Microbiology, 2015. **161**(Pt 3): p. 451-62.
29. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.* Clinical microbiology reviews, 1998. **11**(1): p. 142-201.
30. Schüller, S., *Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium.* Toxins, 2011. **3**(6): p. 626-639.
31. Heiman, K.E., et al., *Escherichia coli O157 Outbreaks in the United States, 2003-2012.* Emerging infectious diseases, 2015. **21**(8): p. 1293-1301.
32. Barton Behravesh, C., et al., *Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2005.* The Journal of infectious diseases, 2011. **204**(2): p. 263-267.
33. Tarr, P.I., C.A. Gordon, and W.L. Chandler, *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome.* The Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1073-1086.
34. Grass, J.E., L.H. Gould, and B.E. Mahon, *Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by Clostridium perfringens, United States, 1998-2010.* Foodborne Pathog Dis, 2013. **10**(2): p. 131-6.
35. Carman, R.J., et al., *Clostridium perfringens toxin genotypes in the feces of healthy North Americans.* Anaerobe, 2008. **14**(2): p. 102-8.
36. Podobnik, M., M. Kisovec, and G. Anderluh, *Molecular mechanism of pore formation by aerolysin-like proteins.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2017. **372**(1726).
37. Briggs, D.C., et al., *Structure of the food-poisoning Clostridium perfringens enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins.* J Mol Biol, 2011. **413**(1): p. 138-49.
38. Mitchell, L.A. and M. Koval, *Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins.* Toxins (Basel), 2010. **2**(7): p. 1595-611.
39. Koval, M., *Claudins--key pieces in the tight junction puzzle.* Cell Commun Adhes, 2006. **13**(3): p. 127-38.
40. Ivie, S.E., et al., *Gene-trap mutagenesis identifies mammalian genes contributing to intoxication by Clostridium perfringens epsilon-toxin.* PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17787.

41. Ivie, S.E. and M.S. McClain, *Identification of amino acids important for binding of Clostridium perfringens epsilon toxin to host cells and to HAVCR1*. *Biochemistry*, 2012. **51**(38): p. 7588-95.
42. Rumah, K.R., et al., *The Myelin and Lymphocyte Protein MAL Is Required for Binding and Activity of Clostridium perfringens epsilon-Toxin*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(5): p. e1004896.
43. Rood, J.I., et al., *Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme*. *Anaerobe*, 2018. **53**: p. 5-10.
44. Lindstrom, M., et al., *Novel insights into the epidemiology of Clostridium perfringens type A food poisoning*. *Food Microbiol*, 2011. **28**(2): p. 192-8.
45. Sarker, M.R., R.J. Carman, and B.A. McClane, *Inactivation of the gene (cpe) encoding Clostridium perfringens enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive C. perfringens type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops*. *Mol Microbiol*, 1999. **33**(5): p. 946-58.
46. Li, J., et al., *Organization of the cpe locus in CPE-positive clostridium perfringens type C and D isolates*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e10932.
47. Bos, J., et al., *Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic Clostridium perfringens type A infection*. *Clin Infect Dis*, 2005. **40**(10): p. e78-83.
48. *Fatal foodborne Clostridium perfringens illness at a state psychiatric hospital--Louisiana, 2010*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2012. **61**(32): p. 605-8.
49. Mantis, N.J., *Vaccines against the category B toxins: Staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. **57**(9): p. 1424-39.
50. Filho, E.J., et al., *Clinicopathologic features of experimental Clostridium perfringens type D enterotoxemia in cattle*. *Vet Pathol*, 2009. **46**(6): p. 1213-20.
51. Garcia, J.P., et al., *Epsilon toxin is essential for the virulence of Clostridium perfringens type D infection in sheep, goats, and mice*. *Infect Immun*, 2013. **81**(7): p. 2405-14.
52. Nagahama, M. and J. Sakurai, *Distribution of labeled Clostridium perfringens epsilon toxin in mice*. *Toxicon*, 1991. **29**(2): p. 211-7.
53. Uzal, F.A. and J.G. Songer, *Diagnosis of Clostridium perfringens intestinal infections in sheep and goats*. *J Vet Diagn Invest*, 2008. **20**(3): p. 253-65.
54. Mullis, K.B., *Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 1990. **48**(8): p. 579-82.
55. Lim, D.V., et al., *Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare*. *Clin Microbiol Rev*, 2005. **18**(4): p. 583-607.
56. Markoulatos, P., N. Siafakas, and M. Moncany, *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach*. *J Clin Lab Anal*, 2002. **16**(1): p. 47-51.
57. Yeh, K.B., et al., *Molecular Detection of Biological Agents in the Field: Then and Now*. *mSphere*, 2019. **4**(6).
58. Patel, I.R., et al., *FDA Escherichia coli Identification (FDA-ECID) Microarray: a Pangenome Molecular Toolbox for Serotyping, Virulence Profiling, Molecular Epidemiology, and Phylogeny*. *Appl Environ Microbiol*, 2016. **82**(11): p. 3384-3394.
59. Miyamoto, K., J. Li, and B.A. McClane, *Enterotoxigenic Clostridium perfringens: detection and identification*. *Microbes Environ*, 2012. **27**(4): p. 343-9.
60. Mahamat Abdelrahim, A., et al., *Large-Scale Genomic Analyses and Toxinotyping of Clostridium perfringens Implicated in Foodborne Outbreaks in France*. *Front Microbiol*, 2019. **10**: p. 777.

61. Newell, D.G. and R.M. La Ragione, *Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies?* Transbound Emerg Dis, 2018. **65 Suppl 1**: p. 49-71.
62. Karch, H., et al., *Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages.* Mol Gen Genet, 1999. **262**(4-5): p. 600-7.
63. Duncan, C.L., D.H. Strong, and M. Sebold, *Sporulation and enterotoxin production by mutants of Clostridium perfringens.* J Bacteriol, 1972. **110**(1): p. 378-91.
64. Layana, J.E., M.E. Fernandez Miyakawa, and F.A. Uzal, *Evaluation of different fluids for detection of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in sheep with experimental enterotoxemia.* Anaerobe, 2006. **12**(4): p. 204-6.
65. Li, J., et al., *Toxin plasmids of Clostridium perfringens.* Microbiol Mol Biol Rev, 2013. **77**(2): p. 208-33.
66. Sarker, M.R., et al., *Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of Clostridium perfringens isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes.* Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(8): p. 3234-40.
67. Fodstad, Ø., et al., *Toxicity of abrin and ricin in mice and dogs.* Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues, 1979. **5**(6): p. 1073-1084.
68. Tam, C.C., et al., *Abrin Toxicity and Bioavailability after Temperature and pH Treatment.* Toxins, 2017. **9**(10): p. 320.
69. Richardson, S.E., et al., *Experimental verocytotoxemia in rabbits.* Infect Immun, 1992. **60**(10): p. 4154-67.
70. Yoshimura, K., et al., *Effects of Shiga toxin 2 on lethality, fetuses, delivery, and puerperal behavior in pregnant mice.* Infection and immunity, 2000. **68**(4): p. 2254-2258.
71. Sugimoto, N., et al., *Pathodynamics of intoxication in rats and mice by enterotoxin of Clostridium perfringens type A.* Toxicol, 1991. **29**(6): p. 751-9.
72. Minami, J., et al., *Lambda-toxin of Clostridium perfringens activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides.* Microbiol Immunol, 1997. **41**(7): p. 527-35.
73. Barnewall, R.E., et al., *Biochemical and aerosol characterization of ricin for use in non-clinical efficacy studies.* J Biochem Mol Toxicol, 2017. **31**(12).
74. Garber, E.A., *Toxicity and detection of ricin and abrin in beverages.* J Food Prot, 2008. **71**(9): p. 1875-83.
75. Tesh, V.L., et al., *Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice.* Infect Immun, 1993. **61**(8): p. 3392-402.
76. Skjelkvålé, R. and C.L. Duncan, *Characterization of enterotoxin purified from Clostridium perfringens type C.* Infection and immunity, 1975. **11**(5): p. 1061-1068.
77. Russo, L.M., A.R. Melton-Celsa, and A.D. O'Brien, *Shiga Toxin (Stx) Type 1a Reduces the Oral Toxicity of Stx Type 2a.* The Journal of infectious diseases, 2016. **213**(8): p. 1271-1279.
78. Sayeed, S., et al., *Epsilon-toxin is required for most Clostridium perfringens type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model.* Infection and immunity, 2005. **73**(11): p. 7413-7421.
79. Araki, T. and G. Funatsu, *The complete amino acid sequence of the B-chain of ricin E isolated from small-grain castor bean seeds. Ricin E is a gene recombination product of ricin D and Ricinus communis agglutinin.* Biochim Biophys Acta, 1987. **911**(2): p. 191-200.

80. Ladin, B.F., et al., *Characterization of a cDNA encoding ricin E, a hybrid ricin-Ricinus communis agglutinin gene from the castor plant Ricinus communis*. Plant molecular biology, 1987. **9**(3): p. 287-295.
81. Mise, T., et al., *Isolation and characterization of ricin E from castor beans*. Agricultural and Biological Chemistry, 1977. **41**(10): p. 2041-2046.
82. Lin, J.Y., et al., *Isolation of four isotoxic proteins and one agglutinin from jequiriti bean (Abrus precatorius)*. Toxicon, 1981. **19**(1): p. 41-51.
83. Hung, C.H., et al., *Cloning and expression of three abrin A-chains and their mutants derived by site-specific mutagenesis in Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1994. **219**(1-2): p. 83-7.
84. Scheutz, F., et al., *Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(9): p. 2951-63.
85. Probert, W.S., C. McQuaid, and K. Schrader, *Isolation and identification of an Enterobacter cloacae strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(7): p. 2346-51.
86. Bai, X., et al., *Identification and pathogenomic analysis of an Escherichia coli strain producing a novel Shiga toxin 2 subtype*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 6756.
87. Lacher, D.W., et al., *Use of the Escherichia coli identification microarray for characterizing the health risks of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from foods*. Journal of food protection, 2016. **79**(10): p. 1656-1662.
88. Hughes, A.C., et al., *Structural and Functional Characterization of Stx2k, a New Subtype of Shiga Toxin 2*. Microorganisms, 2019. **8**(1).
89. Miyamoto, K., et al., *Identification of novel Clostridium perfringens type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20376.
90. Skinner, C., et al., *New Monoclonal Antibodies against a Novel Subtype of Shiga Toxin 1 Produced by Enterobacter cloacae and Their Use in Analysis of Human Serum*. mSphere, 2016. **1**(1).
91. Soborg, B., et al., *A verocytotoxin-producing E. coli outbreak with a surprisingly high risk of haemolytic uraemic syndrome, Denmark, September-October 2012*. Euro Surveill, 2013. **18**(2).
92. Fruth, A., et al., *Molecular epidemiological view on Shiga toxin-producing Escherichia coli causing human disease in Germany: Diversity, prevalence, and outbreaks*. Int J Med Microbiol, 2015. **305**(7): p. 697-704.
93. Delannoy, S., et al., *Characteristics of emerging human-pathogenic Escherichia coli O26:H11 strains isolated in France between 2010 and 2013 and carrying the stx2d gene only*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(2): p. 486-92.
94. De Rauw, K., S. Jacobs, and D. Pierard, *Twenty-seven years of screening for Shiga toxin-producing Escherichia coli in a university hospital. Brussels, Belgium, 1987-2014*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0199968.
95. Prager, R., et al., *Escherichia coli encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen*. Int J Med Microbiol, 2009. **299**(5): p. 343-53.
96. Mellmann, A., et al., *Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic Escherichia coli*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(8): p. 1287-90.
97. Avrameas, S., *Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies*. Immunochemistry, 1969. **6**(1): p. 43-52.

98. Pauly, D., et al., *Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay*. Analyst, 2009. **134**(10): p. 2028-39.
99. Garber, E.A., K.V. Venkateswaran, and T.W. O'Brien, *Simultaneous multiplex detection and confirmation of the proteinaceous toxins abrin, ricin, botulinum toxins, and Staphylococcus enterotoxins a, B, and C in food*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(11): p. 6600-7.
100. Clotilde, L.M., et al., *Microbead-based immunoassay for simultaneous detection of Shiga toxins and isolation of Escherichia coli O157 in foods*. J Food Prot, 2011. **74**(3): p. 373-9.
101. He, X., et al., *Development of a novel immuno-PCR assay for detection of ricin in ground beef, liquid chicken egg, and milk*. J Food Prot, 2010. **73**(4): p. 695-700.
102. Zhang, W., et al., *New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of shiga toxin 2 and its variants*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(4): p. 1292-7.
103. Liu, X., et al., *Rapid detection of abrin in foods with an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34926.
104. Ching, K.H., et al., *Detection of shiga toxins by lateral flow assay*. Toxins (Basel), 2015. **7**(4): p. 1163-73.
105. Feraudet-Tarisse, C., et al., *Highly sensitive sandwich immunoassay and immunochromatographic test for the detection of Clostridial epsilon toxin in complex matrices*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0181013.
106. Simon, S., et al., *Recommended Immunological Assays to Screen for Ricin-Containing Samples*. Toxins (Basel), 2015. **7**(12): p. 4967-86.
107. Prigent, J., et al., *Neutralising antibodies against ricin toxin*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20166.
108. Maddaloni, M., et al., *Immunological characteristics associated with the protective efficacy of antibodies to ricin*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6221-8.
109. Simonova, M.A., et al., *Development of xMAP assay for detection of six protein toxins*. Anal Chem, 2012. **84**(15): p. 6326-30.
110. Brigotti, M., et al., *Effect of alpha-sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes*. Biochem J, 1989. **257**(3): p. 723-7.
111. Ling, J., W.Y. Liu, and T.P. Wang, *Radioassay for RNA N-Glycosidase with Tritium-Labeled Sodium Borohydride or Amino Acid*. Bioorganic Chemistry, 1994. **22**(4): p. 395-404.
112. Sturm, M.B. and V.L. Schramm, *Detecting Ricin: Sensitive Luminescent Assay for Ricin A-Chain Ribosome Depurination Kinetics*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(8): p. 2847-2853.
113. Lubelli, C., et al., *Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay*. Anal Biochem, 2006. **355**(1): p. 102-9.
114. Fulton, R.E. and H.G. Thompson, *Fluorogenic hand-held immunoassay for the identification of ricin: rapid analyte measurement platform*. J Immunoassay Immunochem, 2007. **28**(3): p. 227-41.
115. Hansbauer, E.M., *Stationäre und mobile Verfahren zur Detektion und Differenzierung biologischer Toxine, in Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2016, Freie Universität Berlin. p. 204.
116. He, X., et al., *Novel monoclonal antibodies against Stx1d and 1e and their use for improving immunoassays*. J Immunol Methods, 2017. **447**: p. 52-56.
117. Tam, C.C., et al., *A Monoclonal-Monoclonal Antibody Based Capture ELISA for Abrin*. Toxins (Basel), 2017. **9**(10).

118. Keener, W.K., et al., *An activity-dependent assay for ricin and related RNA N-glycosidases based on electrochemiluminescence*. Anal Biochem, 2006. **357**(2): p. 200-7.
119. Gao, S., et al., *Colloidal gold-based immunochromatographic test strip for rapid detection of abrin in food samples*. J Food Prot, 2012. **75**(1): p. 112-7.
120. Melli, L.J., et al., *Development and evaluation of a novel VHH-based immunocapture assay for high sensitivity detection of Shiga toxin type 2 (Stx2) in stool samples*. J Clin Microbiol, 2019.
121. He, X., et al., *A New Immunoassay for Detecting All Subtypes of Shiga Toxins Produced by Shiga Toxin-Producing E. coli in Ground Beef*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0148092.
122. Kong, Q., et al., *Validation of two new immunoassays for sensitive detection of a broad range of Shiga Toxins*. Austin Immunology, 2016.
123. Wang, J., et al., *Rapid Detection of Escherichia coli O157 and Shiga Toxins by Lateral Flow Immunoassays*. Toxins (Basel), 2016. **8**(4): p. 92.
124. Silva, M.A., et al., *Development and Validation of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Immunodiagnostic Assay*. Microorganisms, 2019. **7**(9).
125. McClane, B.A. and R.J. Strouse, *Rapid detection of Clostridium perfringens type A enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay*. J Clin Microbiol, 1984. **19**(2): p. 112-5.
126. Uemura, T., et al., *A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for Clostridium perfringens enterotoxin*. Lett Appl Microbiol, 1992. **15**(1): p. 23-5.
127. Das, S., et al., *A sandwich duplex immuno PCR for rapid and sensitive identification of Clostridium perfringens alpha and enterotoxin*. Anaerobe, 2019. **57**: p. 63-74.
128. McClane, B.A. and J.T. Snyder, *Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of Clostridium perfringens type A enterotoxin*. J Immunol Methods, 1987. **100**(1-2): p. 131-6.
129. el Idrissi, A.H. and G.E. Ward, *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Clostridium perfringens enterotoxemias*. Vet Microbiol, 1992. **31**(4): p. 389-96.
130. Nagahama, M., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol Lett, 1991. **68**(1): p. 41-4.
131. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
132. Foug, S.K., et al., *Production of functional human T-T hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982. **79**(23): p. 7484-7488.
133. Gustafson, I., *Investigating the interaction of the toxin ricin and its B-chain with immobilised glycolipids in supported phospholipid membranes by surface plasmon resonance*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **30**(1): p. 13-24.
134. Stine, R., M.V. Pishko, and C.L. Schengrund, *Comparison of glycosphingolipids and antibodies as receptor molecules for ricin detection*. Anal Chem, 2005. **77**(9): p. 2882-8.
135. Blome, M.C. and C.L. Schengrund, *Multivalent binding of ricin to bovine serum albumin-based neoglycoconjugates*. Toxicon, 2008. **51**(7): p. 1214-24.
136. Baenziger, J.U. and D. Fiete, *Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides*. J Biol Chem, 1979. **254**(19): p. 9795-9.
137. Ling, H., et al., *Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3*. Biochemistry, 1998. **37**(7): p. 1777-88.

138. Jacobson, J.M., et al., *The crystal structure of shiga toxin type 2 with bound disaccharide guides the design of a heterobifunctional toxin inhibitor*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 885-94.
139. Gallegos, K.M., et al., *Shiga toxin binding to glycolipids and glycans*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30368.
140. Karve, S.S. and A.A. Weiss, *Glycolipid binding preferences of Shiga toxin variants*. PloS one, 2014. **9**(7): p. e101173-e101173.
141. Shinoda, T., et al., *Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 33632.
142. Veshnyakova, A., et al., *On the interaction of Clostridium perfringens enterotoxin with claudins*. Toxins (Basel), 2010. **2**(6): p. 1336-56.
143. Wu, J.H., et al., *Recognition intensities of submolecular structures, mammalian glycostructural units, ligand cluster and polyvalency in abrin-a-carbohydrate interactions*. Biochimie, 2010. **92**(2): p. 147-56.
144. Tahirov, T.H., et al., *Crystal Structure of Abrin-a at 2.14 Å*. Journal of Molecular Biology, 1995. **250**(3): p. 354-367.
145. Rutenber, E., et al., *Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å*. Proteins, 1991. **10**(3): p. 240-50.
146. Montfort, W., et al., *The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å*. J Biol Chem, 1987. **262**(11): p. 5398-403.
147. Dill, K. and J.D. Olson, *Picogram detection levels of asialofetuin via the carbohydrate moieties using the light addressable potentiometric sensor*. Glycoconj J, 1995. **12**(5): p. 660-3.
148. Spiro, R.G. and V.D. Bhoyroo, *Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin*. J Biol Chem, 1974. **249**(18): p. 5704-17.
149. Jacewicz, M., et al., *Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide*. J Exp Med, 1986. **163**(6): p. 1391-404.
150. Lindberg, A.A., et al., *Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by Shigella dysenteriae type 1*. J Biol Chem, 1987. **262**(4): p. 1779-85.
151. Waddell, T., et al., *Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the Escherichia coli verocytotoxin 2*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **152**(2): p. 674-9.
152. DeGrandis, S., et al., *Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin*. J Biol Chem, 1989. **264**(21): p. 12520-5.
153. Chan, Y.S. and T.B. Ng, *Shiga toxins: from structure and mechanism to applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016. **100**(4): p. 1597-610.
154. Lingwood, C.A., et al., *Globotriaosyl ceramide receptor function – Where membrane structure and pathology intersect*. FEBS Letters, 2010. **584**(9): p. 1879-1886.
155. Fraser, M.E., et al., *Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from Escherichia coli O157:H7*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27511-7.
156. Soltyk, A.M., et al., *A mutational analysis of the globotriaosylceramide-binding sites of verotoxin VT1*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5351-9.
157. Falguieres, T., et al., *Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(8): p. 2453-68.
158. Kovbasnjuk, O., M. Edidin, and M. Donowitz, *Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 22): p. 4025-31.
159. Sezgin, E., et al., *The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(6): p. 361-374.

160. Krause, G., et al., *Structure and function of claudins*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 631-45.
161. Saitoh, Y., et al., *Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin*. Science, 2015. **347**(6223): p. 775-778.
162. Suzuki, H., et al., *Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions*. Science, 2014. **344**(6181): p. 304-307.
163. Mineta, K., et al., *Predicted expansion of the claudin multigene family*. FEBS Lett, 2011. **585**(4): p. 606-12.
164. Dorca-Arevalo, J., et al., *Binding of epsilon-toxin from Clostridium perfringens in the nervous system*. Vet Microbiol, 2008. **131**(1-2): p. 14-25.
165. Wioland, L., et al., *Epsilon toxin from Clostridium perfringens acts on oligodendrocytes without forming pores, and causes demyelination*. Cell Microbiol, 2015. **17**(3): p. 369-88.
166. Linden, J.R., et al., *Clostridium perfringens Epsilon Toxin Causes Selective Death of Mature Oligodendrocytes and Central Nervous System Demyelination*. mBio, 2015. **6**(3): p. e02513.
167. Miyata, S., et al., *Clostridium perfringens epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39463-8.
168. Gil, C., J. Dorca-Arevalo, and J. Blasi, *Clostridium Perfringens Epsilon Toxin Binds to Membrane Lipids and Its Cytotoxic Action Depends on Sulfatide*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140321.
169. Shimamoto, S., et al., *Changes in ganglioside content affect the binding of Clostridium perfringens epsilon-toxin to detergent-resistant membranes of Madin-Darby canine kidney cells*. Microbiol Immunol, 2005. **49**(3): p. 245-53.
170. Nagahama, M., et al., *Oligomerization of Clostridium perfringens epsilon-toxin is dependent upon membrane fluidity in liposomes*. Biochemistry, 2006. **45**(1): p. 296-302.
171. Shortt, S.J., R.W. Titball, and C.D. Lindsay, *An assessment of the in vitro toxicology of Clostridium perfringens type D epsilon-toxin in human and animal cells*. Hum Exp Toxicol, 2000. **19**(2): p. 108-16.
172. Fernandez Miyakawa, M.E., O. Zabal, and C. Silberstein, *Clostridium perfringens epsilon toxin is cytotoxic for human renal tubular epithelial cells*. Hum Exp Toxicol, 2011. **30**(4): p. 275-82.
173. Payne, D.W., et al., *Evaluation of a new cytotoxicity assay for Clostridium perfringens type D epsilon toxin*. FEMS Microbiol Lett, 1994. **116**(2): p. 161-7.
174. Blanch, M., et al., *The Cytotoxicity of Epsilon Toxin from Clostridium perfringens on Lymphocytes Is Mediated by MAL Protein Expression*. Mol Cell Biol, 2018. **38**(19).
175. Alonso, M.A. and S.M. Weissman, *cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(7): p. 1997-2001.
176. Schaeren-Wiemers, N., et al., *Characterization of a rat gene, rMAL, encoding a protein with four hydrophobic domains in central and peripheral myelin*. J Neurosci, 1995. **15**(8): p. 5753-64.
177. Zacchetti, D., et al., *VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles*. FEBS Lett, 1995. **377**(3): p. 465-9.
178. Frank, M., *MAL, a proteolipid in glycosphingolipid enriched domains: functional implications in myelin and beyond*. Prog Neurobiol, 2000. **60**(6): p. 531-44.

179. Puertollano, R. and M.A. Alonso, *MAL, an integral element of the apical sorting machinery, is an itinerant protein that cycles between the trans-Golgi network and the plasma membrane*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(10): p. 3435-47.
180. Bayburt, T.H., Y.V. Grinkova, and S.G. Sligar, *Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins*. Nano Letters, 2002. **2**(8): p. 853-856.
181. Bayburt, T.H. and S.G. Sligar, *Membrane protein assembly into Nanodiscs*. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1721-7.
182. Denisov, I.G. and S.G. Sligar, *Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics*. Chem Rev, 2017. **117**(6): p. 4669-4713.
183. Borch, J., et al., *Nanodiscs for Immobilization of Lipid Bilayers and Membrane Receptors: Kinetic Analysis of Cholera Toxin Binding to a Glycolipid Receptor*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(16): p. 6245-6252.
184. Worbs, S., et al., *An International Proficiency Test to Detect, Identify and Quantify Ricin in Complex Matrices*. Toxins (Basel), 2015. **7**(12): p. 4987-5010.
185. Albers, J., et al., *Electrical biochip technology--a tool for microarrays and continuous monitoring*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 521-7.
186. Elsholz, B., et al., *Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays*. Anal Chem, 2006. **78**(14): p. 4794-802.
187. Nebling, E., et al., *Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays*. Anal Chem, 2004. **76**(3): p. 689-96.
188. Schulz, K., et al., *Electrochemical Biochip Assays Based on Anti-idiotypic Antibodies for Rapid and Automated On-Site Detection of Low Molecular Weight Toxins*. Front Chem, 2019. **7**: p. 31.
189. Perera, L.P., L.R. Marques, and A.D. O'Brien, *Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic Escherichia coli and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(10): p. 2127-31.
190. Strockbine, N.A., et al., *Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from Escherichia coli*. Infect Immun, 1985. **50**(3): p. 695-700.
191. Padhye, V.V., T. Zhao, and M.P. Doyle, *Production and characterisation of monoclonal antibodies to Verotoxins 1 and 2 from Escherichia coli of serotype O 157:H7*. Journal of medical microbiology, 1989. **30**(3): p. 219-226.
192. Bürk, C., et al., *Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in Escherichia coli ONT:H19 of bovine origin*. Journal of clinical microbiology, 2003. **41**(5): p. 2106-2112.
193. Keil, C., *Reinigung von Escherichia coli Shigatoxinen und Produktion von poly- und monoklonalen Antikörpern*, in *Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs*. 1999, LMU München.
194. Downes, F.P., et al., *Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies*. Infect Immun, 1988. **56**(8): p. 1926-33.
195. Eichler, K., *Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Clostridium difficile Toxine*. 2017, Technische Universität Dresden.
196. Worbs, S., et al., *Characterization of Ricin and R. communis Agglutinin Reference Materials*. Toxins (Basel), 2015. **7**(12): p. 4906-34.
197. Absher, M., *CHAPTER 1 - Hemocytometer Counting*, in *Tissue Culture*, P.F. Kruse and M.K. Patterson, Editors. 1973, Academic Press. p. 395-397.
198. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.

199. Neuhoff, V., et al., *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis, 1988. **9**(6): p. 255-262.
200. Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. Electrophoresis, 1987. **8**(2): p. 93-99.
201. Frank, M., et al., *rMAL is a glycosphingolipid-associated protein of myelin and apical membranes of epithelial cells in kidney and stomach*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1998. **18**(13): p. 4901-4913.
202. Sligar, S.G. *Protocols for Preparation of Nanodiscs*. 2008; Available from: http://publish.illinois.edu/sligar-lab/files/2020/01/Nanodisc_Protocols.pdf.
203. Denisov, I.G., et al., *Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(11): p. 3477-87.
204. Sigma-Aldrich. *Product Information MSP1D1*. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/m6574pis.pdf.
205. Sigma-Aldrich. *Product Information MSP1E3D1*. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/m7074pis.pdf.
206. Angelisová, P., et al., *The use of styrene-maleic acid copolymer (SMA) for studies on T cell membrane rafts*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2019. **1861**(1): p. 130-141.
207. Hou, J., et al., *Study of claudin function by RNA interference*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(47): p. 36117-36123.
208. Dawson, R.M., B.M. Paddle, and M.R. Alderton, *Characterization of the Asialofetuin microtitre plate-binding assay for evaluating inhibitors of ricin lectin activity*. J Appl Toxicol, 1999. **19**(5): p. 307-12.
209. Blome, M.C., *Characterization of Ricin Binding to Multivalent Bovine Serum Albumin-based Neoglycoconjugates*, in *College of Medicine*. 2008, The Pennsylvania State University. p. 128.
210. Kimura, M., T. Sumizawa, and G. Funatsu, *The complete amino acid sequences of the B-chains of abrin-a and abrin-b, toxic proteins from the seeds of Abrus precatorius*. Biosci Biotechnol Biochem, 1993. **57**(1): p. 166-9.
211. Lin, T.T. and S.L. Li, *Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from Ricinus communis*. Eur J Biochem, 1980. **105**(3): p. 453-9.
212. Wu, A.M. and J.H. Liu, *Lectins and ELLSA as powerful tools for glycoconjugate recognition analyses*. Glycoconjugate journal, 2019. **36**(2): p. 175-183.
213. Rasooly, R., X. He, and M. Friedman, *Milk inhibits the biological activity of ricin*. J Biol Chem, 2012. **287**(33): p. 27924-9.
214. Brandon, D.L. and L.M. Adams, *Milk matrix effects on antibody binding analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay and biolayer interferometry*. J Agric Food Chem, 2015. **63**(13): p. 3593-8.
215. Smedley, J.G., 3rd and B.A. McClane, *Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of Clostridium perfringens enterotoxin by site-directed mutagenesis*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 6914-23.
216. Kitadokoro, K., et al., *Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins*. J Biol Chem, 2011. **286**(22): p. 19549-55.
217. le Maire, M., P. Champeil, and J.V. Møller, *Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1508**(1): p. 86-111.

218. Jiang, Z., et al., *Identification of tyrosine 71 as a critical residue for the cytotoxic activity of Clostridium perfringens epsilon toxin towards MDCK cells*. Journal of Microbiology, 2015. **53**(2): p. 141-146.
219. Kampmeier, S., et al., *The 2011 German Enterohemorrhagic Escherichia Coli O104:H4 Outbreak-The Danger Is Still Out There*. Curr Top Microbiol Immunol, 2018. **416**: p. 117-148.
220. Prevention, C.f.D.C.a. *Bioterrorism Agents/Diseases*. 2018; Available from: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>.
221. Wnek, A.P., R.J. Strouse, and B.A. McClane, *Production and characterization of monoclonal antibodies against Clostridium perfringens type A enterotoxin*. Infect Immun, 1985. **50**(2): p. 442-8.
222. Ditto, N.T. and B.D. Brooks, *The emerging role of biosensor-based epitope binning and mapping in antibody-based drug discovery*. Expert opinion on drug discovery, 2016. **11**(10): p. 925-937.
223. Brooks, B.D., A.R. Miles, and Y.N. Abdiche, *High-throughput epitope binning of therapeutic monoclonal antibodies: why you need to bin the fridge*. Drug Discovery Today, 2014. **19**(8): p. 1040-1044.
224. Robertson, S.L., J.G. Smedley, 3rd, and B.A. McClane, *Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of Clostridium perfringens enterotoxin*. Infect Immun, 2010. **78**(1): p. 505-17.
225. Takahashi, A., et al., *Mutated C-terminal fragments of Clostridium perfringens enterotoxin have increased affinity to claudin-4 and reversibly modulate tight junctions in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **410**(3): p. 466-70.
226. Shinoda, T., et al., *Cell-free methods to produce structurally intact mammalian membrane proteins*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 30442.
227. Lingwood, C.A., et al., *New aspects of the regulation of glycosphingolipid receptor function*. Chemistry and physics of lipids, 2010. **163**(1): p. 27-35.
228. Rutenber, E. and J.D. Robertus, *Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution*. Proteins, 1991. **10**(3): p. 260-9.
229. Zentz, C., J.P. Frenoy, and R. Bourrillon, *Binding of galactose and lactose to ricin. Equilibrium studies*. Biochim Biophys Acta, 1978. **536**(1): p. 18-26.
230. Yao, G., et al., *N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A*. Nature structural & molecular biology, 2016. **23**(7): p. 656-662.
231. Mahrhold, S., et al., *Only the complex N559-glycan in the synaptic vesicle glycoprotein 2C mediates high affinity binding to botulinum neurotoxin serotype A1*. The Biochemical journal, 2016. **473**(17): p. 2645-2654.
232. Stern, D., et al., *A lipid-binding loop of botulinum neurotoxin serotypes B, DC and G is an essential feature to confer their exquisite potency*. PLoS pathogens, 2018. **14**(5): p. e1007048-e1007048.
233. Wimsatt, J.C., S.M. Harmon, and D.B. Shah, *Detection of Clostridium perfringens enterotoxin in stool specimens and culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 1986. **4**(4): p. 307-313.
234. Yamasaki, E., et al., *Quantitative Detection of Shiga Toxins Directly from Stool Specimens of Patients Associated with an Outbreak of Enterohemorrhagic Escherichia coli in Japan--Quantitative Shiga toxin detection from stool during EHEC outbreak*. Toxins, 2015. **7**(10): p. 4381-4389.

235. Batista, F.D. and M.S. Neuberger, *Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate*. *Immunity*, 1998. **8**(6): p. 751-9.
236. Foote, J. and H.N. Eisen, *Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(5): p. 1254-1256.
237. Garber, E.A., J.L. Walker, and T.W. O'BRIEN, *Detection of abrin in food using enzyme-linked immunosorbent assay and electrochemiluminescence technologies*. *Journal of food protection*, 2008. **71**(9): p. 1868-1874.
238. Hodge, D.R., et al., *Comprehensive laboratory evaluation of a highly specific lateral flow assay for the presumptive identification of ricin in suspicious white powders and environmental samples*. *Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science*, 2013. **11**(4): p. 237-250.
239. Slotved, H.-C., et al., *Evaluating 6 ricin field detection assays*. *Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science*, 2014. **12**(4): p. 186-189.
240. GmbH, A.R.D.G. *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*. 2020; Available from: <https://www.alere.com/de/home/product-details/shiga-toxin-quick-check-test.html>.
241. Weingart, O.G., et al., *A bioanalytical platform for simultaneous detection and quantification of biological toxins*. *Sensors (Basel)*, 2012. **12**(2): p. 2324-39.
242. Anderson, G.P., et al., *Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor*. *Biosensors & bioelectronics*, 2000. **14**(10-11): p. 771-777.
243. Szkola, A., et al., *Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay*. *Analyst*, 2014. **139**(22): p. 5885-5892.
244. Feltis, B.N., et al., *A hand-held surface plasmon resonance biosensor for the detection of ricin and other biological agents*. *Biosensors & bioelectronics*, 2008. **23**(7): p. 1131-1136.
245. Phaneuf, C.R., et al., *Integrated LAMP and immunoassay platform for diarrheal disease detection*. *Biosensors & bioelectronics*, 2018. **120**: p. 93-101.
246. Ashkenazi, S. and T.G. Cleary, *Rapid method to detect shiga toxin and shiga-like toxin I based on binding to globotriosyl ceramide (Gb3), their natural receptor*. *Journal of clinical microbiology*, 1989. **27**(6): p. 1145-1150.
247. Togashi, K., S. Sasaki, and W. Sato, *A globotetraosylceramide (Gb(4)) receptor-based ELISA for quantitative detection of Shiga toxin 2e*. *J Vet Med Sci*, 2015. **77**(8): p. 973-6.
248. Acheson, D.W., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for Shiga toxin and Shiga-like toxin II using P1 glycoprotein from hydatid cysts*. *J Infect Dis*, 1990. **161**(1): p. 134-7.
249. Nagatsuka, T., et al., *Localized surface plasmon resonance detection of biological toxins using cell surface oligosaccharides on glyco chips*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013. **5**(10): p. 4173-80.
250. Huebner, M., et al., *A glyco-chip for the detection of ricin by an automated chemiluminescence read-out system*. *Anal Sci*, 2013. **29**(4): p. 461-6.
251. Yang, X., et al., *Escherichia coli strains producing a novel Shiga toxin 2 subtype circulate in China*. *Int J Med Microbiol*, 2020. **310**(1): p. 151377.
252. Boone, J.T., et al., *A Rapid Immunoassay for Detection of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Directly from Human Fecal Samples and Its Performance in Detection of Toxin Subtypes*. *J Clin Microbiol*, 2016. **54**(12): p. 3056-3063.

253. Hansbauer, E.M., et al., *Rapid Detection of Abrin Toxin and Its Isoforms in Complex Matrices by Immuno-Extraction and Quantitative High Resolution Targeted Mass Spectrometry*. Anal Chem, 2017. **89**(21): p. 11719-11727.
254. Krüger, M., *The Role of Non-Toxic Complex Proteins Associated with Botulinum Toxin A in Intestinal Resorption*, in *Fakultät III - Prozesswissenschaften*. 2019, Technische Universität Berlin.
255. Stern, D., et al., *[On-site detection of bioterrorism-relevant agents : Rapid detection methods for viruses, bacteria and toxins - capabilities and limitations]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2016. **59**(12): p. 1577-1586.
256. Rasooly, R., et al., *Sensitive detection of active Shiga toxin using low cost CCD based optical detector*. Biosens Bioelectron, 2015. **68**: p. 705-711.
257. Hatano, H., et al., *Induced Proton Perturbation for Sensitive and Selective Detection of Tight Junction Breakdown*. Anal Chem, 2019. **91**(5): p. 3525-3532.
258. Kalb, S.R. and J.R. Barr, *Mass spectrometric detection of ricin and its activity in food and clinical samples*. Anal Chem, 2009. **81**(6): p. 2037-42.
259. Antoine, M.D., et al., *Rapid detection of ribosome inactivating protein toxins by mass-spectrometry-based functional assays*. International Journal of Mass Spectrometry, 2012. **312**: p. 41-44.
260. Christopher Pöhlmann, K.S., Thomas Elssner. *Detektion biologischer Toxine mittels der pBDi-Plattform*. 2017; Available from: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/CBRNE_Detection/Literature/Poster_pBDi_Toxin-Labornetzwerktreffen_20170413.pdf.
261. Garcia-Rodriguez, C., et al., *Molecular evolution of antibody cross-reactivity for two subtypes of type A botulinum neurotoxin*. Nature biotechnology, 2007. **25**(1): p. 107-116.
262. Schulz, M., *Pan reactive antibodies against botulinum neurotoxin complexes: generation, characterization and application*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2012, Freie Universität Berlin.
263. Von Berg, L., *Functional detection of botulinum neurotoxin serotypes A-F by monoclonal neoepitope-specific antibodies*, in *Fachbereich Biologie, Pharmazie und Chemie*. 2019, Freie Universität Berlin.
264. Sun, J., et al., *Fast on-Site Visual Detection of Active Ricin Using a Combination of Highly Efficient Dual-Recognition Affinity Magnetic Enrichment and a Specific Gold Nanoparticle Probe*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(22): p. 12209-12216.

6 Anhang

Ergänzende Abbildungen und Tabellen

6.1 Rizin und Abrin

6.1.1 Affinität von Asialofetuin und Asialo-GM1 an Rizin und Abrin

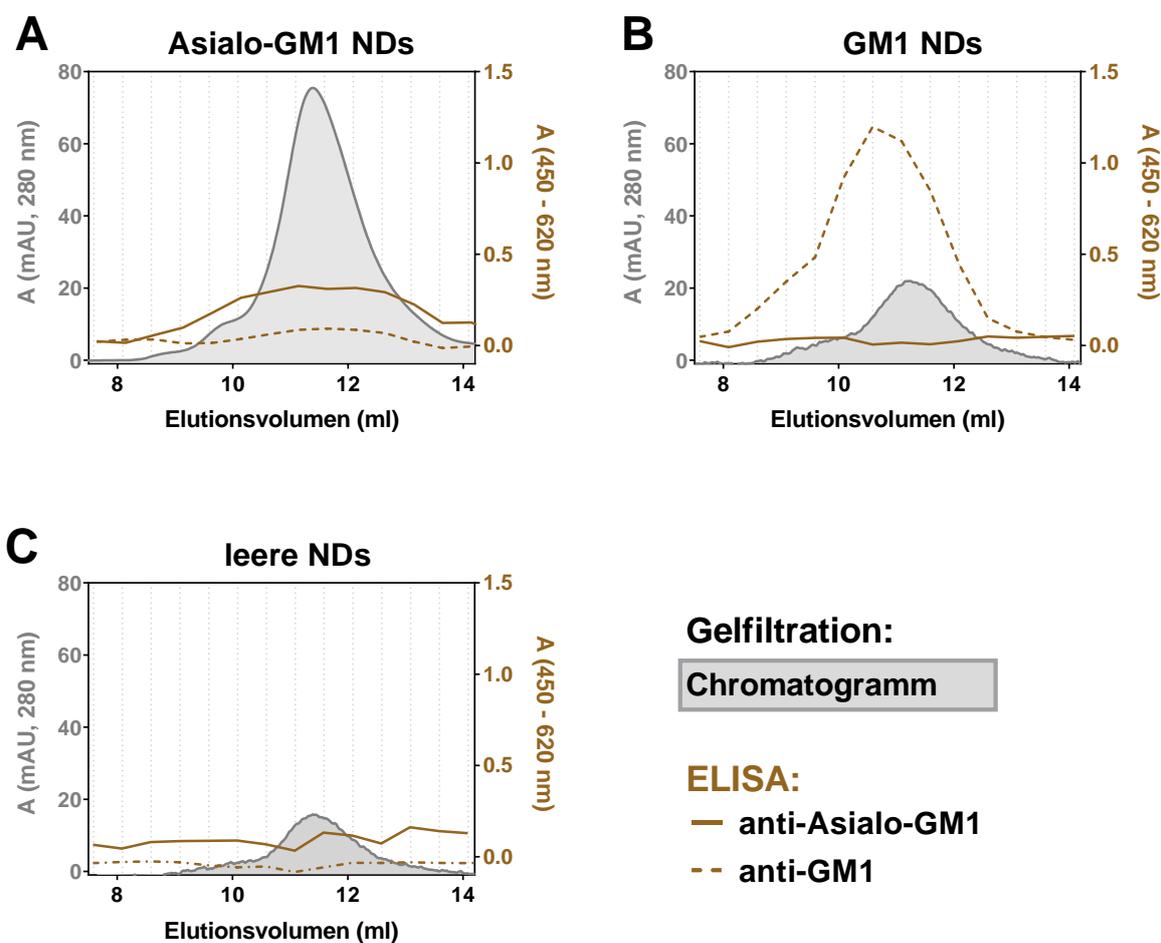


Abbildung 45: Untersuchung von Nanodisks in der Gelfiltration und im indirekten ELISA.

Nanodisks wurden nach dem Standardprotokoll (siehe Methoden) hergestellt und nach der Assemblierung durch Gelfiltration an der Säule Superdex 200 increase 10/300 gI (0,75 ml/min) gereinigt. Das Chromatogramm (aufgetragen auf der linken Y-Achse) wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm erfasst. Die bei der Gelfiltration gesammelten Fraktionen wurden in 1 µg/ml BSA/PBS 1:10 verdünnt und über Nacht auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Blockade unspezifischer Bindungen mit 3 %BSA/PBS wurde mit anti-Asialo-GM1- (17 µg/ml) bzw. anti-GM1-Antikörper (Antiserum, Verdünnung 1:2000) inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit anti-Kaninchen-POD und nachfolgender Zugabe von TMB. Die ELISA-Daten (in braun) wurden auf der rechten Y-Achse aufgetragen. **A.** Asialo-GM1 Nanodisks (8 % Gangliosid-Gehalt) **B.** GM1-Nanodisks (8 % Gangliosid-Gehalt) **C.** Leere Nanodisks.

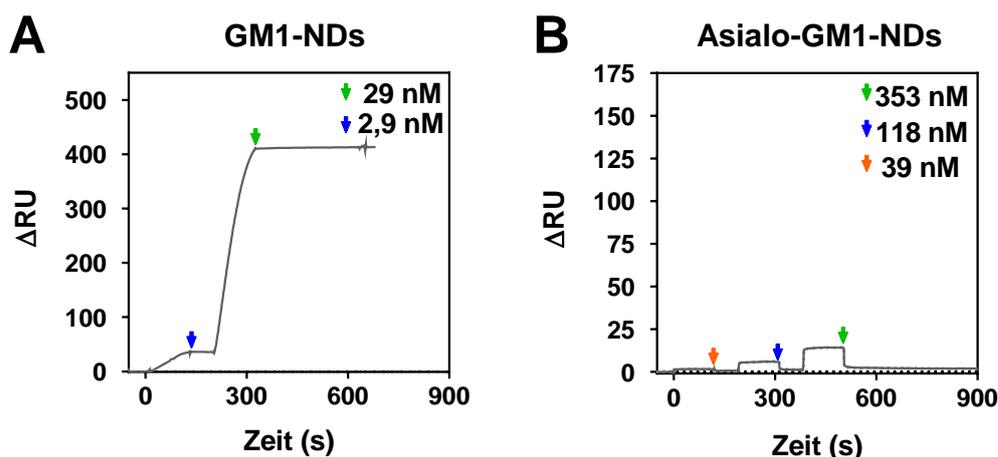


Abbildung 46: SPR-Bindungskinetik von Cholera toxin an Gangliosid-haltige Nanodisks.

A. Bindung an GM1-Nanodisks (Gangliosid-Gehalt: 8 %). **B.** Bindung an Asialo-GM1-Nanodisks (Gangliosid-Gehalt 8 %). Nanodisks wurden nach der beschriebenen Methode (2.5.1) hergestellt. Für die SPR-Messungen wurden die Nanodisks über einen anti-His-Antikörper auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es wurden danach innerhalb eines Messzyklus 2 (A) bzw. 3 (B) Konzentrationen (siehe Abbildung) Cholera toxin (120 s; 30 μ l/min) injiziert. Die durch Pufferinjektion eingeleitete Dissoziation wurde für 300 s (A) bzw. 400 s beobachtet. Durchgezogene Linien stellen die Messkurven dar, gestrichelte Linien kennzeichnen den zugehörigen Fit (1:1 Bindungsmodell).

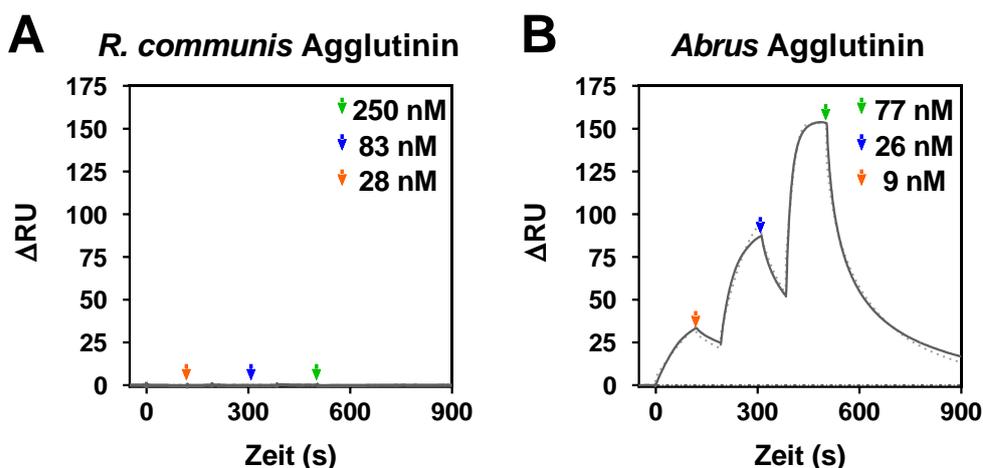


Abbildung 47: Bindung der zu Rizin bzw. Abrin homologen Agglutinine an Asialo-GM1-Nanodisks.

A. Agglutinin aus *R. communis*. **B.** Agglutinin aus *A. precatorius*. Nanodisks wurden wie in (2.5.1) beschrieben hergestellt und in einem SPR-Assay gemessen. Nach der Immobilisierung auf einem Sensorchip durch einen anti-His-Antikörper folgte die Injektion des jeweiligen Agglutinins (120 s, 30 μ l/min) in einer 1:3 Verdünnungsreihe wie angegeben. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 300 s gemessen. Durchgezogene Linien stellen die Messkurven dar, gestrichelte Linien kennzeichnen den zugehörigen Fit (1:1 Bindungsmodell).

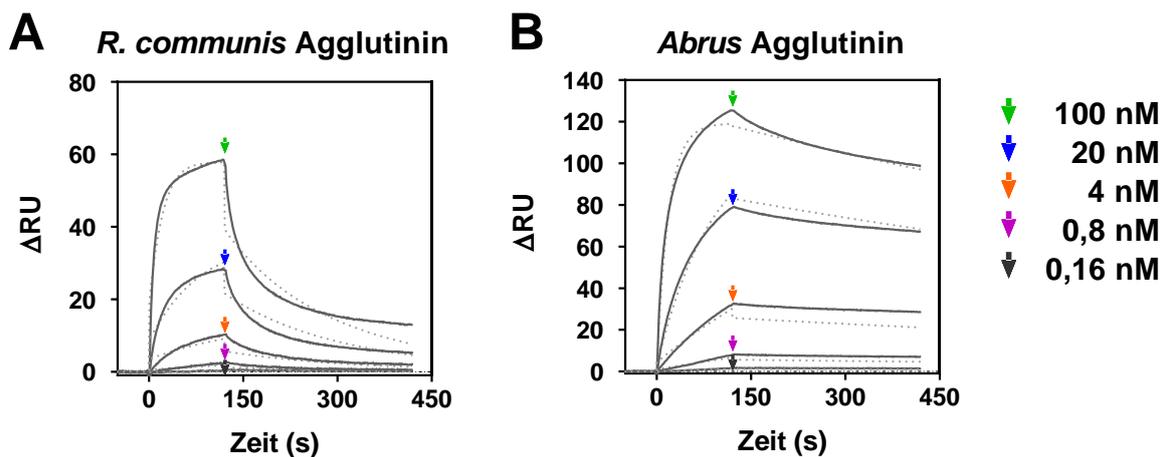


Abbildung 48: Bindung der zu Rizin bzw. Abrin homologen Agglutinine an Asialofetuin.

A. Agglutinin aus *R. communis*. **B.** Agglutinin aus *A. precatorius*. Asialofetuin wurde mittels EDC/NHS-Chemie kovalent an die Oberfläche eines CM5-Sensorchips gebunden. Nach der Immobilisierung folgte die Injektion des jeweiligen Agglutinins (120 s, 30 μ l/min) in einer 1:3-Verdünnungsreihe wie angegeben. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 300 s gemessen. Durchgezogene Linien stellen die Messkurven dar, gestrichelte Linien kennzeichnen den zugehörigen Fit (1:1 Bindungsmodell).

Tabelle 50: Monoklonale Detektionsantikörper für den Nachweis von Abrin im ELLA.

Fänger	Detektor	EC ₅₀ (ng/ml)
AP430	AP3202-Bio	1,1
Asialofetuin	AP3202-Bio	14,8
	AP3659-Bio	44,1
	AP3808-Bio	47,2
	AP10-Bio	-
	AP54-Bio	-
	AP69-Bio	-

EC₅₀ = halbmaximale Effektorkonzentration

6.1.2 Vor-Ort-Nachweise für Rizin und Abrin

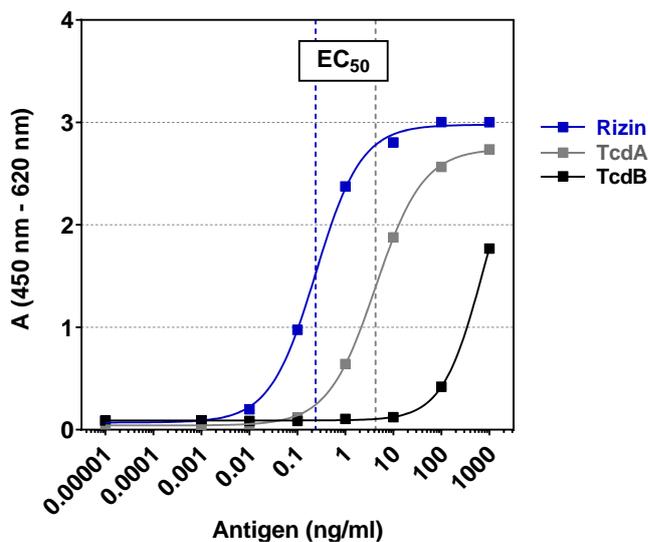


Abbildung 49: Bindung von TcdA und B an Asialofetuin im Vergleich zu Rizin.

Die Immobilisierung von Asialofetuin (4 µg/ml) erfolgte auf einer Mikrotiterplatte über Nacht. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurden Rizin (blau); TcdA (grau) und TcdB (schwarz) in seriellen 1:10-Verdünnungsreihen von 0,001 bis 1000 ng/ml in 0,1 %BSA/PBS-T inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Toxine mit den toxinspezifischen biotinylierten Antikörpern R18-Bio (Rizin), TcdA3211-Bio (TcdA) und TcdB3322-Bio (TcdB). Es schloss sich die Entwicklung mit Poly-HRP und TMB an. Die Werte wurden in Einzelbestimmung gemessen. Gestrichelte Linien zeigen die EC₅₀-Werte: in blau Rizin (0,24 ng/ml) und in grau TcdA (4,3 ng/ml).

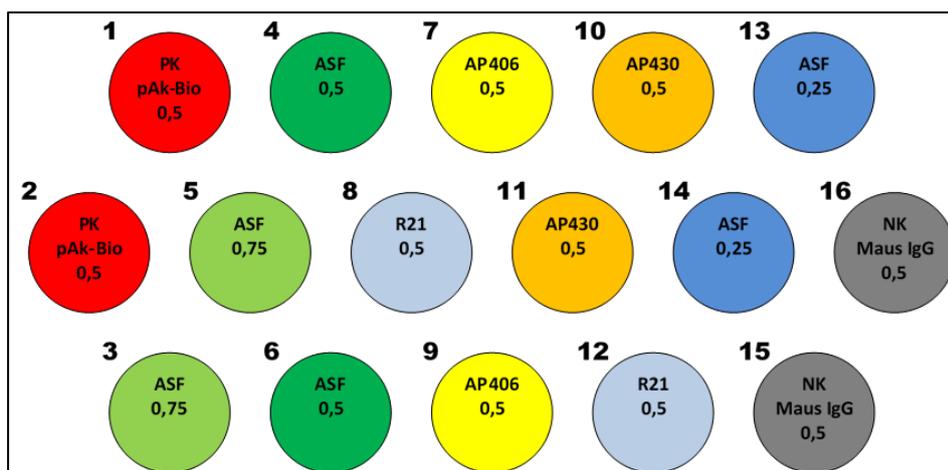


Abbildung 50: Chiplayout der pTD-Biochips zum Nachweis von Rizin und Abrin.

Monoklonale Antikörper (R21, anti-Rizin; AP430 und AP406, anti-Abrin) und Asialofetuin (ASF) wurden von Fa. Analytik Jena auf Biochips gespottet (0,25 bis 0,75 mg/ml, siehe einzelne Positionen). Dabei diente biotinylierter polyklonaler Kaninchenantikörper als Positivkontrolle (PK) und Maus IgG als Negativkontrolle (NK).

6.2 Shigatoxine Stx1 und Stx2

6.2.1 Bindung von Shigatoxinen an Globoside

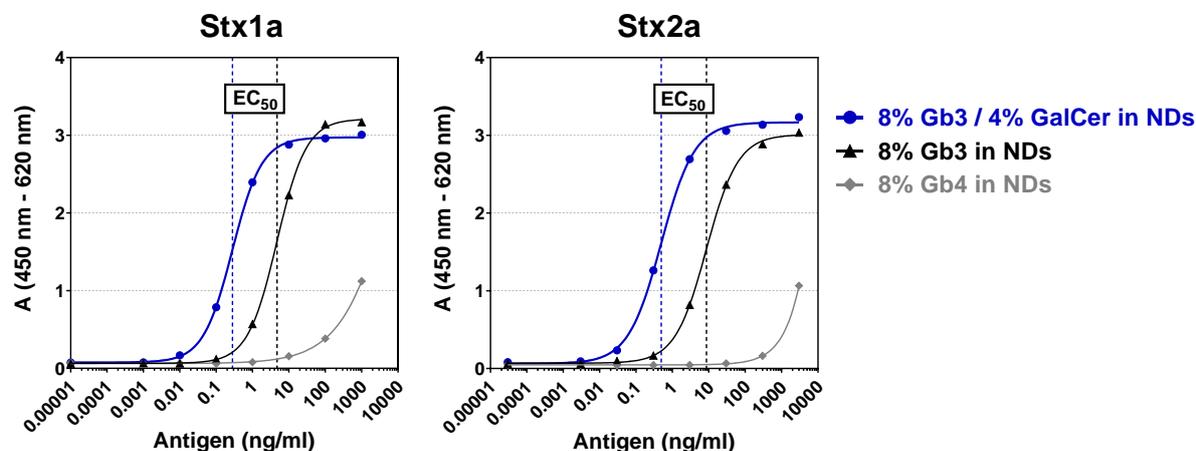


Abbildung 51: Bindung von Shigatoxinen an globosidhaltige Nanodisks.

Nanodisks wurden nach dem Standardprotokoll unter Verwendung von MSP1E3D1 und dem Phospholipid POPC hergestellt. Die Nanodisks enthielten 8 % Gb3 und 4 % Galaktosylceramid (GalCer, blau), 8 % Gb3 (schwarz) oder 8 % Gb4 (grau). Alle Nanodiskpräparationen wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Es folgte die Inkubation mit einer seriellen 1:10-Verdünnungsreihe von 0,01 bis 1000 ng/ml Stx1a (links) bzw. 0,03 bis 3000 ng/ml Stx2a (rechts). Die Detektion wurde mit den biotinylierten Antikörpern 13C4 (Stx1) bzw. 11E10 (Stx2) vorgenommen. Es schloss sich die Entwicklung mit SA-Poly-HRP und TMB an. Dargestellt sind Ergebnisse eines repräsentativen Experiments ($n=1$). Gestrichelte Linien zeigen die EC_{50} -Werte.

6.2.2 Antikörpercharakterisierung

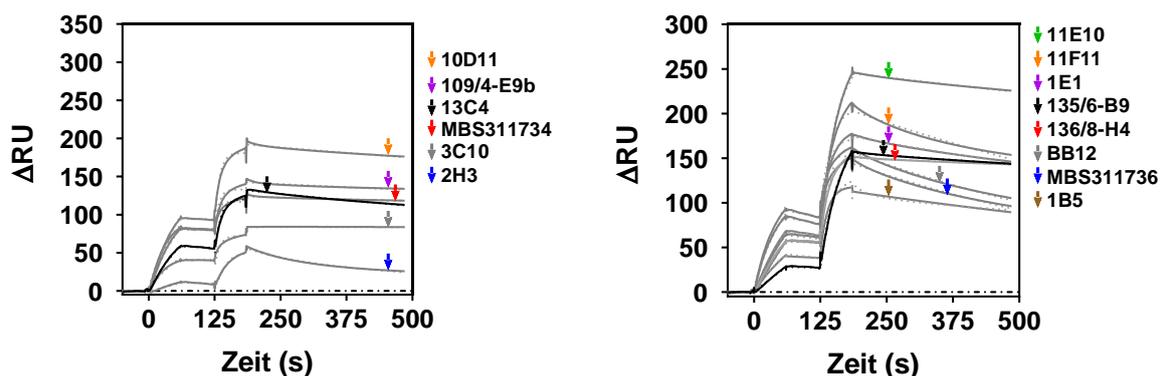


Abbildung 52: SPR-Bindungskinetik Stx-spezifischer Antikörper.

Monoklonale Antikörper wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es folgte die serielle Injektion (60 s; 30 $\mu\text{l}/\text{min}$) von Stx1a (7,1 und 71 nM) oder Stx2a (21 und 210 nM). Durch Pufferinjektion (300 s) wurde die Dissoziation eingeleitet. Die Berechnung des Kurvenfits erfolgte unter Annahme eines 1:1-Bindungsmodells. Durchgezogene Linien zeigen Messkurven, gestrichelte Linien die zugehörigen Fits. Pfeile kennzeichnen die Zugehörigkeit der gemessenen Antikörper zu den entsprechenden Messkurven.

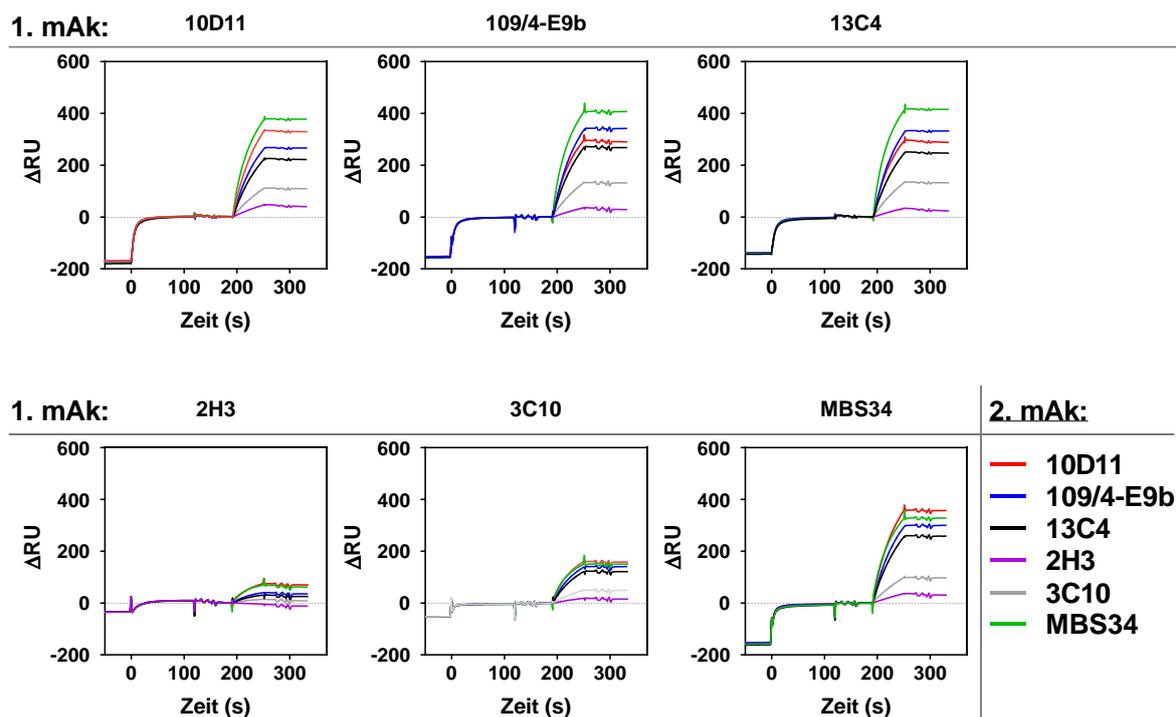


Abbildung 53: Epitopbinning von Stx1-spezifischen Antikörpern.

Monoklonale Antikörper (1. mAk) wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es folgten die Blockade mit unspezifischem Maus IgG und die Injektion von Stx1 (2 µg/ml). Anschließend wurde ein zweiter monoklonaler Antikörper (2. mAk) injiziert. Anhand des Kurvenverlaufs kann festgestellt werden, ob die beiden Antikörper sich blockieren (gleiches Epitop, kein Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk) oder ob sie kombinierbar sind (distinkte Epitope, Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk).

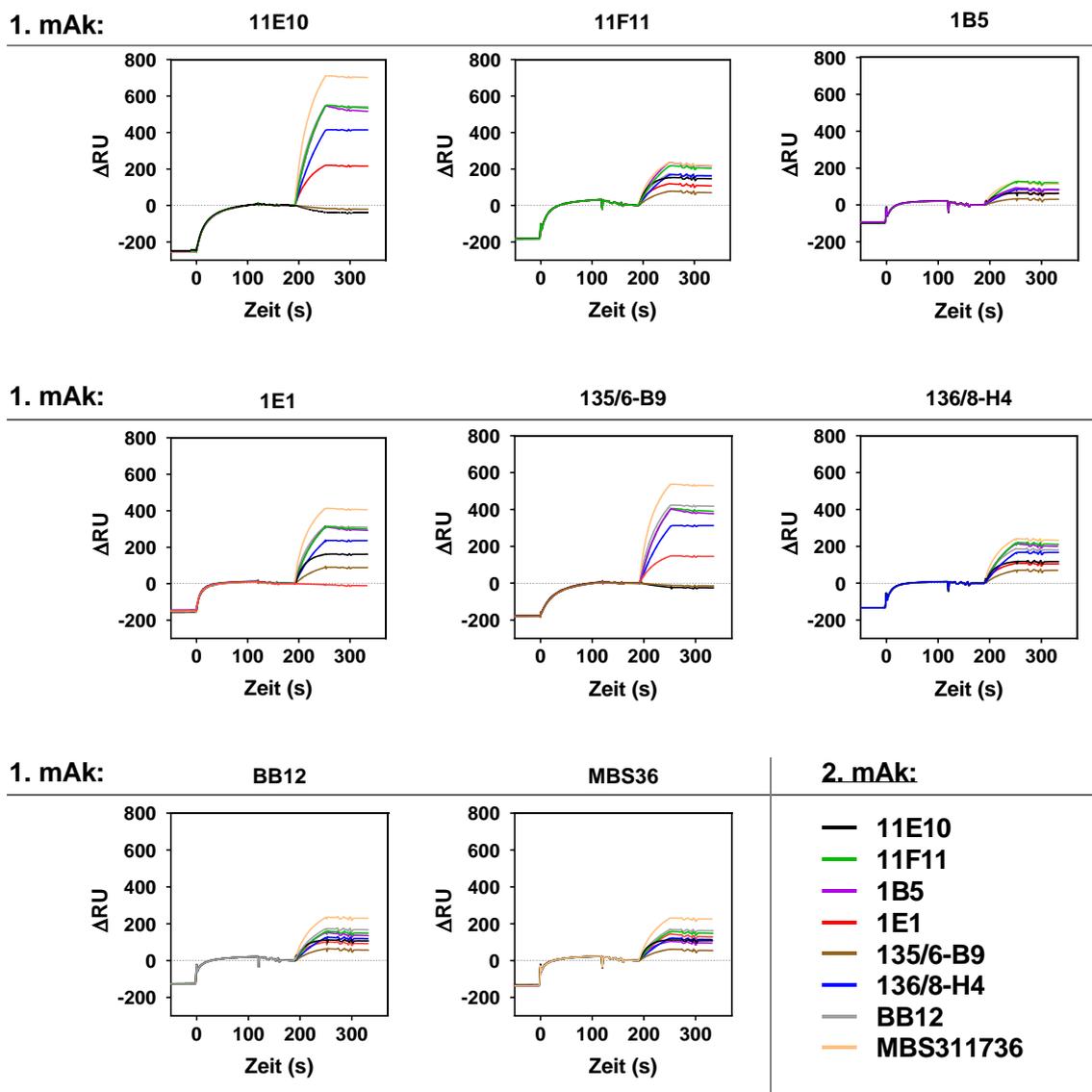


Abbildung 54: Epitop-Binning von Stx2-spezifischen Antikörpern.

Monoklonale Antikörper (1. mAk) wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es folgten die Blockade mit unspezifischem Maus IgG und die Injektion von Stx2 (2 µg/ml). Anschließend wurde ein zweiter monoklonaler Antikörper (2. mAk) injiziert. Anhand des Kurvenverlaufs kann festgestellt werden, ob die beiden Antikörper sich blockieren (gleiches Epitop, kein Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk) oder ob sie kombinierbar sind (distinkte Epitope, Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk).

6.2.3 Bestimmung der Subtypenerkennung

6.2.3.1 Übersicht Testung der Stx1-Subtypenerkennung

Testung der Überstände folgender Stämme:

Stx1a: EDL933

Stx1c: 3560/96

Stx1d: 7139/96

Tabelle 51: Testung der Erkennung verschiedener Stx1-Subtypen.

Testung sensitivster mAk-mAk-Kombinationen				
Fänger	Detektor	Subtypen		
		Stx1a	Stx1c	Stx1d
13C4	109/4	+++	++	-
MBS34	109/4	+++	++	-
2H3	13C4	++	++	-
13C4	13C4	+++	++	-
MBS34	13C4	+++	+++	+
3C10	13C4	+++	++	+
Messung in veränderter Orientierung				
MBS34/3C10	13C4	++	++	+
13C4	MBS34/3C10	+++	++	+++

Beurteilung der Erkennung richtet sich nach Absorptionswerten (A) im ELISA:

+++	=	$A > 2,0$
++	=	$1,0 < A \leq 2,0$
+	=	$0,2 < A \leq 1,0$
-	=	$A \leq 0,2$

6.2.3.2 Übersicht Testung der Stx2-Subtypenerkennung

Testung der Überstände folgender Stämme:

Stx2a: EDL933

Stx2b: 18E0122

Stx2c: E32511/HSC

Stx2d: B2F1

Stx2e: 2771/97

Stx2f: T4/97

Stx2g: 7V

Tabelle 52: Testung der Erkennung verschiedener Stx2-Subtypen.

Testung sensitivster mAk-mAk-Kombinationen								
Fänger	Detektor	Subtypen						
		Stx2a	Stx2b	Stx2c	Stx2d	Stx2e	Stx2f	Stx2g
1E1	11E10	+++	+++	+++	++	+++	–	++
11F11	11E10	+++	–	+++	–	–	–	+++
1B5	11E10	+++	–	+++	–	–	–	+++
MBS36	11E10	+++	+++	+++	+++	+++	–	+++
136/8	11E10	+++	+++	+++	+++	+++	–	+++
1E1	11F11	+++	–	+++	–	–	–	+
135/6	11F11	+++	–	+++	–	–	–	++
1E1	BB12	+++	–	+++	++	+++	+++	+
11E10	BB12	+++	+	+++	++	+++	–	+
135/6	BB12	+++	+	+++	++	+++	++	++
1E1	136/8	+++	–	+++	–	+	+	+
136/8	135/6	+++	–	+++	+	+++	–	+
MBS36	BB12	+++	–	++	–	++	++	–
Testung verschiedener Detektoren mit NDs als Fänger								
NDs	1E1	+++	+	+++	+	+++	++	+
NDs	11E10	+++	++	+++	++	+++	–	++
Messung finaler Kombinationen								
1E1	11E10/BB12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
NDs	1E1/11E10	+++	++	+++	+++	++	++	++

Beurteilung der Erkennung richtet sich nach Absorptionswerten (A) im ELISA:

+++	=	$A > 2,0$
++	=	$1,0 < A \leq 2,0$
+	=	$0,2 < A \leq 1,0$
–	=	$A \leq 0,2$

6.2.4 Lagerstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks

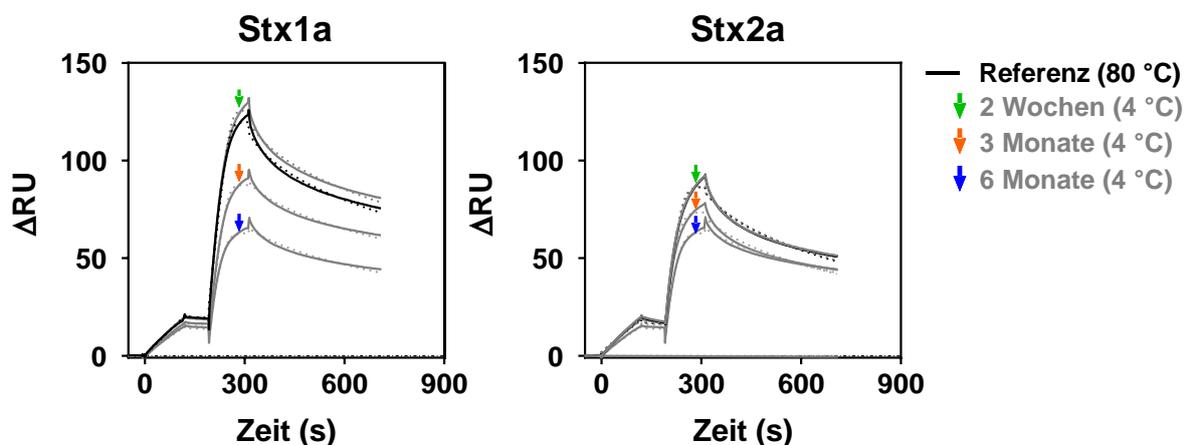


Abbildung 55: SPR-basierte Überprüfung der Lagerungsstabilität von Gb3/GalCer-Nanodisks.

Gb3/GalCer-Nanodisks wurden nach Herstellung für 2 Wochen, 3 Monate bzw. 6 Monate bei 4 °C gelagert. Als Referenzprobe (grau) dienten über 6 Monate bei -80 °C gelagerte Nanodisks. Die Immobilisierung auf dem CM5-Sensorchip erfolgte über ein His Capture Kit. Es folgte die Injektion (120 s, 30 μ l/min) von zwei ansteigenden Konzentrationen Stx1a (links) bzw. Stx2a (rechts). Die Dissoziation (400 s) wurde durch eine Pufferinjektion eingeleitet.

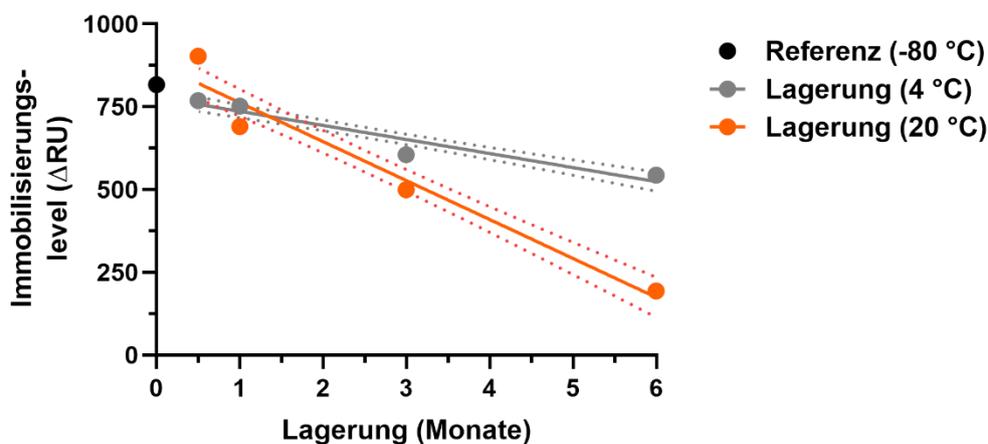


Abbildung 56: Immobilisierungsdichte von NDs (versch. Lagerungstemperaturen und -zeiten).

Gb3/GalCer-Nanodisks wurden hergestellt und für verschiedene Zeiträume (2 Wochen bis 6 Monate) bei 4 °C (grau) bzw. bei 20 °C (orange) gelagert. Als Referenz dienten über 6 Monate bei -80 °C gelagerte Nanodisks. Alle Nanodisks wurden ausgehend von der Konzentration nach Herstellung auf 3 μ g/ml in Laufpuffer verdünnt und für 180 s bei 10 μ l/min über ein His Capture Kit auf einem CM5-Chip immobilisiert. Die dabei ermittelten Immobilisierungsdichten wurden gegenüber der Lagerungszeit aufgetragen. Zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen Lagerungsdauer und Immobilisierungsdichte wurde mittels linearer Regression eine Gerade (KI=95 %) durch die Datenpunkte einer Lagerungstemperatur erstellt.

6.2.5 Vor-Ort-Nachweis der Shigatoxine

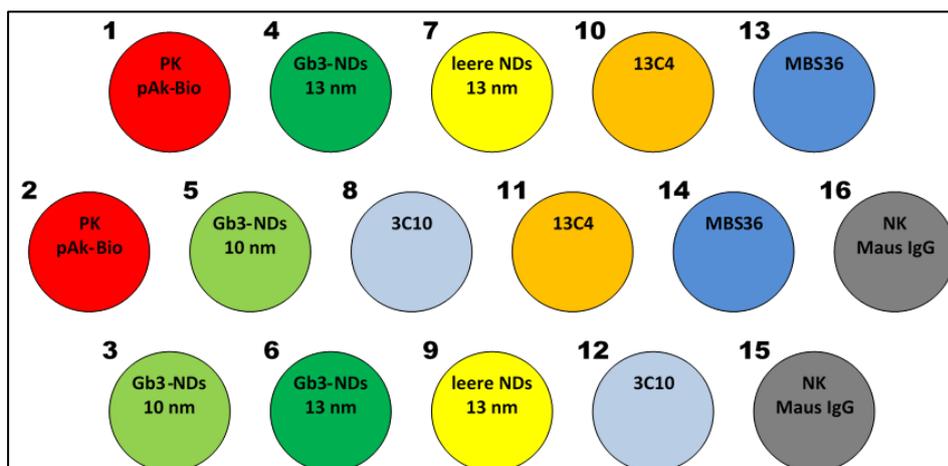


Abbildung 57: Chiplayout der pBDi-Biochips für den Nachweis der Shigatoxine.

Monoklonale Antikörper (13C4 und 3C10, anti-Stx1; MBS36, anti-Stx2) und verschiedene Nanodisks (NDs, leere und Gb3/GalCer-Nanodisks auf der Basis von MSP1D1 D73C für einen ND-Durchmesser von 10 nm oder MSP1E3D1 D73C für einen ND-Durchmesser von 13 nm) wurden von Fa. Bruker Daltonik auf Biochips gespottet (je 0,5 mg/ml). Dabei diente biotinylierter polyklonaler Kaninchenantikörper als Positivkontrolle (PK) und Maus IgG als Negativkontrolle (NK).

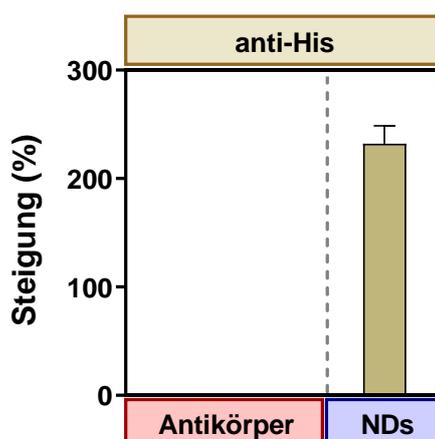


Abbildung 58: Nachweis der Immobilisierung von Nanodisks auf Biochips.

Die Stx-spezifischen Antikörper 13C4 und MBS36 sowie Gb3/GalCer-Nanodisks wurden auf Goldelektroden von Biochips immobilisiert. Nach der Inkubation mit biotinyliertem anti-His-Antikörper (10 µg/ml) wurde mit SA-β-Galaktosidase und 4-Aminophenyl-β-D-Galaktopyranosid entwickelt und das elektrochemische Signal ausgelesen. Dargestellt ist die Messung von einem Biochip, aufgetragen ist der Mittelwert des auf die Positivkontrolle normierten Messwerts mit Standardabweichung der gemessenen Doppelspots.

6.3 *Clostridium perfringens* Enterotoxin

6.3.1 Immunisierungen

6.3.1.1 Hybridomfusionen basierend auf den Domänen RBD und ZD

Immunisierung mit der RBD

Stamm für Maus 1 und 2: BALB/c
 Stamm für Maus 3 und 4: NMRI
 Antigen: CPE RBD

Tabelle 53: Immunisierung mit CPE RBD.

Tag	Durchführung	Antigenmenge (μg)	Puffer
1	Immunisierung (M1-4)	5	PBS; 50 % KFA
26	Immunisierung (M1-4)	5	PBS; 50 % IFA
36	Blutabnahme für Titertest (M1-4)	-	-
54	Immunisierung (M1-4)	5	PBS; 50 % IFA
162	Immunisierung (M1 und M3)	3,7	PBS; 50 % IFA
188	Immunisierung (M3)	3,7	PBS; 50 % IFA
215	1. Boost (M3)	2	PBS
216	2. Boost (M3)	2	PBS
217	2. Boost (M3)	2	PBS
218	Fusion (M3)	-	-

Mäuse sind mit M und der zugehörigen Nummer abgekürzt; KFA = Komplettes Freund-Adjuvans; IFA = Inkomplettes Freund-Adjuvans

Immunisierung mit der ZD

Stamm für Maus 5 und 6: BALB/c
 Stamm für Maus 7: NMRI
 Antigen: CPE ZD

Tabelle 54: Immunisierung mit CPE ZD.

Tag	Durchführung	Antigenmenge (μg)	Puffer
1	Immunisierung (M5-7)	10	PBS; 50 % KFA
26	Immunisierung (M5-7)	10	PBS; 50 % IFA
38	Blutabnahme für Titertest (M5-7)	-	-
55	Immunisierung (M5-7)	5	PBS; 50 % IFA
89	1. Boost (M7)	5	PBS
90	2. Boost (M7)	5	PBS
91	Fusion (M7)	-	-

Mäuse sind mit M und der zugehörigen Nummer abgekürzt; KFA = Komplettes Freund-Adjuvans; IFA = Inkomplettes Freund-Adjuvans

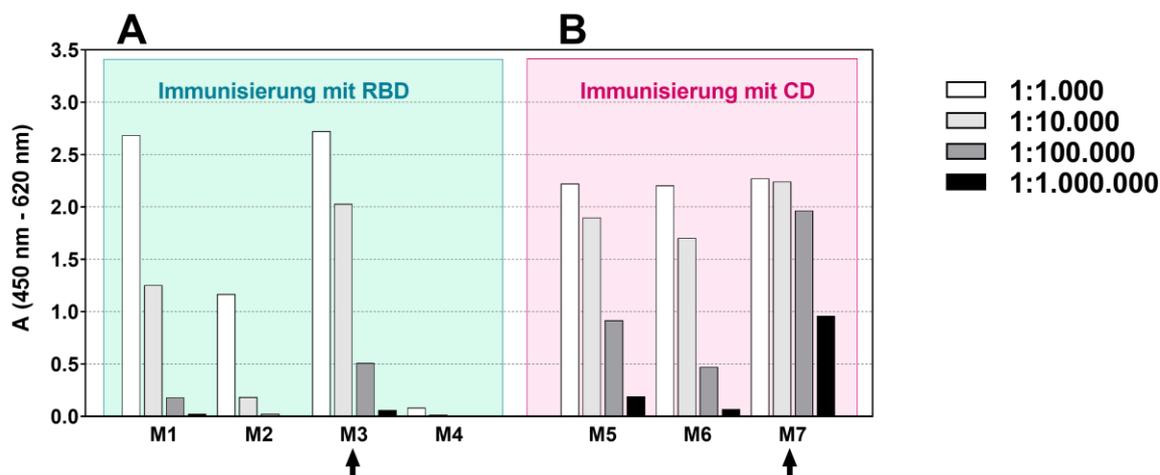


Abbildung 59: Titer von Mäusen nach Immunisierung mit CPE-Domänen.

Mäuse (abgekürzt mit M) wurden mit RBD (A) bzw. ZD (B) immunisiert. Nach der zweiten Immunisierung wurde Blut entnommen, welches bei $2.000 \times g$ zentrifugiert wurde. Das erhaltene Serum wurde im indirekten ELISA getestet. Dazu wurden die Antigene (500 ng/ml) in 1 µg/ml BSA/PBS immobilisiert, nach Blockade unspezifischer Bindung mit den Sera in den angegebenen Verdünnungen inkubiert und mit Fcy-spezifischer anti-Mouse-POD sowie nachfolgend mit TMB entwickelt. Die Pfeile geben die Mäuse an, bei denen später die Milzentnahme für die Hybridomfusion erfolgte.

6.3.1.2 Hybridomfusion basierend auf dem CPE-Gesamttoxin

Stamm für Maus 8 und 9: BALB/c
 Stamm für Maus 10 und 11: NMRI
 Antigen: CPE D48A

Tabelle 55: Immunisierung mit CPE D48A.

Tag	Durchführung	Antigenmenge (µg)	Puffer
1	Immunisierung (M8-11)	10	PBS; 50 % KFA
31	Immunisierung (M8-11)	10	PBS; 50 % IFA
43	Blutabnahme für Titertest (M8-11)	-	-
54	Immunisierung (M10, 11)	10	PBS; 50 % IFA
65	1. Boost (M10)	6	PBS
66	2. Boost (M10)	6	PBS
67	2. Boost (M10)	6	PBS
68	Fusion (M10)	-	-

Mäuse sind mit M und der zugehörigen Nummer abgekürzt; KFA = Komplettes Freund-Adjuvans; IFA = Inkomplettes Freund-Adjuvans

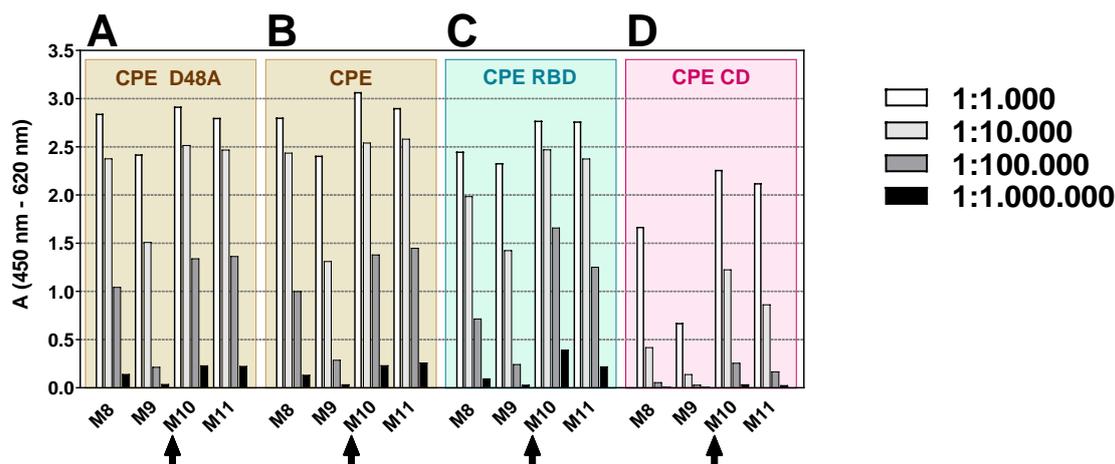


Abbildung 60: Testung des Titers immunisierter Mäuse gegen CPE-Proteine.

Die Immunisierung von Mäusen (M8 bis M11) erfolgte mit einer CPE D48A. Nach der Blutentnahme (Tag 43, Immunisierungsschema) wurde Serum durch Zentrifugation bei $2.000 \times g$ gewonnen. Die Testung im indirekten ELISA erfolgte unter Immobilisierung folgender Antigene (500 ng/ml): CPE D48A (A), CPE (B), RBD (C) und ZD (D) zu je 500 ng/ml. Die Entwicklung erfolgte mit Fc γ -spezifischer anti-Maus-POD und TMB. Pfeile kennzeichnen den Titer der für die Hybridomfusion ausgewählten Maus.

6.3.2 Charakterisierung CPE-spezifischer Antikörper

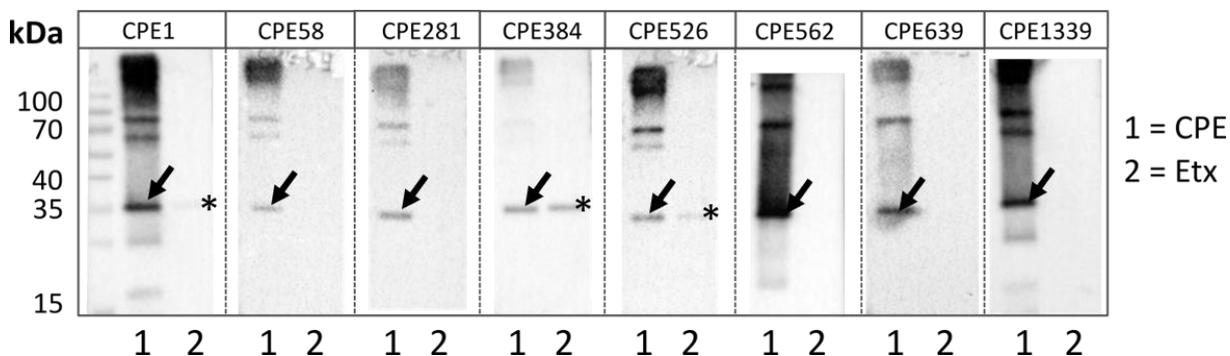


Abbildung 61: CPE-spezifische monoklonale Antikörper im Western Blot.

Monoklonale Antikörper wurden im Western Blot auf die Erkennung von CPE (1) und Etx (2; Negativkontrolle) getestet. Dazu wurden je 250 ng der Antigene in reduzierendem Probenpuffer auf 12 % SDS-PAGE-Gele aufgetragen und aufgetrennt. Die Übertragung der Proteine auf aktivierte PVDF-Membranen erfolgte mittels Elektrobrot. Nach Blockade unspezifischer Bindungen wurde mit CPE-spezifischen Antikörpern (1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Entwicklung wurde mit biotinyliertem Ziege anti-Maus-Antikörper, Avidin-Alkalische Phosphatase und CDP-Star vorgenommen. Als Marker diente PageRuler Prestained Protein Ladder. Die Entwicklungszeiten waren 20 s (CPE1; CPE562; CPE1339), 60 s (CPE58; CPE281; CPE526; CPE639) und 2 min (CPE384). *CPE-Bande aufgrund der Verwendung einer mit CPE kontaminierten Etx-Charge.

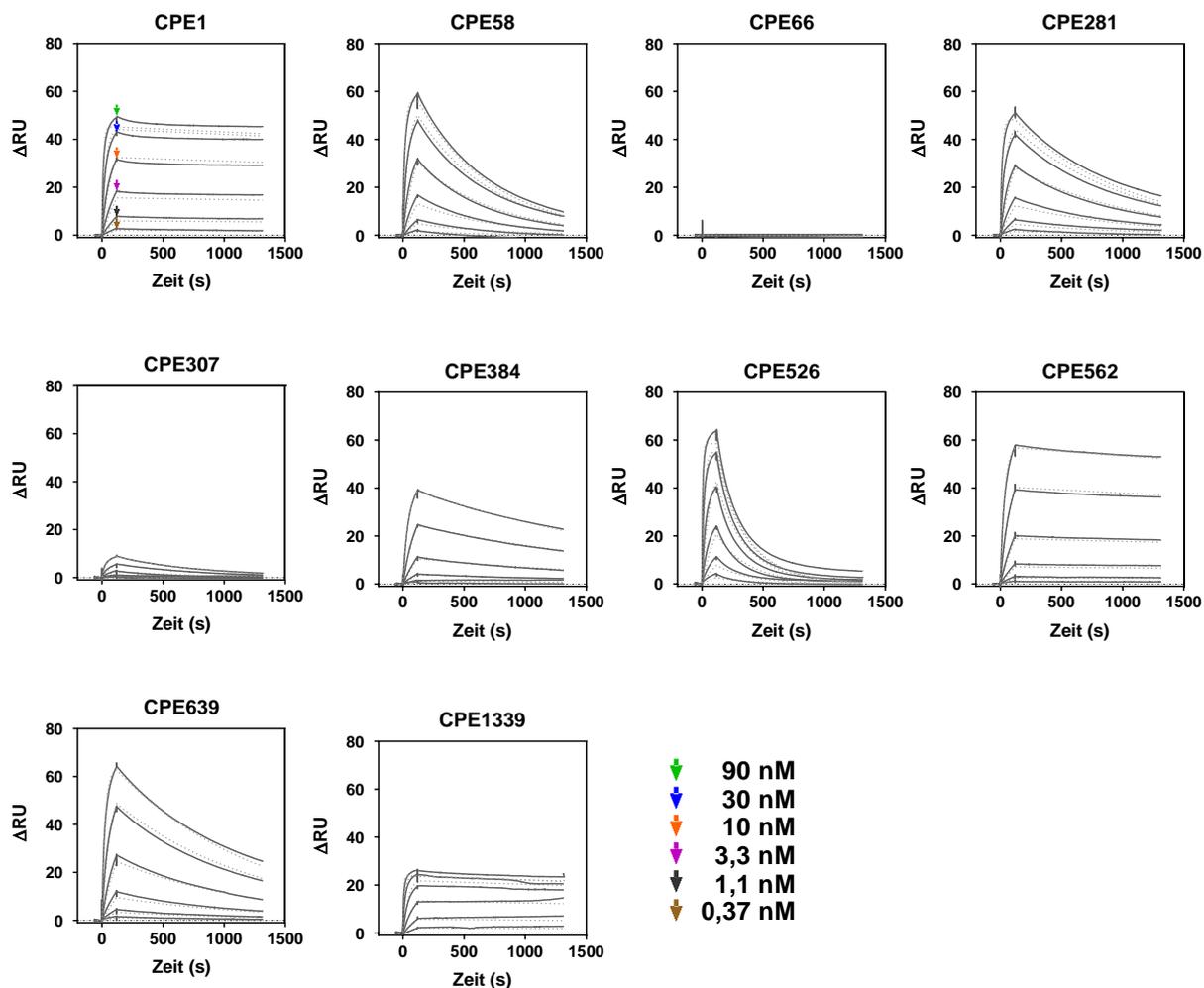


Abbildung 62: SPR-Bindungskinetik von CPE-spezifischen Antikörpern.

Gereinigte monoklonale Antikörper wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es folgte die sequenzielle Injektion (120 s; 30 $\mu\text{l}/\text{min}$) von CPE in den angegebenen Konzentrationen (siehe Pfeile, Abfolge wie bei CPE1). Durch Pufferinjektion (1200 s) wurde die Dissoziation eingeleitet. Die Berechnung des Kurvenfits erfolgte unter Annahme eines 1:1-Bindungsmodells. Durchgezogene Linien zeigen Messkurven, gestrichelte Linien die zugehörigen Fits. Die Klone CPE66 und 307 wurden aufgrund ihres schlechten Bindungsverhaltens gegenüber CPE von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

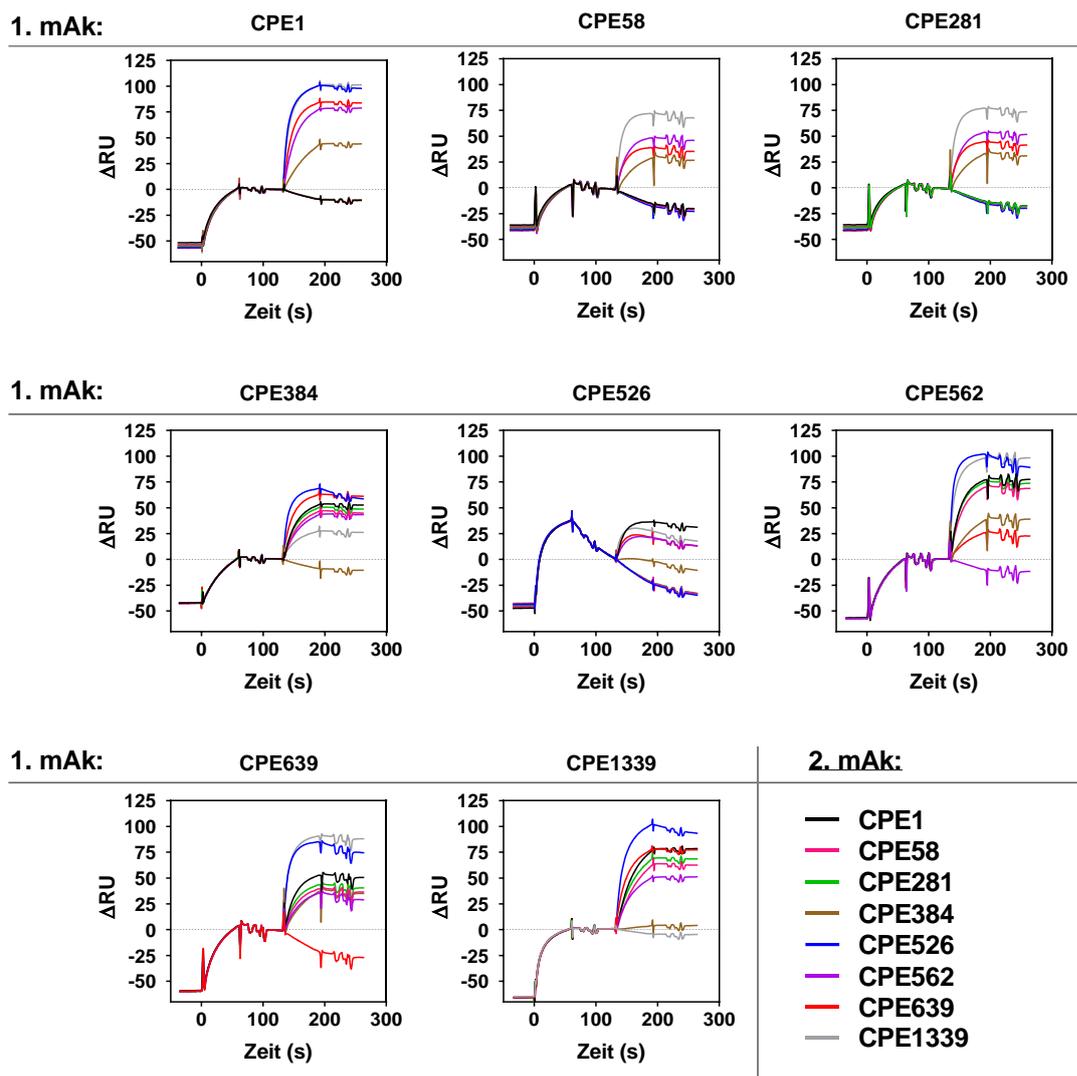


Abbildung 63: Epitopbinning von CPE-spezifischen Antikörpern.

Gereinigte monoklonale Antikörper (1. mAk) wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es folgten die Blockade mit unspezifischem Maus IgG und die Injektion von CPE (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Anschließend wurde ein zweiter monoklonaler Antikörper (2. mAk) injiziert. Anhand des Kurvenverlaufs kann festgestellt werden, ob die beiden Antikörper sich blockieren (gleiches Epitop, kein Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk) oder ob sie kombinierbar sind (distinkte Epitope, Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk).

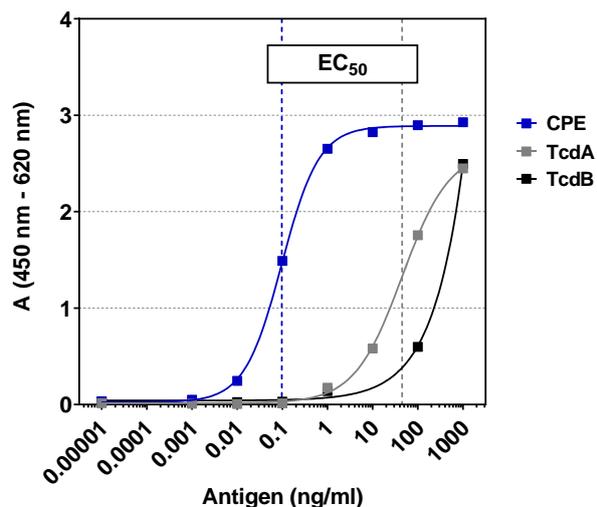


Abbildung 64: Bindung von TcdA und B an Claudin-4.

Claudin-4 (2 µg/ml) wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurden CPE (blau), TcdA (grau) und TcdB (schwarz) in seriellen 1:10-Verdünnungsreihen von 0,001 bis 1000 ng/ml in 0,1 % BSA/PBS-T inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Toxine mit den toxinspezifischen biotinylierten Antikörpern CPE562-Bio (CPE), TcdA3211-Bio (TcdA) und TcdB3322-Bio (TcdB). Es schloss sich die Entwicklung mit Poly-HRP und TMB an. Die Werte wurden in Einzelbestimmung gemessen (n=1). Gestrichelte Linien zeigen die EC₅₀-Werte: in blau CPE (0,01 ng/ml) und in grau TcdA (45 ng/ml).

6.3.3 Vor-Ort-Nachweis von CPE

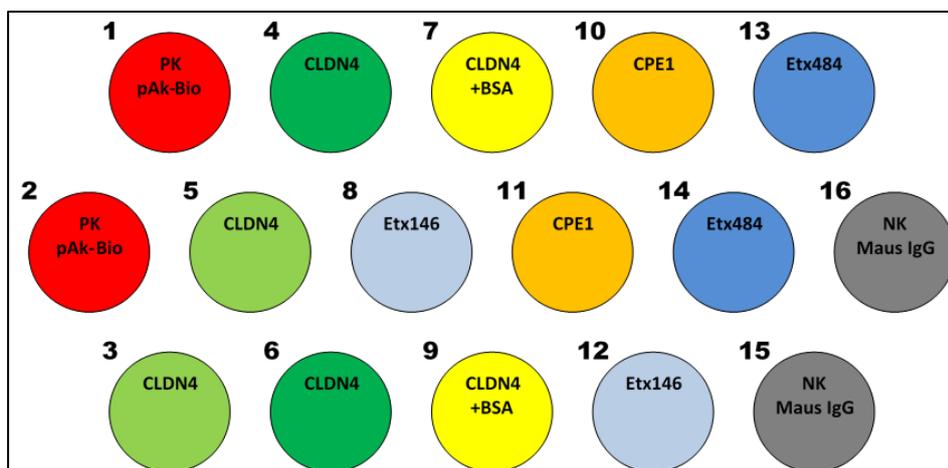


Abbildung 65: Chiplayout der pBDi-Chips zum Nachweis von CPE.

Monoklonale Antikörper (CPE1, anti-CPE; Etx146 und Etx484, anti-Etx) und Claudin-4 (CLDN4) wurden von Fa. Bruker Daltonik auf Biochips gespottet (je 0,5 mg/ml). Claudin-4 wurde zusätzlich auf zwei Positionen zusammen mit BSA immobilisiert. Hierbei diente biotinylierter polyklonaler Kaninchenantikörper als Positivkontrolle (PK) und Maus IgG als Negativkontrolle (NK).

6.4 Epsilon-Toxin aus *C. perfringens*

6.4.1 Antigencharakterisierung

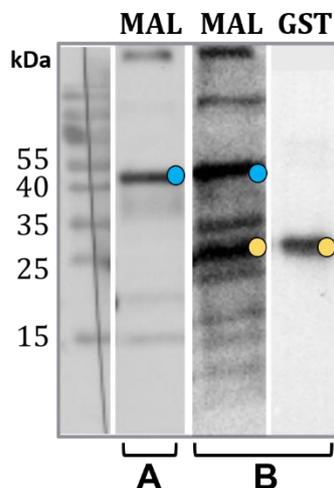


Abbildung 66: Detektion von MAL im Western Blot.

Die Antigene MAL (ungekoppelt) und GST in reduzierendem Probenpuffer (mit β -Mercaptoethanol) wurden auf ein 14 % SDS-Gel aufgetragen (je 300 ng) und elektrophoretisch getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und Blockade unspezifischer Bindungen wurde mit **(A)** polyklonalem MAL-spezifischem (1:500) bzw. **(B)** monoklonalem GST-spezifischem (1:100) Antikörper inkubiert. Die Entwicklung wurde mit biotinyliertem **(A)** Ziege anti-Kaninchen- bzw. **(B)** Ziege anti-Maus-Antikörper, Avidin-Alkalische Phosphatase und CDP-Star für **(A)** 3 min bzw. **(B)** 20 s vorgenommen. Blaue Punkte kennzeichnen MAL-spezifische Banden, gelbe GST-Banden.

6.4.2 Untersuchung von MAL als Rezeptor für Etx

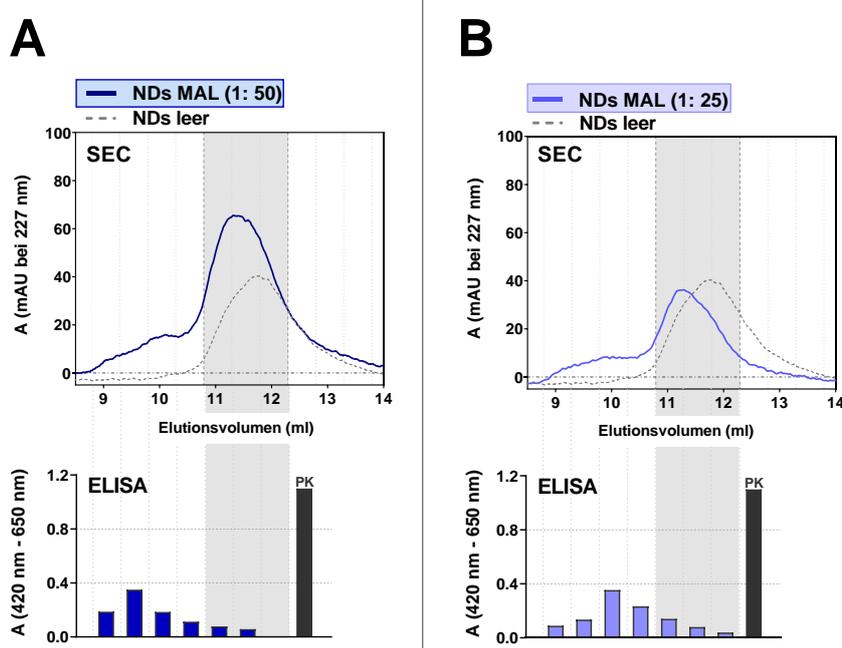


Abbildung 67: Assemblierung von Nanodisks mit ungekoppeltem MAL.

Ungekoppeltes, rekombinantes MAL (entspricht Ansatz 1 in Abbildung 38) wurde im Verhältnis 1:50 **(A)** bzw. 1:25 **(B)** zu MSP mit dem Lipid POPC assembliert. POPC wurde dazu eingetrocknet, mit Natriumdesoxycholat rekonstituiert und bei 0°C mit MSP1E3D1 und MAL vorinkubiert. Entgaste Bio-Beads SM-2 dienen zur Entfernung des Detergenzes. Nach der Assemblierung erfolgte die Reinigung der Nanodisks mittels Größenausschlusschromatographie (SEC, oben). Die Insertion von MAL wurde im indirekten ELISA überprüft (unten). Die aus der SEC stammenden Fraktionen wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert (ca. 3 μ g/ml bezogen auf MSP) und mit polyklonalem MAL-spezifischem Antikörper inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit anti-Kaninchen POD und TMB. Als Positivkontrolle (PK) fungierte immobilisiertes MAL (500 ng/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die bei der SEC gesammelten Fraktionen. Grau markierte Bereiche zeigen das Elutionsvolumen für 13 nm große, leere Nanodisks an.

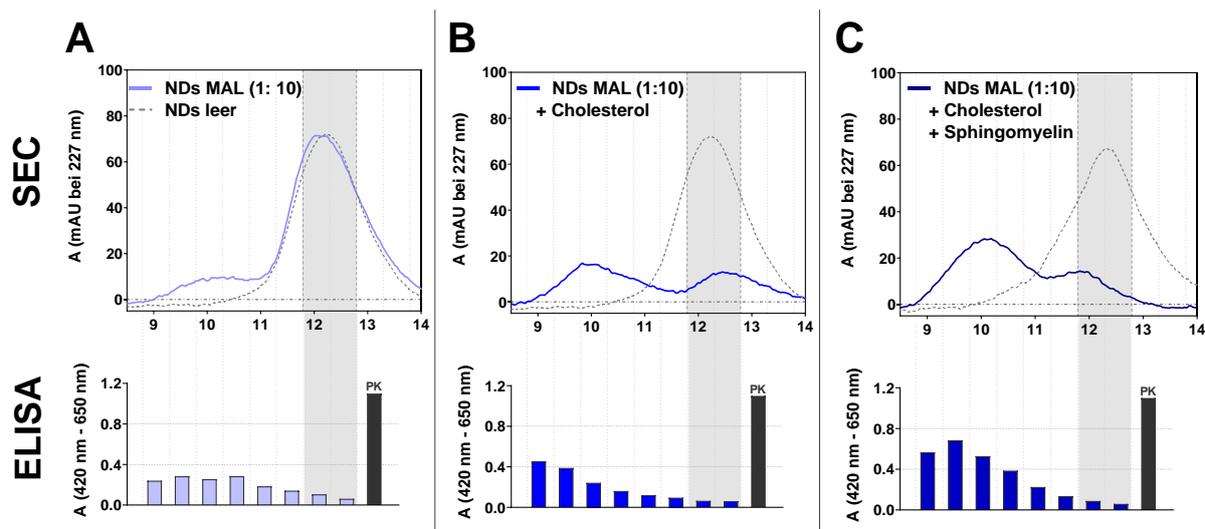


Abbildung 68: Assemblierung von NDs mit immobilisiertem MAL in variabler Lipidumgebung.

Rekombinantes, an einer Matrix immobilisiertes MAL wurde im Verhältnis von 1:10 zu MSP in verschiedenen Lipidumgebungen zu Nanodisks assembliert (entspricht Ansatz 2a in Abbildung 38). **A.** POPC (100 %) **B.** POPC (80 %) und Cholesterol (20 %) **C.** POPC (70 %); Sphingomyelin (20 %) und Cholesterol (10 %). Die Lipide wurden eingetrocknet, mit Natriumdesoxychololat rekonstituiert und bei 0°C mit MSP und MAL vorinkubiert. Entgaste Bio-Beads SM-2 dienten zur Entfernung des Detergenzes. Nach der Assemblierung wurden die Nanodisks mit reduziertem Glutathion (15 mM) von der Matrix eluiert. Die Reinigung der Nanodisks erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie (SEC, oben). Die Insertion von MAL wurde im indirekten ELISA überprüft (unten). Die aus der SEC stammenden Fraktionen wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit polyklonalem MAL-spezifischem Antikörper inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit anti-Kaninchen POD und TMB. Als Positivkontrolle (PK) fungierte immobilisiertes MAL (500 ng/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die bei der SEC gesammelten Fraktionen. Grau markierte Bereiche zeigen das Elutionsvolumen für 13 nm große, leere Nanodisks an.

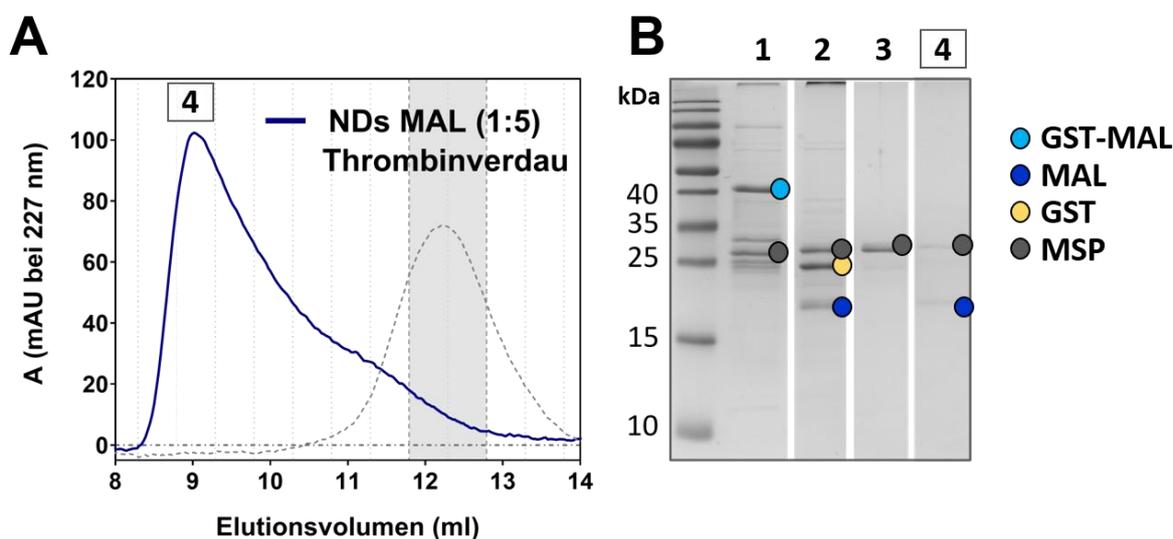


Abbildung 69: Assemblierung von NDs mit immobilisiertem MAL unter Abspaltung des GST-Tags.

Rekombinantes, an einer Matrix immobilisiertes MAL wurde im Verhältnis von 1:5 zu MSP mit dem Lipid POPC zu Nanodisks assembliert (entspricht Ansatz 2b in Abbildung 38). Nachdem die Elution von der Matrix erfolgt war, wurde der Assemblierungsansatz zur Abspaltung des GST-Tags mit Thrombin versetzt (16 h, 22°C). Die Reinigung der Nanodisks erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. **(A)** Dargestellt ist das Chromatogramm der Reinigung (Absorption bei 227 nm in Abhängigkeit des Elutionsvolumens). Grau markierte Bereiche zeigen das Elutionsvolumen für 13 nm große, leere Nanodisks an. **(B)** Die enzymatische Spaltung wurde durch Auftrennung in 14 % SDS-Gelen (reduzierende Bedingungen, mit β -Mercaptoethanol) und Anfärbung mit Coomassie-Blue kontrolliert. Folgendes wurde aufgetragen: **1:** Assemblierungsansatz vor Verdau und **2:** nach Verdau mit Thrombin (je 350 ng bezogen auf MSP); **3:** MSP (400 ng) und **4:** unverdünnte Fraktion aus der SEC mit höchsten Absorptionswerten (227 nm). Farbige Punkte markieren spezifische Banden des ungespaltenen MAL (türkis), gespaltenes MAL (blau), GST (gelb) und MSP (grau).

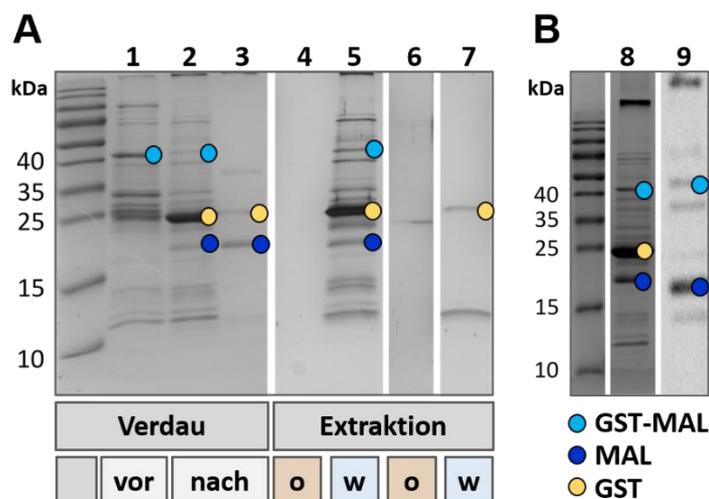


Abbildung 70: Enzymatische Spaltung von MAL und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln.

An Matrix gekoppeltes MAL (etwa 650 µg) wurde zur Abspaltung des GST-Tags mit Thrombin (16 h; 22°C) inkubiert (entspricht Ansatz 3 in Abbildung 38). Zur Überwachung der Spaltung (**A**, 1-3) wurden Proben vor der Inkubation (**1**) und danach (**2**: sedimentierte Matrix; **3**: Überstand) genommen. Die Auftrennung erfolgte in 14 % SDS-Gelen unter reduzierenden Bedingungen. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie-Blue angefärbt. Nach dem Verdau wurden Sediment (Sepharose-Matrix) und Überstand voneinander getrennt gehandhabt. Das Sediment wurde mit etwa dem gleichen Volumen Puffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) aufgeschlämmt. Sediment und Überstand wurden einer Extraktion mit einer Chloroform-Methanol-Mischung (2:1) unterzogen (**A**, 4-7). Es folgte die Trennung von organischer (**4**: Sediment; **6**: Überstand) und wässriger Phase (**5**: Sediment, **7**: Überstand). Die Auftragung in 14 % SDS-Gelen erfolgte direkt (wässrigen Phase) bzw. unter Verdampfung des Lösungsmittels und Wiederaufnahme in reduzierendem Probenpuffer (organische Phase). Proteinbanden wurden mittels Silberfärbung detektiert. Der Nachweis des gespaltenen MALs (ohne GST-Tag) erfolgte mittels Western Blot (**B**). Dazu wurde das Sediment mit Überstand nach Verdau auf 14 % SDS-Gelen aufgetragen und mit Coomassie-Blue angefärbt (**8**) bzw. mittels Elektrobplot auf eine PVDF-Membran übertragen (**9**). Nach Blockade unspezifischer Bindungen wurde Letztere mit einem MAL-spezifischen Antikörper und anschließend mit biotinyliertem Ziege anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit Avidin-Alkalische Phosphatase und CDP-Star. Dabei betrug die Entwicklungszeit 20 s. Farbige Punkte in Gelen (**A**) und Western Blots (**B**) kennzeichnen spezifische Banden des ungespaltenen MAL mit GST-Tag (türkis), gespaltenes MAL (blau) und GST (gelb).

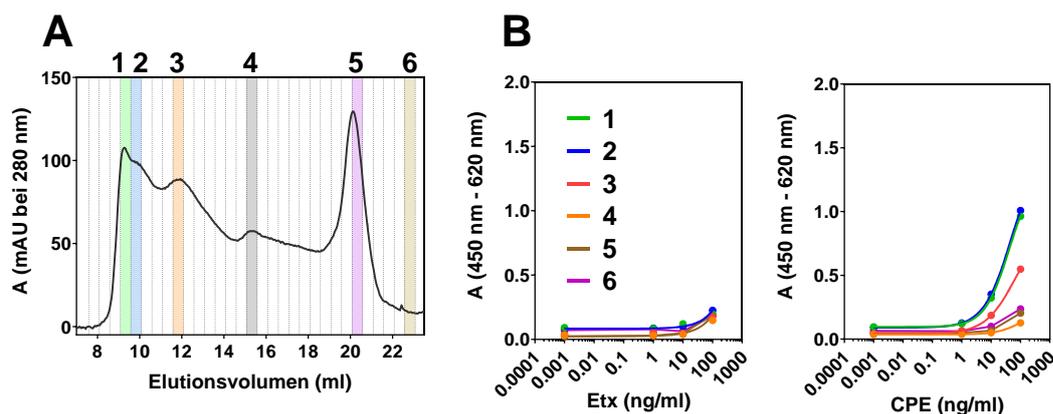


Abbildung 71: Herstellung von SMALPs aus Etx-sensitiven MDCK-Zellen.

Für die Herstellung von SMALPs (*SMA lipid particles*, entspricht Ansatz 4 in Abbildung 38) aus MDCK-Zellen (ATCC; CRL-2936) wurden diese den Herstellerangaben entsprechend in EMEM mit 10 % FKS kultiviert. Die Lyse von etwa 1×10^7 Zellen erfolgte durch Inkubation mit 1 ml 2 % SMA (3:1)-Puffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 25 U Benzonase) bei 20°C für eine Stunde. Nach Ultrazentrifugation (1 h, 100.000 × g) wurde der Überstand abgetrennt und per Größenausschlusschromatographie (Superdex200 Increase 10/300 gl) untersucht (**A**). Die dabei gesammelten Fraktionen (**1-6**) wurden mittels BCA-Kit auf ihren Gesamtproteingehalt getestet und nachfolgend zur Durchführung eines Sandwich-ELISAs (**B**) auf Mikrotiterplatten immobilisiert (5 µg/ml Gesamtprotein). Nach Blockade unspezifischer Bindungen folgte die Inkubation mit seriellen 1:10-Verdünnungsreihen von rekombinatem Etx (links) bzw. CPE (rechts). Die Detektion wurde mit Etx212-Bio bzw. CPE562-Bio vorgenommen. Abschließend erfolgte die Entwicklung mit SA-Poly HRP und TMB.

6.4.3 Immunisierungen

Stamm für Maus 12 und 13: BALB/c
 Stamm für Maus 14 und 15: NMRI
 Antigen: PETx Y84A

Tabelle 56: Immunisierung mit PETx Y84A.

Tag	Durchführung	Antigenmenge (μg)	Puffer
1	Immunisierung (M12-15)	10	PBS; 50 % KFA
29	Immunisierung (M12-15)	20	PBS; 50 % IFA
39	Blutabnahme für Titer test (M12-15)	-	-
50	Immunisierung (M15)	20	PBS; 50 % IFA
61	1. Boost (M15)	5	PBS
62	2. Boost (M15)	5	PBS
63	3. Boost (M15)	5	PBS
64	Fusion (M15)	-	-

Mäuse sind mit M und der zugehörigen Nummer abgekürzt; KFA = Komplettes Freund-Adjuvans; IFA = Inkomplettes Freund-Adjuvans

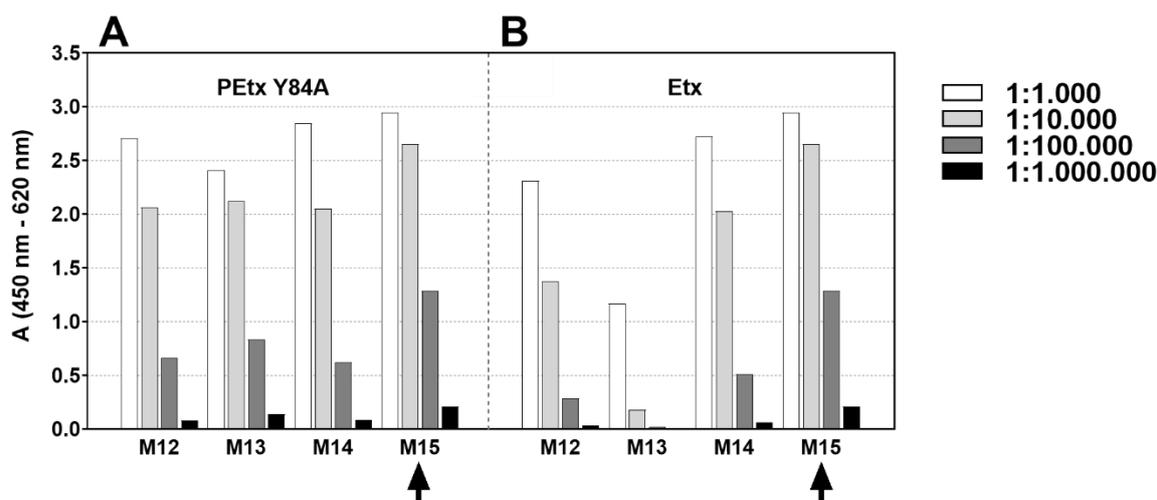


Abbildung 72: Testung des Titers immunisierter Mäuse gegen Etx.

Die Immunisierung von Mäusen (M12 bis M15) erfolgte mit PETx Y84A. Nach der Blutentnahme (Tag 39, Immunisierungsschema) wurde Serum durch Zentrifugation bei $2.000 \times g$ gewonnen. Die Testung im indirekten ELISA erfolgte mit immobilisiertem PETx Y84A (A) und Etx (B) zu je 500 ng/ml. Die Entwicklung erfolgte mit Fcy-spezifischer anti-Maus-POD und TMB. Pfeile kennzeichnen den Titer der für die Hybridomfusion ausgewählten Maus.

6.4.4 Charakterisierung Etx-spezifischer Antikörper

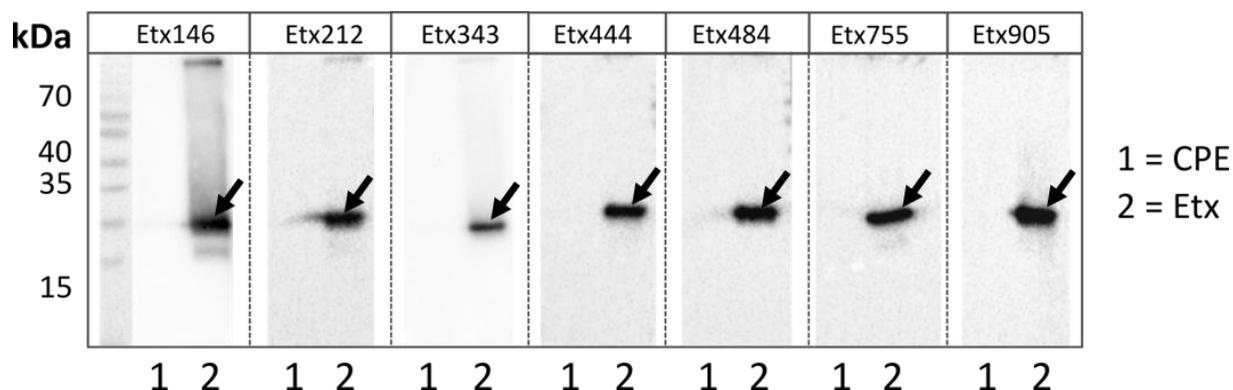


Abbildung 73: Untersuchung Etx-spezifischer monoklonaler Antikörper im Western Blot.

Monoklonale Antikörper wurden im Western Blot auf die Erkennung von CPE (1, Negativkontrolle) und Etx (2) getestet. Antigene (je 250 ng) wurden in reduzierendem Probenpuffer auf 12 % SDS-PAGE-Gele aufgetragen und aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf aktivierte PVDF-Membranen mittels Elektrobrot und Blockade unspezifischer Bindungen wurde mit Etx-spezifischen Antikörpern (1 µg/ml) inkubiert. Die Entwicklung wurde mit biotinyliertem Ziege anti-Maus-Antikörper, Avidin-Alkalische Phosphatase und CDP-Star vorgenommen. Als Marker diente PageRuler Prestained Protein Ladder. Die Entwicklungszeiten waren 30 s (Etx146, Etx343) bzw. 60 s (Etx212, Etx444, Etx484, Etx755, Etx905).

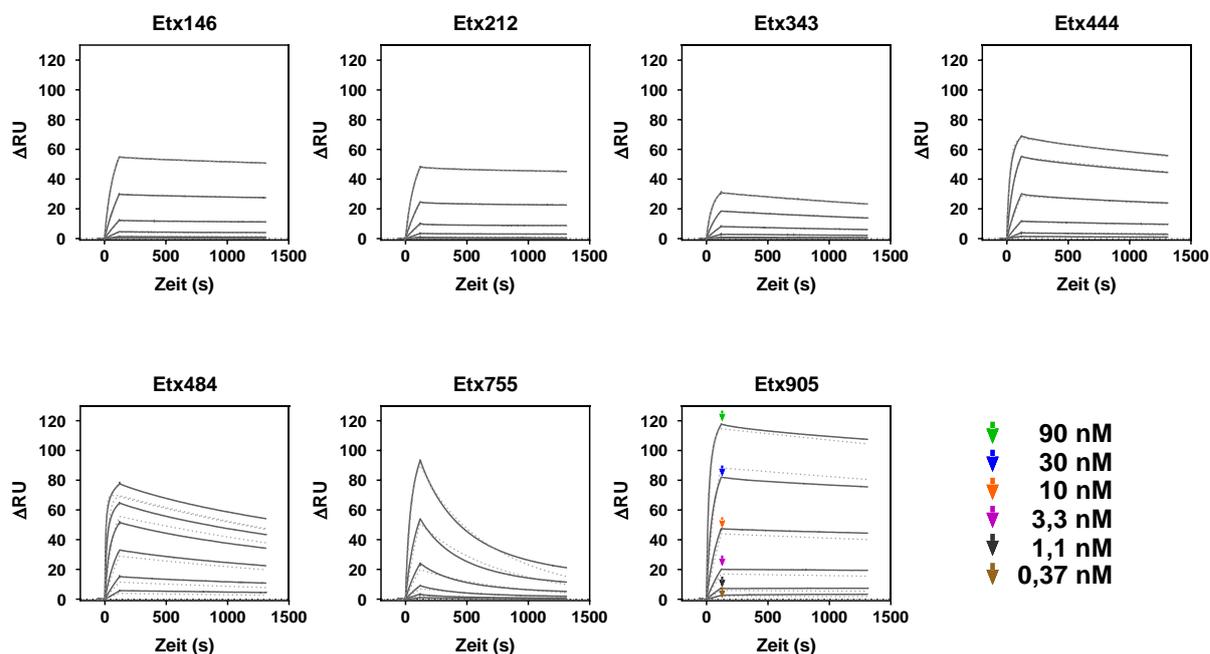


Abbildung 74: SPR-Bindungskinetik von Etx-spezifischen Antikörpern.

Gereinigte monoklonale Antikörper wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es folgte die sequenzielle Injektion (120 s; 30 µl/min) von Etx in den angegebenen Konzentrationen (siehe Pfeile, Abfolge wie bei Etx905). Durch Pufferinjektion (1200 s) wurde die Dissoziation eingeleitet. Die Berechnung des Kurvenfits erfolgte unter Annahme eines 1:1-Bindungsmodells. Durchgezogene Linien zeigen Messkurven, gestrichelte Linien die zugehörigen Fits.

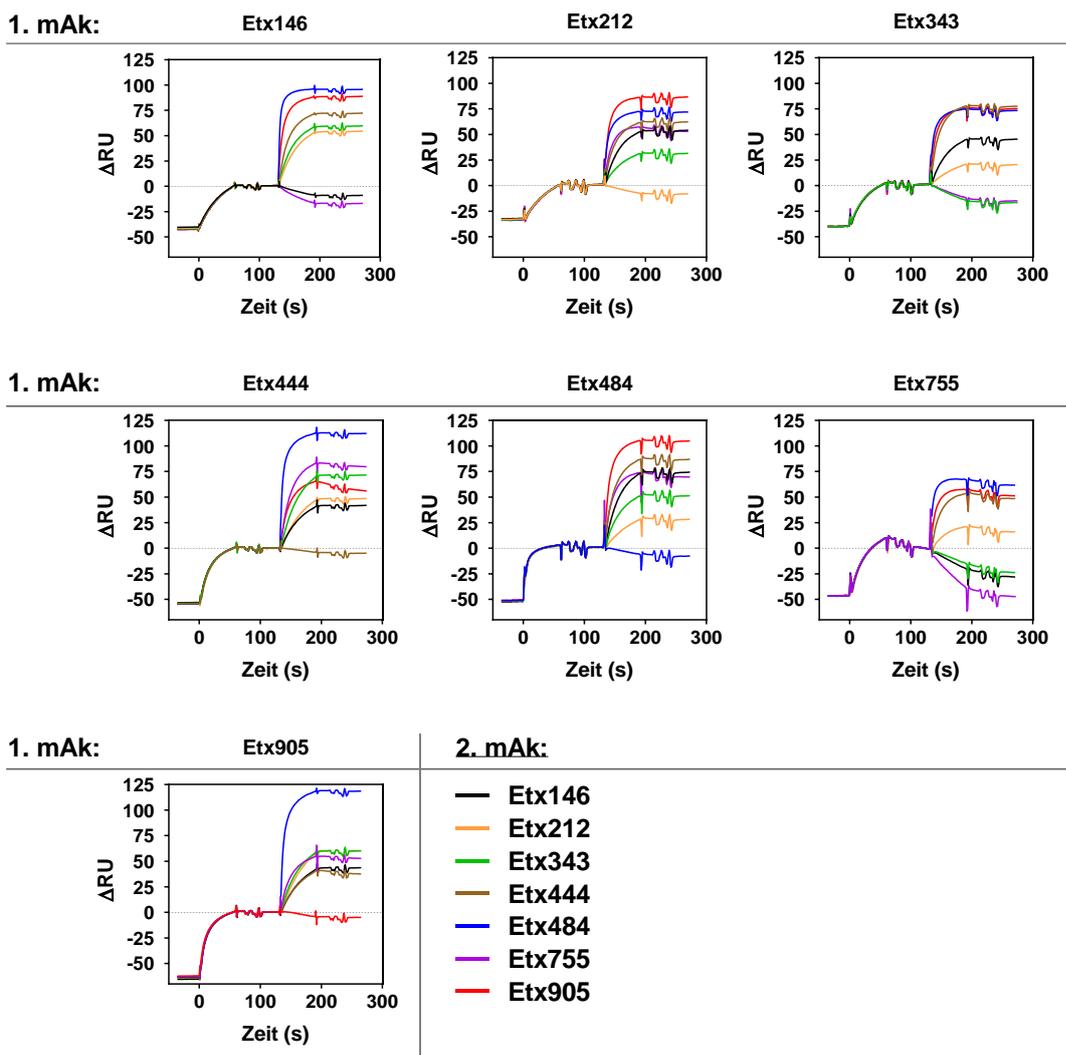


Abbildung 75: SPR-basiertes Epitopbinning Etx-spezifischer Antikörper.

Gereinigte monoklonale Antikörper (1. mAk) wurden über ein Mouse Capture Kit auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Es folgten die Blockade mit unspezifischem Maus IgG und die Injektion von Etx (2 µg/ml). Anschließend wurde ein zweiter monoklonaler Antikörper (2. mAk) injiziert. Anhand des Kurvenverlaufs kann festgestellt werden, ob die beiden Antikörper sich blockieren (gleiches Epitop, kein Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk) oder ob sie kombinierbar sind (distinkte Epitope, Signalanstieg bei Injektion des 2. mAk).

6.4.5 Vor-Ort-Nachweis von Etx

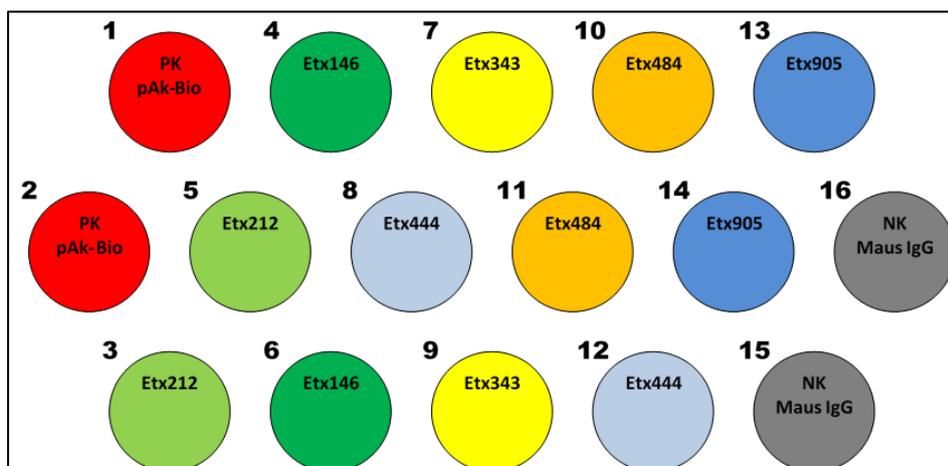


Abbildung 76: Chiplayout von pBDi-Chips zum Nachweis von Etx.

Etx-spezifische monoklonale Antikörper (Etx146, Etx343, Etx444, Etx484, Etx905) wurden von Fa. Bruker Daltonik auf Biochips gespottet (je 0,5 mg/ml). Hierbei diente biotinylierter polyklonaler Kaninchenantikörper als Positivkontrolle (PK) und Maus IgG als Negativkontrolle (NK).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders möchte ich Dr. Brigitte Dorner für die Möglichkeit danken, diese Arbeit durchführen und ein solch interessantes Thema bearbeiten zu dürfen. Die hervorragende wissenschaftliche Anleitung und Koordinierung des Projekts haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung an der Freien Universität Berlin und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vor allem danke ich allen Kollegen, mit denen ich im Verlauf dieser Promotion zusammenarbeitete. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Dr. Maren Krüger für die geduldige Einarbeitung, die exzellente fachliche Unterstützung und ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft. Den Schreibprozess unterstützte sie nicht nur durch das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern vor allem auch durch motivierende und aufheiternde Worte. Das SensTox-Projekt, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand, wird mir dank der tollen Zusammenarbeit mit Dr. Maren Krüger und Anyess von Bock-Auth in bester Erinnerung bleiben, nicht zuletzt aufgrund der vielfältigen schönen Aktivitäten außerhalb der Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Dr. Daniel Stern für die wertvollen fachlichen Ratschläge, das Korrekturlesen dieser Arbeit und die konstruktiven Tipps zum Überwinden von Schreibblockaden bedanken. Bei Dr. Martin Dorner bedanke ich mich für die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen und seine große Hilfsbereitschaft im Verlauf dieser Promotion. Darüber hinaus danke ich Dr. Sylvia Worbs, auf deren umfangreichen Vorarbeiten zu den Pflanzentoxinen Rizin und Abrin diese Arbeit aufbauen konnte. Dr. Martin Skiba danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und die Bereitstellung dieser Daten. Außerordentlichen Dank möchte ich außerdem Anna Kowalczyk, Conny Müller, Jacek Millert, Ewa Schlereth, Olena Shatohina, Kathrin Grunow, Heidrun Ranisch, Petra Leist und Michael Niecke für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und die harmonische Arbeitsatmosphäre aussprechen. Bei allen weiteren, namentlich nicht erwähnten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ZBS3 bedanke ich mich herzlich für die tolle Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei allen Projektpartnern des SensTox-Projektes bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank Dr. Andreas Rummel, Dr. Stefan Mahrhold und Dr. Jasmin Weisemann (MHH Hannover) für die Bereitstellung diverser rekombinanter Proteine und die anregenden Diskussionen. Dr. Thomas Elßner und Dr. Christopher Pöhlmann von Bruker Daltonik danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellungen bezüglich des pBDi-Systems. Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märklbauer (LMU München) danke ich für die Bereitstellung der Shigatoxin-spezifischen monoklonalen Antikörper. Dr. Ute Messelhäuser (LGL Bayern), Prof. Dr. Christian Menge (FLI Jena), Dr. Angelika Fruth (RKI) und PD Dr. med. habil. Dagmar Rimek (TLV Thüringen) danke ich für die Bereitstellung diverser toxischer Bakterienüberstände.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir stets Rückhalt gaben, mich liebevoll unterstützten und unermesslich geduldig mit mir waren. Dafür bin ich euch sehr dankbar!