

Stationäre und mobile Verfahren zur
Detektion und Differenzierung
biologischer Toxine

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

Eva-Maria Hansbauer

aus Hutthurm (Landkreis Passau)

2016

Diese Arbeit wurde von Februar 2013 bis März 2016 in der Arbeitsgruppe „Biologische Toxine“ im Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene am Robert Koch-Institut in Berlin unter der Leitung von Frau Dr. Brigitte G. Dorner angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Brigitte G. Dorner

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der Disputation: 12.07.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Brigitte G. Dorner, auf deren Initiative und unter deren hervorragender wissenschaftlicher Anleitung die vorliegende Arbeit entstand. Vielen Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftlichen Diskussionen und das Feedback!

Herrn Prof. Dr. Mutzel danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit an der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Herrn Dr. Martin Skiba danke ich sehr herzlich für die Einarbeitung und die gute Zusammenarbeit im GEFREASE-Projekt. Vielen Dank für den Meinungsaustausch, die wertvollen Anregungen und das außergewöhnliche Geburtstagsgeschenk!

Ein besonderes Dankeswort gilt Herrn Dr. Martin Dorner für immerwährende konstruktive Diskussionen und Hilfestellungen.

Bei Dr. Sylvia Worbs und Dr. Uwe Fiebig bedanke ich mich für die nützlichen Tipps und Tricks bei der Herstellung monoklonaler Antikörper, bei Dr. Daniel Stern für die Hilfe bei der Oberflächenplasmonresonanz und bei Dr. Bettina Kampa für das Korrekturlesen des Abstracts. Meinen Mitdoktorandinnen Maren Krüger und Laura von Berg danke ich für die große Hilfsbereitschaft und das nette Arbeitsklima.

Für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag, gerade bei den Fusionen, bedanke ich mich bei Sandy Sonntag, Heidrun Ranisch, Jacek Millert, Ewa Schlereth, Olena Shatohina, Kathrin Grunow, Petra Leist und Michael Niecke. Herzlichen Dank an alle Mitglieder von ZBS3 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit!

Bedanken möchte ich mich ferner bei Dr. Thomas Elßner und Dr. Christopher Pöhlmann (Bruker Daltonik) für die gute Zusammenarbeit in Bezug auf den portablen Toxindetektor und bei Nahid Derakshani (BBK) in Bezug auf die Anwenderübung. Dank gilt auch Dr. Andreas Rummel (Medizinische Hochschule Hannover) für die Bereitstellung rekombinanter Toxine und die Neutralisationsexperimente. Dr. Cédric Woudstra und Dr. Patrick Fach (ANSES) danke ich für die Zusammenarbeit bei der Validierung der Testsysteme für veterinärpathogene BoNTs. Das GEFREASE-Projekt – und damit diese Arbeit – wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit stets mit Rat und Tat beigestanden haben. Vor allem danke ich meiner Familie für die Unterstützung und das Verständnis. Nicht zuletzt gilt mein Dank Peter für seine liebevolle Geduld, Motivation und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	i
Inhaltsverzeichnis.....	ii
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	ix
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Relevanz biologischer Toxine im Gesundheits-, Lebensmittel- und Sicherheitsbereich1	
1.1.1 Staphylokokken Enterotoxine.....	3
1.1.2 Botulinum Neurotoxine.....	8
1.1.3 Abrin.....	16
1.2 Stationäre und Vor-Ort-Detektionsverfahren.....	20
1.2.1 Ausgewählte stationäre und Vor-Ort-Detektionsverfahren.....	22
1.2.2 Portabler Toxindetektor pTD.....	27
1.3 GEFREASE-Projekt.....	30
1.4 Ziele der Arbeit.....	31
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 Geräte.....	32
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.3 Chemikalien.....	34
2.1.4 Matrices.....	34
2.1.5 Toxine.....	35
2.1.6 Enzyme und Antikörper.....	36
2.1.7 Puffer.....	38
2.1.8 Zelllinie und Medien.....	40
2.1.9 Tiere.....	41
2.1.10 Peptide.....	41
2.1.11 Kommerzielle Kits.....	42
2.1.12 Software.....	42
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	43
2.2.1.1 Zellkultur-Techniken.....	43
2.2.1.2 Kryokonservierung der Hybridomazellen.....	43
2.2.1.3 Mykoplasmentestung der Hybridomazellen.....	44
2.2.2 Umgang mit Toxinen.....	44

2.2.2.1	Sicherheitsaspekte im Umgang mit Toxinen.....	44
2.2.2.2	Herstellung toxinhaltiger Kulturüberstände	44
2.2.2.3	Maus Bioassay.....	44
2.2.3	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	45
2.2.3.1	Toxoid-Herstellung	45
2.2.3.2	Immunisierung	45
2.2.3.3	Vorbereitung der Primärzellen	45
2.2.3.4	Vorbereitung der Myelomzellen	46
2.2.3.5	Fusion.....	46
2.2.3.6	Subklonierung	46
2.2.3.7	Durchflusszytometrie	47
2.2.3.8	Antikörperherstellung.....	47
2.2.3.9	Antikörperreinigung	47
2.2.3.10	Isotypbestimmung	48
2.2.3.11	Kopplung von Biotin an Antikörper.....	48
2.2.4	Proteinchemische Methoden.....	48
2.2.4.1	Antikörperkonzentrationsbestimmung	48
2.2.4.2	SDS-PAGE.....	49
2.2.4.3	Färbetechniken für SDS-Gele	50
2.2.5	Immunoassays	51
2.2.5.1	Western Blot.....	51
2.2.5.2	Indirekter ELISA	51
2.2.5.3	Sandwich ELISA.....	52
2.2.5.4	ELLA.....	52
2.2.5.5	Screeningverfahren mittels Suspensionsarray	52
2.2.5.6	Oberflächenplasmonresonanz (SPR).....	54
2.2.6	Endopep-Massenspektrometrie	55
2.2.6.1	Immunoanreicherung.....	55
2.2.6.2	Endopep-Assay.....	55
2.2.6.3	MS-Detektion	56
2.2.7	pTD System.....	56
2.2.7.1	Vorbereitung.....	56
2.2.7.2	Messung	57
2.2.8	Auswertungen von Immunoassays	57
2.2.8.1	ELISA.....	57
2.2.8.2	pTD System.....	58

3	Ergebnisse.....	59
3.1	Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen SEA	62
3.1.1	Immunisierungsstrategie und Screening.....	62
3.1.2	Charakterisierung der anti-SEA Antikörper	63
3.1.3	Sandwich ELISA	65
3.2	Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen humanpathogene BoNT 67	
3.2.1	Immunisierungsstrategie und Screening.....	68
3.2.1.1	Umfassende Immunisierung gegen alle humanpathogenen BoNT	68
3.2.1.2	Einzelimmunisierung mit H _C /E1	70
3.2.2	Charakterisierung der anti-BoNT/A Antikörper.....	71
3.2.3	ELISA für BoNT/A	75
3.2.4	Charakterisierung der anti-BoNT/E Antikörper	78
3.2.5	Sandwich ELISA	81
3.3	Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen veterinärpathogene BoNT	83
3.3.1	Immunisierungsstrategie und Screening.....	83
3.3.2	Charakterisierung der anti-BoNT/C und /DC Antikörper	84
3.3.3	Sandwich ELISA	86
3.4	Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Abrin.....	88
3.4.1	Immunisierungsstrategie und Screening.....	88
3.4.2	Charakterisierung der anti-Abrin Antikörper	90
3.4.3	Sandwich ELISA	92
3.4.4	ELLA.....	93
3.5	Applikationsbeispiel: Differenzierung zwischen BoNT/C, /D und den Mosaik-Typen /CD und /DC	96
3.5.1	Aufbau eines Sandwich ELISA Systems zur Differenzierung veterinärpathogener BoNTs.....	96
3.5.2	Differenzierung mittels Endopep-MS Assay.....	100
3.5.3	Validierung der Testsysteme zur Differenzierung von veterinärpathogenen BoNTs.....	103
3.5.3.1	BoNT/C, /CD, /D und /DC-haltige Kulturüberstände	103
3.5.3.2	Selektivität gegenüber verwandten <i>Clostridien</i>	105
3.5.3.3	Untersuchungen von primärem Anzuchtmaterial.....	106
3.6	Applikationsbeispiel: Vor-Ort-Detektion mittels pTD	109
3.6.1	Einzelnachweise der Toxine	109
3.6.1.1	Detektion von SEA.....	109
3.6.1.2	Detektion von BoNT/E.....	111

3.6.1.3	Detektion von BoNT/C	113
3.6.1.4	Detektion von BoNT/D	115
3.6.1.5	Detektion von Abrin.....	116
3.6.2	Multiplex-Nachweis der fünf Toxine	118
3.6.2.1	Untersuchungen der einzelnen Toxine	118
3.6.2.2	Gleichzeitige Untersuchungen aller Toxine	122
3.6.3	Validierung des Vor-Ort-Toxinsnachweises in verschiedenen Matrices	123
3.6.4	Selektivität gegenüber verwandten Toxinen	126
3.6.5	Applikation des pTD Systems in einer Anwenderübung	128
4	Diskussion.....	133
4.1	Immunisierungs- und Screeningsstrategien	133
4.2	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	136
4.3	Stationäre Einzeltoxinnachweise	139
4.4	Applikationsbeispiel: stationäre Differenzierung veterinärpathogener BoNT mittels ELISA und Endopep-MS Assay	141
4.5	Applikationsbeispiel: Multiplex- und Vor-Ort-Detektionsplattform pTD.....	144
4.5.1	Einzeltoxindetektion mit dem pTD System.....	144
4.5.2	Multiplex-Nachweis und Validierung des pTD Systems	146
4.5.3	Einsatzmöglichkeiten des pTD.....	149
4.6	Ausblick.....	151
5	Zusammenfassung.....	153
6	Abstract.....	155
7	Literatur.....	157
8	Publikationen	172
9	Anhang	173
9.1	Immunisierungen	173
9.1.1	SEA Immunisierung	173
9.1.2	BoNT/A und /E Immunisierung	174
9.1.3	H _C /C Immunisierung	177
9.1.4	Abrin Immunisierungen.....	178
9.1.5	Weitere durchgeführte Fusionen	180
9.2	Chiplayout für die pTD Plattform.....	181
9.2.1	Layout zur Detektion von SEA und BoNT/E (Biochip 1).....	181
9.2.2	Layout zur Detektion von BoNT/C und /D (Biochip 2)	181
9.2.3	Layout zur Detektion von H _C /C (Biochip 3)	182
9.2.4	Layout zur Detektion von Abrin (Biochip 4)	182
9.2.5	Layout für Anwenderübung (Biochip 5)	183

9.2.6	Layouts zur Antikörperfindung für Multiplex-Chip (Biochip 6 und 7).....	183
9.2.7	Layout finaler Chip (Biochip 8)	184
9.3	Überblick: Anti-BoNT/B und -BoNT/F Antikörper	185
9.4	Nachweis der Klonalität mittels Durchflusszytometrie	185
9.5	Untersuchung der Epitopfamilien der anti-H _C /A Antikörper	186
9.6	Untersuchung der Epitopfamilien der anti-H _C /C Antikörper.....	187
9.7	Western Blot: Spezifität der anti-BoNT/C und /D Antikörper	188

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: SEA als Superantigen	4
Abb. 2: Phylogenetische Einordnung der SEs und SEIs.....	5
Abb. 3: Wirkungsmechanismus der BoNTs	10
Abb. 4: Übersicht über bisher bekannte Sero- und Subtypen der BoNTs	11
Abb. 5: Mosaikstruktur von BoNT/C, /CD, /D und /DC.....	13
Abb. 6: Pflanze, Samen und Wirkort von Abrin	17
Abb. 7: Unterschiede zwischen Vor-Ort- und stationärem Nachweis.....	20
Abb. 8: Prinzip des <i>lateral flow assays</i>	23
Abb. 9: Prinzip des Suspensionsarrays.....	24
Abb. 10: Prinzip und Auswertung der Oberflächenplasmonresonanz.....	26
Abb. 11: Prinzip des pTD	28
Abb. 12: Labor- und Koffervariante des pTD	30
Abb. 13: Schematische Darstellung der Generierung und Charakterisierung von mAk	61
Abb. 14: Reaktivität der anti-SEA Antikörper	63
Abb. 15: Western Blot: Spezifität der mAk SEA165 und SEA388.....	64
Abb. 16: Kinetische Charakterisierung von SEA165, SEA388 und SEA2353	64
Abb. 17: Sandwich ELISA zum Nachweis von SEA, SEB und SEE.....	65
Abb. 18: Untersuchung des Titers immunisierter Mäuse mittels Suspensionsarray.....	69
Abb. 19: Reaktivität der anti-H _C /A Antikörper	71
Abb. 20: Reaktivität der anti-H _C /A Antikörper gegen Subtypen von BoNT/A.....	72
Abb. 21: Bindungsstudien der Antikörper A185, A778 und A2807 gegenüber H _C -Fragmenten von BoNT/A Subtypen	73
Abb. 22: Neutralisation der anti-BoNT/A Antikörper.....	74
Abb. 23: Sandwich ELISA zum Nachweis unterschiedlicher BoNT/A Subtypen	76
Abb. 24: Reaktivität der anti-H _C /E Antikörper.....	78
Abb. 25: Reaktivität der anti-BoNT/E Antikörper gegen Subtypen von BoNT/E.....	79
Abb. 26: Kinetische Charakterisierung der anti-H _C /E Antikörper.....	80
Abb. 27: Sandwich ELISA zum Nachweis von BoNT/E1, /E3 und /Ex.....	81
Abb. 28: Reaktivität der anti-H _C /C Antikörper	84
Abb. 29: Western Blot: Spezifität der anti-H _C /C Antikörper	84
Abb. 30: Kinetische Charakterisierung von HcC141, HcC515, HcC1304 und HcC2378	85
Abb. 31: Sandwich ELISA zum Nachweis von BoNT/C und H _C /C.....	86
Abb. 32: Sandwich ELISA zum Nachweis von BoNT/DC.....	87
Abb. 33: Reaktivität der anti-Abrin Antikörper (1. Fusion, NMRI)	90
Abb. 34: Spezifität der anti-Abrin Antikörper.....	91
Abb. 35: Kinetische Charakterisierung von AP3202 und AP2573.....	91

<i>Abb. 36:</i> Western Blot zweier anti-Abrin Antikörper	92
<i>Abb. 37:</i> Sandwich ELISA zur Detektion von Abrin-a und <i>Abrus</i> Agglutinin	93
<i>Abb. 38:</i> Reaktivität der anti-Abrin Antikörper in einem ELLA.....	94
<i>Abb. 39:</i> Sandwich ELISA zur Differenzierung veterinärpathogener BoNTs	99
<i>Abb. 40:</i> Schematische Darstellung des Endopep-MS Assays.....	101
<i>Abb. 41:</i> Differenzierung von clostridialen Kulturüberständen mittels ELISA und Endopep-MS Assay.....	102
<i>Abb. 42:</i> Einzelnachweis von SEA.....	111
<i>Abb. 43:</i> Einzelnachweis von BoNT/E.....	112
<i>Abb. 44:</i> Einzelnachweis von BoNT/C	114
<i>Abb. 45:</i> Einzelnachweis von BoNT/D	115
<i>Abb. 46:</i> Einzelnachweis von Abrin-a.....	117
<i>Abb. 47:</i> Multiplex-Nachweis aller fünf Toxine einzeln.....	120
<i>Abb. 48:</i> Vergleich der Messung der einzelnen Analyten mit einem bzw. allen Detektions-Ak	121
<i>Abb. 49:</i> Multiplex-Nachweis aller fünf Toxine gleichzeitig.....	123
<i>Abb. 50:</i> Nachweis der fünf Toxine in fünf Matrices	125
<i>Abb. 51:</i> Schematischer Ablauf der Diagnostik veterinärpathogener Botulismusproben.....	143

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1:</i> Beispiele für SE-bedingte Lebensmittelvergiftungen	3
<i>Tab. 2:</i> Sequenzhomologien in [%] der SEs auf Aminosäure-Ebene	6
<i>Tab. 3:</i> Überblick: Detektionsmöglichkeiten für SEA und SEB	7
<i>Tab. 4:</i> Überblick: Detektionsmöglichkeiten für BoNT	15
<i>Tab. 5:</i> Überblick: Detektionsmöglichkeiten für Abrin	19
<i>Tab. 6:</i> Überblick: Ausgewählte stationäre und Vor-Ort-Nachweis-Methoden für biologische Toxine	22
<i>Tab. 7:</i> Überblick: Bisher etablierte pTD Chips	29
<i>Tab. 8:</i> Geräte	32
<i>Tab. 9:</i> Verbrauchsmittel	33
<i>Tab. 10:</i> Chemikalien	34
<i>Tab. 11:</i> Matrizes	35
<i>Tab. 12:</i> Toxine	35
<i>Tab. 13:</i> Kommerzielle Antikörper und Enzyme	36
<i>Tab. 14:</i> Primärantikörper	37
<i>Tab. 15:</i> Puffer	38
<i>Tab. 16:</i> Medienzusätze	40
<i>Tab. 17:</i> Medien für die Zellkultur	40
<i>Tab. 18:</i> Peptide	41
<i>Tab. 19:</i> Kits	42
<i>Tab. 20:</i> Software	42
<i>Tab. 21:</i> SDS-PAGE	50
<i>Tab. 22:</i> Partikel für den Suspensionsarray	53
<i>Tab. 23:</i> Zusammenfassung der anti-SEA Antikörper	66
<i>Tab. 24:</i> Zusammenfassung der anti-H _C /A Antikörper	77
<i>Tab. 25:</i> Zusammenfassung der anti-H _C /E Antikörper	82
<i>Tab. 26:</i> Zusammenfassung der anti-H _C /C Antikörper	87
<i>Tab. 27:</i> Abrin Extrakte	88
<i>Tab. 28:</i> Zusammenfassung der anti-Abrin Antikörper	95
<i>Tab. 29:</i> Überblick über die zur Differenzierung verwendeten Antikörper	97
<i>Tab. 30:</i> Validierung der Sandwich ELISA zur Differenzierung veterinärpathogener BoNTs ..	98
<i>Tab. 31:</i> Spezifität der ELISA gegenüber Überständen von Bakterienkulturen	103
<i>Tab. 32:</i> Spezifität der ELISA gegenüber Überständen verwandter <i>Clostridien</i>	105
<i>Tab. 33:</i> Spezifität der ELISA gegenüber primären Bakterienkulturen	107
<i>Tab. 34:</i> pTD Vorversuche zur SEA Detektion	110
<i>Tab. 35:</i> pTD Vorversuche zur BoNT/E Detektion	112

Tab. 36: pTD Vorversuche zur BoNT/C Detektion 113

Tab. 37: pTD Vorversuche zur BoNT/D Detektion 115

Tab. 38: pTD Vorversuche zur Abrin Rohextrakt und Abrin-a Detektion..... 116

Tab. 39: Überblick Einzeltoxin-Nachweis 117

Tab. 40: Antikörper-Einsatz für den Multiplex-Toxinnachweis mit dem pTD System 118

Tab. 41: Überblick: Multiplex-Nachweis 119

Tab. 42: Konzentrationen für den Multiplex-Nachweis 122

Tab. 43: Spezifität des pTD Nachweises gegenüber verwandten Toxinen 127

Tab. 44: pTD Vorversuche zur H_C/C Detektion..... 128

Tab. 45: Proben für die Anwenderübung 129

Tab. 46: Auswertung der Anwenderübung 131

Tab. 47: Auswertung des Fragebogens für Vor-Ort-Detektionsgeräte 132

Abkürzungsverzeichnis

$A_{[450-620nm]}$	Absorption bei 450 nm Wellenlänge minus Absorption bei 620 nm
Abb.	Abbildung
Aggl.	Agglutinin
AH	Azaserin/Hypoxanthin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASF	Asialofetuin
BALB/c	Albino-Labormausstamm (Inzucht)
BBK	Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe
BoNT	Botulinum Neurotoxin
BSA	bovines Serumalbumin
C.	<i>Clostridium</i>
CEA	<i>Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives</i>
C-CT	Carboxy-terminales Spaltprodukt des Endopeptidase-Substrats für BoNT/C und /CD
CDP-Star	Chemilumineszenz-Substrat
C-NT	Amino-terminales Spaltprodukt des Endopeptidase-Substrats für BoNT/C und /CD
C-terminal	Carboxy-terminal
CV	Variationskoeffizient
d	Durchmesser
Da	Dalton [g/mol]
D-CT	Carboxy-terminales Spaltprodukt des Endopeptidase-Substrats für BoNT/D und /DC
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-NT	Amino-terminales Spaltprodukt des Endopeptidase-Substrats für BoNT/D und /DC
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale Effektorkonzentration
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELLA	<i>enzyme-linked lectin assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>flow cell</i>

FKS	fötales Kälberserum
<i>g</i>	mittlere Erdbeschleunigung
GEFREASE	<i>GErman FRench Equipment for Analysis and Surveillance of biot threats in the Environment</i>
GPG	G-Protein gereinigt
HBS-EP+	HEPES gepufferte Salzlösung mit EDTA und Tween 20
HC	schwere Kette (Botulinum Neurotoxine)
H _C	C-terminaler Teil der schweren Kette
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H _N	N-terminaler Teil der schweren Kette
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
IgG	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
kDa	Kilodalton
KFA	komplettes Freund's Adjuvans
LC	leichte Kette (Botulinum Neurotoxine)
LD ₅₀	halbletale Dosis
LFA	<i>lateral flow assay</i>
LLOQ	<i>lower limit of quantification</i>
LM	Lebensmittel
LOD	Detektionslimit
M	Molar = mol/l
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight</i>
MBA	Maus Bioassay
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MPN	<i>mouse phrenic nerve</i>
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N-terminal	Amino-terminal
n. d.	nicht durchgeführt
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMRI	Labormausstamm (Auszucht)

NTNHA	nicht-toxisches, nicht-Hämagglutinin Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAP	p-Aminophenol
pAPG	p-Aminophenyl- β -Galaktosid
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-TBN	PBS mit Tween 20, BSA und Natriumazid
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
POD	Peroxidase
pTD	portabler Toxindetektor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
rec.	rekombinant
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	<i>resonance unit</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
scBoNT	<i>single chain</i> Botulinum Neurotoxin
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEA	Staphylokokken Enterotoxin A
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
sec	Sekunde
SEE	Staphylokokken Enterotoxin E
SE	Staphylokokken Enterotoxin
SNAP25	<i>synaptosome associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TPGY	Trypton-Pepton-Glukose-Hefe-Medium
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
ULOQ	<i>upper limit of quantification</i>
ÜS	Überstand von Bakterienkulturen
v/v	Volumen pro Volumen
VAMP-2	<i>vesicle-associated membrane protein 2</i>
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Relevanz biologischer Toxine im Gesundheits-, Lebensmittel- und Sicherheitsbereich

In der großen Gruppe der biologischen Toxine werden giftige Substanzen zusammengefasst, die von Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren produziert werden und die eine schädigende Wirkung auf einen Organismus ausüben. Insgesamt gibt es mehr als zweihundert bakterielle Toxine und dreihundert Pflanzentoxine, welche für den Menschen pathogen sind [1, 2]. Die Toxine, auf denen diese Arbeit den Schwerpunkt legt, sind aufgrund ihrer hohen Letalität und/oder ihres gehäufteten Vorkommens besonders relevant. Proteine unterschiedlicher Größe mit verschiedenen Wirkungsmechanismen stehen im Fokus dieser Arbeit.

Es handelt sich um die bakteriellen Staphylokokken Enterotoxine (SE), Botulinum Neurotoxine (BoNT) und das Pflanzengift Abrin. Diese führen einerseits zu natürlichen Vergiftungen, andererseits haben sie das Potential, als biologische Agenzien missbräuchlich verwendet zu werden.

Natürliche Vergiftungsfälle durch Toxine treten vor allem durch Lebensmittelvergiftungen auf. Staphylokokken Enterotoxine führten in der Vergangenheit zu massenhaften Intoxikationen mit bis zu 13 000 Erkrankten [3]. Vergiftungen mit Botulinum Neurotoxinen sind deutlich seltener (ca. 10 Fälle pro Jahr in Deutschland), können aber letal enden [4, 5]. Akzidentelle Vergiftungen mit Abrin werden in Einzelfällen berichtet [6, 7].

Biologische Toxine können für bioterroristische Attentate missbraucht werden, um Einzelpersonen oder Personengruppen zu schädigen. SEs und die BoNTs werden von den amerikanischen Behörden (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, und *Department of Health and Human Services*, Washington D.C.) auf der Liste der möglichen biologischen Agenzien geführt [8-10]. Höchste Priorität haben Substanzen der Kategorie A, wie z. B. BoNTs: Diese Substanzen führen zu hoher Mortalität und dadurch hohem Panikpotential in der Bevölkerung. Besondere Vorbereitungen des öffentlichen Gesundheitsdienstes für den Fall von Ausbringungs- oder Anschlagversuchen sind daher nötig, um effektive gesundheitspolitische Gegenmaßnahmen (z. B. spezielle Behandlungsoptionen) zu treffen. SEs finden sich ebenso wie Rizin, welches zu Abrin nahe verwandt ist und die gleiche Wirkungsweise hat, in der Kategorie B. Diese Toxine führen zu geringerer Mortalität als Kategorie-A-Toxine, trotzdem sollen Kompetenzen zur Detektion und Behandlung aufgebaut werden [10, 11]. Abrin ist im Gegensatz zu Rizin nicht klassifiziert, seine Verwendung ist dennoch eingeschränkt: So werden in den USA Labore, die mehr als 100 mg Abrin vorrätig haben, registriert und kontrolliert [7]. Deutschland unterliegt Im- und Exportregulationen im Bereich der biologischen Toxine, da es seit 1985 Mitglied der „Australia Group“ ist, welche die Einhaltung der Chemie- und Biowaffen-Übereinkommen unterstützt. Auf der „Australia

Group“-Liste werden 19 Toxine geführt, darunter die hier behandelten SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin [12].

In der Vergangenheit kam es bereits zu einigen Ausbringungs- oder Anschlagversuchen. Die Aum-Sekte versuchte in den 1990er Jahren, in Japan Anschläge mit BoNTs durchzuführen [13-15]. Im Irak stellte man zwischen 1989 und 1990 20 000 l eines BoNT-haltigen Kulturüberstandes her, 100 Bomben wurden mit BoNT gefüllt [14, 16]. Der bulgarische Schriftsteller und Dissident Georgi Markov wurde mit Rizin vergiftet [17]. Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) wurde während der 1960er Jahre in den USA als mögliches biologisches Agens untersucht [18]. Ein sicherer Nachweis dieser Toxine ist demnach sehr wichtig, um geeignete Gegenmaßnahmen einzuleiten. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit sensitive Detektionsverfahren für Staphylokokken Enterotoxine, Botulinum Neurotoxine und Abrin entwickelt werden.

1.1.1 Staphylokokken Enterotoxine

Staphylokokken Enterotoxine (SE) sind ca. 30 kDa große Proteotoxine, welche zu Lebensmittelvergiftungen führen [19].

Die SEs werden von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und seltener von *Staphylococcus intermedius* produziert [20, 21]. *S. aureus* ist ein ubiquitär vorkommendes, kugelförmiges Gram-positives Bakterium. Es gehört in die Gruppe der opportunistischen Pathogene. Es wird angenommen, dass 20 % der Bevölkerung dauerhafte Träger von *S. aureus* sind und weitere 60 % zeitweise von diesem besiedelt werden [22]. Am häufigsten wird es auf der Nasenschleimhaut gefunden, wo es meist keine Infektionen verursacht. Erst wenn das Immunsystem des Wirts geschwächt ist, kommt es zu einem Krankheitsgeschehen [23]. Besonders gefährlich ist eine Infektion mit den Methicillin-resistenten Varianten von *S. aureus* (MRSA), welche nicht mit den gängigen Antibiotika behandelt werden können [24, 25].

Die von *S. aureus* produzierten SEs führen zu Lebensmittelvergiftungen. Die Hauptursachen von Lebensmittelvergiftungen in der Europäischen Union waren 2014 Viren (20,4 %), Salmonellen (20 %) und bakterielle Toxine (16,1 %), wobei SEs etwa die Hälfte beitrugen (7,5 % aller Ausbrüche). Die Inzidenz lag 0,12 pro 100000 Einwohner [26]. Da es sich nicht um eine meldepflichtige Krankheit handelt, liegt die Dunkelziffer vermutlich höher. In den USA wird die Zahl der Erkrankten pro Jahr auf 241000 geschätzt [4]. Symptome der SE-bedingten Lebensmittelvergiftung sind Übelkeit, Bauchkrämpfe und Erbrechen, in manchen Fällen zusätzlich Diarrhoe [27]. Die Symptome setzen sehr schnell ein (30 min bis 8 h), eine spontane Erholung tritt meist nach 24 h ein [19].

Beispiele für durch SEs hervorgerufene Lebensmittelvergiftungen werden in *Tab. 1* angegeben, weitere Beispiele finden sich in [20]. Besonders häufig betroffene Lebensmittel sind Milch- und Fleischprodukte [19].

Tab. 1: Beispiele für SE-bedingte Lebensmittelvergiftungen

<i>Jahr</i>	<i>Ort</i>	<i>Quelle</i>	<i>Erkrankungen</i>	<i>Referenz</i>
2000	Japan	Milch	13 000	[3]
2003	Brasilien	Pfannkuchen mit Hühnerfleisch	42	[28]
2008	Frankreich	Nudelsalat	100	[20]
2013	Deutschland	Eiscreme	13	[29]
2014	Schweiz	Weichkäse	14	[30]

Damit es zu einer Lebensmittelvergiftung mit SEs kommt, müssen vier Voraussetzungen erfüllt sein: (1) Eine Quelle: Lebensmittel oder menschlicher Träger, (2) eine Übertragung auf das Nahrungsmittel, (3) geeignete Bedingungen zum Wachstum und zur Toxinproduktion

(Temperatur, pH, Zeit) und (4) Aufnahme ausreichender Mengen des Toxins [20]. Da SEs hitzestabil sind, lassen sie sich durch Kochen nicht zerstören [31]. Als minimale wirkungsauslösende orale Dosis werden beim Menschen 0,1 µg angesehen [3, 32].

Das Enterotoxin SEB wird von den amerikanischen Behörden in Kategorie B der potenziellen biologischen Agenzien eingestuft [9, 10]. Es ist relativ einfach zugänglich, stabil gegenüber vielen Umwelteinflüssen und aerosolisierbar [18]. Aus Versuchen mit Affen wird eine halbmaximale letale Dosis von 20 µg/kg Körpergewicht abgeschätzt [33, 34]. Da die gastrointestinalen Wirkungen viel früher einsetzen (siehe oben), wird SEB als sogenanntes *incapacitating agent* (handlungsunfähig machendes Agens) angesehen [35]. In den 1960er Jahren wurden in den USA drei Programme zur Untersuchung von SEB als biologisches Agens durchgeführt [36]. SEA, auf welchen im Rahmen dieser Arbeit der Schwerpunkt liegen sollte, sowie SEC, SED und SEE werden auf der amerikanischen Liste der *select agents* geführt [8].

Die Enterotoxine von *S. aureus* haben zwei wesentliche Wirkungsmechanismen. Zum einen gehören sie in die Gruppe der Superantigene. Superantigene binden an T-Lymphozyten (T-Zellen) und an den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) Antigen-präsentierender Zellen. Diese werden Antigen-unabhängig miteinander in Kontakt gebracht, sodass es zu einer polyklonalen Stimulierung der T-Zellen kommt (Abb. 1). Etwa 5-20 % der T-Zellpopulation werden durch Superantigene aktiviert [37]. Durch die massive Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt dies zu einer systemischen Antwort des Immunsystems, Fieber und in seltenen Fällen zu einem tödlichen Schock [31, 38].

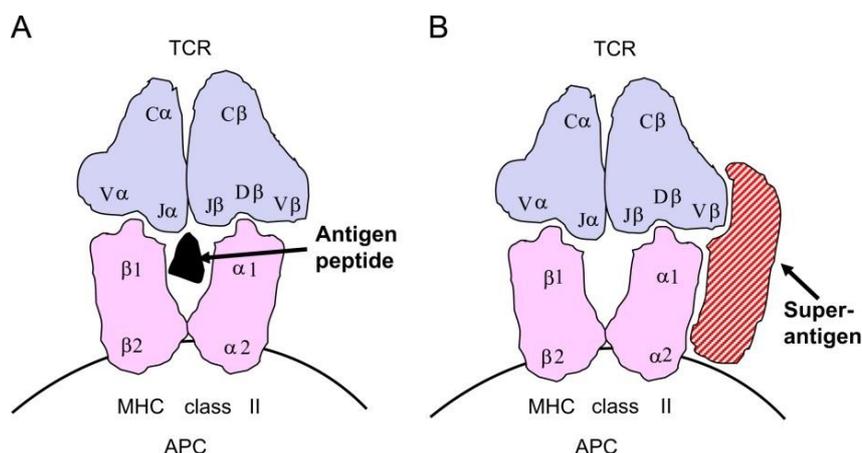


Abb. 1: SEA als Superantigen

Schematische Darstellung der Antigen-Bindung (A) und einer Superantigen-Bindung (B). Durch die Präsentation eines Antigen-Peptids durch Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) Proteinen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) kann ein spezifischer T-Zell-Rezeptor (TCR) binden und so eine Interaktion auslösen (A). Das Superantigen führt zur Antigen-unabhängigen Interaktion von MHC II und TCR und zur Stimulierung der T-Zellen (B). Diese Abbildung stammt aus [39].

Zum anderen haben SEs eine direkte Wirkung auf den Gastrointestinal-Trakt mit den Symptomen Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe und Diarrhoe [18, 40]. Dabei lösen Entzündungsreaktionen im Darm Diarrhoe aus [41]. Die Ursache für das Erbrechen ist unklar. Es wird vermutet, dass Rezeptoren im intestinalen Gewebe existieren, welche zu einer Weiterleitung des Brechreizes über den Vagusnerv ins Gehirn führen [39, 40].

Staphylococcus aureus produziert eine Vielzahl verschiedener Enterotoxine. Diese werden in zwei großen Gruppen eingeteilt: SE mit emetischer (Erbrechen hervorrufender) Wirkung und SE-ähnliche Toxine ohne diese Wirkung (*SE-like*, *SEI*) [42]. Die SEs werden nach ihrer Entdeckung fortlaufend mit Buchstaben benannt [43]. 2015 waren SEA bis SE/Y benannt [44]. SEF wurde in TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin*) umbenannt, da es keine enterotoxische Wirkung hat und daher nicht zu den SEs gezählt wird [39]. Durch den Vergleich der Proteinsequenz der Toxine untereinander lassen sich fünf Gruppen definieren (*Abb. 2*). Zur ersten Gruppe gehören SEA, SEE, SE/P, SE/IJ, SED, SE/N, SES, SE/O und SEH, zur zweiten SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SE/U, SEG und SER. Die dritte Gruppe bilden SEI, SE/K, SE/M, SE/V, SE/Q und SE/L. SET und TSST-1 werden in eigenen Gruppen geführt [27, 45].

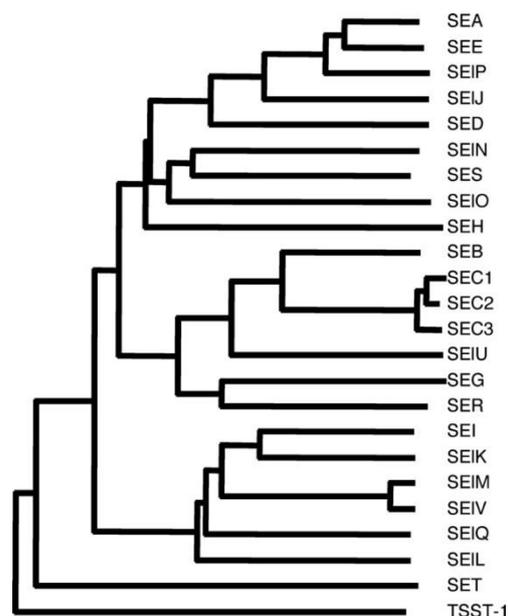


Abb. 2: Phylogenetische Einordnung der SEs und SEIs

Der Phylogenie-Baum basiert auf der *neighbor joining* Methode auf Aminosäure-Ebene. Die Toxine werden in fünf Gruppen eingeordnet. Diese Abbildung stammt aus [45].

Die Einteilung in Gruppen spiegelt sich in den Sequenzhomologien wider. SEA und SEE, welche zur gleichen Gruppe gehören, sind zu 81 % homolog (*Tab. 2*). SEA und SEB hingegen gehören zu verschiedenen Gruppen, sie weisen 31 % Homologie auf.

Tab. 2: Sequenzhomologien in [%] der SEs auf Aminosäure-Ebene

	<i>SEB</i>	<i>SECI</i>	<i>SED</i>	<i>SEE</i>	<i>SEG</i>	<i>SEH</i>	<i>SEI</i>	<i>SEJ</i>
<i>SEA</i>	31	25	51	81	24	37	33	66
<i>SEB</i>	-	67	33	30	46	24	23	30
<i>SECI</i>		-	27	27	42	25	22	22
<i>SED</i>			-	54	22	38	31	52
<i>SEE</i>				-	25	38	31	64
<i>SEG</i>					-	26	24	24
<i>SEH</i>						-	25	36
<i>SEJ</i>							35	-

Diese Tabelle wurde modifiziert nach [31].

Die häufigsten vorkommenden Toxine sind SEA, SEB und SED [18]. Lebensmittelvergiftungen lassen sich in Frankreich, USA, Großbritannien, Japan und Südkorea am häufigsten (bis zu 90 % aller Fälle) auf SEA zurückführen [27].

Besteht ein Verdacht auf eine durch SEs verursachte Lebensmittelvergiftung, wird zum einen versucht, *S. aureus* selbst in den betroffenen Lebensmitteln nachzuweisen. Hierzu werden verschiedene mikrobiologische Anzuchtverfahren durchgeführt, um mittels PCR-Methoden die Toxingene zu detektieren [20, 46]. Zum anderen wird das Toxin direkt über verschiedene Methoden nachgewiesen (Tab. 3). Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Detektion von SEA und SEB gelegt. Alle diese Systeme beruhen auf Antikörpern (Ak), daher ist deren Qualität entscheidend für die Güte des Nachweises. ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assays*) sind sehr sensitiv, haben aber den Nachteil der langen Inkubationszeiten von mehreren Stunden. Kommerziell erhältlich sind zwei ELISAs, Vidas und Ridascreen, welche die Standardmethoden des europäischen Referenzlaboratoriums für SEs darstellen [47]. Diese weisen SEA bis SEE aus verschiedenen Lebensmitteln nach, für die anderen SEs existieren bislang keine Standardmethoden. Sehr vielversprechend, aber noch nicht kommerziell erhältlich, sind verschiedene Biosensoren, die schnell und mit einer Nachweisgrenze (LOD) im pg/ml-Bereich SEs detektieren. *Lateral flow assays* (LFA) sind mit einem LOD von 0,2-12,5 ng/ml weniger sensitiv, aber einfacher in der Anwendung. Eine unzweifelhafte Detektion erfolgt mittels Massenspektrometrie. Da häufig Intoxikationen von Lebensmitteln mit SEs auftreten, ist ein sensitiver und spezifischer Nachweis möglichst aller SEs, auch aus Matrices, nötig. Besonders bei industriell hergestellten Nahrungsmitteln muss eine Kontamination zügig entdeckt werden, um Lebensmittelvergiftungen zu verhindern.

Tab. 3: Überblick: Detektionsmöglichkeiten für SEA und SEB

<i>Method</i>	<i>LOD</i>	<i>Dauer</i>	<i>Matrizes</i>	<i>Referenzen</i>
Bioassay	0,3 µg ^a	3 h	-	[39, 48]
PCR	200 fg/µl DNA	3 h	Kulturen, LM	[46]
ELISA	32-100 pg/ml	8 h	Urin	[49, 50]
ELISA (kommerziell)	< 31 pg/ml	4 h	Kulturüberstand, LM	[51, 52]
RPLA	0,5 ng/ml	3 h	Kulturüberstand, LM	[53]
LFA	0,2-12,5 ng/ml	5-20 min	LM, Urin	[54-56]
Bead-Assay	0,1-0,3 ng/ml	2 h	Kulturüberstand, LM	[57, 58]
Biosensoren	0,1-500 pg/ml	10 min-20 h	LM	[59-64]
MS	0,25 ng/ml	8 h	LM, Urin	[65]

PCR *polymerase chain reaction*, ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*, RPLA *Rapid latex agglutination test*, LFA *lateral flow assay*, MS *Massenspektrometrie*, LOD *Detektionslimit*, LM *Lebensmittel*, ^a *halbmaximale emetische Dosis in der Moschusspitzmaus pro Tier*

1.1.2 Botulinum Neurotoxine

Botulinum Neurotoxine (BoNT) sind die giftigsten Substanzen, die bisher bekannt sind. Sie gehören in die Gruppe der hochmolekularen Proteotoxine. Das aktive, 150 kDa große Protein wirkt als Nervengift und ruft die Krankheit Botulismus hervor [66].

BoNTs werden von verschiedenen *Clostridien* (*C.*)-Arten, nämlich *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* sowie *C. argentinensis*, produziert [67, 68]. Diese Gram-positiven, sporenbildenden Bakterien leben obligat anaerob. Daneben gibt es atoxische Vertreter dieser Spezies. Der Neurotoxin-Gencluster wird entweder chromosomal kodiert oder liegt auf einem Plasmid [68]. Geht dies durch Interkonversion verloren, wird aus den toxinproduzierenden Bakterien ein atoxischer Vertreter, welcher einen anderen Speziesnamen trägt (aus veterinärpathogenen *C. botulinum* werden z. B. *C. novyi*) [69-73].

Das typische klinische Bild des Botulismus ist die absteigende schlaffe Lähmung, die mit Seh- und Schluckbeschwerden beginnt und bis zum Tod durch Atemlähmung führen kann [74]. Die Erstbeschreibung des „*Bacillus botulinus*“ gelang van Ermengen 1897 nach einem lebensmittelbedingten Botulismusfall [75]. Hier hatten sich elf Teilnehmer einer Feier durch einen kontaminierten Schinken mit BoNT vergiftet, drei von ihnen starben.

In den USA wurden von 2009 bis 2013 686 laborbestätigte Botulismusfälle gezählt [76], in Deutschland treten deutlich weniger Botulismusfälle auf [77]: Im gleichem Zeitraum wurden 24 Fälle diagnostiziert, 2014 waren sechs und 2015 drei Personen erkrankt (RKI-interne Quellen und [5]).

In den USA kam es am häufigsten (ca. 77 %) zu Säuglingsbotulismus. Hierbei wurden *Clostridien*-Sporen mit der Nahrung aufgenommen. Honig steht oft im Verdacht, die Krankheit auszulösen. Da die Besiedlung des Darmtraktes von Säuglingen nicht abgeschlossen ist, können die Sporen auskeimen und sich in vegetative Zellen umwandeln. Diese produzieren das Toxin im Darm, welches zum Krankheitsbild des Säuglingsbotulismus führt. Es liegt eine Toxikoinfektion vor [78-80].

11 % der in den USA gemeldeten Fälle wurden durch Wundbotulismus hervorgerufen. Hierbei kommt es in Wunden zur Auskeimung von *Clostridien*-Sporen, welche Toxin produzieren [81]. Diese Variante der Infektion tritt meist bei Drogengebern auf [82].

Weitere 10 % der Fälle in den USA sind auf lebensmittelbedingten Botulismus zurückzuführen. Hierbei kommt es durch unsachgemäße Vorbereitung und Herstellung von Lebensmitteln zur Kontamination mit Sporen. Unter bestimmten Bedingungen (anaerob, wie z. B. durch das Einsalzen von Fisch oder bei der Konservenherstellung) können vegetative Zellen entstehen, welche Toxine freisetzen [83-85].

In Deutschland wurden zwischen 2001 und 2015 acht Fälle von Säuglingsbotulismus (7 %) und fünfundzwanzig Fälle (22 %) von Wundbotulismus diagnostiziert. Weitere 82 Patienten ließen

sich auf Lebensmittelbotulismus zurückführen (Quelle: Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologische Jahrbücher der entsprechenden Jahre).

Die orale Toxizität LD_{50} von BoNT liegt bei 650 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht, bei Aufnahme des Komplexes (siehe unten) sinkt diese auf 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [86]. Es wird eine minimale letale Dosis von 0,4-1 ng/kg Körpergewicht nach Injektion angenommen [34, 87].

Zur Behandlung von Botulismus wird ein Antitoxin aus Pferden oder humanes Immunglobulin eingesetzt. Zudem werden je nach Schweregrad unterstützende, intensivmedizinische Maßnahmen wie künstliche Beatmung und Ernährung durchgeführt [88, 89]. Die Genesung beschleunigt sich durch zeitnahe Gabe des Antitoxins [90].

Aufgrund ihrer extrem hohen Toxizität könnten die BoNTs als biologische Agenzien missbraucht werden. Um 1930 führte Japan erste Versuche zum Einsatz von BoNT im besetzten China durch [74]. In der Folgezeit forschten mehrere Länder, wie z. B. der Irak und die Sowjetunion, an einer Verwendung als biologisches Agens [14, 16]. Die Anschlagversuche der Aum-Sekte scheiterten, zeigen aber das Potenzial der Gefährdung gut auf [15, 74]. Aufgrund der Inkubationszeit (bei Lebensmittelbotulismus 12 bis 72 h) und der Seltenheit der natürlichen Erkrankung (Unsicherheiten bei der Diagnose) besteht die Gefahr, dass ein Anschlag lange unentdeckt bliebe [14].

BoNTs werden von den Bakterien in einer inaktiven *single chain* Variante (scBoNT) hergestellt. Diese wird durch Spaltung mit einer Protease, entweder von *C. botulinum* selbst oder durch eine Wirtsprotease, aktiviert [91, 92]. BoNTs werden zusammen mit den sogenannten Komplexproteinen freigesetzt. Im selben Gencluster wie BoNT ist das nicht-toxische, nicht-Hämagglutinin (NTNHA) codiert. Dieses weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu BoNT auf und interagiert über mehrere Positionen mit diesem [93]. Das Toxin wird stabilisiert und vor Proteasen und pH-Änderungen, wie sie z. B. im Gastrointestinaltrakt auftreten, geschützt. Je nach Sero- und Subtyp werden zusätzlich Hämagglutinine gebildet (HA17, HA33 und HA70), welche vermutlich für die Aufnahme der Toxine aus dem Darmlumen wichtig sind [94, 95].

Die aktiven BoNTs bestehen aus zwei Ketten, welche mit einer Disulfid-Brücke verbunden sind. In der sogenannten leichten Kette (LC, ca. 50 kDa) liegt die katalytische Aktivität [96]. Die schwere Kette (HC) mit ca. 100 kDa wird weiter unterteilt in einen *N*-terminalen Teil (H_N), welcher für die Translokation zuständig ist, und einen *C*-terminalen Teil (H_C), welcher die Rezeptorbindungsstellen trägt [92].

Durch die H_C -Domäne werden die Rezeptoren der BoNTs gebunden (*Abb. 3* links). Dabei handelt es sich in allen bisher bekannten Fällen um eine duale Rezeptorbindung, d. h. es müssen zwei Rezeptoren gebunden werden. Bei allen Serotypen (siehe unten) – mit einer Ausnahme –

liegen zum einen eine Zuckerbindungsstelle sowie zum anderen eine Proteinbindungsstelle vor [97-99]. Nur für den Serotyp C wurden bisher noch kein Proteinrezeptor, sondern zwei Gangliosid-Bindungsstellen entdeckt [97, 100]. Nach der Bindung an die Rezeptoren werden die BoNTs durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und in Vesikel in die Zelle transportiert. Der *N*-terminale Teil der schweren Kette (H_N -Domäne) vermittelt die Translokation der leichten Ketten ins Zytosol der Nervenzellen.

Hier kann die katalytische Aktivität durch die LC wirksam werden [92, 101, 102] (Abb. 3 rechts). Alle BoNTs sind Zink-abhängige Endoproteasen, welche Proteine im sog. SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*)-Komplex schneiden [96]. Der SNARE-Komplex ist in den cholinergen Nervenfasern in die Ausschüttung der Neurotransmitter eingebunden. Werden die Proteine dieses Komplexes geschnitten, wird die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Zellmembran verhindert [102]. So können Neurotransmitter nicht ausgeschüttet werden und die Reizweiterleitung der Nerven wird unterbrochen. Hierdurch kommt es zu Lähmungserscheinungen [66, 92].

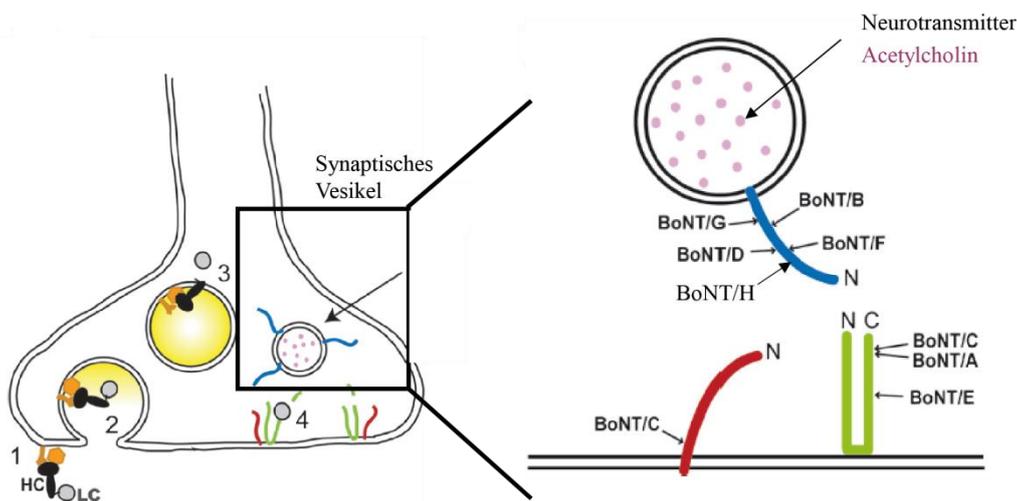


Abb. 3: Wirkungsmechanismus der BoNTs

Links: BoNTs binden mit den Rezeptorbindungsstellen (HC, orange) an die Oberfläche der Neuronen (1). Über rezeptorvermittelte Endozytose werden die BoNTs in Vesikeln aufgenommen (2). Durch die Vermittlung der Translokationsdomäne (schwarz) gelangt die leichte Kette (grau) ins Zytosol (3). Die leichte Kette verhindert durch ihre Endopeptidase-Aktivität die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Zellmembran und damit die Freisetzung von Acetylcholin (lila) als Neurotransmitter (4).

Rechts: BoNT/A, /C, /E schneiden SNAP25 (grün). BoNT/B, /D, /F, /G und /H schneiden Synaptobrevin (alias VAMP-2, blau). BoNT/C spaltet zusätzlich Syntaxin (rot). Diese Abbildung wurde modifiziert nach [103].

BoNTs werden in verschiedene Serotypen eingeteilt. Historisch gesehen beruht diese Einteilung auf der Reaktivität mit neutralisierenden Antikörpern: Antikörper, welche die Wirkung eines Serotyps blockieren, neutralisieren einen anderen Serotyp nicht [104].

Nach der Aufklärung der Zielmoleküle der Endoprotease-Aktivität stellte sich heraus, dass sich die zuvor definierten Serotypen anhand der Aktivität der leichten Ketten unterscheiden. Die

Schnittstelle im SNARE-Komplex ist für alle Serotypen einzigartig (Abb. 3 rechts) [105]. Zurzeit liegen sieben gesicherte Serotypen (BoNT/A-/G) vor [106-109]. Bei einem weiteren, neu identifizierten Toxin wird diskutiert, ob ein neuer Serotyp BoNT/H entdeckt wurde [104, 110], denn BoNT/H ist ein Mosaiktoxin aus BoNT/F und BoNT/A [111]. Die Serotypen BoNT/A, /C und /E schneiden *synaptosome associated protein of 25 kDa* (SNAP25), wohingegen Synaptobrevin (auch *vesicle-associated membrane protein 2*, VAMP-2, genannt) das Ziel von BoNT/B, /D, /F, /G und /H ist [96, 105, 112, 113]. BoNT/C spaltet zusätzlich Syntaxin [92].

Neben dieser Unterscheidung werden die einzelnen Serotypen weiter in Subtypen unterteilt. Derzeit sind 40 Subtypen bekannt (Abb. 4). Ein Subtyp wird definiert, wenn eine minimale Abweichung auf Aminosäure-Ebene von 2,6 % zu allen bereits bekannten Subtypen vorliegt [114]. Zudem treten Abweichungen bei der funktionalen Aktivität sowie bei der Erkennung durch Antikörper auf [115]. So wurden bei BoNT/A bisher acht Subtypen identifiziert, bei /B acht, bei /E elf und bei /F sieben. Die größte Variabilität findet sich mit 36 % bei den BoNT/F Subtypen. BoNT/A, /E und /B Subtypen unterscheiden sich untereinander zu 16 %, 11 % bzw. 7 % [110, 115-119]. Bei BoNT/C und D treten Mosaikformen auf, die mit /CD und /DC bezeichnet werden (Abb. 5, siehe unten, [120]).

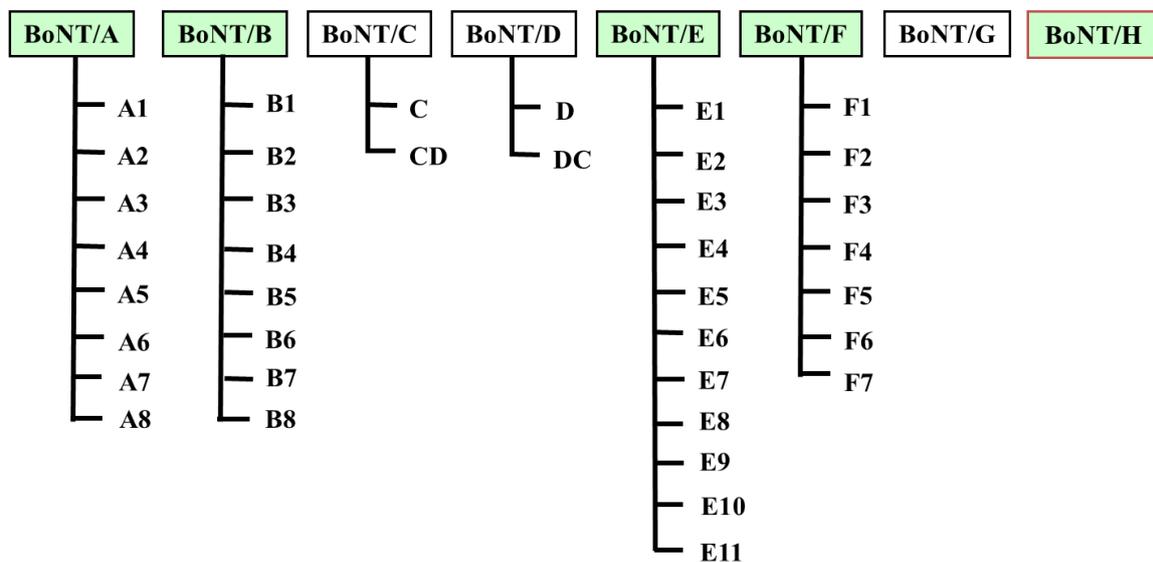


Abb. 4: Übersicht über bisher bekannte Sero- und Subtypen der BoNTs

Bisher sind acht Serotypen A-H bekannt, dabei sind die humanpathogenen Serotypen grün markiert. Zusätzlich rot markiert ist das neu vorgestellte BoNT/H-Molekül, welches ein Mosaiktoxin aus /A und /F darstellt. Jedem Serotyp wurden die bisher bekannten Subtypen zugeordnet, welche mit Zahlen bezeichnet werden. Bei BoNT/C und /D existieren Mosaikvarianten, welche mit /CD und /DC benannt werden. Daten wurden aus [100, 110, 115-118, 120, 121] zusammengefasst.

Untersucht man die drei großen Erkrankungsfelder Lebensmittel-, Wund- und Säuglingsbotulismus genauer, zeigt sich eine unterschiedliche Beteiligung der Serotypen in den USA [76]. Für andere Länder liegen keine belastbaren Daten vor. BoNT/A, /B, /E, /F und /H

sind die humanpathogenen Vertreter, wobei bislang BoNT/H nur bei einem Säuglingsbotulismusfall nachgewiesen wurde [104, 122]. Lebensmittelbotulismus wird zu 70 % von BoNT/A verursacht. Die anderen BoNTs verteilen sich wie folgt: 11 % BoNT/B, 16 % BoNT/E und 1,5 % BoNT/F. Bei Wundbotulismus liegt zu knapp 90 % BoNT/A vor, 4 % sind BoNT/B und 6 % andere bzw. nicht bestimmt. Säuglingsbotulismus hingegen wird zu 38 % von BoNT/A-Stämmen und zu 60 % von BoNT/B-Stämmen hervorgerufen. Über die Häufigkeiten der einzelnen Subtypen gibt es keine Angaben. Bei der Diagnostik eines verdächtigen Botulismusfalls müssen alle Serotypen sowie möglichst alle Subtypen erkannt werden. Werden einzelne Sero- oder Subtypen nicht erkannt, können keine geeigneten Behandlungsmethoden wie die Gabe eines Antitoxins eingeleitet werden [88].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Schwerpunkt bei den humanpathogenen Serotypen BoNT/A und /E liegen. BoNT/A Intoxikationen treten in allen Erkrankungsfeldern auf, während BoNT/E Intoxikationen fast immer lebensmittelbedingt durch den Verzehr von unsachgemäß zubereiteten Fischen und Fischprodukten ausgelöst werden [84, 123].

Im Tierreich treten hauptsächlich die Serotypen BoNT/C und /D auf [124, 125]. Eine experimentelle Intoxikation des Menschen mit BoNT/C scheint möglich [126]. Von veterinärpathogenen Botulismus sind am stärksten Vögel und Rinder betroffen [127, 128]. Botulismus wurde zusätzlich bei Pferden und Nerzen nachgewiesen [129, 130]. Durch die Erkrankung von Nutztierherden sind mit Botulismus ökonomische Verluste verbunden [130, 131]. Bei BoNT/C und D gibt es Mosaikvarianten (*Abb. 5*), welche in Europa die dominanten Formen darzustellen scheinen [120]. Diese Mosaikvarianten, BoNT/CD und /DC, sind schon seit den 1980er Jahren bekannt [132, 133]. Eine eindeutige Zuordnung auf genetischer Ebene gelang erst in den letzten Jahren [120, 134]. Die veterinärpathogenen *Clostridien* lassen sich zudem anhand ihrer Flagellin-Gene in verschiedene Gruppen einteilen [135].

Bei BoNT/C und /CD sind die leichten Ketten mit der katalytischen Aktivität zu ca. 97 % identisch, die H_N-Domäne ist ebenfalls sehr ähnlich. Die Rezeptorbindungsdomäne H_C/CD hingegen ist näher mit der H_C-Domäne von BoNT/D verwandt (*Abb. 5*).

BoNT/DC ähnelt in der LC- und H_N-Domäne BoNT/D (> 95 % Sequenzidentität), die H_C-Domäne weicht deutlich von BoNT/D ab. Hier liegt die größte Ähnlichkeit zu H_C/C vor (ca. 74 % Sequenzidentität).

BoNT/C und /CD schneiden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit das gleiche Zielprotein SNAP25, BoNT/D und /DC spalten VAMP-2.

Diese Mosaikstruktur macht eine Detektion und Differenzierung von BoNT/C, /CD, /D und /DC auf Proteinebene sehr schwierig und war bislang nicht möglich. Dieses Problem sollte im Verlauf der Doktorarbeit adressiert werden.

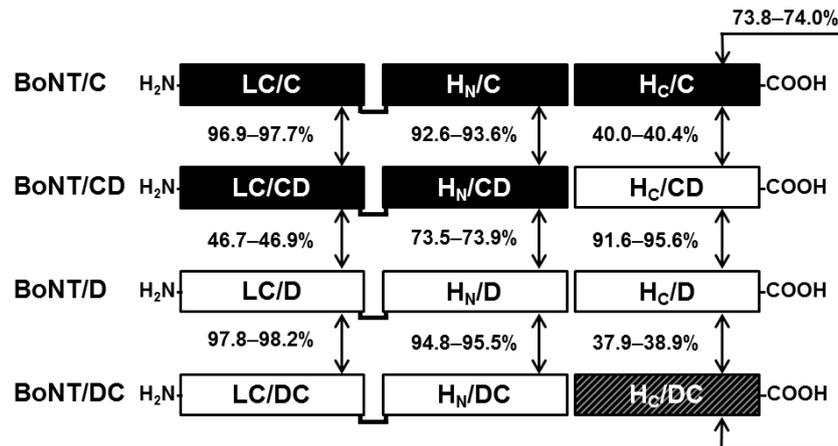


Abb. 5: Mosaikstruktur von BoNT/C, /CD, /D und /DC

Schematisch werden die Domänen LC, H_N und H_C der veterinärpathogenen BoNT/C, /CD, /D und /DC dargestellt. Die leichten Ketten werden durch eine Disulfid-Brücke (eckige Klammer) mit schweren Ketten verbunden. Genbank-Einträge von insgesamt 18 veterinärpathogenen Stämmen wurden verglichen, um die Ähnlichkeiten anzugeben (Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene in %). Diese Abbildung wurde aus Hansbauer *et al.* [136] entnommen.

Botulismus wird zum einen durch die klinische Diagnose und zum anderen über die Labordiagnostik festgestellt.

Einen Überblick über Labormethoden zur Detektion von Botulinum Neurotoxinen findet sich in Tab. 4. Weitere Methoden wurden von Dorner, Lindström und Čapek [119, 137, 138] zusammengefasst. Als „Goldstandard“ wird immer noch der Maus Bioassay (MBA) angesehen. Dieser ist in der Lage, alle BoNT Sub- und Serotypen mit hoher Sensitivität (etwa 20-30 pg/ml) zu erkennen. Nachteile sind die lange Zeit der Versuchsdurchführung (bis zu vier Tage) und der hohe Verbrauch an Mäusen. Für eine Probe mit Bestimmung des Serotyps werden 62 Mäuse nach der DIN-Norm 10102 eingesetzt [139]. Die Entwicklung von Alternativmethoden zur Vermeidung von Tierversuchen ist daher unter ethischen Gesichtspunkten sehr wichtig und wünschenswert.

PCR-basierte Methoden weisen das Toxin-Gen des produzierenden Organismus nach. Da das Toxin in Abwesenheit des Bakteriums toxisch ist, ist der DNA-Nachweis nicht immer zielführend. Andere Methoden beruhen auf dem Einsatz von monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörpern (mAk bzw. pAk), die in verschiedenen Formaten (z. B. ELISA, LFA, Biosensoren) eingesetzt werden. Damit kann die Anwesenheit des Toxins in Lebensmitteln und klinischen Proben nachgewiesen werden. Methoden, die die Aktivität der BoNT detektieren, wie *mouse phrenic nerve assay* (MPN Assay) oder verschiedene Endopeptidase Assays, werden als Tierversuchersatzmethode entwickelt. Beim MPN Assay wird die Aktivität der BoNTs an einem isolierten Nerv-Muskel-Extrakt (*Nerv phrenicus* und halber Zwerchfellmuskel) *ex vivo* getestet, was das Leid der Tiere deutlich verringert. Der Endopep-MS Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt [140, 141]. Dabei werden die Toxine mit an Beads gekoppelten Antikörpern aus Lebensmitteln oder klinischen Proben angereichert. Anschließend wird ein

Peptidsubstrat zugegeben, welches der Sequenz von SNAP25 oder VAMP-2 ähnelt. Die BoNTs schneiden mit ihrer intrinsischen Endopeptidase-Aktivität das Substrat in zwei Teile. Diese Spaltprodukte werden durch Massenspektrometrie nachgewiesen [142-145]. Weiterhin kann mittels Massenspektrometrie eine zweifelfreie Identifikation der Toxine erfolgen. Die Methoden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Dauer (von wenigen Minuten bis hin zu Tagen), was die Sensitivität beeinflusst. Kürzere Detektionsverfahren sind meist weniger sensitiv. Grundsätzlich sind Methoden, die bisher für einzelne Serotypen etabliert wurden, für alle Serotypen erweiterbar.

Obwohl in den letzten Jahren Fortschritte in der Detektion von BoNTs erreicht wurden, finden sich einige Limitationen in den Detektionsmethoden. Die meisten Techniken sind einzelnen Expertenlaboratorien vorbehalten, ein internationaler Austausch von Reagenzien wie z. B. Antikörpern findet sehr selten statt. Um eine umfassende Validierung der Techniken durchführen, müssen diese mit möglichst vielen Sero- und Subtypen getestet werden. Da es keine zentrale Stammsammlung von *Clostridien* oder Toxinen gibt, ist dies praktisch schwer umzusetzen. Zudem liegt der Aufbau von Detektionskompetenzen gegen biologische Agenzien wie BoNT oft an der Schnittstelle zwischen nationalen Sicherheitsbehörden und dem Gesundheitsbereich, was eine Zusammenarbeit erschwert. 2014 wurde ein erster internationaler Leistungstest zur Detektion der humanpathogenen Serotypen BoNT/A, /B und /E durchgeführt: Es waren 95 % aller qualitativen Ergebnisse korrekt, bei der quantitativen Bestimmung wurden große Abweichungen gefunden [146].

Im Bereich der veterinärpathogenen Toxine existiert eine zusätzliche Lücke: Die Differenzierung von BoNT/C, /CD, /D und DC kann bisher nicht auf Proteinebene durchgeführt werden. Aus diesem Grund fehlen epidemiologische Studien über das Auftreten der Mosaikvarianten in Erkrankungsfällen. Ein solcher immunologischer Nachweis sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt werden.

Tab. 4: Überblick: Detektionsmöglichkeiten für BoNT

<i>Methode</i>	<i>Serotypen</i>	<i>LOD</i>	<i>Dauer</i>	<i>Matrizes</i>	<i>Referenzen</i>
Maus Bioassay	A-H	20-30 pg/ml	1-4 Tage	Kulturüberstand, Serum, Stuhl, LM	[111, 122, 139]
MPN	A-F	30-1 600 pg/ml	4 h	Kulturüberstand, LM	[87, 147, 148]
PCR	A-G	3-600 GE	0,5-4 h	Kulturüberstand, Serum, Stuhl, LM	[149-152]
ELISA (pAk)	A-G	0,03-100 ng/ml	5-7 h	Kulturüberstand, Serum, Stuhl, LM	[153-156]
ELISA (mAk)	A-G	10-1 500 pg/ml	5-7 h	Kulturüberstand, Serum, Stuhl, LM	[157-160]
ELISA (Mikroarray)	A-F	1-8 pg/ml	20 h	Serum, Stuhl, LM	[161]
LFA	A, B, D, E	10-50 ng/ml	15 min	Kulturüberstand, Serum, Stuhl, LM	[162-165]
Bead-basierter Assay	A, B	0,007-1,5 ng/ml	20 min-4 h	Kulturüberstand, LM	[57, 166, 167]
Versch. Biosensoren	A, B, F	0,1-5 ng/ml	10 min-1 h	Kulturüberstand, LM	[61, 168] und unpublizierte Daten
Endopeptidase Assays	A, B, D, E, F, G	0,015-15 ng/ml	6-20 h	Kulturüberstand, Serum, LM	[169-173]
Endopep-MS	A-H	0,05-50 pg/ml	4-20 h	Kulturüberstand, Serum, Stuhl, LM	[113, 140, 141, 143, 144, 174- 176]
MS	A-H	0,008-75 ng/ml	1-8 h	Kulturüberstand, Serum, Stuhl, LM	[113, 177, 178]

MPN Maus *phrenic nerve assay*, PCR *polymerase chain reaction*, ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*, LFA *lateral flow assay*, MS Massenspektrometrie, LOD Detektionslimit, GE Genomäquivalente, LM Lebensmittel

1.1.3 Abrin

Das Pflanzentoxin Abrin ist ein ca. 60 kDa großes Proteotoxin, welches zu schweren Vergiftungen führen kann [7].

Abrin wird von der Leguminose *Abrus precatorius* hergestellt (Abb. 6 a). Die Pflanze war ursprünglich heimisch in Indien, lässt sich aber nun in allen tropischen Regionen finden [179]. Sie wird dort als Heilpflanze zur Behandlung von Augenkrankheiten, Tetanus und diversen anderen Erkrankungen benutzt. Das Toxin Abrin wurde bisher nur aus den Samen isoliert [179, 180]. Die Samen sind leuchtend rot mit einer schwarzen Färbung an der Basis (Abb. 6 b). Selten lassen sich weiße, braune und orangene Varietäten finden. Die Samen sind unter vielen Namen bekannt: Jequirity (England), Gunja, Rati (Indien), Rosary pea (Ägypten), Crab's eye (Nepal), Precatory bean (USA) oder Paternostererbse (Deutschland) [179]. Viele der Namen deuten auf die Hauptverwendung hin, nämlich die Verwendung als Schmuckobjekt in Rosenkränzen [180, 181].

Das durch eine Intoxikation mit Abrin hervorgerufene Krankheitsbild ist abhängig vom Aufnahmeweg. Inhalative Aufnahme führt im Mausmodell zu Entzündungsreaktionen, Ödemen und Atemproblemen [182]. Orale Intoxikationen, in Selbstmordabsicht oder akzidentell, führen zu Durchfall, Erbrechen und Übelkeit [183, 184]. Je nach Dosis erscheinen weitere Symptome wie Halluzinationen, Fieber und Herzrasen [185].

Es wurden sechs Fälle von Intoxikationen in Suizid-Absicht in der Literatur beschrieben, davon verlief einer letal [7, 186]. Zudem sind akzidentelle Vergiftungen in Einzelfällen bekannt, wobei sich die meisten Patienten ohne Folgeschäden erholten [181, 184, 185]. Ein Fall, bei dem drei oder vier Samen oral aufgenommen wurden, endete tödlich [187].

Die halbmaximale letale Dosis LD_{50} (intraperitoneal injiziert) im Mausmodell liegt bei 70 ng/Maus [188, 189], einer anderen Quelle zufolge reichen 10-13 ng intravenös verabreicht, um eine Maus zu töten [190]. Dieser Unterschied ist vermutlich auf die unterschiedliche Präparationen und Isoformen (siehe unten) zurückzuführen. Es wurde gezeigt, dass ein Molekül Abrin ausreicht, um eine Zelle zu töten [191]. Die minimale letale Dosis beim Menschen durch intravenöse Applikation liegt bei 0,3 µg/kg Körpergewicht [34].

Aufgrund der hohen Toxizität von Abrin wird der missbräuchliche Einsatz als biologisches Agens befürchtet. 2015 wurden zwei Anschlagversuche mit Abrin publik [7]. Da Abrin leicht aus den Samen zu gewinnen ist, wird es auf der Listen der sogenannten *select agents* der amerikanischen Behörden der gefährlichen Substanzen geführt [7, 8]. Im Gegensatz zu BoNT (Kategorie A) und SEB (Kategorie B) wird es derzeit nicht in eine Kategorie einsortiert.

Impfungen oder medizinische Gegenmittel sind zurzeit nicht verfügbar. Eine Behandlung ist unterstützend möglich [181].



Abb. 6: Pflanze, Samen und Wirkort von Abrin

a) Pflanzenteile, b) Samen von *Abrus precatorius*, c) Abrin schneidet die *N*-Glykosidbindung des markierten Adenins in der α -Sarcin/Rizin-Domäne der 28S rRNA. Es wird die Bindung von Elogationsfaktoren verhindert und die Proteinsynthese blockiert. Diese Abbildung wurde aus [192] und [193] entnommen.

Abrin ist ein Ribosomen-inaktivierendes Protein (RIP). RIPs werden in zwei Klassen eingeteilt: Klasse I sind monomere Proteine mit *N*-Glykosidase-Aktivität und einer Größe von etwa 30 kDa [194, 195]. Im Gegensatz dazu bestehen Klasse II RIPs wie Abrin aus zwei Ketten: Die A-Kette beinhaltet die enzymatische Aktivität der RNA *N*-Glykosidase und die B-Kette (ca. 35 kDa) sorgt für die Rezeptorbindung. Beide Ketten sind durch eine Disulfid-Brücke verbunden [188, 189].

Bei Abrin bindet die B-Kette an Galaktose-haltige Rezeptoren, das Toxin wird daher zu den Lektinen gezählt [196, 197]. Die inaktivierende Wirkung von Abrin A-Kette auf eukaryotische Ribosomen wurde bereits in den 1970er Jahren aufgeklärt [189, 198]. Die Elongation der Proteinsynthese der Ribosomen wird verhindert, indem eine Deadenylierung in der 28S rRNA auftritt (Abb. 6 c). Durch die RNA *N*-Glykosidase-Aktivität wird die Bindung zwischen dem Zucker und Adenin in der α -Sarcin/Rizin-Domäne gespalten [194, 199]. So können Elongationsfaktoren nicht mehr binden und es kommt zum Abbruch der Proteinsynthese [195, 196]. Ein Molekül Abrin A-Kette inaktiviert 1 500 Ribosomen pro Minute [200].

Abrin existiert in verschiedenen Isoformen. Diese werden mit Abrin-a,-b,-c und -d bezeichnet [201]. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, an Sepharose 4B zu binden. Abrin-a und -d binden Galaktose, während Abrin-b und -c diese Fähigkeit nicht aufweisen [202-204], was zu Unterschieden in der Toxizität führt [201, 203]. Abrin-a und -b stimmen in der B-Kette in 256 von 268 Aminosäuren überein, bei der A-Kette weichen 46 Aminosäuren ab [204, 205]. Andere Bezeichnungen (Abrin-I, -II, -III) werden von Hegde *et al.* vorgeschlagen [206-208]. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Bezeichnungen Abrin-a, -b usw. verwendet. Abrin-a, auf welchem im Rahmen dieser Arbeit der Schwerpunkt lag, ist das toxischste von ihnen mit einer LD₅₀ von 10 µg/kg Körpergewicht nach intraperitonealen Injektion im Mausmodell [201].

Nahe verwandt zu Abrin ist *Abrus* Agglutinin, welches ebenfalls in den Samen exprimiert wird [209]. Im Vergleich von *Abrus* Agglutinin mit Abrin-a findet man eine 67%ige Sequenzidentität auf Aminosäure-Ebene in der A-Kette und 80 % in der B-Kette [210, 211]. Dieses Protein besitzt zwar eine RNA *N*-Glykosidase-Aktivität, ist jedoch aufgrund struktureller Änderungen im aktiven Zentrum deutlich weniger aktiv [210, 211]. Stattdessen führt das Protein, welches als Tetramer aus zwei A- und zwei B-Ketten vorliegt, zur Agglutination von Erythrozyten [7, 201, 210]. Die LD₅₀ für *Abrus* Agglutinin liegt bei 5 mg/kg Körpergewicht [211].

Das aus *Ricinus communis* stammende RIP Rizin weist ebenfalls große Ähnlichkeit mit Abrin auf. Hier wurden 60 % Sequenzidentität der B-Ketten und 40 % der A-Ketten gefunden [205, 212]. Beide Proteine haben den gleichen biologischen Wirkmechanismus [196]. *Ricinus communis* wird im großen Maßstab (ca. 1-2 Million Tonnen pro Jahr) angebaut, um das in den Samen enthaltene Castor-Öl zu gewinnen [213-215]. Als Abfallprodukt entsteht ein Pressrückstand, welcher Rizin in großen Mengen enthält [215]. Rizin wurde in den USA 2003 und 2013 für Anschlagversuche per Brief eingesetzt [216].

Im Falle einer Vergiftung mit Abrin beruht die Detektion auf drei verschiedenen Methoden (Tab. 5). Zum Ersten wird per PCR sehr sensitiv die DNA nachgewiesen, falls DNA in der Probe enthalten ist. Zum Zweiten wird das Protein mittels Immunoassays oder Massenspektrometrie in Expertenlaboren detektiert. Der sensitivste Test beruht auf der Messung von Radioaktivität und dauert 24 h [217]. Kommerziell erhältlich und deutlich schneller ist ein LFA mit einer Nachweisgrenze von 10 ng/ml [218]. Für die verwandten RIPs Rizin und Shiga Toxin wurde ein massenspektrometrischer Funktionstest entwickelt, dieser sollte auf Abrin übertragbar sein [219]. Als dritte Möglichkeit wird der Surrogatmarker L-Abrine (*N*_α-Methyl-L-Tryptophan), ein niedermolekulares Alkaloid, detektiert [220]. 0,5-1 % des Trockengewichts der Samen ist L-Abrine, Abrin selbst trägt ca. 0,075-0,75 % bei [221]. Bei einer akzidentellen Vergiftung kann L-Abrine nachgewiesen werden. Zu bedenken gilt, dass im Falle eines Anschlages mit reinem Abrin diese Methoden des DNA- und L-Abrine-Nachweises nicht benutzt werden können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Detektion von Abrin bisher nur in ausgewählten Expertenlaboratorien möglich ist. Während PCRs relativ leicht in andere Labore übertragbar sind, basieren Immunoassays auf geeigneten Antikörpern. Da die Reagenzien nicht frei verfügbar sind, existiert in Deutschland bislang kein sensitives Nachweissystem für Abrin. Diese Detektionslücke sollte im Verlauf der Arbeit geschlossen werden.

Tab. 5: Überblick: Detektionsmöglichkeiten für Abrin

<i>Methode</i>	<i>LOD</i>	<i>Dauer</i>	<i>Matrizes</i>	<i>Referenzen</i>
PCR	1,2 GE	2 h	LM	[192]
ELISA	0,1-10 ng/ml	5 h	LM	[222-226]
LFA	3-10 ng/ml	10 min	LM, Pulver	[218, 225, 227]
SERS	0,1 ng/ml	15 min	-	[228]
Bead-Assay	0,5-2,2 ng/ml	2-4 h	LM	[57, 166]
RIA	0,05-0,1 ng/ml	24 h	Blut	[217]
Biosensoren	3 ng/ml	1 h	LM	[229]
MS	n. a.	2 h	-	[213, 230]
(MS Funktionalität ^a)	n. a.	2 h	-	[219]
L-Abrine (Biosensor)	2,5-16 μ M	15-60 min	LM, Urin	[231, 232]
L-Abrine (MS)	2,5 ng/ml	n. a.	LM, Urin	[6, 221]

PCR *polymerase chain reaction*, ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*, LFA *lateral flow assay*, SERS *Surface-enhanced Raman scattering*, RIA *radioimmunoassay*, MS *Massenspektrometrie*, LOD *Detektionslimit*, LM *Lebensmittel*, GE *Genomäquivalente*, ^a wurde bisher nur für die RIPs Rizin und Shiga Toxin gezeigt, n. a. nicht angegeben

1.2 Stationäre und Vor-Ort-Detektionsverfahren

Biologische Toxine gehören zu den gefährlichsten bekannten Substanzen und erfordern daher sensitive Nachweissysteme. Es existieren Detektionsverfahren, die die DNA oder Proteine nachweisen. Der gleichzeitige Nachweis von DNAs verschiedener Pathogene mittels PCR-Techniken ist einfach durchzuführen und erlaubt eine sensitive Detektion der Erreger [46, 150, 192]. Da Toxine in Abwesenheit eines Produzenten wirksam sind, sind die Methoden nur dann geeignet, wenn der Toxin-produzierende Organismus und seine genetische Information vorhanden sind. Die Detektion und Identifikation des Proteins ist daher zu bevorzugen [166].

Der sichere Nachweis möglichst vieler biologischer Toxine basiert auf Immunoassays mit Antikörper-Toxin-Interaktionen. Ein großes Problem ist die Zugänglichkeit zu diesen Antikörpern. Erhältliche kommerzielle Detektionsreagenzien sind meist von ungenügender Qualität. Hoch qualitative Antikörper (Ak) sind häufig nicht frei verfügbar und/oder werden durch nationale Interessen geschützt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit eigene Antikörper generiert und Nachweissysteme für biologische Toxine etabliert.

In der Vergangenheit wurden bevorzugt klassische Sandwich ELISA auf Mikrotiterplatten für den stationären Nachweis der Toxine im Labor entwickelt. In den letzten Jahren entstanden neue Formate, die entweder vor Ort von nicht-wissenschaftlichem Personal eingesetzt werden können oder stationäre Multiplexverfahren, die einen gleichzeitigen Nachweis verschiedener Toxine erlauben.

Kategorie	Vor-Ort-Nachweis	Stationärer Nachweis
Sensitivität	gering	hoch
Spezifität	gering	hoch
Multiplex-Fähigkeit	gering	hoch
Bedienbarkeit	einfach	komplex
Geschwindigkeit	schnell	langsam
Preis	günstig	teuer
Datenverarbeitung/-auswertung	„Ja-oder-nein“ oder einfach	komplex

Abb. 7: Unterschiede zwischen Vor-Ort- und stationärem Nachweis

Die Nachweissysteme unterscheiden sich in verschiedenen Kategorien, deren Ausprägungsgrad schematisch anhand eines Dreiecks dargestellt ist.

Vor-Ort-Methoden haben im Vergleich zu stationären Nachweisverfahren, wie z. B. Sandwich ELISA, einige Vorteile, aber auch Nachteile (*Abb. 7*). Vor-Ort-Nachweise überzeugen durch eine einfache Bedienbarkeit, einen günstigen Preis und eine schnelle Messung. Das Ergebnis ist meist nicht quantitativ, sondern eine „Ja-oder-nein“-Aussage. Stationäre Methoden weisen eine höhere Spezifität und Sensitivität auf, zudem ist die Datenverarbeitung/-auswertung komplexer.

Eine Quantifizierung ist damit möglich. Zudem existieren verschiedene technische Möglichkeiten wie Suspensionsarrays oder Mikroarrays, die simultane Nachweise mehrerer Analyten erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte beides entwickelt werden, der Vor-Ort-Nachweis und der stationären Nachweis.

Zur schnellen Detektion sollte am besten direkt vor Ort eine erste Einschätzung der Lage erfolgen. Die Labordiagnostik aus *Tab. 3*, *Tab. 4* und *Tab. 5* sowie die im Rahmen der Arbeit neu entwickelten ELISAs dauern meist mehrere Stunden und/oder erfordern den Probentransport in ein Expertenlabor. Um hier Abhilfe zu schaffen, wurden Vor-Ort-Detektionsverfahren entwickelt. Diese sollten mehrere Charakteristika aufweisen [233, 234]:

Die Detektionsmethoden sollten schnell (am besten weniger als eine Stunde Laufzeit), sensitiv und spezifisch (Minimierung der falsch-negativen und falsch-positiven Testergebnisse) sein. Zudem sollten sie kostengünstig und unempfindlich gegenüber Umwelteinflüssen, wie z. B. Temperaturschwankungen, sein. Der apparative Aufwand sollte so gering wie möglich sein, um die Diagnostik an vielen Orten zu etablieren. Der wichtigste Punkt war die einfache Durchführbarkeit. Vor-Ort-Detektionsverfahren sollten innerhalb kurzer Zeit von Personen ohne biologische/chemische Vorbildung zu erlernen sein. Einsatzkräften, wie Polizei und Feuerwehr, sollte eine erste Einschätzung der Lage mit Hilfe dieser diagnostischen Verfahren gelingen.

Zwei Vor-Ort-Detektionsverfahren werden im folgenden Kapitel kurz vorgestellt. Der im Rahmen dieser Arbeit weiter entwickelte portable Toxindetektor pTD wird in 1.2.2 genauer beschrieben.

Bei den stationären Methoden werden miniaturisierte Verfahren und Multiplex-Verfahren entwickelt, welche die Nachteile eines klassischen Sandwich ELISA, wie die Dauer und der ausschließliche Einzelnachweis, kompensieren. Da meist unbekannt ist, welches Agens benutzt wurde, ist der simultane Nachweis verschiedener Toxine technisch vorteilhaft. Ein vielversprechendes System ist der Protein Mikroarray für Toxine, welcher von Jenko *et al.* entwickelt wurde [161]. Hier gelang der Nachweis von BoNT/A, /B, /C, /D, /E, /F, Rizin, Shiga Toxin 1 und 2 sowie SEB in Puffer und komplexen Matrices mit Detektionslimits im unteren pg/ml-Bereich. Der Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie, ein weiteres im Rahmen dieser Arbeit verwendetes Multiplex-Detektionsverfahren, wird in Abschnitt 1.2.1 genauer erläutert.

Das Oberflächenplasmonresonanz-Verfahren (SPR) stellt ein miniaturisiertes Verfahren dar, welches die Interaktion von Antikörpern und Antigen in Echtzeit misst (1.2.1). Es wird sowohl zur Beurteilung der Affinität von Antikörpern als auch zur Bestimmung des Toxingehalts von Lösungen verwendet.

In den folgenden Kapiteln werden ausgewählte Nachweismethoden aus allen Einsatzbereichen vorgestellt (Tab. 6). Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie und die SPR-Technik eingesetzt, um geeignete Antikörper zu identifizieren. Mit Hilfe der neu generierten Antikörper wurden ELISAs etabliert. Zudem wurden die Antikörper in das portable Toxindetektor System pTD implementiert.

Tab. 6: Überblick: Ausgewählte stationäre und Vor-Ort-Nachweis-Methoden für biologische Toxine

	<i>Vor-Ort-Nachweis</i>	<i>Stationärer Nachweis</i>
Einzelnachweis	LFA, ABICAP	ELISA, SPR
Multiplex-Nachweis	pTD	Suspensionsarray basierend auf der Luminex Technologie

LFA *lateral flow assay*, ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*, SPR Oberflächenplasmonresonanz, pTD portabler Toxindetektor

1.2.1 Ausgewählte stationäre und Vor-Ort-Detektionsverfahren

Die hier und im folgenden Kapitel vorgestellten Detektionsverfahren basieren auf Immunoassays, welche auf verschiedenen Trägeroberflächen im Sandwich-Format durchgeführt werden.

Lateral Flow Assay

Die einfachsten und häufigsten Vor-Ort-Detektionsnachweise sind *lateral flow assays* (LFA). Diese oft kommerziell erhältlichen Nachweissysteme beruhen auf dem Prinzip der Papierchromatographie mit anschließender Immunofärbung. Die Einsatzgebiete sind vielfältig: Lebensmitteltestung (Mykotoxine, Pathogene, etc.), Test biologischer Agenzien (Bakterien, Viren, Toxine), Umweltmonitoring (Kontaminationen in Trinkwasser), Veterinärmedizin (Pathogene, Hormone) und medizinische Tests (Hormone, Krankheitsmarker, Drogen, Glucose, etc., [234, 235]). Ihre Funktionsweise lässt sich einfach beschreiben (Abb. 8): Die Probe wird in der Auftragszone auf eine Membran getropft und über Kapillarkräfte durch den Streifen gesaugt. In der ersten Zone wird der Analyt durch einen Detektionsantikörper erkannt, welcher mit z. B. Goldpartikeln markiert ist. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wandert entlang der Nitrocellulose-Membran. In der Testzone entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, es bildet sich eine farbige Linie. In der Kontrollzone wird der markierte Detektionsantikörper von einem anti-Spezies Antikörper erkannt, dies erzeugt eine weitere, im Falle der Goldmarkierung rote, Linie. Die Auswertung des LFAs erfolgt nach ca. 10-20 min per Auge oder mit einem Lesegerät [218]. Beide Linien zeigen einen validen positiven Test an. Erscheint ausschließlich die Kontrolllinie, ist der Test negativ. Fehlt diese, funktioniert der LFA

nicht und sollte wiederholt werden. Typische Detektionslimits beim Nachweis von Toxinen mit LFAs sind 1-50 ng/ml (*Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5*). LFAs lassen sich für den Toxinnachweis aus verschiedenen Matrices verwenden [54, 55, 162, 163, 218]. Sie dienen der vorläufigen Detektion und sollten immer in qualifizierten Laboren mit unabhängigen Techniken bestätigt werden [165]. Durch den Einsatz verschiedener Fängerantikörper an unterschiedlichen Positionen des Streifens ist ein Multiplex-Verfahren möglich [236].

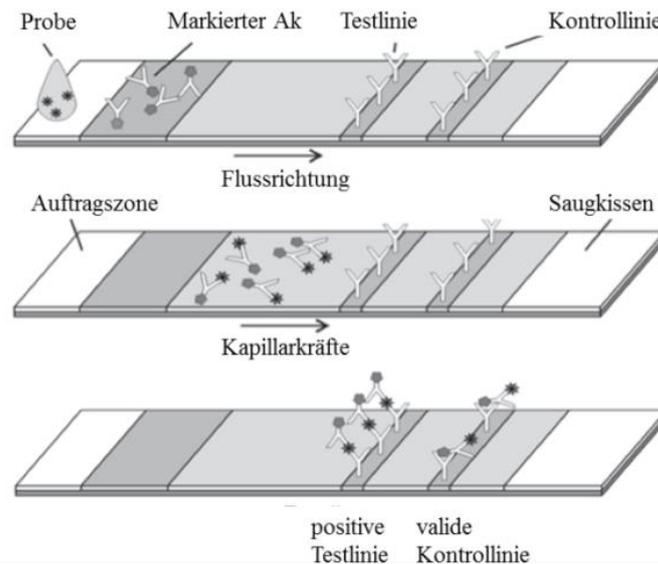


Abb. 8: Prinzip des *lateral flow assays*

Die Probe mit dem Analyten wird auf die Auftragszone getropft und von dem (z. B. mit Gold) markiertem Detektionsantikörper erkannt. Die Wanderung erfolgt mit Hilfe von Kapillarkräften. Ist ein Analyt vorhanden, werden zwei Linien sichtbar. Bei einem negativen Resultat erscheint ausschließlich die Kontrolllinie. Diese Abbildung wurde modifiziert nach [237].

ABICAP

Ein weiteres Vor-Ort-Detektionssystem, welches auf einem ähnlichen Prinzip basiert, ist das sogenannte ABICAP-System. Im Gegensatz zu LFAs beruht das ABICAP-System auf einer dreidimensionalen Immunochematographie, bei der Filter in Säulen als Trägermaterial benutzt werden. Auf diese Filter wurde zuvor der Fängerantikörper immobilisiert. Die Probe mit dem Analyten, der Enzym-markierte Detektionsantikörper und das Substrat werden sequentiell auf die Säule gegeben. Ist der Analyt enthalten, bildet sich ein farbiges Präzipitat. Dieser Farbkomplex wird per Auge oder mit einem Lesegerät quantitativ ausgewertet [238]. Das Verfahren dauert 45 min, mit Modifikationen ist eine Verkürzung auf 15 min möglich. In der Arbeitsgruppe wurden mit diesem System Nachweisgrenzen im einstelligen ng/ml-Bereich für BoNT/A, /B und /F, SEB und Rizin erzielt (unveröffentlichte Daten und [239]). Für BoNT/A Komplex wurde ein ca. zehnfach sensitiverer Nachweis entwickelt [240]. Für die Komplexe von BoNT/B, /E und /F wurden Detektionslimits von 10-100 ng/ml bestimmt [241]. Bei BoNT/C und /D wurde jeweils eine mausletale Dosis pro Milliliter nachgewiesen [242].

Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie

Der Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie ist ein stationäres Multiplex-Verfahren [166, 243], welches in der Lage ist, bis zu 100 Analyten gleichzeitig nachzuweisen. Der Aufbau ähnelt dem eines Sandwich ELISAs, allerdings gibt es zwei wichtige Unterschiede. Der Fängerantikörper wird nicht auf einer 96-Kavitäten-Platte immobilisiert, sondern an paramagnetische Luminex-Partikel gekoppelt, welche mit einer Mischung aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Abb. 9 A). Über das Verhältnis der Farbstoffe wird jede Partikelsorte nach Anregung mit einem Laser bei einer Wellenlänge von 635 nm spektral identifiziert. Pro Analyt wird eine Partikelsorte verwendet. Durch die magnetischen Partikel ist eine Anreicherung aus größeren Volumina möglich. Mehrere unterschiedliche Partikel mit den entsprechenden Fängerantikörpern werden zur untersuchten Probe zugegeben. Der Analyt bindet und wird mit einem zweiten biotinylierten Detektionsantikörper markiert.

Der zweite Unterschied liegt im Nachweissystem. Der Nachweis erfolgt über den Farbstoff Phycoerythrin, welcher an Streptavidin gebunden ist. Über die Interaktion von Streptavidin und Biotin werden die Analyt-erkennenden Partikel markiert [244]. Die Menge des gebundenen Farbstoffes ist direkt proportional zur Menge des Antigens und wird mittels eines zweiten Lasers bei 532 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Durchflusszytometers (Abb. 9 B). Der gesamte Prozess dauert etwa vier Stunden.

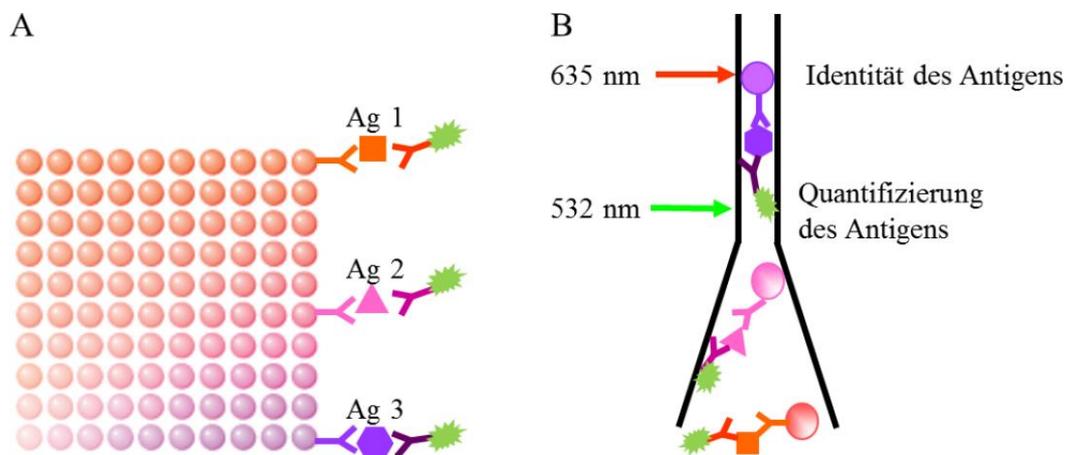


Abb. 9: Prinzip des Suspensionsarrays

In A sind die hundert mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Luminex-Partikel dargestellt. Die Fängerantikörper wurden zuvor immobilisiert und erkennen in der Probe das entsprechende Antigen (Ag). Über einen biotinylierten Detektionsantikörper wird Streptavidin-Phycoerythrin gebunden. Dieser Komplex wird in einem Durchflusszytometer mit zwei Lasern vermessen (B). Bei 635 nm (rot) wird die Fluoreszenzmarkierung der Partikel ausgelesen, bei 532 nm (grün) wird das Signal des Reporterfarbstoffes Phycoerythrin bestimmt. Diese Abbildung wurde modifiziert nach [243].

Anwendungsbeispiele für den Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie als Toxinnachweis finden sich in der Literatur: Garber *et al.* gelang ein Multiplex-Nachweis für Abrin, Rizin, SEB und BoNT/A Komplex mit LODs von 2,2 ng/ml, 0,11 ng/ml, < 0,2 ng/ml und

1,2 ng/ml. Es wurden mehrere Antikörper pro Toxin verwendet, sodass insgesamt 31 verschiedene Partikel benutzt wurden [57]. Ein unabhängiger Detektionsansatz, basierend auf anderen Antikörpern, zeigte deutlich sensitivere Ergebnisse, hier wurden Abrin, Rizin, SEB, BoNT/A und BoNT/B mit folgenden Detektionslimits nachgewiesen: 546 pg/ml, 2 pg/ml, 3 pg/ml, 21 pg/ml bzw. 73 pg/ml [166].

Oberflächenplasmonresonanz

Oberflächenplasmonresonanz-Messungen (*surface plasmon resonance*, SPR) ermöglichen die markierungsfreie Bestimmung kinetischer Bindungsparameter zweier Interaktionspartner in Echtzeit. Hierzu wird ein Interaktionspartner (z. B. Antikörper) auf der Oberfläche eines mit einer Goldschicht versehenen und üblicherweise mittels Carboxymethyl-dextran modifizierten Glas-Sensorchips als Ligand immobilisiert. Über ein Mikrofluidik-System wird der zweite Interaktionspartner in Lösung auf den Sensorchip injiziert, wodurch es zu einer Interaktion zwischen Ligand und Analyt kommt (*Abb. 10 links*). Das Messprinzip beruht auf der Reflexion eines durch ein Prisma auf die Goldoberfläche eingestrahlten Lichtstrahls, wobei ein evaneszentes elektromagnetisches Feld entsteht. Durch die Anregung von Oberflächenplasmonen in der Goldschicht kommt es zur Absorption von Licht bei einem bestimmten Ausfallwinkel. Da das während der Reflexion entstehende evaneszente Feld über die Goldoberfläche hinaus in die Interaktionsfläche des Mikrofluidik-Systems hineinragt, wird der Ausfallwinkel der Lichtabsorption direkt durch den Brechungsindex der Flüssigkeit oberhalb der Goldoberfläche beeinflusst. Bei Bindung des Analyten ändert sich der Brechungsindex durch Anlagerung von Molekülen nahe der Goldoberfläche, wodurch sich der Absorptionswinkel ändert, welcher in Echtzeit gemessen und am Detektor in Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) registriert wird [245, 246].

In der Arbeit wurde diese stationäre Technik zur Messung der Bindungsstärke von Antikörpern und Antigenen verwendet, um möglichst hoch-affine Antikörper zu identifizieren, die in nachfolgenden Anwendungen, wie z. B. Sandwich ELISA-basierten oder Vor-Ort-Detektionsverfahren, einen sensitiven Nachweis des Antigens erlauben (*Abb. 10 rechts*). Hierzu wird der Antikörper auf der funktionalisierten Goldschicht immobilisiert. Das Antigen wird in Lösung zugegeben. Die Änderung des Brechungsindex durch die Assoziation von Antikörper und Analyt führt zu einem Anstieg des Signals. Durch die Injektion von Puffer wird die Dissoziation eingeleitet und das Signal verringert sich. Bei einer starken Interaktion von Antikörper und Analyt kommt es zu einer geringen Abnahme (*Abb. 10 rechts oben*), bei einer instabilen Bindung nimmt das Signal rasch ab (*Abb. 10 rechts unten*).

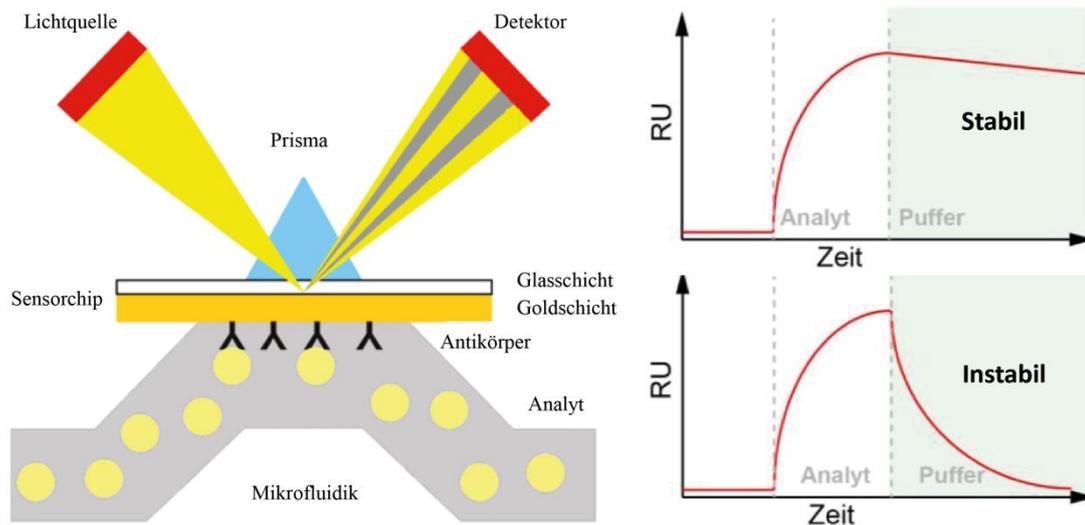


Abb. 10: Prinzip und Auswertung der Oberflächenplasmonresonanz

Links: Das Licht wird auf den Sensor gelenkt und von der Goldoberfläche reflektiert. Durch die durch Interaktionen entstehende Schicht in der Flusszelle wird der Brechungsindex verändert, was zu einer Änderung des Absorptionswinkels des reflektierten Lichts führt. Diese wird am Detektor gemessen. Die Abbildung wurde nach [247] modifiziert.

Rechts: Repräsentative Darstellungen der Messung einer Antikörper-Antigen-Interaktion. Der zu untersuchende Ak wird mit Hilfe von anti-Maus Antikörpern immobilisiert. Die Zugabe von Analyt führt zur Assoziation und zu einem Anstieg des Signals, gemessen in RU. Zur Messung der Dissoziation wird Puffer injiziert. Ein langsamer Abfall des Signals zeigt eine stabile Interaktion an (oben). Zerfällt der Antikörper-Antigen-Komplex schnell, d. h. die Bindung ist instabil, nimmt das Signal schnell ab (unten) und eine hohe Dissoziationsrate wird berechnet.

Neben der Bestimmung der kinetischen Parameter der Interaktion ist es ebenso möglich, Analyten in Lösung zu quantifizieren. Eine Markierung ist nicht nötig, zudem ist im Gegensatz zu den vorherigen Methoden bei dieser Art der Detektion nur ein Antikörper nötig. Die SPR-Technik wurde unter anderem zum sensitiven Nachweis von bakteriellen und Dinoflagellaten-Toxinen, Mykotoxinen und Pflanzentoxinen eingesetzt [247]. Die Detektion von SEB mittels SPR gelang im einstelligen pg/ml-Bereich [248]. Die Nachweisgrenze für Abrin, basierend auf einem humanen anti-Abrin Antikörper, lag bei 35 ng/ml [249]. Für Rizin und Ricinus Agglutinin wurde eine Methode etabliert, welche die beiden nahverwandten Proteine differenziert und quantifiziert [250].

1.2.2 Portabler Toxindetektor pTD

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Multiplex-Verfahren für die Vor-Ort-Diagnostik im Fokus stehen: das pTD Gerät. pTD steht für *portabler Toxindetektor* und wird von Bruker Daltonik, Leipzig, vertrieben. Ältere Namen des Herstellers für dieses Gerät sind ePaTOX II und eBiochip. Das pTD Gerät ist vor Ort in der Lage, biologische Agenzien schnell und stabil nachzuweisen.

Es handelt sich um ein miniaturisiertes elektrochemisches Sensorsystem, welches Proteine, DNA oder RNA nachweisen kann. Der Sensor wird mittels Mikrofluidik-Systems von den benötigten Agenzien überspült. Die Funktionsweise des Gerätes ist einfach und robust (*Abb. 11*, [251-254]): Die Basis besteht aus einem Silizium-Chip mit 16 verschränkten Goldelektroden. Auf diese spezifischen Positionen werden über Thiol-Gold-Interaktionen und hydrophobe Adsorption Fängersubstanzen immobilisiert (Antikörper oder Oligonukleotide). Der Chip wird in das pTD Gerät eingebracht. Über ein System aus Pumpen und Ventilen werden die Probe, das Detektionsreagenz und ein enzymatisches Nachweissystem über die Chipoberfläche gespült. Bindet der Analyt an die Fängersubstanzen (z. B. Antikörper), wird diese Interaktion mit Hilfe der Detektionsreagenzien nachgewiesen. Die Nachweisreaktion beruht auf einem biotinyliertem Detektionsreagenz und Streptavidin- β -Galaktosidase. Streptavidin- β -Galaktosidase spaltet das Substrat p-Aminophenyl- β -Galaktosid (pAPG) in zwei Teile, in p-Aminophenol (pAP) und β -Galaktosid. pAP ist eine redox-aktive Substanz und dient als Elektronen-Überträger zwischen Anode und Kathode. Auf diese Weise wird ein Stromfluss erzeugt, welcher direkt proportional zur Menge des gebundenen Analyten ist. Der Anstieg des Stromflusses bei gestoppter Fluidik (*stopped flow*) wird in nA/min gemessen. Da auf dem Chip Positiv- und Negativkontrollen integriert sind, wird der gemessene Anstieg des Stromflusses normalisiert ausgegeben (siehe 2.2.8.2). Dies erlaubt eine relative Vergleichbarkeit verschiedener Messungen. Werden auf den Chips Antikörper immobilisiert, wie im Rahmen dieser Arbeit, bestehen auch die Kontrollen aus Antikörpern. Als Negativkontrolle wird Maus Immunglobulin (IgG) eingesetzt, hier sollten bei korrekter Messung keine Signale auftreten. Werden dennoch Signale gemessen, kann auf Störsubstanzen in der Probe, wie z. B. unspezifische Interaktionen mit den verwendeten Matrices, geschlossen werden. Als Positivkontrolle wird ein biotinylierter Kaninchen-Antikörper eingesetzt, an welchen Streptavidin- β -Galaktosidase immer bindet. Tritt hier kein positives Signal über einem zuvor definierten Schwellenwert auf, ist dies ein Hinweis auf defekte Elektroden oder auf Hemmung des Enzyms durch in der Probe enthaltene störende Faktoren. Die gesamte Messung dauert 20 Minuten, es können bis zu sieben Analyten simultan in Duplikaten (14 Messpositionen und 2 Kontrollen) detektiert werden. Abschließend erfolgt ein vierminütiger Dekontaminationsschritt mit NaOH und SDS, um eine Verschleppung der Probe zu vermeiden.

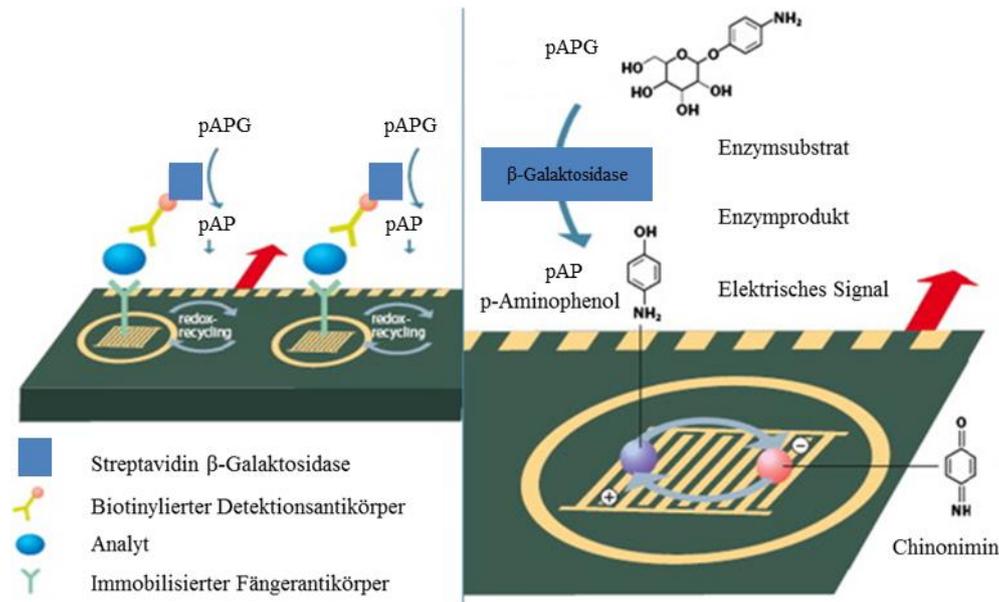


Abb. 11: Prinzip des pTD

Auf einem Silizium-Chip mit verschränkten Goldelektroden wird ein Fängerantikörper immobilisiert. Sequentiell binden der Analyt, der biotinylierte Detektionsantikörper und Streptavidin-β-Galaktosidase. Es kommt zur Spaltung von p-Aminophenyl-β-Galaktosid (pAPG) in p-Aminophenol (pAP) und β-Galaktosid. pAP durchläuft einen Redoxzyklus mit Chinonimin. Der erzeugte Stromfluss ist proportional zur gebundenen Menge des Analyten. Diese Abbildung wurde nach [255] modifiziert.

Bisher wurden mit den pTD Chips Messungen mit verschiedenen Analyten durchgeführt (Tab. 7). Vorwiegend wurde DNA nachgewiesen. Einzelne Assays wurden zum Nachweis von Proteinen entwickelt. So wies ein Test das Auftreten von humanen Alloantikörpern gegen Blutplättchen-Antigene nach [255]. Ein weiterer Assay detektierte Antikörper gegen das Hepatitis C-Virus [254].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper als Fänger- und Detektionsreagenzien benutzt.

Bislang war eine spezifische und sensitive Toxindetektion mit diesem Gerät nur in limitiertem Umfang möglich. Das größte Problem war die mangelnde Verfügbarkeit von entsprechenden Fänger- und Detektionsantikörpern, welche spezifisch für die in Kapitel 1.1 vorgestellten Toxine sind.

Aufgabe war es deshalb, die neu generierten Antikörper in ein Vor-Ort-Nachweisverfahren zu implementieren. So sollte eine breite Palette von bakteriellen und pflanzlichen Toxinen abgedeckt werden. Bisher wurden in der Arbeitsgruppe Chips für die Detektion von BoNT/A, /B und /F, Rizin und SEB entwickelt (unveröffentlichte Daten). Publiziert ist ein Nachweis von SEB mit Hilfe des pTD mit einem Detektionslimit von 1 ng/ml [256].

Tab. 7: Überblick: Bisher etablierte pTD Chips

<i>Analyt</i>	<i>Fänger</i>	<i>Detektor</i>	<i>Besonderheit</i>	<i>Referenz</i>
Virale DNA	Oligonukleotide	-	Direkte Biotinylierung der Probe während PCR	[257]
Bakterielle RNA	Oligonukleotide	Oligonukleotide	-	[251, 258]
Bakterielle DNA	Oligonukleotide	Oligonukleotide	-	[259, 260]
Bakterielle DNA	Oligonukleotide	-	Direkte Biotinylierung der Probe während PCR	[261]
Protein	Antikörper	Antikörper	-	[255, 256]
Antikörper	Antigen	Antikörper	Prinzip indirekter ELISA	[254]
Biolog. Toxine	Antikörper	Antikörper	-	diese Arbeit

Das pTD Gerät verbindet in geeigneter Weise die Anforderungen, die an ein Multiplex- und Vor-Ort-Detektionssystem gestellt werden. Es werden im finalen Chip fünf Analyten gleichzeitig bestimmt. Durch die integrierten Positiv- und Negativkontrollen ist eine Evaluierung möglich, ob die Messung valide ist. Zudem kann die Bedienung des Gerätes in ca. einer Stunde erlernt werden. Die Gesamtlaufzeit von 25 min pro Messung ist für ein Vor-Ort-Detektionssystem akzeptabel.

1.3 GEFREASE-Projekt

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen des deutsch-französischen Projektes GEFREASE (German French Equipment for Analysis and Surveillance of biothreats in the Environment) durchgeführt [262]. Das deutsche Schlagwort dazu lautet „Sicheres Erkennen biologischer Gefahren vor Ort“. Im Rahmen des Programms „Forschung für die zivile Sicherheit“ wurden die deutschen Partner vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert. Das französische Äquivalent *Agence nationale de la recherche* unterstützte die Partnerinstitutionen aus Frankreich.

Insgesamt waren vier Partner involviert, zwei aus Deutschland und zwei aus Frankreich: Je eine wissenschaftliche Institution aus jedem Land sowie ein Industriepartner.

Die Industriepartner Bruker Daltonik und Bertin Technologies brachten je eine Detektionsplattform (pTD und KIM [263]) in das Projekt ein, welche während des Förderzeitraums weiter entwickelt werden sollte.

Das Detektionsspektrum des pTD wurde im Rahmen des Projektes auf Toxine, Bakterien und Viren ausgeweitet. Zur Verbesserung der Vor-Ort-Detektion wurde eine mobile Kofferlösung des pTD Gerätes (pTDi) entwickelt (Abb. 12). Funktionsweise, Sensitivität und verwendbare Chips waren identisch. Das pTDi kann unabhängig von einer Stromversorgung betrieben werden und ist von außen dekontaminierbar.



Abb. 12: Labor- und Koffervariante des pTD

Links die Laborvariante, mit der die hier vorgestellten Ergebnisse erzeugt wurden. Rechts ist die neue Koffervariante pTDi abgebildet.

Die wissenschaftlichen Institutionen waren auf französischer Seite das *Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives* (Behörde für Atomenergie und erneuerbare Energien, CEA) in Marcoule und auf deutscher Seite das Robert Koch-Institut in Berlin. Beide Institutionen entwickelten hochqualitative Detektionsreagenzien. So lag der Fokus des CEAs auf der Antikörperherstellung gegen die fünf Erreger *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera* und *Variola major*, während am RKI Ak gegen Toxine generiert wurden (diese Arbeit). Das Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (BBK) war im Projekt assoziierter Partner. In dieser Funktion unterstützte es die Ausrichtung der

Anwender-Übung (siehe 3.6.5) und fungierte als Kontaktstelle zu den biologisch geschulten Einsatzkräften (*analytische Task Force B* Bereich).

1.4 Ziele der Arbeit

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen des oben vorgestellten GEFREASE-Projektes erstellt. Ausgangspunkt der Arbeit war, dass bisher in Deutschland keine hoch qualitativen Detektionsreagenzien für den Nachweis der biologischen Toxine SEA, Abrin, BoNT/C, /D und /E vorhanden waren. Es mangelte an sensitiven und spezifischen stationären sowie mobilen Nachweisverfahren. Um diese Fähigkeitslücken zu schließen, wurde folgende Aufgabenstellung definiert:

- Generierung und Charakterisierung qualitativ hochwertiger Antikörper zur Detektion der biologischen Toxine SEA, Abrin, BoNT/C, /D und /E, für die in Deutschland keine adäquaten Reagenzien zur Verfügung standen.
- Entwicklung spezifischer und sensitiver Sandwich ELISA, die für den stationären Nachweis der Toxine eingesetzt werden können.
- Schließung von Fähigkeitslücken in der stationären Detektion von veterinärpathogenen BoNT/C, /D sowie den Mosaikvarianten /CD und /DC mittels Sandwich ELISA und Endopeptidase-Tests. Ein routinefähiger, differenzierender Nachweis, der außerhalb von Expertenlaboren eingesetzt werden kann, sollte etabliert und mit Hilfe von Realproben validiert werden. Parallel dazu sollte ein Test der Endopeptidase-Aktivität auf massenspektrometrischer Basis für Expertenlabore weiterentwickelt werden.
- Implementierung der Antikörper gegen die relevanten Toxine SEA, Abrin, BoNT/C, /D und /E in die automatisierte Vor-Ort-Detektionsplattform pTD, einem elektrischen Biochipsystem des Verbundpartners Bruker Daltonik.
- Umfassende Validierung des neu entwickelten Biochips mit Bestimmung der Nachweisgrenzen.
- Vorbereitung, Durchführung und Auswertung einer Anwenderübung, bei dem die Vor-Ort-Technologie auf ihre Praxistauglichkeit geprüft wird. Ziel der Anwenderübung sollte es sein, Einsatzkräften die Testung des pTD unter simulierten Praxisbedingungen zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte, welche für die Durchführung dieser Arbeit nötig waren, finden sich in *Tab. 8*. Standardgeräte wie Kühlschränke, Pipetten und Zentrifugen werden nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 8: Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Anaerobier-Werkbank	MACS 500	Don Whitley Scientific, West Yorkshire, United Kingdom
Biacore (SPR)	X100	GE Healthcare, München
Brutschrank	HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	LSRII	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer	Bio-Plex 200	Bio-Rad, München
Elektrophoresegerät	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, München
Geldokumentation	ChemiDoc MP	Bio-Rad, München
Flüssigchromatographie-Anlage	ÄKTAexplorer100	GE Healthcare, München
Massenspektrometer	Autoflex Speed	Bruker Daltonics, Bremen
Metallsieb	212 µm	VWR, Darmstadt
Mikroplatten-Lesegerät	Anthos LP400	Diagnostics Pasteur, Chaska, MN, USA
Mikroskop	DMIL 090-135.001	Leica, Wetzlar
Photometer	NanoPhotometer P300	IMPLEN, München
Plattenwascher	HydroSpeed	Tecan, Crailsheim
pTD/ePaTOX II	Laborgerät	Bruker Daltonik, Leipzig/ Analytik Jena, Jena
Semi-Dry Blotter	TransBlot Turbo V.102	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	HERASafe	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad	Sonifier 450	Branson, Danbury, CT, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 9 zeigt einen Überblick über verwendete Verbrauchsmittel. Standardlaborware wie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße werden nicht gesondert erwähnt.

Tab. 9: Verbrauchsmittel

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Cryoröhrchen	1,8 ml	Nunc, Roskilde, DK
Dialyseschlauch	MWCO 8-10 kDa	Spectrum Labs, Frankfurt a. M.
ELISA-Platten	MaxiSorp 96F	Nunc, Roskilde, DK
Filterpapier	Whatman 3 MM CHR	Invitrogen, Karlsruhe
Filtersieb	70 µm BD Falcon Cell Strainer	BD, Heidelberg
Flaschenaufsatz-Filter	ExpressR Plus 0,22 µm (PES)	Millipore, Billerica, MA, USA
Kanülen	StericanR Kanülen	B. Braun, Melsungen
Klebefolien	für Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, DK
PD-10 Säulen	GE Sephadex	GE Healthcare, München
PVDF-Membran	Immobilon-P 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Protein A Säulen	HiTrap MabSelect SuRe	GE Healthcare, München
Protein G Säulen	HiTrap Protein G HP	GE Healthcare, München
Bio-Plex-Platten	96-Well, Polystyrol, Flach-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritzen	1 ml, 10 ml, 20 ml (steril)	B. Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter	0,22 µm oder 0,8 µm mit PVDF-Membran	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Whatman Papier	GB003	VWR, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen	Amicon Ultra MWCO 10 kDa (Proteine) bzw. 100 kDa (IgG)	Millipore, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen	Nunclon Delta mit Filterkappe	Nunc, Roskilde, DK
Zellkulturplatten	MicroWell Nunclon Delta	Nunc, Roskilde, DK
Zellschaber	Größe S, M, L	Nunc, Roskilde, DK
Zellsieb	70 µm	BD, Heidelberg

2.1.3 Chemikalien

Alle nicht in *Tab. 10* aufgeführten Chemikalien wurden in p. a. Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Seelze), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

Tab. 10: Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Bio-Rad, München
Asialofetuin	Sigma-Aldrich, Seelze
5-Bromo-5-Nitro-1,3-Dioxan	Sigma-Aldrich, Seelze
BSA (Immunoassays)	Sigma-Aldrich, Seelze
BSA (Zellkultur)	Serva, Heidelberg
Coomassie G-250	Bio-Rad, München
DMSO	Sigma-Aldrich, Seelze
DTT	Carl Roth, Karlsruhe
EDC	Pierce, Rockford, IL, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Seelze
FKS für Zellkultur	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Freunds Adjuvans (KFA bzw. IFA)	Sigma-Aldrich, Seelze
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Seelze
Natronlauge 32 %	Carl Roth, Karlsruhe
PEG 1500	Roche, Mannheim
Saponin	Sigma-Aldrich, Seelze
SDS	Sigma-Aldrich, Seelze
Sulfo-NHS	Pierce, Rockford, IL, USA
TEMED	Bio-Rad, München
TMB	Seramun, Heidesee
Tropix CDP-Star	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt

2.1.4 Matrices

Für die Validierung des pTD Systems wurden die in *Tab. 11* aufgeführten Matrices verwendet. Die beiden festen Matrices wurden vom RKI an alle Partner versandt, sodass keine Schwankungen auftraten. Bei Milch und Mineralwasser wurden handelsübliche Marken verwendet. Die Luftkeimsammlung wurde von Bertin Technologies mit einem Coriolis Luftkeimsammler in der Nähe von Paris im August 2013 durchgeführt und je ein Aliquot wurde jedem Projektpartner zur Verfügung gestellt.

Tab. 11: Matrices

<i>Matrix</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
Hausstaub		Robert Koch-Institut
Luftkeimsammlerprobe	Gesammelt im Pariser Umland, Lösungsmittel PBS-T	Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, FR
Milch	1,5 % Fett, ultrahoherhitzt	Milsani, Leppersdorf
Standardboden	2.1, gedämpft	Lufa, Speyer
Mineralwasser	Evian	Danone-Eaux, Frankfurt a. M.

2.1.5 Toxine

Alle in Tab. 12 genannten Toxine und Toxinfragmente wurden unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen (siehe 2.2.2) gehandhabt.

Tab. 12: Toxine

<i>Toxin</i>	<i>Hersteller</i>
Abrin-a	Robert Koch-Institut
<i>Abrus</i> Agglutinin	Robert Koch-Institut
Abrin Rohextrakt	Robert Koch-Institut
BoNT/A1	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/A1 Komplex	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/B1	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/B1 Komplex	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/C	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/C Komplex	Metabiologics, Madison, WI, USA
scBoNT/CD	Dr. A. Rummel, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)
scBoNT/D	Dr. A. Rummel, MHH
BoNT/DC	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/DC Komplex	Metabiologics, Madison, WI, USA
scBoNT/E1	Dr. A. Rummel, MHH
BoNT/E3	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/E3 Komplex	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/F1	Metabiologics, Madison, WI, USA
BoNT/F1 Komplex	Metabiologics, Madison, WI, USA
Rizin	Robert Koch-Institut
<i>Ricinus</i> Agglutinin	Robert Koch-Institut
Staphylokokken Enterotoxin A (rec./gereinigt)	Toxin Technology, Sarasota, FL, USA
Staphylokokken Enterotoxin B	Sigma-Aldrich, Seelze
Weitere Staphylokokken Enterotoxine	Toxin Technology, Sarasota, FL, USA
Toxindomänen, rekombinant exprimiert	Dr. A. Rummel, MHH
Überstände von <i>C. botulinum</i> und verwandten <i>Clostridien</i>	Robert Koch-Institut

Der Kooperationspartner Dr. A. Rummel (Institut für Toxikologie, MHH) stellte diverse rekombinante Toxine zur Verfügung: Rekombinante BoNT/C Proteine basierten auf der Sequenz des *Clostridium botulinum* Stammes Stockholm, rekombinante BoNT/D Proteine auf der des Stammes BVD/-3 (identisch zu 1873). Nicht-toxisches H_C/C bestand aus den Aminosäuren 867-1291, fusioniert mit einem C-terminalen Strep-Tag. Für das nicht-toxische H_C/D wurden die Aminosäuren 863-1276 verwendet, ebenfalls mit Strep-Tag. Die *single chain* Varianten, scBoNT/C, scBoNT/CD (basierend auf Stamm 003-9) und scBoNT/D waren katalytisch aktiv. ScBoNT/C_i und scBoNT/D_i wurden zudem als inaktive Varianten zur Verfügung gestellt, hierzu wurden drei Aminosäuren (E230A/R372A/Y375F) im katalytischen Zentrum mutiert.

2.1.6 Enzyme und Antikörper

Kommerziell erworbene Sekundärantikörper und Proteine finden sich in *Tab. 13*. Die Antikörper aus *Tab. 14* wurden mit einer Ausnahme am Robert Koch-Institut generiert.

Tab. 13: Kommerzielle Antikörper und Enzyme

<i>Protein</i>	<i>Hersteller</i>
Avidix-Alkalische Phosphatase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Maus Immunglobulin	Dianova, Hamburg
Pferd anti-BoNT/A, /B und /E (Behring-Serum)	Novartis, Marburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Biotin	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG-Biotin	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG-Cy5	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (H+L)-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (Fcγ spezifisch)-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (Fcγ spezifisch)-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg
Poly-HRP	Diavita, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase	Dianova, Hamburg

Tab. 14: Primärantikörper

<i>Name</i>	<i>Spezifität¹</i>	<i>Art, Spezies</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Ursprung/Referenz</i>
A120	BoNT/A, H _N	mAk, Maus	IgG1	RKI, L. Niederstadt [264]
A185	BoNT/A, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
A778	BoNT/A, H _C	mAk, Maus	IgG2a	RKI, diese Arbeit
A1103	BoNT/A, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
A1121	BoNT/A, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
A1688	BoNT/A, H _N	mAk, Maus	IgG1	RKI, D. Pauly [166]
A2807	BoNT/A, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
C9	BoNT/C, H _C	mAk, Maus	IgG2b	RKI, M. Skiba
C394	BoNT/C, LC	mAk, Maus	IgG2b	RKI, J. Wolf [265]
C1916	BoNT/C, LC	mAk, Maus	IgG1	RKI, J. Wolf [265]
C1352	BoNT/C und /D, H _C	mAk, Maus	IgG2b	RKI, F. Finkenwirth [266]
C2574	BoNT/C und /D, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, F. Finkenwirth [266]
HcC10S	BoNT/C und /DC, H _C	mAk, Maus	IgG1	CEA, L. Bellanger
HcC141	BoNT/C, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
HcC515	BoNT/C, H _C	mAk, Maus	IgG2b	RKI, diese Arbeit
HcC1304	BoNT/C, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
HcC2378	BoNT/C und /DC, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
HCD115	BoNT/C und /D	pAk, Hühnchen	IgG	RKI, J. Wolf [265]
D63	BoNT/D, LC	mAk, Maus	IgG2b	RKI, J. Wolf [265]
D967	BoNT/D, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, F. Finkenwirth [266]
E136	BoNT/E, H _N	mAk, Maus	IgG2a	RKI, T. Schreiber [160]
E163	BoNT/E, LC	mAk, Maus	IgG1	RKI, T. Schreiber
E173	BoNT/E, H _N	mAk, Maus	IgG2a	RKI, T. Schreiber
E1346	BoNT/E, H _C	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
E1447	BoNT/E, H _C	mAk, Maus	IgG2b	RKI, diese Arbeit
E3128	BoNT/E, H _C	mAk, Maus	IgG2b	RKI, diese Arbeit
E3194	BoNT/E, H _C	mAk, Maus	IgG2b	RKI, diese Arbeit
E3226	BoNT/E, H _C	mAk, Maus	IgG2b	RKI, diese Arbeit
KE97	BoNT/E	pAk, Kaninchen	IgG	RKI, T. Schreiber [160]
SEA165	SEA	mAk, Maus	IgG1	RKI, U. Fiebig
SEA388	SEA	mAk, Maus	IgG1	RKI, U. Fiebig
SEA2353	SEA	mAk, Maus	IgG1	RKI, U. Fiebig
AP10	Abrin+Aggl., Rizin	mAk, Maus	IgG2a	RKI, diese Arbeit
AP54	Abrin-b ²	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit

<i>Name</i>	<i>Spezifität¹</i>	<i>Art, Spezies</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Ursprung/Referenz</i>
AP60	Abrin-a	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
AP69	Abrin-b ²	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
AP267	<i>Abrus</i> Agglutinin	mAk, Maus	IgG2a	RKI, S. Worbs
AP406	Abrin-a	mAk, Maus	IgG1	RKI, S. Worbs
AP430	Abrin-a	mAk, Maus	IgG2a	RKI, S. Worbs
AP476	<i>Abrus</i> Agglutinin	mAk, Maus	IgG2a	RKI, S. Worbs
AP2573	<i>Abrus</i> Agglutinin	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
AP3202	Abrin-a	mAk, Maus	IgG1	RKI, diese Arbeit
AP3659	Abrin-b ²	mAk, Maus	IgG2a	RKI, diese Arbeit
AP3808	Abrin-b ²	mAk, Maus	IgG2a	RKI, diese Arbeit
KAP142	Abrin	pAk, Kaninchen	IgG	RKI, S. Worbs

¹ LC Leichte Kette, H_N N-terminaler Teil der schweren Kette, H_C C-terminaler Teil der schweren Kette,

² nicht eindeutig experimentell bestätigt

2.1.7 Puffer

Für die vorliegende Arbeit benötigte Puffer werden in *Tab. 15* angegeben.

Tab. 15: Puffer

<i>Bezeichnung</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Verwendung</i>
ACK-Puffer	7,3	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA	Erythrozytenlyse
Blockpuffer	7,2	2 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T	Western Blot, ELISA
Caseinpuffer	7,3	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	ELISA
Detektionspuffer	10,0	0,1 M Diethanolamin 0,01 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Western Blot
Elektrophoresepuffer	8,3	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS	SDS-Page
Endopep-Puffer	7,4	20 mM HEPES, 0,2 M ZnCl ₂ , 10 mM Dithiothreitol, 1 mg/ml BSA, je 50 pmol/μl BoNT/C und BoNT/D Peptid Substrat	Endopep-MS Assay
FACS-PBS	7,2	PBS mit 2,5 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) NaN ₃	Durchflusszytometrie

<i>Bezeichnung</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Verwendung</i>
Färbelösung	2,0	0,008 % (w/v) Coomassie G-250 36 mM Salzsäure	Coomassiefärbung
HBS-EP+	7,4	10 mM HEPES 150 mM NaCl 3 mM EDTA 0,05 % (v/v) Tween 20	Oberflächen- plasmonresonanz
Lämmli-Probenpuffer (3 x)	6,8	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % (v/v) Glycerol 2 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau Evtl. 0,1 M DTT	SDS-Page
PBS	7,2	137 mM NaCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄	Standardpuffer
PBS/BSA	6,0 7,2	PBS mit 0,1 % (w/v) BSA PBS mit 0,1 % (w/v) BSA	pTD Messungen ELISA
PBS-TBN	7,4	PBS mit 0,1 % (w/v) BSA 0,02 % (v/v) Tween 20 0,05 % (w/v) NaN ₃	Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie
PBS-T	7,2	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20	Waschpuffer
Saponinpuffer	7,2	0,5 % (w/v) Saponin in PBS	Durchflusszytometrie
Transferpuffer	9,2	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol 0,037 % (w/v) SDS	Western Blot

2.1.8 Zelllinie und Medien

Neben aus Mäusen gewonnenen Primärzellen wurden in dieser Arbeit die Myelomzellen P3x63Ag8.653 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) verwendet. Für die Kultivierung dieser Zelllinie sowie der generierten Hybridomazelllinien wurden die Medienzusätze und die Medien wie in *Tab. 16* und *Tab. 17* beschrieben angesetzt. FKS wurde zuvor 60 min im Wasserbad bei 56 °C inaktiviert. FKS zur Antikörperproduktion (GPG-FKS) wurde zuvor von bovinen Antikörpern mittels ÄKTA Chromatographie und einer Protein G Säule gereinigt.

Tab. 16: Medienzusätze

<i>Bezeichnung</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Hersteller</i>
AH	50 × Azaserin/Hypoxanthin (Endkonzentration 5.7 µM Azaserin, 100 µM Hypoxanthin)	Sigma-Aldrich, Seelze
FKS	Fötale Kälberserum	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
IL-6	Rekombinant, Novitec, 200 000 U/ml	Hiss Diagnostics, Freiburg i. Br.
β-Mercaptoethanol	50 mM in PBS	Serva, Heidelberg
100 x Pen/Strep	10 000 U/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin	Biochrom, Berlin
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute Medium	Biochrom, Berlin

Tab. 17: Medien für die Zellkultur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Erläuterung</i>	<i>Verwendung</i>
R10F ⁻	RPMI1640, 10 % (v/v) FKS, 50 µM β- Mercaptoethanol	Anzucht von Myelom- Zelllinie, Isolation Thymozyten
R10F ⁺	Wie R10F ⁻ mit 1 % (v/v) Pen/Strep	Kultivierung Hybridomazellen
R10F ⁺ GPG	RPMI1640, 10 % (v/v) GPG-FKS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 % (v/v) Pen/Strep	Herstellung Antikörper
R20F ⁻ AH	RPMI1640, 20 % (v/v) FKS, 50 µM β- Mercaptoethanol, 50 U/ml IL-6, 1 x AH	Selektionsmedium für Hybridomazellen
R20F ⁺	RPMI1640, 20 % (v/v) FKS, 50 U/ml IL-6, 1 % (v/v) Pen/Strep, 50 µM β- Mercaptoethanol	Anfängliche Kultivierung Hybridomazellen
Einfriermedium	80 % FKS, 20 % DMSO	Einfrieren von Zellen

2.1.9 Tiere

Für die Generierung monoklonaler Antikörper (mAk) im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs bis zwölf Wochen alte BALB/c- oder NMRI-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden pathogenfrei nach dem deutschen Tierschutzgesetz von 2006 gehalten und *ad libitum* ernährt. Die Immunisierungsversuche wurden unter dem Aktenzeichen H0109/03 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin registriert. Für die Untersuchung des Titerverlaufs wurden den Tieren aus der Schwanzvene mit Hilfe einer Kanüle wenige μl Blut entnommen. Nach vollendeter Gerinnung (60 min, Raumtemperatur (RT)) wurde der Blutkuchen abzentrifugiert (zweimal $2000 \times g$, 5 min, RT) und der Überstand für den Titer test mittels indirektem ELISA (siehe 2.2.5.2) verwendet.

Immunisierungen wurden mit einem Mindestabstand von drei Wochen intraperitoneal durchgeführt (siehe 9.1).

Der Maus Bioassay (2.2.2.3) wurde unter dem Aktenzeichen A0073/08 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin registriert.

2.1.10 Peptide

Die Peptide (HPLC-gereinigt, Reinheit > 95 %) aus *Tab. 18* wurden für die Endopep-MS-Untersuchungen eingesetzt [267, 268] und von peptides & elephants (Potsdam) oder Dr. Petra Henklein (Institut für Biochemie, Charité Universitätsmedizin, Berlin) hergestellt. Angegeben ist das Masse-zu-Ladung-Verhältnis m/z .

Tab. 18: Peptide

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>m/z</i>
BoNT/C-Substrat	Biotin-KGSNRTRIDEANQRATRMLGGK-biotin	2911
C-NT	Biotin-KGSNRTRIDEANQR	1871
C-CT	ATRMLGGK-biotin	1059
BoNT/D-Substrat	LQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQKLSELDDRADAL	4496
D-NT	LQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQK	3297
D-CT	LSELDDRADAL	1217

2.1.11 Kommerzielle Kits

Die Kits aus *Tab. 19* wurden nach Angabe des Herstellers verwendet.

Tab. 19: Kits

<i>Kit</i>	<i>Verwendungszweck</i>	<i>Hersteller</i>
DNeasy Blood and Tissue Kit	DNA-Extraktion	Qiagen, Hilden
Isotyping Kit	Isotypisierung mAk	Roche, Mannheim
Mouse-Capture Kit	Oberflächenplasmonresonanz	GE Healthcare, München
VenorGenM Kit	Mykoplasmentest	Minerva Biolabs, Berlin

2.1.12 Software

Die in *Tab. 20* erwähnte Software wurde für die Erstellung dieser Arbeit verwendet.

Tab. 20: Software

<i>Programm</i>	<i>Verwendungszweck</i>	<i>Hersteller</i>
Adobe Creative Suite 4.0	Illustration/Bildbearbeitung	Adobe Inc., San José, CA, USA
Biacore X100 Control Software 1.0	Steuerung Biacore X100	GE Healthcare, München
Biacore X100 Evaluation Software 1.1	Datenanalyse Bindungskinetik	GE Healthcare, München
Bio-Plex Manager 6.1	Steuerung Bio-Plex 200	Bio-Rad, München
CellQuest Pro 5.1	Kontrollsoftware FACS	BD, Heidelberg
Endnote 7.3	Literaturverwaltung	Thomson Reuter, New York, NY, USA
ePaTOX 1.31	Steuerung pTD/ePaTOX II	Analytik Jena, Jena
flexAnalysis 3.4	Auswertung MS-Spektren	Bruker Daltonics, Bremen
FlowJo 8.7	Analyse FACS-Daten	Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
Mikrowin 2010	ELISA-Daten Erfassung	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath
Office 2010	Textverarbeitung/Datenanalyse	Microsoft Inc., Redmond, WA, USA
Prism 5.04	Datenanalyse/Darstellung	GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA
pTD Control 1.30	Steuerung pTD/ePaTOX II	Bruker Daltonik, Leipzig
UNICORN Control	ÄKTAexplorer Steuerung	GE Healthcare, München

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur-Techniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Materialien und Lösungen verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (HeraCell 240, Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Humidität. Die benutzten FKS-Chargen wurden zuvor auf Unterstützung des Hybridoma-Wachstums getestet.

Trypanblau-Test

Zur Bestimmung der Lebendzellkonzentration wurde ein Trypanblau-Test durchgeführt [269]. Dabei wurden die Zellen gut resuspendiert und ca. 50 µl steril entnommen. Ein Volumenanteil der Zellsuspension wurde mit ein bis neunzehn Volumenanteilen Trypanblau-Lösung (1 % (w/v) in PBS) verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Unter dem Mikroskop (DMIL 090-135.001, Leica, Wetzlar) wurden lebende Zellen mit guter Vitalität (ungefärbt und rund) gezählt. Trypanblau zeigt die Integrität der Zellmembran an, tote Zellen färben sich blau.

Türks-Test

Zur Bestimmung der Konzentration der Splenozyten wurde Türks-Lösung verwendet. Erythrozyten wurden durch die in der Türks-Lösung enthaltene Essigsäure hämolysiert. Die verbliebenen Splenozyten wurden wie bei der Trypanblau-Färbung in einer 1:10 Verdünnung gezählt.

2.2.1.2 Kryokonservierung der Hybridomazellen

Vitale Hybridomazellen wurden für eine Langzeitlagerung eingefroren. Dazu wurden 10 ml Zellsuspension aus einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche durch Zentrifugation geerntet (350 × g, 6 min, RT). Das Zellpellet wurde in 900 µl kaltem Kulturmedium aufgenommen, in ein Cryoröhrchen (Nunc, Roskilde, DK) überführt und für 30 min bei 4 °C aufbewahrt. Zur Konservierung wurde 900 µl Einfriermedium zugegeben, kurz resuspendiert und sofort bei -80 °C in einer Styroporkiste eingefroren. Nach zwei bis vier Wochen wurden die Klone in den N₂-Tank transferiert.

Um die Vitalität beim Auftauen zu gewährleisten, wurden die eingefrorenen Zellen zügig bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und in 9 ml Kulturmedium überführt. Nach dem Waschen der Zellen mit 10 ml Kulturmedium (Zentrifugation wie oben) wurden die Zellen wie gewohnt kultiviert.

2.2.1.3 Mykoplasmentestung der Hybridomazellen

Um die Zellen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen zu untersuchen, wurde das Pellet ($350 \times g$, 6 min, RT) einer 1 ml Suspensionskultur der Hybridomazellen verwendet. Dieses wurde in 200 μ l PBS resuspendiert und mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet. Die PCR wurde nach Anleitung des VenorGeM Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs, Berlin) durchgeführt.

2.2.2 Umgang mit Toxinen

2.2.2.1 Sicherheitsaspekte im Umgang mit Toxinen

Alle Toxinarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe mit HEPA-2 Filter, Heraeus, Hanau) nach entsprechender Einweisung in einem Toxin-Sicherheitslabor durchgeführt. Zusätzlich wurden zwei Paar Handschuhe (Neopren und Latex) und ein gummierter Rückenschlusskittel getragen. Zudem fand ein Laborschuh-Wechsel statt. Feststoffabfälle wurden bei 134 °C für 60 min autoklaviert und gesondert entsorgt. Toxinhaltige Flüssigkeiten wurden durch Zugabe von NaOH (Endkonzentration 5 %) über Nacht inaktiviert.

2.2.2.2 Herstellung toxinhaltiger Kulturüberstände

Zur Herstellung von Kulturüberständen wurden die Bakterien in Trypton-Pepton-Glucose-Hefeextrakt (TPGY)-Medium für ein bis sieben Tage bei 30 °C kultiviert. Es wurden folgende anaerobe Bakterien benutzt: *C. botulinum* (Gruppe I, II, III und IV), *C. baratii*, *C. berijerinckii*, *C. botulinum* Gruppe II atoxisch, *C. butyricum*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. glycolicum*, *C. hiranonis*, *C. innocuum*, *C. novyi*, *C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. sartagoforme*, *C. scindens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. subterminale*, *C. tertium* und *C. tetani*. Um anaerobe Bedingungen für die Kultur zu erhalten, wurde eine Anaerobier-Werkbank (MACS 500, Don Whitley Scientific, West Yorkshire, United Kingdom, Einsatz von Mischgas: 6 % H₂, 10 % CO₂, 84 % N₂) verwendet. Überstände wurden durch Zentrifugation ($12000 \times g$, 5 min, 4 °C) und zwei Filtrationen (0,45 μ m und 0,2 μ m Spritzenvorsatzfilter) von vegetativen Zellen abgetrennt.

2.2.2.3 Maus Bioassay

Kulturüberstände von isolierten *C. botulinum*-Stämmen oder primären Anreicherungskulturen wurden in PBS mit 0,1 % BSA pH 7,2 verdünnt und intraperitoneal in weibliche BALB/c-Mäuse gespritzt (Tierversuchsaktenzeichen A0073/08 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin). Bei den Tieren wurde bis zu vier Tagen überwacht, ob typische Botulismus-Symptome wie Wespentaille, Atemprobleme oder einsetzende Lähmung auftraten. In diesem Fall wurden die Mäuse sofort aus ethischen Gründen euthanisiert.

2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

2.2.3.1 Toxoid-Herstellung

Eine native Applikation der Botulinum Neurotoxine und Abrins in Mengen, die für eine Immunisierung nötig sind (1-50 µg Protein), würde zum Tod der Tiere führen [34]. Aus diesem Grund wurden zum einen rekombinante Toxine verwendet, die aus einer inaktiven Form bzw. aus einzelnen Domänen bestanden, zum anderen wurde Abrin durch Formaldehyd-Behandlung inaktiviert (Endkonzentration 0,3 % (v/v) Formaldehyd, 14 Tage, 37 °C).

2.2.3.2 Immunisierung

Für die Immunisierung wurden weibliche BALB/c- oder NMRI-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit einem Mindestalter von 6 Wochen verwendet. Das Antigen (siehe Immunisierungsschema, Kapitel 9.1) wurde in sterilen PBS verdünnt und mit gleichen Teilen Freund's Adjuvans (für die erste Immunisierung komplettes Freund's Adjuvans, für Folgeimmunisierungen inkomplettes, Sigma-Aldrich, Seelze) vermischt. Nach 10 min Schütteln auf dem Vortexer wurde die Lösung 2 min bei 4 °C im Ultraschallbad beschallt (Tastgrad 50 %, Ausgabekontrolle 5; Sonifier 450, Branson, Danbury, CT, USA). Die nun zähflüssige Suspension wurde intraperitoneal injiziert, pro Tier wurden 100-200 µl appliziert. Die Immunisierungen erfolgten mit einem Mindestabstand von 3 Wochen.

2.2.3.3 Vorbereitung der Primärzellen

Sobald bei immunisierten Mäusen ein konstanter Titer gemessen wurde, wurden diese für eine Fusion vorbereitet. Dazu erfolgte an zwei bis drei Tagen vor der Fusion jeweils täglich eine intraperitoneale Injektion des Antigens in PBS ohne Zugabe von Freund's Adjuvans. Am Tag der Fusion wurden die immunisierte Maus (bzw. mehrere) sowie drei bis neun nicht immunisierte, 6-12 Wochen alte BALB/c-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) durch zervikale Dislokation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurden die Thymi der nicht immunisierten Mäuse sowie die Milz der immunisierten Maus entnommen. Die Gewebe wurden getrennt auf feinporigen Maschendraht (212 µm, VWR, Darmstadt) zerrieben und in PBS mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Biochrom, Berlin) resuspendiert. Die Zellen wurden einmal mit 1 % Pen/Strep in PBS gewaschen (380 × g, 6 min, RT). Die Thymuszellen wurden mit dem Trypanblau-Test (siehe 2.2.1.1) gezählt und bis zur Verwendung in R10F⁻ Medium bei 37 °C aufbewahrt. Die Milzzellen wurden mit Hilfe eines Zellsiebs (70 µm, BD, Heidelberg) filtriert und erneut gewaschen. Zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten wurde ACK-Lyse-Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,3) für 4 min zugegeben. Danach wurde mit 36 ml 1 % Pen/Strep in PBS abgestoppt, filtriert wie oben und zentrifugiert (380 × g, 6 min, RT). Die Splenozyten wurden in RPMI1640-Medium mit β-Mercaptoethanol bei 37 °C

aufbewahrt. Die Bestimmung der Zellkonzentration der Milzzelllösung erfolgte mittels Türks-Tests (siehe 2.2.1.1).

2.2.3.4 Vorbereitung der Myelomzellen

Zeitgleich zu 2.2.3.3 wurden P3x63Ag8.653 Myelomzellen dreimal mit RPMI1640-Medium mit β -Mercaptoethanol gewaschen ($380 \times g$, 8 min, RT), in 30 ml Medium resuspendiert und mittels Trypanblau-Test (2.2.1.1) gezählt.

2.2.3.5 Fusion

Die Fusion wurde nach der von Köhler und Milstein entwickelten Hybridoma-Technologie durchgeführt [270]. Splenozyten und Myelomzellen wurden im Verhältnis 2:1 vermengt und sedimentiert ($380 \times g$, 6 min, RT). Durch langsame Zugabe von PEG 1500 (1 ml pro 100×10^6 Milzzellen, Roche, Mannheim) erfolgte die Fusion. Die Zellen wurden in RPMI1640 Medium mit β -Mercaptoethanol resuspendiert und gewaschen ($380 \times g$, 6 min, RT). Die nun entstandenen Hybridomazellen wurden im Selektionsmedium aufgenommen und mit den Thymozyten als Fütterungszellen (gleiche Menge wie Milzzellen) vermengt. Das Ausplattieren erfolgte mit einer eingestellten Konzentration von 1×10^5 Hybridomazellen/ml in sterilen Mikrotiter-Zellkulturplatten (96 Kavitäten, 200 μ l/Kavität, Nunc, Roskilde, DK).

An Tag 7 und 8 nach Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde das gesamte Medium durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Durch den Austausch des Mediums wurden vorhandene Antikörper entfernt, die von nicht fusionierten B-Zellen sezerniert wurden. Zu diesem Zeitpunkt konnten bereits erste Klone erkannt werden. Ab Tag 10 nach der Fusion wurden die Überstände der Hybridomazellen mittels indirektem (2.2.5.2) und Sandwich ELISA (2.2.5.3) sowie mittels Oberflächenplasmonresonanz (2.2.5.6) und, falls nötig, im Multiplex-Screening (2.2.5.4) auf Reaktivität gegenüber dem gesuchten Antigen getestet.

2.2.3.6 Subklonierung

Hybridomaklone, welche Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften produzierten, wurden durch limitierende Verdünnung subkloniert, um die Klonalität sicherzustellen. Dazu wurden die Zellen resuspendiert und die Zellkonzentration mit Trypanblau-Test (2.2.1.1) bestimmt. Mittels einer 1:3 Verdünnungsreihe wurden Mikrotiterplatten mit einer Konzentration von 30 bis 0,3 Zellen/100 μ l in R20F⁺ belegt. An Tag 7 wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet, Einzelklone wurden markiert und die Zellen mit 150 μ l frischem R20F⁺ gefüttert. An Tag 9 oder 10 nach der Aussaat wurden die Überstände der Einzelklone im ELISA kontrolliert. Die jeweils drei besten Subklone wurden expandiert und eingefroren (siehe 2.2.1.2), der beste Klon wurde einer weiteren Subklonierung unterzogen. Nach zwei Subklonierungen wurde die Klonalität und stabile Antikörperproduktion mittels Fluoreszenz-Färbung intrazellulärer Antikörper und Durchflusszytometrie (2.2.3.7) überprüft.

2.2.3.7 Durchflusszytometrie

Um Hybridomazellen zu untersuchen, ob sie eine einheitliche klonale Population darstellen, wurde eine intrazelluläre Färbung der Antikörper durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden je 200 µl resuspendierte, vitale Hybridomazellen aus einer Zellkulturflasche in eine Rundboden-Mikrotiterplatte überführt und pelletiert ($400 \times g$, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und mit 100 µl 4 % (v/v) Formaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Die Hybridomazellen wurden danach zweimal mit 200 µl PBS und einmal mit Saponinpuffer (0,5 % (w/v) Saponin in PBS) gewaschen. Durch diese Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die intrazellulären Antikörper anschließend mit anti-Maus-IgG-Cy5 gefärbt (6 µg/ml in Saponinpuffer verdünnt). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Zellklon ohne Cy5-markierten Antikörper mitgeführt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl/Kavität Saponinpuffer gewaschen und in FACS-PBS resuspendiert.

Die Hybridomazellen wurden mit dem LSRII Gerät und der Cell Quest Pro Software (BD, Heidelberg) analysiert. Dabei wurden anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung fixierte Zellen ausgewählt. Mit Hilfe der Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) wurden die Populationen aufgrund ihrer Größe, Granularität und ihres Fluoreszenzsignals unterschieden.

2.2.3.8 Antikörperherstellung

Die zweifach subklonierten Hybridomaklone, die stabil vielversprechende Antikörper in den ersten Experimenten produzierten, wurden schrittweise vom Mediumzusatz IL-6 entwöhnt. Der FKS-Gehalt des Mediums wurde auf 10 % gesenkt. Die Zellen wurden daraufhin in einem Medium mit G-Protein affinitätsgereinigtem FKS (R10F⁺ GPG) expandiert, um eine Kontamination mit bovinen Antikörpern auszuschließen. Nachdem ein Volumen von 0,5 bis 2 l erreicht wurde und bis zu 90 % der Zellen starben, wurde der Überstand durch zweimalige Zentrifugation geerntet ($2000 \times g$, 10 min, 10 °C gefolgt von $8000 \times g$, 10 min, 10 °C). Der Überstand wurde neutralisiert mit 2 M Tris pH 8,8, steril filtriert (0,22 µm Flaschenaufsatzfilter, Millipore, Billerica, MA, USA) und bis zur Reinigung (2.2.3.9) bei 4 °C gelagert.

2.2.3.9 Antikörperreinigung

Die Reinigung der Antikörper erfolgte mit Hilfe einer ÄKTAexplorer100 Anlage und einer HiTrap MabSelect SuRe-Säule (GE Healthcare, München). Die Säule wurde mit Laufpuffer (20 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl; pH 7,2) äquilibriert, mit dem Hybridoma-Überstand beladen und bis zur vollständigen Entfernung nicht gebundener Proteine mit Laufpuffer gespült. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Natriumcitrat pH 3,6. Die Antikörperlösung wurde sofort durch 3,6 M Tris/HCl pH 9,0 neutralisiert, um eine Konformationsänderung und dazugehörigen Funktionsverlust zu verhindern. Die Säule wurde mit 0,25 M Natronlauge gespült, um etwaige

Verunreinigungen zu entfernen, und mit Laufpuffer neutralisiert. Zur längeren Aufbewahrung wurde die Säule in 20 % Ethanol gelagert.

Die vereinigten antikörperhaltigen Fraktionen wurden in einen vorbereiteten Dialyseschlauch (8-10 kDa Ausschlussgröße, Spectrum Labs, Frankfurt a. M.) gefüllt. Die Dialyse erfolgte dreimal mindestens 3 h gegen jeweils 1 l PBS. Falls die Antikörperkonzentration nach der Dialyse kleiner als 1 mg/ml war, wurden die Antikörper durch Zentrifugation ($4000 \times g$, 20 min, RT) mittels eines Amicon Ultra Zentrifugenröhrchen (10 kDa MWCO) in einer Ausschwingzentrifuge eingengt. Die Antikörperlösung wurde abschließend sterilfiltriert (0,22 μm Spritzenvorsatzfilter mit PVDF-Membran, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Verbrauchsmengen wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.3.10 Isotypbestimmung

Die Bestimmung des Isotyps der neu hergestellten monoklonalen Antikörper erfolgte mit Hilfe des Isotyping Kits (Roche, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers.

2.2.3.11 Kopplung von Biotin an Antikörper

Für die Kopplung wurden 500 μl Antikörperlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS präpariert. Diese wurde mit 50 μl frischer 1 M NaHCO_3 und mit 5 μl Biotin-NHS (13,4 mM in DMSO, Sigma-Aldrich, Seelze) versetzt, um ein Kopplungsverhältnis von 20 Biotinmolekülen pro Antikörper zu erhalten. Nach einstündiger Rotation wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl 10 % (w/v) NaN_3 abgestoppt. Ungebundene Biotin-Haptene wurden durch Gelfiltration mit PD10-Säulen (GE Healthcare, München) abgetrennt. Dazu wurden die Säulen mit Laufpuffer (PBS mit 0,05 % NaN_3) äquilibriert, mit dem Reaktionsansatz beladen und erneut mit Laufpuffer gewaschen. Das Eluat wurde zu 250 μl fraktioniert und am IMPLIN Photometer (siehe 2.2.4.1) vermessen. Der Proteingehalt wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt, relevante Fraktionen (mehr als 0,1 mg/ml Protein) wurden vereinigt, erneut vermessen und für die Lagerung mit BSA (Endkonzentration 0,2 % (w/v)) versetzt. Biotinylierte Antikörper wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, Verbrauchsmengen wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Antikörperkonzentrationsbestimmung

Die Antikörperkonzentration in Lösung wurde am IMPLIN Photometer (NanoPhotometer P300, IMPLIN, München) vermessen. Dazu wurde das Gerät 30 min vorgewärmt und durch Messung einer Leerprobe (meist PBS) auf Null gesetzt. Als Programm wurde Antikörperkonzentrationsbestimmung IgG10 gewählt. Es wurden 4 μl der Antikörperlösung auf den Probenhalter pipettiert und eine Messung bei 280 nm, referenziert auf 320 nm, durchgeführt.

Anhand des voreingestellten Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 210\,000 \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes $A = c \times \varepsilon \times d$ die Konzentration berechnet.

2.2.4.2 SDS-PAGE

Die Größenauftrennung von Proteinen erfolgte mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS)[271]. Zu diesem Zweck wurden Gele mit verschiedenen Konzentrationen von Acrylamid/Bisacrylamid je nach Größe des zu untersuchenden Proteins bereitgestellt (*Tab. 21*). Dazu wurde zuerst eine ca. 5 cm hohe Trenngelschicht in die präparierten Glasplatten gegossen, mit Wasser vorsichtig überschichtet und 30 min gewartet. Nach der Inkubation wurde das Wasser abgenommen, die Sammelgelschicht gegossen und der Probenauftragskamm eingebaut. Die auspolymerisierten Gele wurden in eine PROTEAN 3 Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) nach Anleitung des Herstellers eingebaut und mit Elektrophorese-Laufpuffer bis zur Markierung befüllt. Zur Größenabschätzung der Proteine wurde PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Braunschweig) aufgetragen. Die Proben wurden mit entsprechenden Volumen reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem Lämmli-Probenpuffer versetzt (maximales Volumen pro Tasche: 15 μl), 5 min bei 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Präzipitate wurden durch Zentrifugation (12000 $\times g$, 1 min, RT) abgetrennt. Der Überstand wurde in die Geltaschen gefüllt und Strom angelegt. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine trennten sich anhand ihrer Größe auf. Solange sich die Proteine in der Sammelgelphase befanden, wurde eine Spannung von 40 V gewählt. Nach dem Übergang in die Trenngelschicht wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Sobald die Bromphenolblaubande, welche vor den Proteinen lief, das Gelende erreichte, wurde die Elektrophorese beendet, das Gel entnommen und für Färbeverfahren (2.2.4.3) oder für einen Western Blot (2.2.5.1) weiterverwendet.

Tab. 21: SDS-PAGE

<i>Schicht</i>	<i>Konzentration/ Verwendung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Trenngellösung	7,5 %/ Antikörper BoNT (nicht reduzierend)	2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) 4,9 ml bidestilliertes Wasser 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,1 ml 10 % (w/v) SDS 0,060 ml 10 % (w/v) APS 0,007 ml TEMED
	10 %/ BoNT Abrin	3,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) 4,1 ml bidestilliertes Wasser Andere Reagenzien wie oben
	12,5 %/ Antikörper SEA	4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) 3,4 ml bidestilliertes Wasser Andere Reagenzien wie oben
Sammelgellösung	alle	0,65 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 3,05 ml bidestilliertes Wasser 0,05 ml 10 % (w/v) SDS 0,025 ml 10 % (w/v) APS 0,006 ml TEMED

2.2.4.3 Färbetechniken für SDS-Gele

Coomassie-Färbung

Für diese Färbung wurde das Gel im Anschluss an die Elektrophorese dreimal für 5 min mit Wasser gewaschen. Danach wurde das Gel zwei Stunden unter vorsichtigem Schütteln in Coomassie-Färbelösung eingelegt und durch anschließendes Waschen mit Wasser bis zur gewünschten Intensität entfärbt (Nachweisgrenze ca. 15-100 ng pro Bande).

Silberfärbung

Diese sensitivere Färbemethode [272] erfolgte im Anschluss an die Coomassiefärbung. Alternativ wurde das Gel in 50 % Ethanol und 12 % Eisessig zweimal 30 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen (je 20 min) mit 50 % Ethanol wurde das Gel 1 min mit 0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ behandelt. Nach drei Waschschritten mit Wasser (je 20 sec) erfolgte die Inkubation mit der Silberlösung (0,2 % (w/v) AgNO_3 , 0,075 % (v/v) Formalin) für 20 min. Das Gel wurde erneut zweimal mit Wasser gewaschen und mit einer Lösung von 3 % (w/v) K_2CO_3 , 0,0004 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ und 0,05 % (v/v) Formalin entwickelt. Die Färbung wurde durch 1 % (w/v) Glycin gestoppt und das Gel in Wasser aufbewahrt. Die Dokumentation der Gele erfolgte am ChemiDoc MP System (Bio-Rad, München). Die Nachweisgrenze lag bei ca. 1 ng pro Bande [272].

2.2.5 Immunoassays

2.2.5.1 Western Blot

Der Western Blot erfolgte direkt im Anschluss an die SDS-PAGE. Das Gel wurde aus der Elektrophorese-Kammer entnommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel 10 min in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,037 % (w/v) SDS) geschwenkt. Weiterhin wurden sechs Whatmann-Papiere mit einer Größe von 8,5 x 6 cm und eine PVDF-Membran (PVDF-Membran Immobilon P, 0,45 µm, Millipore, Schwalbach) in Transferpuffer eingelegt. Die Membran wurde zuvor mit 100 % Methanol aktiviert und mit Wasser gewaschen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte im TransBlot Turbo V.102 (Bio-Rad, München) nach Anleitung des Herstellers. Es wurden 1,0 A und 25 V für 30 min angelegt. Nach dem Blotten wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockpulver (2 % Magermilchpulver in PBS-T) geblockt. Der Primärantikörper wurde für eine Stunde bei RT in einer Konzentration von 1-10 µg/ml in Blockpuffer zugegeben. Alternativ wurde 1:10 verdünnter Hybridoma-Überstand benutzt. Nach dreimaligem Waschen mit Blockpulver (je 10 min) erfolgte die Zugabe eines biotinylierten anti-Spezies Antikörpers (1:5000 in Blockpuffer verdünnt, 30 min, RT). Es wurde erneut gewaschen und zur Detektion Avidin-alkalische Phosphatase in einer 1:5000 Verdünnung für 30 min zugegeben. Nun wurde dreimal mit Blockpuffer und dreimal mit Detektionspuffer gewaschen (je 5 min). Der Nachweis erfolgte mit Tropix CDP-Star (1:50 in Detektionspuffer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die durch die Reaktion des Enzyms entstandene Emission von Licht wurde am ChemiDoc MP (Bio-Rad, München) dokumentiert.

2.2.5.2 Indirekter ELISA

Der indirekte ELISA wurde für die Analyse der Titerentwicklung in immunisierten Mäusen, für das Screening der Überstände der Hybridomazellen und zur Testung der Spezifität verwendet. Es wurden 500 ng/ml Toxin in 1 µg/ml (w/v) BSA in PBS verdünnt und je 50 µl/Kavität über Nacht bei 4 °C auf einer MaxiSorp Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde, DK) immobilisiert. Das Toxin wurde abgenommen, mit 5 % NaOH inaktiviert und die Platte wurde viermal mit PBS-T (200 µl/Kavität) mit dem HydroSpeed Plattenwascher (Tecan, Crailsheim) gewaschen. Nach dem Blocken unspezifischer Bindungen (Blockpuffer, 2 % Magermilchpulver in PBS-T, 200 µl/Kavität, 1 h, RT) wurden die Antikörper in einer Konzentration von 5-10 µg/ml bzw. unverdünnte Hybridoma-Überstände bzw. Mausserum (1:1000-1:100000 verdünnt) in Blockpuffer für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T erfolgte die Detektion mit einem anti-Spezies Antikörper, gekoppelt an eine Peroxidase (POD), in geeigneter Verdünnung in Blockpuffer (50 µl/Kavität, 30 min, RT). Die Platte wurde achtmal gewaschen. Als Substrat wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, SeramunBlue slow, Seramun, Heidensee, 100 µl/Kavität, 5-30 min, RT) verwendet, das Abstoppen der

enzymatischen Reaktion erfolgte mit 100 µl/Kavität 0,25 M Schwefelsäure. Alle ELISA Platten wurden mit dem Mikroplatten-Lesegerät Anthos LP400 (Diagnostics Pasteur, Chaska, MN, USA) bei 450 nm und 620 nm vermessen. Die Absorption ergab sich aus der Differenz beider Werte.

2.2.5.3 Sandwich ELISA

Sandwich ELISA wurden zur Bestimmung der Sensitivität des Toxinnachweises eingesetzt. Auf einer MaxiSorp Mikrotiterplatte wurden 5-10 µg/ml Fängerantikörper (50 µl/Kavität) in PBS über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungen mit 200 µl/Kavität Caseinpuffer (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; pH 7,3) oder 2 % Magermilchpulver in PBS-T für 1 h bei RT. Die Mikrotiterplatte wurde erneut gewaschen und mit Antigen in geeigneter Verdünnung in 0,1 % (w/v) BSA in PBS pH 7,2 (50 µl/Kavität, 2 h, RT) inkubiert. Toxine wurden abgenommen, mit 5 % NaOH inaktiviert und die Platte wurde viermal mit PBS-T gewaschen. Nun wurde der biotinylierte Detektionsantikörper in passender Verdünnung (meist 0,5-5 µg/ml in Caseinpuffer oder Blockpuffer, 50 µl/Kavität, 1 h, RT) zugegeben und viermal gewaschen. Mit Hilfe einer an Streptavidin gekoppelten Peroxidase und TMB wurde eine Farbreaktion (siehe 2.2.5.2) erzeugt, die nach dem Abstoppen mit dem ELISA Plattenleser ausgewertet wurde.

2.2.5.4 ELLA

Der ELLA (*enzyme-linked lectin assay*) wurde zur Charakterisierung der anti-Abrin Antikörper eingesetzt. Dazu wurde 4 µg/ml Asialofetuin (Sigma-Aldrich, Seelze) in Carbonat-Bicarbonatpuffer (0,05 M NaHCO₃, 0,05 M Na₂CO₃, pH 9,9) über Nacht auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die zu untersuchenden Antikörper wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml mit 500 ng/ml Abrin in 0,1 % BSA in PBS oder nur 0,1 % BSA in PBS auf einer Rundbodenplatte für 90 min vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Mikrotiterplatte viermal mit PBS-T gewaschen und unspezifische Bindungsstellen wurden durch PBS-T mit 3 % (w/v) BSA für eine Stunde blockiert. Die Mikrotiterplatte wurde erneut gewaschen und die Antikörper-Toxin bzw. -BSA-Mischung wurde überführt. Nach 90-minütiger Inkubation wurde die Mischung abgewaschen und ein Ziege-anti-Maus (bzw. anti-Kaninchen) Antikörper, gekoppelt an POD, für eine Stunde zugegeben. Der Nachweis erfolgt wie beim ELISA mit TMB und Schwefelsäure. Die Farbreaktion wurde bei 450 und 620 nm vermessen.

2.2.5.5 Screeningverfahren mittels Suspensionsarray

Für die Analyse von Hybridoma-Überständen, die aus einer Fusion mit einer Immunisierung mit mehr als einem Antigen stammen, wurde ein Multiplex-Screening durchgeführt. Dieses beruht

auf dem Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie (1.2.1). Die paramagnetischen Partikel (MagPlex Microspheres, Luminex, Austin, TX, USA) beinhalteten zwei Fluoreszenz-Farbstoffe, welche mit Hilfe eines Lasers bei 635 nm ausgelesen wurden (siehe 1.2.1). Das Screeningverfahren ähnelte einem indirekten ELISA. Toxine wurden an die carboxylierte Oberfläche der Partikel gekoppelt. Nach Zugabe der Hybridoma-Überstände banden die vorhandenen Antikörper an die entsprechenden Partikelarten. Diese Interaktion wurde mit einem Farbstoff, der an einen anti-Spezies Antikörper gebunden war, nachgewiesen. Die Signale des Farbstoffs wurden mit Hilfe des zweiten Lasers ausgelesen.

Kopplung von Toxinen an Luminex-Partikel

Die Kopplung von Toxinen an die farbkodierten Partikel erfolgte mittels EDC-NHS-Chemie nach Anweisung des Herstellers (Pierce, Rockford, IL, USA). Alle Arbeiten wurden lichtgeschützt durchgeführt. Die Menge des Toxins sowie die verwendeten Partikel werden Tab. 22 entnommen. Die Konzentration der Partikel wurde auf 1000 Partikel/ μ l PBS-TBN (PBS, 0,1 % BSA, 0,02 % Tween 20, 0,05 % NaN_3 , pH 7,4) eingestellt.

Tab. 22: Partikel für den Suspensionsarray

<i>Toxine</i>	<i>Menge pro 1,5 Mio Partikel</i>	<i>Region</i>
BoNT/A1	30 μ g	042
BoNT/B1	30 μ g	007
BoNT/E3	30 μ g	015
BoNT/F1	120 μ g	054
Rizin	30 μ g	048

Suspensionsarray

Der Suspensionsarray wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur in einer Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) durchgeführt. Pro Kavität wurden 0,5 μ l Partikel jeder Region, bis zu einem Endvolumen von 50 μ l mit PBS mit 1 % (w/v) BSA (pH 7,2) verdünnt, eingesetzt. Diese wurden zweimal mit Hilfe eines magnetischen Plattenwaschers (HydroSpeed, Tecan, Crailsheim) gewaschen. Es wurde unverdünnter Hybridoma-Überstand zugegeben und die Platte 30 sec bei 1100 rpm geschüttelt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 600 rpm. Nach erneutem Waschen wurde 60 μ l/Kavität anti-Maus Antikörper gekoppelt an R-Phycoerythrin (Dianova, Hamburg, 1:400 in PBS mit 1 % BSA verdünnt) für 1 h zugegeben. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Partikel in 50 μ l PBS mit 1 % BSA gut resuspendiert und mit dem Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, München) vermessen. Es wurde die Software Bio-Plex Manager 6.1 (Bio-Rad, München) mit folgenden Einstellungen benutzt:

calibration high, 100er Region, 50 μ l Probenvolumen, 10 Partikel/Region, Timeout 45 sec, Dubletten-Diskriminationseinstellung 8000-22000.

2.2.5.6 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Kinetische Bindungseigenschaften der Antikörper wurden mit Hilfe des Biacore X100 Oberflächenplasmonresonanz-Systems (GE Healthcare, München) bei 25 °C untersucht. Hierzu wurde ein CM5-Sensorchip mit anti-Maus Antikörpern nach Anleitung des Herstellers (Mouse-Capture-Kit, GE Healthcare, München) beschichtet. Als Puffer wurde für alle Versuche HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) verwendet. Monoklonale Antikörper (2-5 μ g/ml) wurden auf der Flusszelle 2 (Fc2) bei einer Flussrate von 5 μ l/min für 60 s immobilisiert, was zu 100 bis 300 Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) immobilisierten Antikörpern führte. Flusszelle 1 (Fc1) wurde als Negativkontrolle verwendet und von den Signalen von Fc2 abgezogen (Δ RU(Fc2-Fc1)). Inaktive Toxine oder Toxinfragmente wurden in einer 1:3 Verdünnungsreihe im nM-Bereich für 60 sec mit einer Flussrate von 30 μ l/min injiziert. Die Dissoziation der Antikörper-Antigen-Komplexe wurde durch die Injektion von HBS-EP+ gestartet und 600 oder 1 200 sec beobachtet. Die Regeneration beider Flusszellen erfolgte mit 10 mM Glycin-HCl Puffer pH 1,7 (GE Healthcare, 180 sec, Flussrate 10 μ l/min). Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurde der Messzyklus für jeden Antikörper mit der höchsten Konzentration begonnen und nach Analyse aller Konzentrationen mit erneuter Messung der höchsten Konzentration abgeschlossen. Zur Auswertung der Daten wurde im ersten Schritt die *resonance units* (RU) der Flusszelle 1 als Negativkontrolle von Flusszelle 2 subtrahiert. In einem zweiten Schritt wurde eine Referenzierung auf eine dreifache Injektion einer Pufferlösung durchgeführt [273]. Zur Bestimmung der Bindungsparameter wurden die doppelt referenzierten Bindungskurven unter Verwendung eines 1:1 Langmuir-Bindungsmodells ($A + B = AB$) mit lokalem Maximalwert R_{\max} mathematisch modelliert (Biacore X100 Evaluation Software).

Zur schnellen Abschätzung der kinetischen Parameter im Screening wurden Antikörper direkt aus Hybridoma-Überständen immobilisiert und zwei Antigen-Konzentrationen (1 und 10 μ g/ml) in einer sogenannten *single cycle* Kinetik eingesetzt und die Dissoziationsphase auf 120 sec verkürzt.

Um die Antikörper in Epitopfamilien einzuteilen, wurden veränderte Einstellungen benutzt [274]. Wie oben wurde zunächst der erste Antikörper auf einem CM5-Chip mit Hilfe des Mouse-Capture-Kits immobilisiert. Danach wurden die freien Bindungsplätze mit unspezifischen Maus-Immunglobulin (Dianova, Hamburg) gesättigt (beide Flusszellen, 100 μ g/ml für 60 s bei 5 μ l/min). Inaktive Toxine oder Toxinfragmente (10 μ g/ml) wurden für 60 sec in beide Flusszellen injiziert. Die Dissoziation wurde 60 sec bei 5 μ l/min gemessen. In einem Verstärkungsschritt wurde nun der zweite Antikörper injiziert (beide Flusszellen,

100 µg/ml für 60 s bei 5 µl/min). Bindet dieser mAk an einem anderen Epitop als der erste, wird ein Signalzuwachs gemessen. Kann der zweite Antikörper nicht binden, da der erste Antikörper das Epitop abdeckt, kommt es zu keiner Steigerung der RU.

2.2.6 Endopep-Massenspektrometrie

Für die Untersuchung von Toxinen mittels Endopep-Massenspektrometrie (MS) wurden im ersten Schritt die Toxine mit Antikörpern angereichert. Im zweiten Schritt wurde der eigentliche Test durchgeführt (vergleiche 1.1.2). Hierbei wurde die intrinsische Endopeptidase-Aktivität der BoNTs benutzt, welche ein Peptidsubstrat in zwei Teile schnitt. Diese Spaltprodukte wurden zuletzt mittels MS nachgewiesen.

2.2.6.1 Immunoanreicherung

Für die Immunoanreicherungen wurden Antikörper nach Anleitung des Herstellers an paramagnetische, tosylaktivierte M-280 Dynabeads (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) gekoppelt. Es wurden folgende mAks verwendet: C394, D63, HcC2378 oder D967. C394 und D63 wurden zur Unterscheidung der Aktivität der leichten Kette von BoNT/C und /D eingesetzt, die beiden anderen dienen zur Differenzierung von BoNT/C, /CD, /D und /DC mittels Endopep-MS Assay.

200 µl Bakterienkultur wurden mit 300 µl PBS-T und 20 µl der Beadlösung gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rotator inkubiert. Als Negativkontrolle wurde TPGY Medium verwendet. C394- und D63-Beads konnten kombiniert eingesetzt werden, HcC2378 und D967 mussten in getrennten Ansätzen verwendet werden. Im Anschluss wurden die Beads zweimal mit 1 ml PBS-T, zweimal mit 1 ml PBS und einmal mit 0,1 ml Wasser gewaschen. Überstände von primärem Anzuchtmaterial wurden zusätzlich nach dem PBS-T Waschschrift zweimal mit 1 ml PBS-T mit 2 M NaCl gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Danach wurden die Beads in 20 µl Endopep-Puffer (20 mM HEPES, 0,2 M ZnCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1 mg/ml BSA, je 50 pmol/µl BoNT/C und BoNT/D Peptidsubstrat) aufgenommen.

2.2.6.2 Endopep-Assay

Der eigentliche Test wurde analog zu Moura *et al.* und Hedeland *et al.* durchgeführt [175, 267]. Die Beads, an welche das Toxin über die Antikörper gebunden wurde, wurden in den Puffer mit den beiden Peptid-Substraten (Tab. 18) überführt. Die Reaktionslösung wurde für 10 min auf 47 °C erhitzt und schließlich für 17 h bei 42 °C in einem Thermocycler inkubiert. BoNT/C und /CD schnitten durch die in den leichten Ketten vorliegende enzymatische Aktivität das BoNT/C-Substrat. Dieses beruhte auf einer modifizierten Sequenz von SNAP25, dem natürlichen Substrat. BoNT/D und /DC spalteten das BoNT/D-Substrat (basierend auf der Sequenz von VAMP-2) in zwei Teile.

2.2.6.3 MS-Detektion

Die Detektion der Spaltung wurde mit Hilfe eines Autoflex Speed *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight* Massenspektrometer (MALDI-TOF, Bruker Daltonics, Bremen) mit smartbeam Laser untersucht. 2 µl der Reaktionslösung wurden mit 18 µl MALDI-Matrix (5 mg/ml α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (Bruker Daltonics) in 0,1 % Trifluor-Essigsäure (Sigma-Aldrich, Seelze) und 50 % Acetonitril (Carl Roth, Karlsruhe) in HPLC Wasser, 1 mM Ammoniumphosphat (Merck, Darmstadt)) vermengt. Davon wurde 1 µl auf ein MTP 384 Stahl Target übertragen. Zur Messung wurde der MS-positive Ionenmodus verwendet, die Spektren wurden von m/z 600 bis 4 800 bei einer Matrixunterdrückung bis m/z 500 aufgenommen. Der Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) wurde zur externen Kalibrierung verwendet. Jedes Spektrum setzte sich aus durchschnittlich 4 000 Laserschüssen zusammen. Die Auswertung erfolgte mit flexAnalysis 3.4 Software (Bruker Daltonics).

Die Spaltprodukte von BoNT/C-Substrat (m/z 2911) wurden bei m/z 1871 (*N*-terminal, C-NT) und m/z 1059 (*C*-terminal, C-CT) gefunden. BoNT/D-Substrat (m/z 4496) wurde in m/z 3297 (*N*-terminal, D-NT) und m/z 1217 (*C*-terminal, D-CT) geschnitten.

2.2.7 pTD System

2.2.7.1 Vorbereitung

Das pTD System basiert auf den gleichen Prinzipien wie ein klassischer Sandwich ELISA, allerdings werden die Reaktionen vollautomatisch auf einem Biochip durchgeführt und die Signale werden elektrochemisch erzeugt (*Abb. 11*). Dafür wurden die ausgewählten Antikörper in Duplikaten mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml auf einen Silizium-Chip gespottet (Durchführung Analytik Jena, Itzehoe). Als Negativkontrolle wurde Maus Immunglobulin (Dianova, Hamburg), als Positivkontrolle biotinylierter Kaninchenantikörper (Analytik Jena, Itzehoe) verwendet.

Untersucht wurden mit dem pTD zum einen toxische Pufferlösungen (0,1 % (w/v) BSA in PBS, pH 6), zum anderen toxische Matrixlösungen. Die flüssigen Matrices wurden zu gleichen Teilen mit 0,1 % BSA in PBS (pH 6) verdünnt. Partikelhaltige Lösungen wie Boden- oder Staubproben wurden mit neun Teilen 0,1 % BSA in PBS, pH 6 versetzt und 30 min unter Rotieren inkubiert. Feste Bestandteile wurden mit einem 0,8 µm Spritzenvorsatzfilter (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) entfernt. Der Durchfluss wurde für die Messungen verwendet.

Zur Vorbereitung einer Messung wurde das lyophilisierte Substrat (4-Aminophenyl- β -D-galactopyranosid) und das Enzym (Streptavidin- β -Galaktosidase) in jeweils 1,5 ml Assaypuffer (alle Reagenzien Analytik Jena, Itzehoe) durch Schütteln gelöst. Der biotinylierte Antikörper wurde in einer Konzentration von 1-10 µg/ml in Assaypuffer eingesetzt. Alle Lösungen sowie die Chips wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Nach der Initialisierung wurde das pTD mit Hilfe des Programm „System Wash“ mit destilliertem Wasser gespült.

2.2.7.2 Messung

Vor der eigentlichen Messung wurden die Schläuche des Gerätes durch die Funktion „prime“ mit Enzym, Substrat, biotinyliertem Antikörper(n) und Assaypuffer befüllt. Ein Satz Reagenzien reichte für fünf aufeinanderfolgende Messungen. Die Probe (Minimum 0,8 ml) wurde in den Probenhalter eingebracht und auf die passende Position im Gerät gesteckt. Der passende Chip wurde in den Chiphalter eingeführt. Die Eingabe der Lotnummer in der Software führte zur automatischen Bestimmung der Schwellenwerte für die Positiv- und Negativkontrolle. Nach Drücken des „Start“-Knopfes begann die vollautomatische Messung, welche 20 min dauerte. Nach der Messung wurden die Schläuche und Pumpen mit Dekontaminationslösung (0,1 % SDS, 0,1 M NaOH, Analytik Jena, Itzehoe) gespült.

2.2.8 Auswertungen von Immunoassays

2.2.8.1 ELISA

Für Verdünnungsreihen wurde ein 4-Parameter-Fit durch die Software GraphPad Prism 5.04 angelegt.

Das Detektionslimit (LOD) wurde aus der Absorption des Leerwertes zuzüglich 3,29-facher Standardabweichung (SD) des Leerwertes berechnet, unter der Annahme SD_{Leerwert} gleich $SD_{\text{Detektionslimit}}$ [275, 276]. Die halbmaximale Effektorkonzentration (EC_{50}) lag am Wendepunkt des 4-Parameter-Fits vor. Die untere und obere Quantifizierungsgrenze LLOQ und ULOQ (*lower und upper limit of quantification*) wurden durch den linearen Teil der sigmoidalen Kurve begrenzt. Sie errechneten sich aus den Wendepunkten der ersten Ableitung des 4-Parameter-Fits, also dem Minimum und Maximum der zweiten Ableitung.

Der Variationskoeffizient CV% ergibt sich nach folgender Formel:

$$CV\% = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100 \%$$

Bei den ELISAs in *Tab. 30* wurde der CV% jeweils bei der EC_{50} bestimmt. Dazu wurden zehn Doppelbestimmungen der Konzentration der EC_{50} auf einer Platte (CV% intra EC_{50}) an einem Tag oder jeweils eine Doppelbestimmung an zehn aufeinanderfolgenden Tagen auf zehn Platten (CV% inter EC_{50}) benutzt. Ausreißer unter der Voraussetzung der Normalverteilung wurden mit Hilfe des Grubbs-Testes auf einem Signifikanzlevel von 5 % identifiziert und von weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Dafür wurde die Abweichung des Maximums oder Minimums vom Mittelwert berechnet und durch die Standardabweichung geteilt. War dieser Wert größer als die tabellierte kritische Grenze, lag ein einseitiger Ausreißer vor. Für zwei Ausreißer (zwei größten bzw. zwei kleinsten Werte bzw. größter und kleinster Wert) wurde die Formel entsprechend angepasst [277, 278].

Wurden weniger als zehn Replikate eines ELISA durchgeführt, so wurde die Anzahl der durchgeführten Experimente angegeben und das Detektionslimit anhand des Kurvenverlaufs geschätzt.

2.2.8.2 pTD System

Für die Auswertung wurden die normalisierten Werte der pTD Software (Analytik Jena) verwendet. Diese berechnen sich nach folgender Formel:

$$A_{norm} = \frac{\text{Messwert} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100 \%$$

Dabei wurden die Werte mit der Einheit nA/min eingesetzt. Der Schwellenwert, ab der ein normalisierter Wert zu einem positivem Resultat führte, wurde je nach Toxin und möglichem Hintergrund festgelegt. Die Schwelle zur Bestimmung des Detektionslimits beim Einzeltoxinnachweis wurde berechnet aus dem Mittelwert der Signale der toxinpezifischen Positionen bei Verwendung einer Leerprobe zuzüglich dreifacher Standardabweichung. Beim Multiplex-Nachweis wurde der Schwellenwert ($3 \% A_{norm}$) aus den Mittelwerten aller zehn Probenpositionen auf dem Chip zuzüglich der dreifachen Standardabweichung bei zehn Messungen von Pufferproben bestimmt.

Ausreißer wurden wie oben mit Hilfe des Grubbs-Testes auf einem Signifikanzlevel von 5 % identifiziert und ausgeschlossen.

3 Ergebnisse

Der Nachweis von Toxinen beruht im optimalen Fall auf der Proteinebene, da die Toxine in Abwesenheit eines Produzenten und seiner genetischen Information toxisch sein können. Diese Detektion basiert auf zwei Säulen: Immunologische Nachweissysteme oder zweifelsfreie Identifikation mittels Massenspektrometrie. Für den letztgenannten Nachweis ist ein hoher apparativer Aufwand nötig, zudem dürfen keine Störsubstanzen in der Probe vorhanden sein. Immunologische Nachweissysteme überzeugen durch ein breites Anwendungsgebiet und basieren *per definitionem* auf Antikörpern. Diese Antikörper werden entweder monoklonal oder polyklonal hergestellt.

Zur Generierung der Antikörper sind mehrere Schritte nötig (*Abb. 13*): Zunächst werden die Tiere mit den Zielantigenen immunisiert. Toxine werden meist nicht direkt eingesetzt, da sie zum Tod der Tiere führen. Aus diesem Grund wird auf inaktivierte Toxine bzw. Toxinfragmente zurückgegriffen. Diese werden zusammen mit Adjuvanzen verabreicht, welche die Immunantwort stimulieren [279].

Haben die Tiere eine ausreichende Immunantwort gezeigt, wird im Fall von polyklonalen Antikörpern (pAk) Blut entnommen, aus dem die Antikörper gereinigt werden. pAk sind Mischungen aus Ak und detektieren aufgrund ihrer Variabilität in der Antigen-Bindedomäne verschiedene Epitope auf dem gewünschten Antigen.

Monoklonale Antikörper richten sich gegen ein definiertes Epitop und werden von Klonen einer Antikörper-produzierenden B-Zelle hergestellt. Um die Zahl der B-Zellen zu erhöhen, deren Antikörper das gewünschte Protein erkennen, werden vor der Fusion repetitive Immunisierungen (3, 2 und 1 Tag vorher) ohne Adjuvans durchgeführt. Memory-B-Zellen werden auf diese Weise reaktiviert und zu terminalen Plasma-B-Zellen differenziert [280].

Zur Generierung monoklonaler Antikörper wird dann eine Fusion durchgeführt. Bei der Fusion werden B-Zellen aus der Milz gewonnen und mit einer immortalen Myelomzelllinie fusioniert [270]. Nicht-fusionierte Splenozyten sterben nach wenigen Tagen in der Zellkultur ab. Nicht-fusionierte Myelomzellen haben einen Defekt in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und überleben nicht im Selektionsmedium, welches Hypoxanthin (Vorstufe von Purinen) und Azaserin (Blockade anderer Purin-Biosynthesewege) enthält. Nur Hybridomazellen, welche den Defekt der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase kompensieren können, sind in der Zellkultur für unbegrenzte Zeit kultivierbar [270, 281]. Diese so entstandenen Hybridomazellen produzieren weiterhin Antikörper mit gleichbleibender Qualität.

Als Nächstes müssen geeignete Antikörper identifiziert werden (*Abb. 13*). In einer durchschnittlichen Fusion entstehen ca. 4 000 Hybridomazelllinien, von denen ca. 1 % der

Zelllinien Antikörper mit vielversprechender Reaktivität gegen das gewünschte Toxin produziert (persönliche Erfahrungen). Die Qualität eines zu entwickelnden Nachweissystems hängt wesentlich von der Qualität der verwendeten Antikörper ab, aus diesem Grund ist ein qualifiziertes Screeningverfahren entscheidend. In dieser Arbeit wurden zur Auswahl qualitativ hochwertiger mAk ELISA-Formate oder Suspensionsarrays auf Basis der Luminex-Technologie sowie Oberflächenplasmonresonanz (SPR) eingesetzt [282]. Ausgewählte Zelllinien werden durch limitierte Verdünnung subkloniert und expandiert. Um sicherzustellen, dass die entstandenen Hybridomazelllinien klonal sind, wird eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Intrazelluläre IgGs werden mit fluoreszierenden anti-Maus Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert, ob sie eine einheitliche, klonale Population darstellen (exemplarisch gezeigt in 9.4).

Die Antikörper werden aus den Hybridoma-Überständen über eine Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt. Im nächsten Schritt werden die gewonnenen Antikörper umfassend mittels ELISA, SPR und Western Blot charakterisiert, um einen Überblick über bevorzugte Einsatzgebiete zu erhalten. Manche Antikörper eignen sich für Western Blot-Analysen, andere sind für den Einsatz im Sandwich ELISA besser geeignet. Die ausgewählten hoch-affinen und spezifischen Antikörper werden für stationäre und mobile Detektionsverfahren eingesetzt.

Der erste Teil der Ergebnisse stellt die in dieser Arbeit generierten Antikörper vor. Im zweiten Teil werden Anwendungsbeispiele für diese Antikörper gezeigt. Die Ak wurden zum stationären Nachweis der Toxine mittels ELISA und Endopeptidase-Massenspektrometrie verwendet. Die veterinärpathogenen BoNT/C, /CD, /D und /DC wurden erstmals auf immunologischer Ebene differenziert. Weiterhin wurden die Ak in die mobile Detektionsplattform pTD implementiert, um einen sensitiven Vor-Ort-Nachweis für Toxine zu ermöglichen.

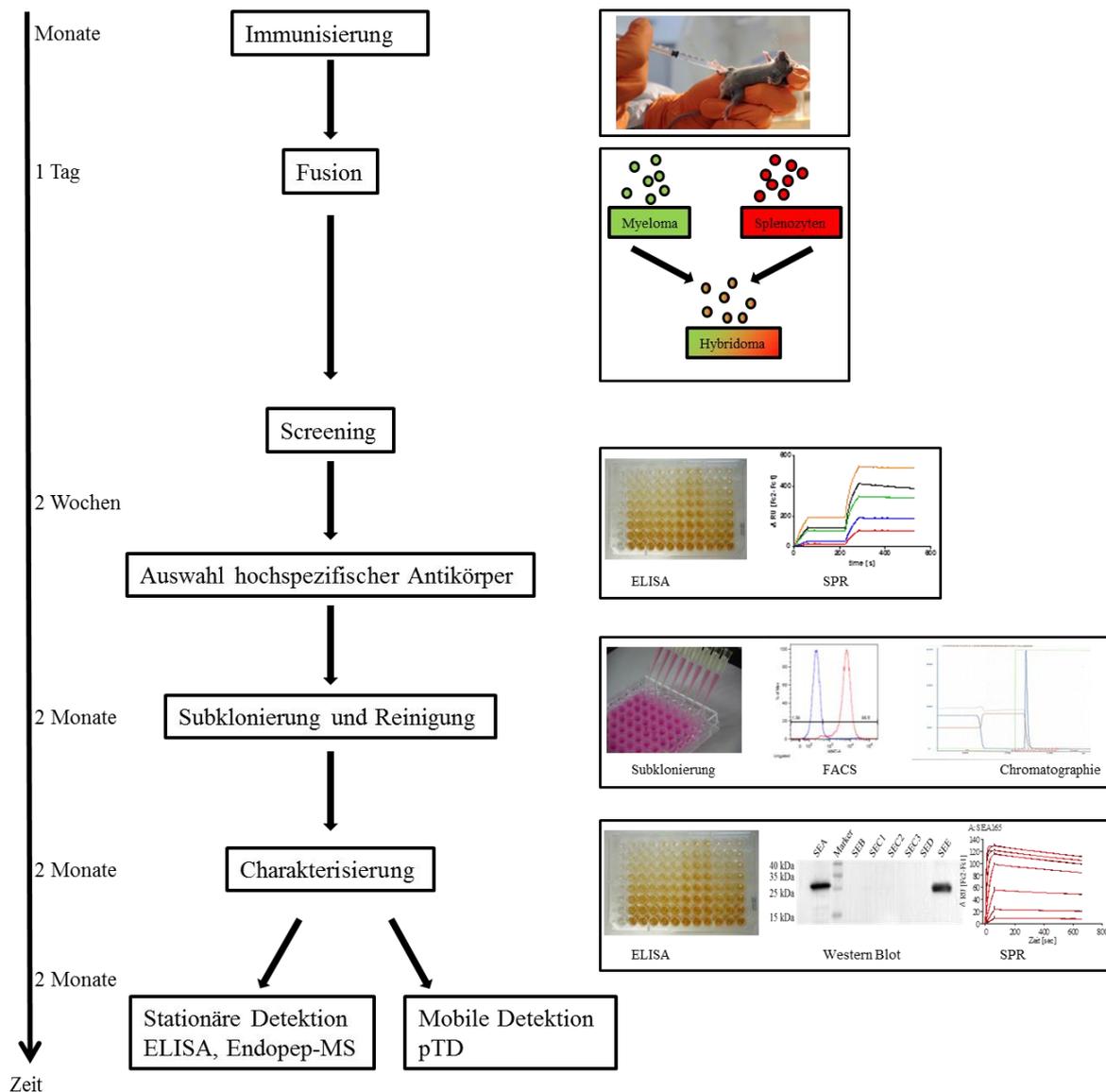


Abb. 13: Schematische Darstellung der Generierung und Charakterisierung von mAk
 Mäuse werden mehrmals mit atoxischen Antigenen immunisiert. Nachdem ein stabiler Titer erreicht ist, wird die Milz entnommen. Die Splenozyten werden mit Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert. Fusionierte Zellen werden selektiert und ihr Überstand für das folgende Screening mittels ELISA und SPR verwendet. Zellen, welche spezifische Ak produzieren, werden ausgewählt, subkloniert und expandiert. Die gereinigten Antikörper werden umfassend mittels ELISA, Western Blot und SPR charakterisiert. Zur Detektion des entsprechenden Toxins werden im Rahmen der Arbeit ein stationärer Nachweis im ELISA-Format bzw. Endopep-MS Assay und ein mobiler Nachweis auf der pTD Plattform entwickelt. Foto der Mausimmunisierung: AFP.

3.1 Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen SEA

3.1.1 Immunisierungsstrategie und Screening

Zur Herstellung hoch-affiner Antikörper gegen SEA wurden zwei NMRI-Mäuse mit rekombinantem SEA immunisiert (siehe Immunisierungsschema 9.1.1). SEA ist bei einer Menge von bis zu 2,5 mg/kg Körpergewicht nicht tödlich für Mäuse [34], daher war eine vorherige Inaktivierung des Toxins nicht nötig. Bereits nach drei Immunisierungen wurde mittels indirektem ELISA (2.2.5.2) bei einer NMRI-Maus ein ausreichender, SEA-spezifischer Titer bestimmt (9.1.1). Um die Anzahl der Antigen-erkennenden B-Zellen zu erhöhen, wurden an den drei Tagen vor der Fusion erneut Injektionen mit SEA durchgeführt. Die Milz wurde der NMRI-Maus entnommen und mit P3x63Ag8.653 Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert. Es wurden ca. 2 500 Hybridoma-Überstände mittels indirektem ELISA auf Antigenspezifität getestet, ein Viertel zeigte ein positives Signal. Nach zwei Subklonierungen und einer Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz wurden die besten zwei Klone (SEA165/6/6 und SEA388/26/5) ausgewählt und die entsprechenden Antikörper gereinigt. SEA2353/1/5, ein weiterer anti-SEA spezifischer Klon, wurde in einer unabhängigen Fusion identifiziert, welche auch Antikörper gegen SED lieferte (Immunisierungsschema und Titer test in 9.1.1). Diese mAks wurden im Folgenden auf Spezifität mittels indirektem ELISA und im Western Blot getestet.

3.1.2 Charakterisierung der anti-SEA Antikörper

Zur Charakterisierung der neu generierten mAk wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Die mAk wurden mittels indirektem ELISA auf ihre Reaktivität gegenüber verschiedenen Toxinen analysiert (Abb. 14). Dazu wurden die Toxine auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit den mAks inkubiert. Alle mAk wiesen keine Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen getesteten Toxinen oder BSA auf (Abb. 14 A). Betrachtete man die Gruppe der Staphylokokken Enterotoxine genauer (Abb. 14 B), zeigte sich bei den Antikörpern SEA165 und SEA2353 eine Erkennung von SEE und schwach von SEB. SEA und SEE haben eine Sequenzhomologie von 81 % auf Aminosäure-Ebene [31]. Der mAk SEA388 hingegen war spezifisch für SEA. Eine Analyse von SEA165 und SEA388 mittels Western Blot stützte die Ergebnisse aus dem indirekten ELISA (Abb. 15). SEA165 erkannte unter den aufgetragenen SEs SEA und SEE, mAk SEA388 detektierte ausschließlich SEA.

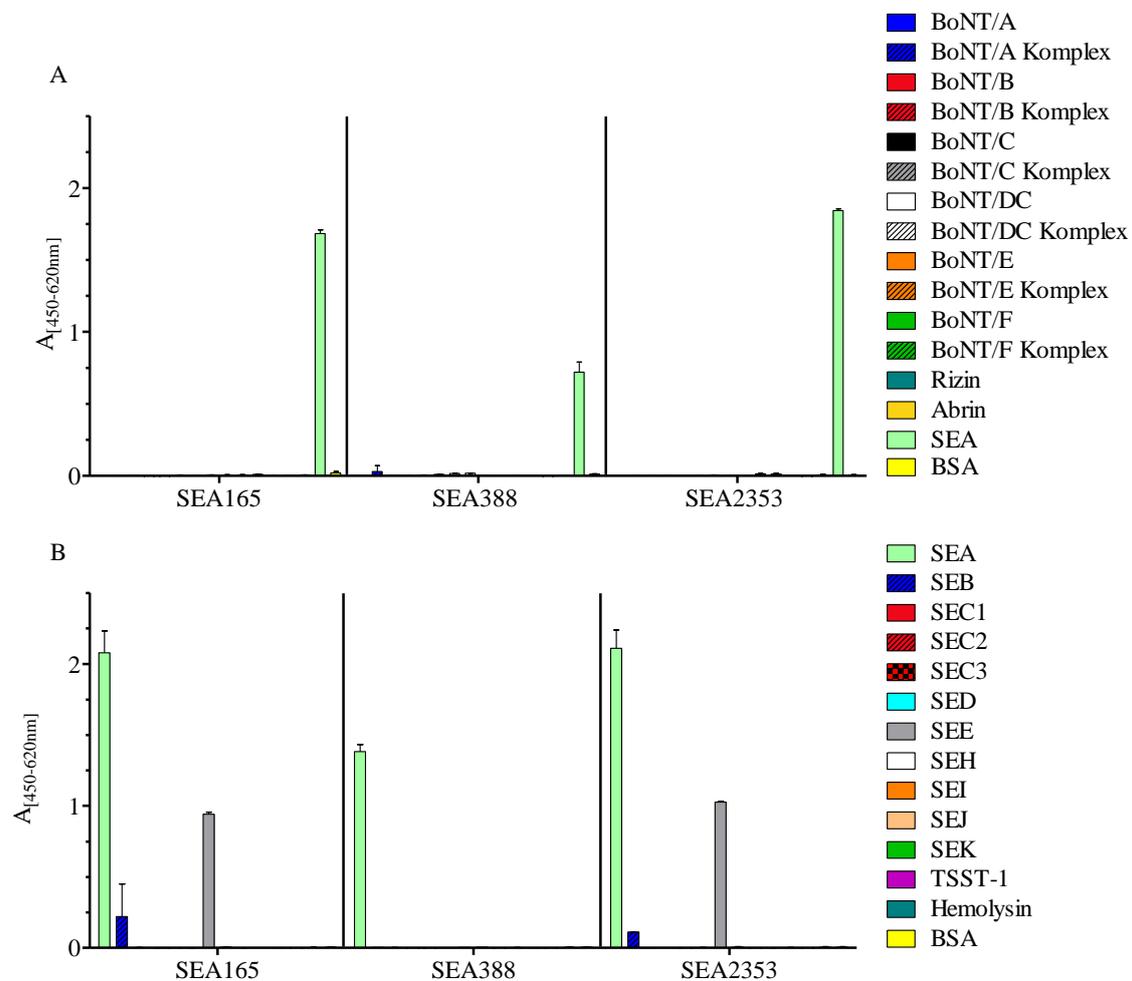


Abb. 14: Reaktivität der anti-SEA Antikörper

Die angegebenen Toxine wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die mAks SEA165, SEA388 und SEA2353 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

A: SEA165

B: SEA388

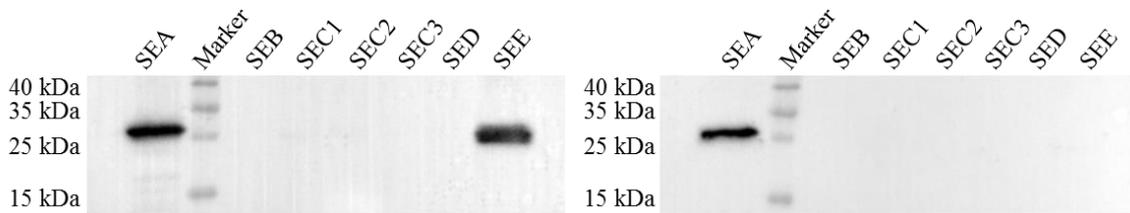


Abb. 15: Western Blot: Spezifität der mAk SEA165 und SEA388

Je 500 ng der angegebenen SEs wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Blocken wurde jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$ SEA165 (A) oder SEA388 (B) zugegeben. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörpers, Avidin-alkalische Phosphatase und CDP-Star. Als Marker wurde PageRuler prestained benutzt. Entwicklungsdauer: 1 bis 2 min.

Zusätzlich wurde die Affinität der generierten Antikörper mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht (Abb. 16). Der jeweilige Antikörper wurde mittels eines immobilisierten anti-Maus Antikörpers (Mouse-Capture-Kit) auf der Goldoberfläche gefangen und die Bindungskinetik gegen SEA gemessen. Es wurden Verdünnungsreihen von 333 nM bis 0,046 nM SEA injiziert. Anhand der gemessenen Assoziations- und Dissoziationsraten wurde mit Hilfe eines 1:1 Langmuir Bindungsmodells die Affinität der Antikörper bestimmt. SEA165 wies die höchste Affinität (0,3 nM) gegenüber SEA auf, gefolgt von SEA388 (0,5 nM). Die geringste Affinität mit 7,0 nM zeigte SEA2353.

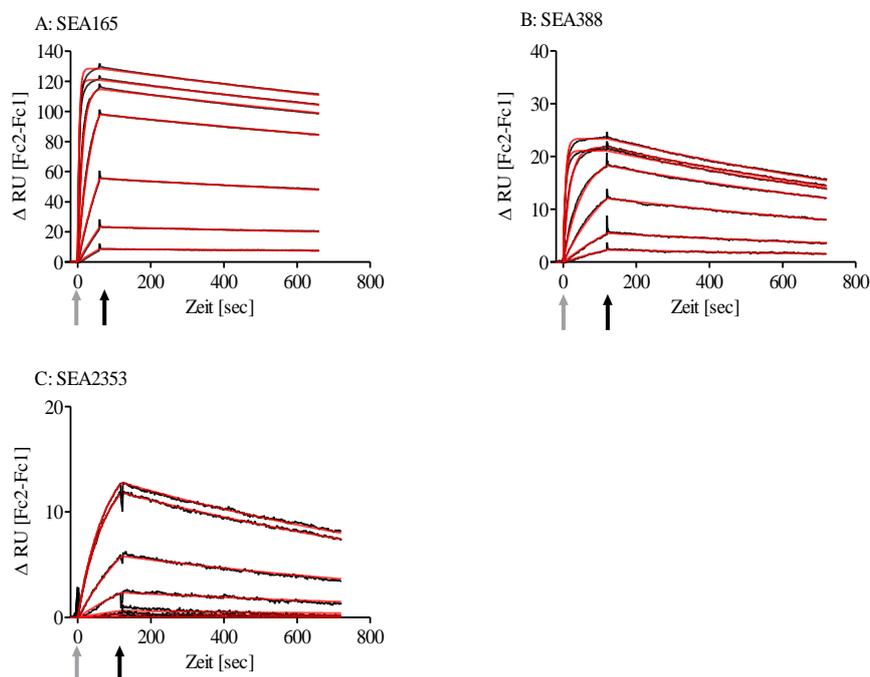


Abb. 16: Kinetische Charakterisierung von SEA165, SEA388 und SEA2353

Die Antikörper SEA165 (A), SEA388 (B) und SEA2353 (C) wurden mittels Mouse-Capture-Kit auf der Flusszelle 2 (Fc2) mit 100 bis 300 Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) immobilisiert. Flusszelle 1 (Fc1) wurde als Negativkontrolle verwendet. SEA wurde in einer 1:3 Verdünnungsreihe von 333 nM bis 1,37 nM für 60 sec (A) bzw. 111 nM bis 0,046 nM für 120 sec (B und C) injiziert (grauer Pfeil). Die Dissoziation der Antikörper-Antigen-Komplexe wurde durch die Injektion von HBS-EP+ gestartet (schwarzer Pfeil) und 600 sec beobachtet. In Schwarz sind die gemessenen Kurven dargestellt, in Rot der Fit der Kurven (1:1 Langmuir-Bindungsmodells mit lokalen R_{max} , siehe 2.2.5.6).

3.1.3 Sandwich ELISA

Die neu generierten monoklonalen Antikörper SEA165, SEA388 und SEA2353 wurden für einen Einzelnachweis von SEA mittels Sandwich ELISA verwendet. Es wurden vier mögliche Kombinationen untersucht, um die sensitivste Variante zu identifizieren.

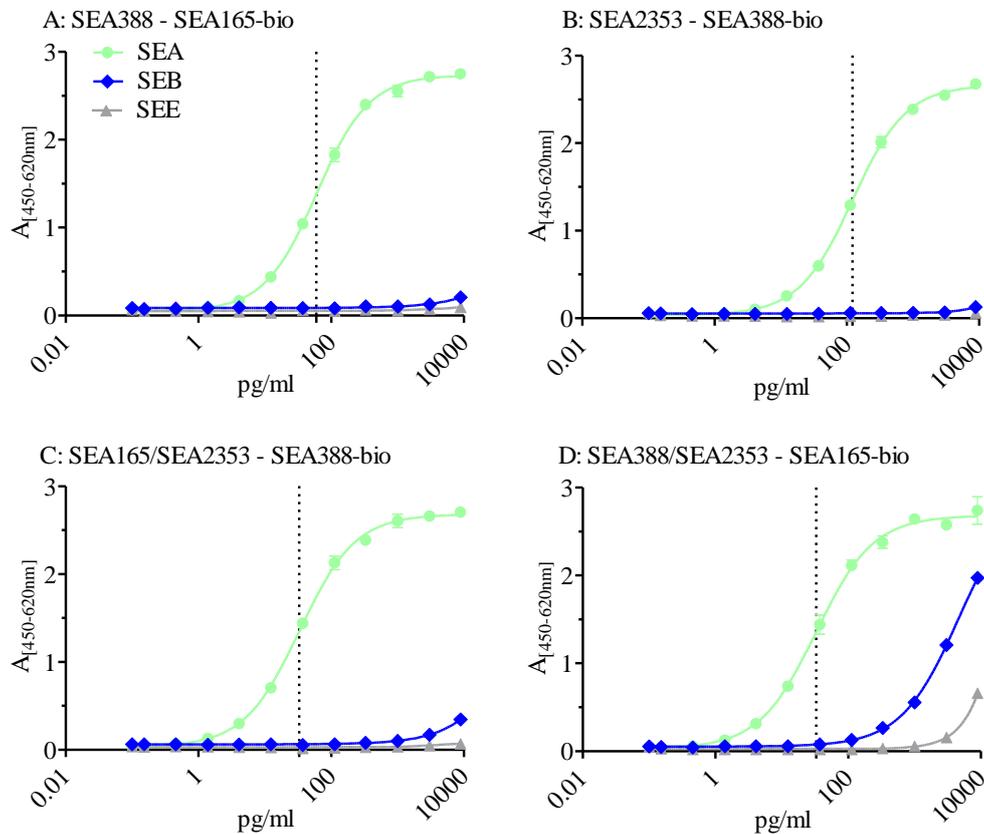


Abb. 17: Sandwich ELISA zum Nachweis von SEA, SEB und SEE

Die Fängerantikörper (je 10 $\mu\text{g/ml}$) mAk SEA388 (A), SEA2353 (B), eine äquimolare Mischung aus SEA165/SEA2353 (C) oder SEA388/SEA2353 Antikörpern (D) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurden die Platten mit SEA, SEB und SEE in Konzentrationsreihen von 0,15 – 9 000 pg/ml in 0,1 % BSA/PBS inkubiert. Nach Zugabe der biotinylierten Detektionsantikörper SEA165-biotin (A, D) oder SEA388-biotin (B, C) wurde der ELISA mit Hilfe von Poly-HRP und TMB entwickelt. Gestrichelt wurde die EC_{50} eingezeichnet. Dargestellt sind die Duplikate eines repräsentativen Experiments von zwei durchgeführten.

Mit diesen drei Antikörpern ließen sich sehr sensitive Sandwich ELISA zum Nachweis von SEA etablieren (Abb. 17). Die ELISA Kombinationen A, B und C wiesen ausschließlich SEA nach. Durch die Verwendung von SEA388 und SEA2353 als Fängerantikörper und von SEA165-Bio zeigte sich eine Kreuzreaktivität auf SEB und SEE, wenn hohe Konzentrationen getestet wurden (Abb. 17 D). Zur Detektion von SEB bzw. SEE waren andere, in der Arbeitsgruppe generierte Sandwich ELISA besser geeignet (Daten nicht dargestellt). Durch den Vergleich der halbmaximalen Effektorkonzentration EC_{50} lässt sich feststellen, dass eine Kombination aus allen drei mAk sensitiver war als ein Sandwich ELISA aus zwei mAk. Die

halbmaximale Effektorkonzentration EC_{50} lag bei beiden Varianten bei 33 pg/ml. Das Detektionslimit wurde auf etwa 2 pg/ml geschätzt. Für die Übertragung der Nachweisreaktion in das portable Multiplex-Detektionssystem pTD wurden alle drei Antikörper ausgewählt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch zwei Fusionen drei monoklonale Antikörper gegen SEA mit hoher Affinität und Spezifität gewonnen wurden (*Tab. 23*).

Tab. 23: Zusammenfassung der anti-SEA Antikörper

<i>Name</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Indirekter ELISA</i>	<i>Sandwich ELISA</i>	<i>Western Blot</i>	<i>Affinität K_D [nM]</i>
SEA165	SEA > SEE >> SEB	IgG1	+++	+++	+++	0,3
SEA388	SEA	IgG1	++	+++	++	0,5
SEA2353	SEA > SEE >> SEB	IgG1	+++	+++	n. d.	7,0

Die drei neu generierten anti-SEA Antikörper wurden mittels indirektem und Sandwich ELISA sowie mittels Western Blot untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf den jeweiligen mAk mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. Der Isotyp wurde mittels Isotyping Kits und die Affinität mittels SPR analysiert; n. d. nicht durchgeführt.

3.2 Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen humanpathogene BoNT

Zu den humanpathogenen Botulinum Neurotoxinen gehören die Serotypen A, B, E, und F. Jeder Serotyp wird anhand von Sequenzunterschieden in verschiedene Subtypen unterteilt (> 2,6 % Unterschied auf Aminosäure-Ebene, [114]). Die Subtypen von BoNT/A unterscheiden sich untereinander um 16 %, BoNT/B um 7 %, BoNT/E um 11 %. BoNT/F Subtypen variieren mit 36 % am stärksten (siehe 1.1.2 und *Abb. 4*).

Die Sequenzvariationen beeinflussen das Bindungsvermögen von Antikörpern, insbesondere von mAk. Für BoNT/A waren in der Arbeitsgruppe zu Beginn dieser Arbeit diverse Antikörper vorhanden, die eine Reaktivität gegen ausgewählte, aber nicht gegen alle BoNT/A Subtypen aufwiesen. Die mAk mit der breitesten Reaktivität waren A1688 und A120, welche die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Subtypen A1-A5 und A8 erkannten. Da diese Antikörper überlappende Epitope hatten, konnte mit diesen Reagenzien kein Sandwich ELISA etabliert werden. Zur Detektion der Subtypen A1-A8 musste daher auf ein polyklonales Serum aus Pferden zurückgegriffen werden (Behring-Serum, [166]). Vergiftungen mit BoNT/A und /B treten in Deutschland, Europa und den USA am häufigsten auf, daher ist die Detektion dieser Serotypen und der zugehörigen Subtypen essentiell (vergleiche 1.1.2 und [87]). Um hier möglichst alle Subtypen abzudecken, wurde im Rahmen der Doktorarbeit versucht, Antikörper mit breiter Reaktivität gegenüber BoNT/A Subtypen herzustellen.

Für BoNT/E ergibt sich ein ähnliches Bild: Die drei in der Arbeitsgruppe vorhandenen monoklonalen Antikörper E136, E163 und E173 waren nicht in der Lage, alle am RKI verfügbaren Subtypen von BoNT/E zu detektieren. E136 und E173 detektierten BoNT/E1 und /E3, während E163 ausschließlich /E3 erkannte. Ein neu in der Gruppe entdeckter Subtyp mit der vorläufigen Bezeichnung BoNT/Ex wurde von keinem der vorhandenen mAk nachgewiesen. Aus diesem Grund sollten Antikörper mit breiter Reaktivität gegen BoNT/E Subtypen hergestellt werden.

Für BoNT/B und /F lagen in der Arbeitsgruppe verschiedene mono- und polyklonale Antikörper vor. Da es nur eine sehr begrenzte Zahl an verfügbaren Subtypen in der Arbeitsgruppe gibt, war eine umfassende Untersuchung neu generierter mAk nicht möglich. Daher wird auf eine ausführliche Darstellung von anti-BoNT/B und anti-BoNT/F Antikörpern verzichtet.

3.2.1 Immunisierungsstrategie und Screening

Um ein sensitives und gleichzeitig spezifisches Nachweissystem für BoNT/A und /E zu entwickeln, wurden BALB/c- und NMRI-Mäuse mit dem C-terminalen Teil der schweren Kette von BoNTs (H_C) immunisiert. Es wurden die nichttoxischen Fragmente $H_C/A1$, $H_C/B1$, $H_C/E1$ und $H_C/F1$ verwendet. Da durch Vorarbeiten monoklonale Antikörper gegen die leichte Kette und den N-terminalen Teil der schweren Kette existierten (z. B. A1688, E136 und E173), sollte so ein unabhängiges Epitop auf den BoNT-Molekülen adressiert werden.

3.2.1.1 Umfassende Immunisierung gegen alle humanpathogenen BoNT

In der ersten Immunisierungsstrategie wurde neben $H_C/E1$ und $H_C/A1$ mit weiteren H_C -Fragmenten der anderen humanpathogenen BoNT-Moleküle immunisiert. Durch die Immunisierung mit $H_C/A1$, $H_C/B1$, $H_C/E1$ und $H_C/F1$ sollte eine breit gefächerte Immunantwort gegen möglichst konservierte Epitope in allen H_C -Domänen induziert werden. Wie aus 9.1.2 ersichtlich, wurden bei einer BALB/c-Maus jeweils zwei Toxinfragmente gleichzeitig verabreicht. Die NMRI-Maus erhielt anfangs ein Fragment. Um die Titerentwicklung möglichst effektiv aus wenigen Mikrolitern Blut zu untersuchen, wurde ein Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie etabliert (siehe 1.2.1 und 2.2.5.5). Bei diesem System wird ein Array auf 6 μm großen magnetischen Mikropartikeln verwendet, die aufgrund der internen Mischung zweier Fluoreszenzfarbstoffe eindeutig differenzierbar sind. An diese Partikel wurden mittels EDC-NHS-Chemie die Vollängen-Toxine gekoppelt. Die im Serum vorhandenen Antikörper banden an die zugehörigen Toxine. Durch Waschen wurden unspezifische Antikörper entfernt, bevor die gebundenen Antikörper mit dem Farbstoff Phycoerythrin (PE), gekoppelt an einen anti-Maus Antikörper, nachgewiesen wurden. Im Luminex-Messgerät, einem Durchflusszytometer mit zwei Lasern, wurde einerseits die Identität der Partikelsorte – und damit des entsprechenden Toxins – und andererseits die Bindung des gesuchten Antikörpers durch den Farbstoff PE nachgewiesen (siehe *Abb. 9*). Diese Technik wurde vor der Fusion für den Titerest und nach der Fusion für das Screening der Hybridoma-Überstände verwendet.

Der Titer der beiden zur Fusion vorgesehenen Mäuse vor den final durchgeführten Immunisierungen ist in *Abb. 18* dargestellt. Es wurde die Reaktivität der im Serum vorhandenen Antikörper gegen die humanpathogenen Serotypen BoNT/A, /B, /E und /F untersucht. Als Negativkontrolle wurde das nicht-verwandte Pflanzentoxin Rizin verwendet, um gegebenenfalls unspezifisch bindende Antikörper zu detektieren. Die Ergebnisse wurden logarithmisch als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aufgetragen. Die NMRI-Maus (links) entwickelte Antikörper hauptsächlich gegen BoNT/A. Das Immunsystem der BALB/c-Maus (rechts) hingegen produzierte Antikörper gegen alle humanpathogenen BoNT. Beide Mäuse wurden für je eine Fusion verwendet.

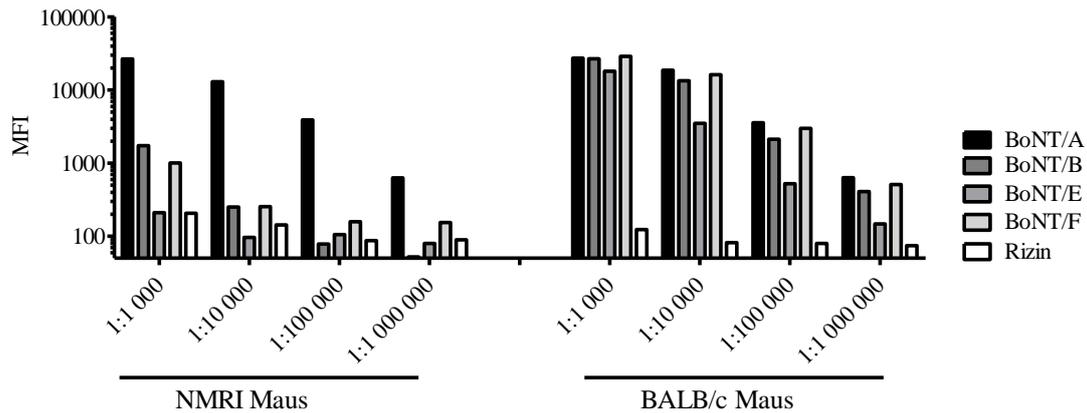


Abb. 18: Untersuchung des Titers immunisierter Mäuse mittels Suspensionsarray

Mäuse wurden sechs- bzw. siebenmal mit rekombinant hergestellten H_C -Fragmenten der BoNTs immunisiert. BoNT/A, /B, /E, /F und Rizin wurden kovalent an Luminex-Partikel gebunden.

Das Serum der NMRI- und der BALB/c-Maus in den angegebenen Verdünnungen (von 10^{-3} bis 10^{-6}) wurde mit den Partikeln inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mit einem anti-Maus Antikörper, gekoppelt an PE, nachgewiesen. Im Luminex-Messgerät wurden einerseits die Identität (Partikelsorte) und andererseits die Intensität der Interaktion (Bindung von PE) gemessen. Das Ergebnis wird in mittleren Fluoreszenzeinheiten (MFI) dargestellt.

Aus der BALB/c-Maus wurden 205 Millionen Splenozyten isoliert, aus der NMRI-Maus 163 Millionen Splenozyten. Insgesamt wurden mit dem oben beschriebenen Screening 4150 Hybridoma-Überstände untersucht. Es wurden fünf Antikörper gegen BoNT/A identifiziert: A185/18/2, A778/10/1, A1103/11/1, A1121/7/5, A2807/7/3, welche in Kapitel 3.2.2 näher charakterisiert werden. Ein Klon, E1346/10/5, wurde mit Reaktivität gegen BoNT/E gefunden. Aus diesen beiden Fusionen wurden zudem Hybridomazellen identifiziert, die zu den Antikörpern B488/14/2 (gegen BoNT/B), F757/14/16 und F1726/19/2 (gegen BoNT/F) führten (Überblick siehe 9.3).

3.2.1.2 Einzelimmunisierung mit H_C/E1

Um weitere Antikörper mit Spezifität gegen BoNT/E zu generieren, wurde in einem zweiten Ansatz ausschließlich H_C/E1 zur Immunisierung genutzt. Zwei NMRI-Mäuse wurden mit je 20-35 µg H_C/E1 immunisiert. Die Immunisierung mit einmalig 1 µg *single chain* BoNT/E1 (scBoNT/E1) sollte Antikörper induzieren, welche andere Domänen erkennen. Der Titer der Mäuse wurde mittels indirektem ELISA auf Reaktivität gegen kommerziell erhältliches BoNT/E3 untersucht (9.1.2).

Nach drei Immunisierungen zeigte sich ein zufriedenstellender Titer. Die Milzen der beiden NMRI-Mäuse wurden entnommen, die Splenozyten isoliert und mit Hybridomazellen fusioniert. Es wurden 120 Millionen Splenozyten isoliert. Da aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits ein polyklonaler Fängerantikörper (KE97) aus Kaninchen zur Verfügung stand, wurde die Analyse der Hybridoma-Überstände in einem Sandwich-ELISA-Format durchgeführt (siehe 2.2.5.3). Das Screening der Hybridoma-Überstände wurde analog zum Titertest gegen BoNT/E3 durchgeführt. Mit dieser Strategie war es möglich, Antikörper zu finden, die sowohl BoNT/E1 als auch /E3 erkannten. Zur Detektion wurde ein nicht auf Kaninchen kreuzreagierender anti-Maus Antikörper, gekoppelt mit einer POD, verwendet.

Im Screening wurden 3 600 Klone untersucht. Die vier vielversprechendsten Klone, E1447/1/9, E3128/20/1, E3194/1/12 und E3226/1/7 wurden in der Fusion von Tier 1 gefunden. Die aus Tier 2 isolierten Splenozyten zeigten eine hohe Fusionsrate, so wurden 2 800 Hybridoma-Überstände aus dieser Fusion getestet. Diese Antikörper führten im ELISA zu schwachen Signalen. Nach zwei Subklonierungen wurden die entsprechenden Antikörper aus den Zellkulturüberständen gereinigt. Ihre Charakterisierung folgt in Kapitel 3.2.4.

Eine weitere Fusion von einer mit H_C/E immunisierten Maus führte zu keinen verwertbaren Antikörpern (Immunisierungsschema siehe 9.1.5).

3.2.2 Charakterisierung der anti-BoNT/A Antikörper

Aus den in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenen Immunisierungen und Fusionen entstanden insgesamt fünf Antikörper mit Reaktivität gegen BoNT/A: A185/18/2, A778/10/1, A1103/11/1, A1121/7/5 und A2807/7/3. Zur Überprüfung der Reaktivität und Spezifität gegenüber diversen Toxinen wurden die generierten Antikörper mittels indirektem ELISA untersucht (Abb. 19). Die Analyse der Kreuzreaktivität auf BoNT/A bis /F mitsamt zugehöriger Komplexe, SEB, Rizin und Abrin zeigte, dass alle mAk ausschließlich BoNT/A und deutlich schwächer BoNT/A Komplex (nur A778, A1103 und A2807) erkannten.

Zusätzlich wurden die neu generierten Antikörper auf Kreuzreaktivität gegen das neuartige, hybride BoNT-Molekül BoNT/H getestet [104]. BoNT/H stellt ein Mosaik aus BoNT/F und /A dar [111]. Alle fünf Antikörper erkannten rekombinant hergestelltes *single chain* BoNT/H aufgrund der Sequenzähnlichkeit von BoNT/A und BoNT/H im Bereich der Rezeptorbindungsdomäne H_C (Abb. 19). Weitere Signale waren nicht festzustellen.

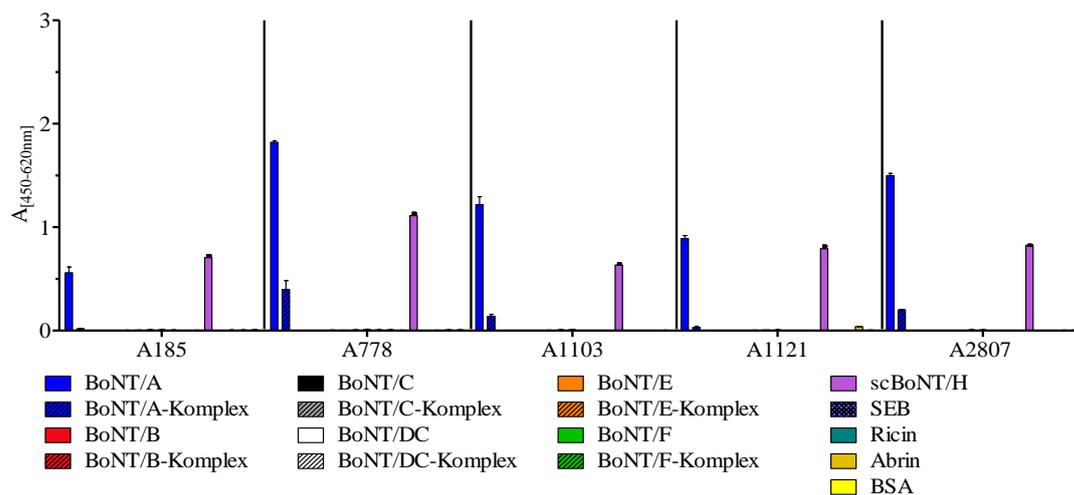


Abb. 19: Reaktivität der anti-H_C/A Antikörper

Die angegebenen Toxine wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die mAk A185, A778, A1103, A1121 und A2807 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

In einem weiteren indirekten ELISA wurde die Erkennung der Subtypen von BoNT/A analysiert (Abb. 20). BoNT/A8 ist am nächsten mit BoNT/A1, /A2, /A5 und /A6 verwandt (> 93 % Sequenzidentität auf Aminosäure-Ebene), die größte Abweichung mit 87,7 % Sequenzidentität auf Aminosäure-Ebene wurde zu BoNT/A3 gefunden [115].

Zu diesem Zweck wurden kommerziell erhältliches BoNT/A1, /A2, /A3 (miprolab, Göttingen) sowie rekombinante Varianten von BoNT/A4, /A5 und /A8 (Dr. A. Rummel, MHH) immobilisiert und mit den Antikörpern inkubiert. Es stellte sich heraus, dass die isolierten mAk alle untersuchten Subtypen erkannten. Gute Reaktivitäten zeigten sich bei A778 und A1103

gegen BoNT/A1-/A8. A185 und A1121 zeigten eine deutliche Präferenz für BoNT/A1 und detektierten die anderen Subtypen schwächer. Der mAk 2807 detektierte BoNT/A2 und /A3 schlechter als andere Subtypen.

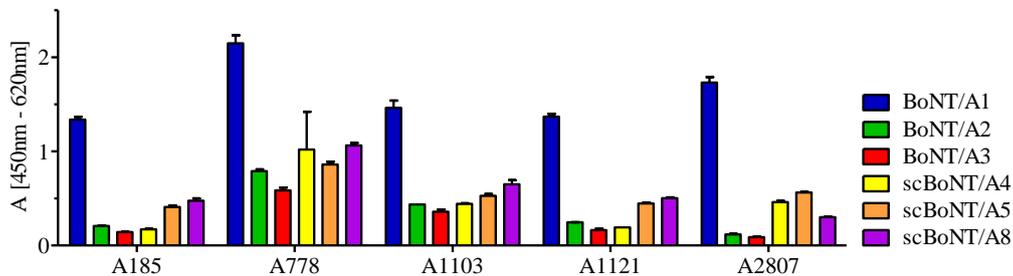


Abb. 20: Reaktivität der anti-H_C/A Antikörper gegen Subtypen von BoNT/A

Die Subtypen wurden mit je 500 ng/ml in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die mAk A185, A778, A1103, A1121 und A2807 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen an POD gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

Auf Basis der Ergebnisse von ELISAs und Oberflächenplasmonresonanz-Messungen wurden die Antikörper A185, A778 und A2807 genauer analysiert. Zunächst wurden die Affinitäten der Antikörper gegenüber den rekombinant hergestellten H_C-Fragmenten der Subtypen A1-A8 (Dr. A. Rummel, MHH) genauer untersucht. Die rekombinanten Fragmente wiesen eine gute Qualität auf (Reinheit > 90 % in der SDS-PAGE), einzig H_C/A6 zeigte im Gelbild eine Doppelbande (Daten nicht dargestellt).

mAk A185 zeigte eine schnelle und stabile Bindung an die H_C/A Fragmente der Subtypen A1-A5 sowie A8 (Abb. 21). Bei H_C/A6 und /A7 erfolgte ebenfalls eine schnelle Bindung, nach Pufferinjektion (schwarzer Pfeil in Abb. 21) hingegen folgte eine schnelle Dissoziation (zur Bewertung der Kurvenverläufe vergleiche Abb. 10 rechts).

A778 zeigte ein ähnliches Bild, hier findet eine schnelle Dissoziation der Fragmente H_C/A6 und /A7 nach Pufferinjektion statt. Die anderen Subtypen führten zu langsameren Dissoziationsraten. Der mAk A2807 band H_C/A1 und /A4-A8 schnell und stabil, eine schwächere Affinität aufgrund einer erhöhten Dissoziationsrate ergab sich bei /A2 und /A3. Die K_D-Werte für die Bindung von H_C/A1 sind in Tab. 24 angegeben.

Mittels SPR wurde in weiteren Versuchen festgestellt, dass diese drei Antikörper unterschiedliche Epitope erkannten (Daten siehe 9.5).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die mAk A185, A778 und A2807 alle bisher bekannten Subtypen über die H_C-Domäne binden.

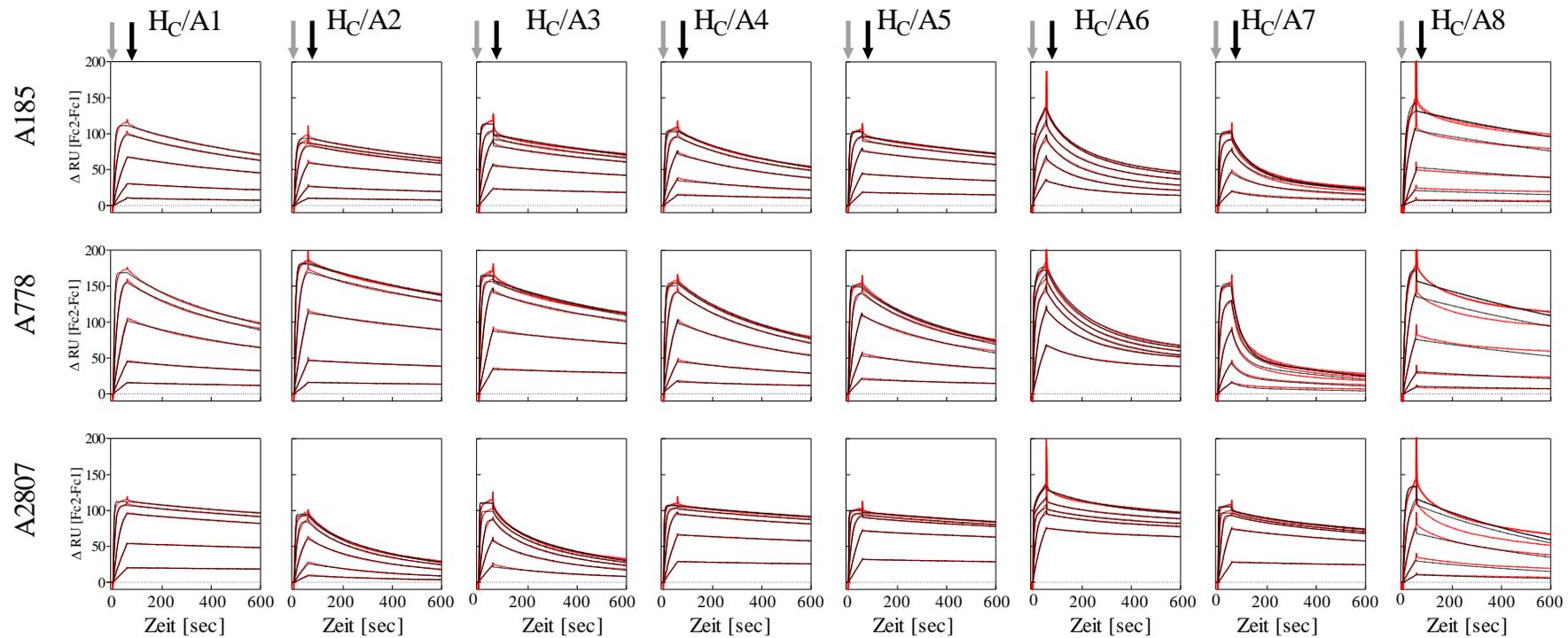


Abb. 21: Bindungsstudien der Antikörper A185, A778 und A2807 gegenüber H_C-Fragmenten von BoNT/A Subtypen

Die Antikörper A185, A778 oder A2807 wurden mittels Mouse-Capture-Kit auf der Flusszelle 2 mit 100 bis 300 RU immobilisiert. Flusszelle 1 wurde als Negativkontrolle verwendet. H_C/A Fragmente der angegebenen Subtypen (H_C/A1 bis H_C/A8) wurden in einer 1:3 Verdünnungsreihe von 200 nM bis 0,82 nM für 60 sec injiziert (grauer Pfeil). Die Dissoziation der Antikörper-Antigen-Komplexe wurde durch die Injektion von HBS-EP+ gestartet (schwarzer Pfeil) und 600 sec beobachtet. In Schwarz sind die gemessenen Kurven dargestellt, in Rot der Fit der Kurven (1:1 Langmuir-Bindungsmodell mit lokalen R_{max}, siehe 2.2.5.6). Diese Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Stern (RKI) erstellt.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Antikörper neutralisierende Wirkung haben, d. h. die funktionelle Wirkung des Toxins inhibieren. Zu diesem Zweck wurden die Antikörper A185, A778 und A2807 im sogenannten *mouse phrenic nerve* (MPN) Hemidiaphragma (Zwerchfell)-Assay in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. A. Rummel (MHH) untersucht. Es handelte sich um ein *ex vivo* Modell zur Bestimmung der Aktivität von Neurotoxinen.

In einem Organbad wurde ein Nerv-Muskel-Präparat (*Nervus phrenicus* und halber Zwerchfellmuskel) kontinuierlich indirekt elektrisch stimuliert und die Kontraktionsamplitude des Muskels gemessen. Durch die Zugabe von BoNT wurde konzentrationsabhängig die Kontraktion vermindert. Gemessen wurde die Zeit nach der Zugabe von BoNT bis zur Halbierung der Kontraktionsamplitude, welche die halbmaximale Paralysezeit ergab. Haben Antikörper eine neutralisierende Wirkung, wird die Abnahme der Kontraktion verzögert oder ganz verhindert [147, 148, 283, 284].

Unter Einsatz von 6 pM BoNT/A wurde ohne Antikörper eine halbmaximale Paralysezeit von etwa 60 min erreicht (Abb. 22, schwarze Balken). 100 nM A185 bzw. A778 verlängerten die Paralysezeit auf 120 bzw. 140 min. Beim Einsatz der gleichen Konzentration von mAk A2807 wurde innerhalb der Versuchsdauer (180 min) keine Abnahme auf die halbmaximale Kontraktionsamplitude gemessen. Aus diesem Grund wurden Versuche mit 10 nM A2807 durchgeführt. Diese Konzentration steigerte die halbmaximale Paralysezeit auf etwa 170 min.

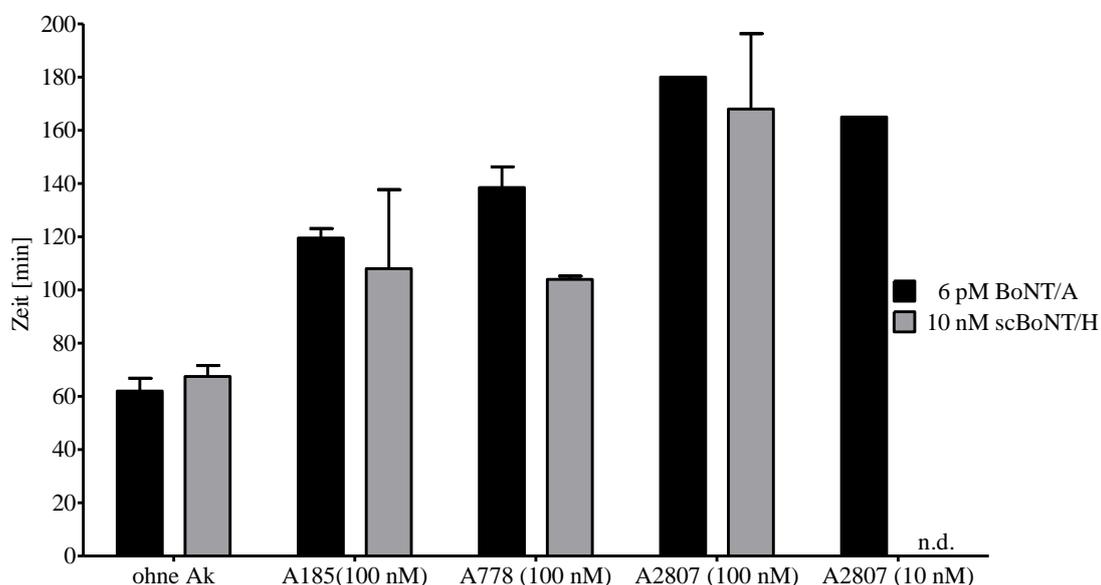


Abb. 22: Neutralisation der anti-BoNT/A Antikörper

In ein Organbad mit dem Nerv-Hemidiaphragma-Präparat wurden 6 pM BoNT/A oder 10 nM scBoNT/H eingebracht. Anschließend wurden 100 nM A778, 100 nM A185 oder 100 nM bzw. 10 nM A2807 hinzugefügt. Gemessen wurde die Zeit der Abnahme bis zur halbmaximalen Kontraktion (= halbmaximale Paralysezeit). Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. A. Rummel (MHH) zur Verfügung gestellt; n. d. nicht durchgeführt.

Der mAk A2807 war in der Lage, BoNT/A im Hemidiaphragma-Assay sehr effektiv zu neutralisieren. Die Aktivität von BoNT/A wurde durch die Bindung des Antikörpers an das Toxin deutlich reduziert.

Bei Einsatz des neu entdeckten Mosaiks BoNT/H (10 nM rekombinantes scBoNT/H) statt BoNT/A zeigte sich ein ähnliches Bild (*Abb. 22*, graue Balken). 100 nM der mAk A185 und A778 hatten leicht neutralisierende Wirkung (Verlängerung auf ca. 110 min). 100 nM A2807 erhöht die halbmaximale Paralysezeit auf etwa 170 min, was einer effektiven Neutralisierung entspricht.

3.2.3 ELISA für BoNT/A

Die drei Antikörper A185, A778 und A2807 wurden im Folgenden zur Etablierung eines Sandwich ELISAs benutzt. Dieser Test sollte alle bekannten Subtypen von BoNT/A detektieren. Zum Zeitpunkt der Doktorarbeit waren in der Arbeitsgruppe die Subtypen A1-A5 und A8 als Vollängen-Toxine rekombinant bzw. aus *C. botulinum* gereinigt vorhanden. Diese sollten nun durch geeigneten Antikörpereinsatz detektiert werden.

Der mAk A2807 hatte die höchste Affinität gegenüber den meisten H_C-Fragmenten (z. B. 0,2 nM für H_C/A1, *Tab. 24*), daher wurde dieser als Fängerantikörper ausgewählt. A2807 zeigte eine erhöhte Dissoziationsrate bei Bindung von BoNT/A2 und /A3. Um dies auszugleichen, wurden die mAk A778 und A185 ebenfalls als Fängerantikörper eingesetzt. Eine Mischung von gleichen Teilen A185, A778 und A2807 als Fängerantikörper verbesserte die Detektion verschiedener Subtypen deutlich (Daten nicht dargestellt). Als Detektionsantikörper mit einer breiten Erkennung wurde A120, ein weiterer RKI-interner Antikörper, benutzt. Das Epitop von A120 lag in der H_N-Domäne und war in Kombination mit den H_C-spezifischen mAks für die Detektion zugänglich.

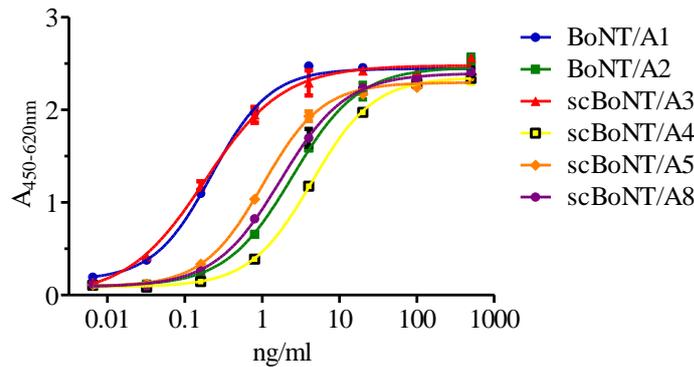


Abb. 23: Sandwich ELISA zum Nachweis unterschiedlicher BoNT/A Subtypen

Die Fängerantikörper (je 3 µg/ml) A185, A778 und A2807 wurden äquimolar gemischt und auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurden die Platten mit BoNT/A1 und A2 (Metabionics) sowie rekombinanten scBoNT/A3, /A4, /A5 und /A8 (Dr. A. Rummel, MHH) in Konzentrationen von 500 ng/ml bis 32 pg/ml in 0,1 % BSA/PBS inkubiert. Nach Zugabe des biotinylierten Detektionsantikörper A120-bio (2,5 µg/ml) wurde der ELISA mit Hilfe eines polymeren Streptavidin-Peroxidase-Konjugats und TMB entwickelt. Dargestellt sind die Duplikate eines repräsentativen Experiments von zwei durchgeführten.

Bei dieser ELISA Variante (Abb. 23) war die Detektion von BoNT/A1 und /A3 am sensitivsten mit einer geschätzten LOD kleiner als 10 pg/ml. Die halbmaximale Effektorkonzentration EC_{50} lag bei ca. 200 pg/ml. BoNT/A2, A5 und A8 wurden mit dieser Kombination etwa gleich gut nachgewiesen. Die EC_{50} lag bei 1,0 bis 2,4 ng/ml Toxin. Am schwächsten wurden BoNT/A4 detektiert (EC_{50} 4,3 ng/ml). Die Fängerantikörper A185, A778 und A2807 waren in der Lage, alle H_C -Fragmente der Subtypen zu binden (vergleiche Abb. 21), daher war eine Bindung des Vollängen-Toxins möglich. Puffer (0,1 % BSA in PBS, pH 7,2) führte zu keinem Hintergrund.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neu generierten anti-BoNT/A Antikörper eine hohe Affinität zu verschiedenen BoNT/A Subtypen aufweisen (Abb. 21). Mit Hilfe dieser Antikörper ist es gelungen, ein sensitives Nachweissystem für BoNT/A1, /A2, /A3, /A4, /A5 und /A8 aufzubauen. Durch die Mischung dreier monoklonaler Fängerantikörper A185, A778 und A2807 wurden alle Antigene mit niedriger Nachweisgrenze detektiert. Die Nachweisgrenze mit A120-bio als Detektorantikörper lag für BoNT/A1, /A2, /A3, /A5 und /A8 bei maximal 30 pg/ml Toxin, für /A4 etwa doppelt so hoch.

Tab. 24: Zusammenfassung der anti-H_C/A Antikörper

<i>Name</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Subtypen</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Indirekter ELISA</i>	<i>Sandwich ELISA</i>	<i>Western Blot</i>	<i>MPN Assay</i>	<i>Affinität zu H_C/A1 [nM]</i>
A185	H _C /A, H _C /H	BoNT/A1-8, schwächer A6, A7	IgG1	+	+++	+	+	1,0
A778	H _C /A, H _C /H	BoNT/A1-8, schwächer A6, A7	IgG2a	+++	+++	+	+	1,1
A1103	H _C /A, H _C /H	BoNT/A1-8 schwächer A7, A8	IgG1	++	++	+++	n. d.	n. d.
A1121	H _C /A, H _C /H	BoNT/A1, A2, A4, A5 und A8	IgG1	++	++	++	n. d.	n. d.
A2807	H _C /A, H _C /H	BoNT/A1-8, schwächer A2, A3	IgG1	+++	+++	++	+++	0,2

Die fünf neu generierten anti-H_C/A Antikörper wurden mittels indirektem und Sandwich ELISA sowie im Western Blot untersucht. Zudem wurde die mAk auf ihre Neutralisationswirkung im MPN Assay untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf den jeweiligen mAk mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität; + entspricht 10-50 % relative Signalintensität. Zudem wurden der Isotyp mittels Isotyping Kits und die Affinität mittels SPR bestimmt; n. d. nicht durchgeführt.

3.2.4 Charakterisierung der anti-BoNT/E Antikörper

Die in 3.2.1.1 und 3.2.1.2 beschriebenen Fusionen der mit H_C/E immunisierten Mäusen führten zu folgenden Antikörpern: E1346/10/5, E1447/1/9, E3128/20/1, E3194/1/12 und E3226/1/7. Mittels indirektem ELISA wurden die generierten Antikörper auf Reaktivität und Spezifität gegenüber diversen Toxinen untersucht (Abb. 24). Alle Antikörper erkannten ausschließlich BoNT/E und BoNT/E Komplex (jeweils BoNT/E3 von Metabionics). Andere getestete Toxine wurden nicht erkannt.

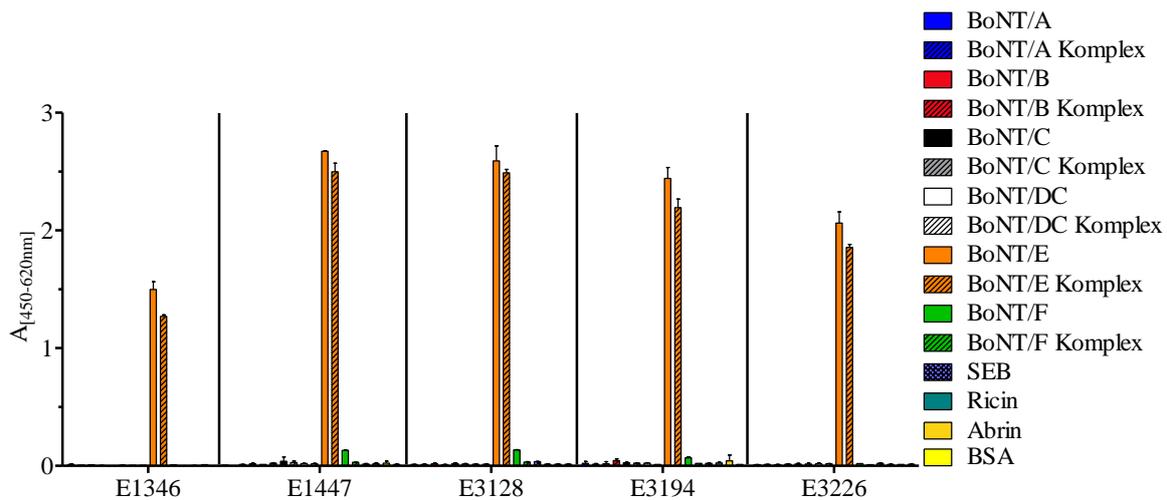


Abb. 24: Reaktivität der anti-H_C/E Antikörper

Die angegebenen Toxine wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die mAk E1346, E1447, E3128, E3194 und E3226 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

In einem weiteren indirekten ELISA wurde die Reaktivität gegenüber den Subtypen von BoNT/E untersucht (Abb. 25). Es wurde rekombinantes scBoNT/E1, gereinigtes BoNT/E3 und der Bakterienüberstand des im RKI identifizierten Subtyps mit der vorläufigen Bezeichnung BoNT/Ex immobilisiert. Während BoNT/E1 und /E3 weniger als 2 % Sequenzunterschiede aufweisen, zeigt BoNT/Ex eine Abweichung von ca. 8 % auf Aminosäure-Ebene (interne Information).

E1346, E1447, E3128 und E3194 waren in der Lage, im indirekten ELISA scBoNT/E1 und BoNT/E3 sowie den noch nicht publizierten Subtyp /Ex nachzuweisen. Alle zeigten dabei eine klare Präferenz für BoNT/E1 und /E3. E3226 erkannte BoNT/Ex nur sehr schwach. Wie bereits bekannt, detektierten die mAk E136 und E173 BoNT/E1 und /E3. E163 war spezifisch für BoNT/E3. Der pAk KE97 erkannte, wie die im Rahmen dieser Arbeit generierten mAks, alle Subtypen.

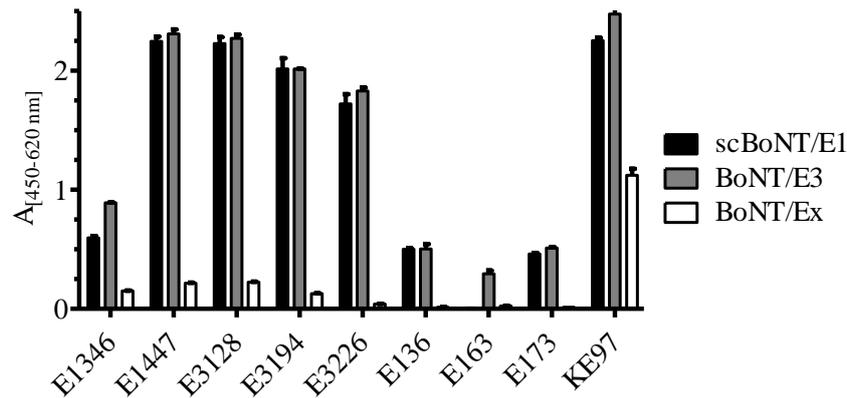


Abb. 25: Reaktivität der anti-BoNT/E Antikörper gegen Subtypen von BoNT/E
 scBoNT/E1 und /E3 wurden mit je 500 ng/ml in PBS/1 µg/ml BSA immobilisiert. Bakterieller Überstand des Subtyps BoNT/Ex wurde in einer 1:30 Verdünnung verwendet. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die mAk in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD gekoppelten Ziege-anti-Spezies Antikörper und TMB.

Die Affinität der Antikörper wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht (*Abb. 26*). Der jeweilige Antikörper wurde mittels Mouse-Capture-Kit auf der Goldoberfläche immobilisiert und die Bindungskinetik gegen das Teilfragment H_C/E1 gemessen. Es wurden Verdünnungsreihen von 1 000 nM bis 4,2 nM injiziert, anhand der gemessenen Assoziations- und Dissoziationsraten wurde mit Hilfe eines 1:1 Langmuir Bindungsmodells die Affinität der Antikörper bestimmt. Die Affinitäten aller Antikörper lagen im zweistelligen nM-Bereich (*Tab. 25*). Der Antikörper mit der höchsten Affinität war E1447 (13 nM), der mit der geringsten Affinität E1346 (57 nM).

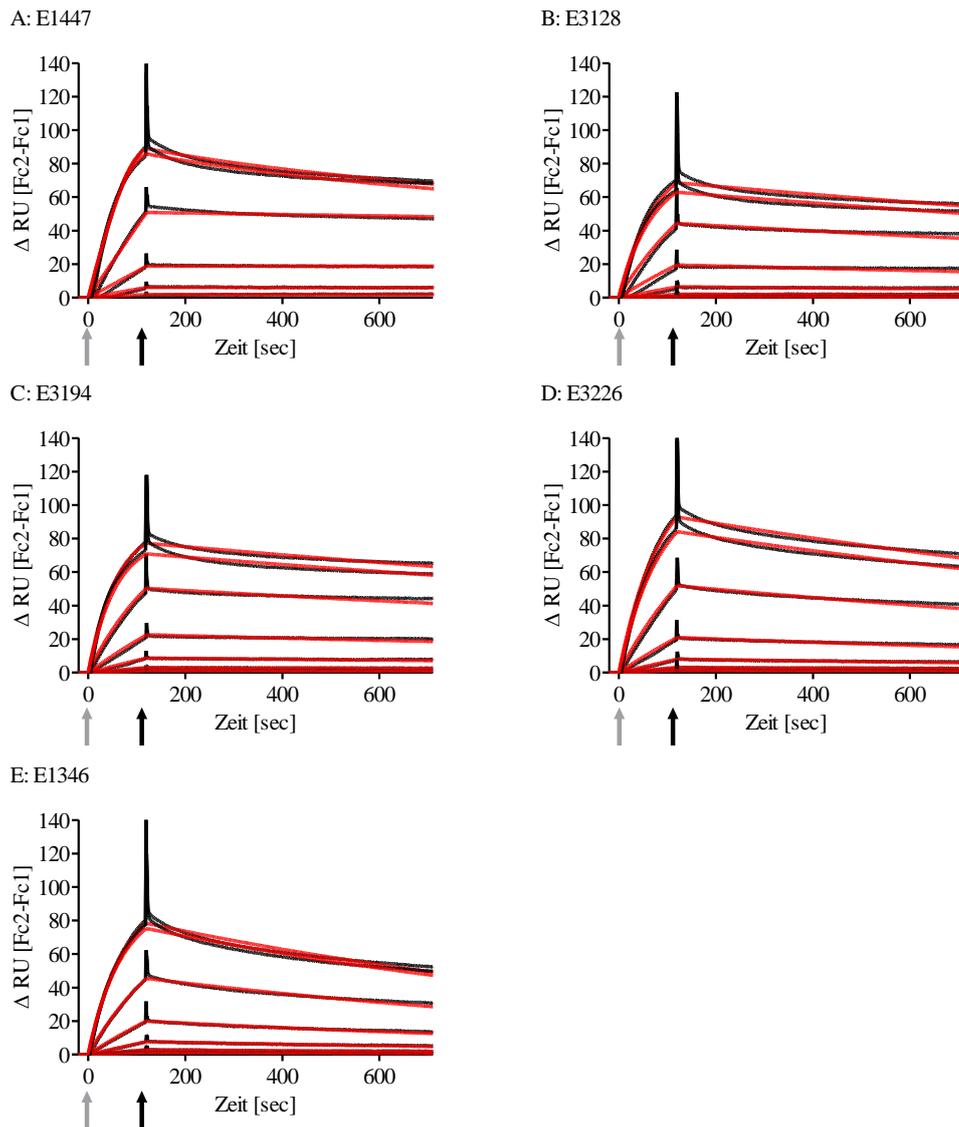


Abb. 26: Kinetische Charakterisierung der anti- H_C/E Antikörper

Die Antikörper E1447 (A), E3128 (B), E3194 (C), E3226 (D) oder E1346 (E) wurden mittels Mouse-Capture-Kit auf der Flusszelle 2 mit 100 bis 300 RU immobilisiert. Flusszelle 1 wurde als Negativkontrolle verwendet. $H_C/E1$ wurde in einer 1:3 Verdünnungsreihe von 1 000 nM bis 4,2 nM für 120 sec injiziert (grauer Pfeil). Die Dissoziation der Antikörper-Antigen-Komplexe wurde durch die Injektion von HBS-EP+ gestartet (schwarzer Pfeil) und 600 sec beobachtet. In Schwarz sind die gemessenen Kurven dargestellt, in Rot der Fit der Kurven (1:1 Langmuir-Bindungsmodells mit lokalen R_{max} , siehe 2.2.5.6).

3.2.5 Sandwich ELISA

Die fünf im Rahmen der Arbeit generierten Antikörper wurden zur Etablierung eines Sandwich ELISA verwendet, welcher die in der Arbeitsgruppe vorhandenen BoNT/E Subtypen /E1, /E3 und den nicht publizierten Subtyp /Ex erkennen sollte. Wie sich in Vorversuchen zeigte, waren die Ak E1447, E3128, E3194 und E3226 nicht als Fängerantikörper geeignet (Daten nicht dargestellt). E1346, der aus der Fusion der immunisierten Maus mit unterschiedlichen H_C-Fragmenten gewonnen wurde, ist wie der pAk KE97 als Fängerantikörper einsetzbar. Als bester Detektionsantikörper erwies sich E1447-bio. Mit diesen Antikörpern ließen sich sensitive Nachweissysteme für BoNT/E entwickeln, wobei scBoNT/E1 und /E3 etwa gleich gut detektiert wurden (*Abb. 27 links*). Die Kombination aus den beiden monoklonalen Antikörpern E1346 und E1447-bio zeigte ein LOD von etwa 1 ng/ml BoNT/E1 bzw. /E3 (*Abb. 27 links*). Der Einsatz von KE97 als Fängerantikörper verbesserte das Detektionslimit auf ca. 20 pg/ml BoNT/E, die EC₅₀ lag bei ca. 0,6 ng/ml.

Der Überstand des neu entdeckten Subtyps BoNT/Ex wurde mit KE97 und E1447-bio bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁵ detektiert (*Abb. 27 rechts*). Die Kombination aus E1346 und E1447-bio war fünfzigfach weniger sensitiv.

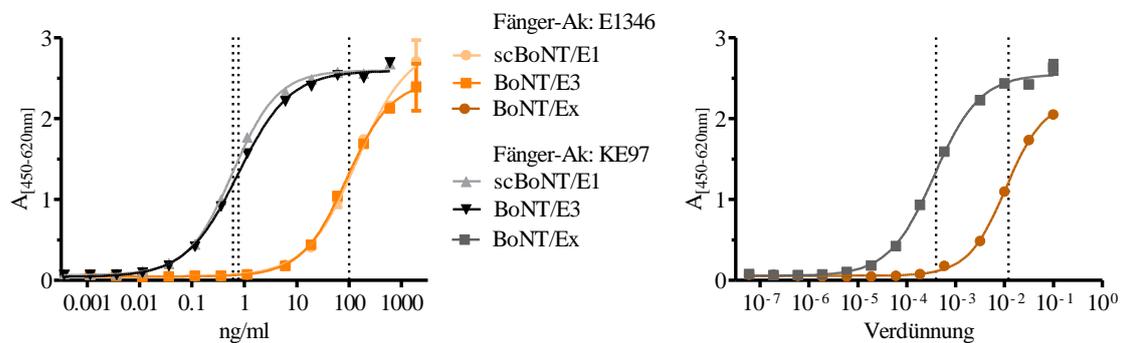


Abb. 27: Sandwich ELISA zum Nachweis von BoNT/E1, /E3 und /Ex

Die Fängerantikörper E1346 (orange) bzw. KE97 (schwarz/grau, je 5 µg/ml) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurden die Platten mit scBoNT/E1, BoNT/E3 (links) in Konzentrationen von 2 000 ng/ml bis 0,3 pg/ml in 0,1 % BSA/PBS inkubiert. Der Überstand des Subtyps BoNT/Ex (rechts) wurde von 1:10 bis 1:6 × 10⁻⁸ in 0,1 % BSA/PBS verdünnt. Nach Zugabe des biotinylierten Detektionsantikörper E1447-biotin (2,5 µg/ml) wurde der ELISA mit Hilfe eines polymeren Streptavidin-Peroxidase-Konjugats und TMB entwickelt. Dargestellt sind die Duplikate eines repräsentativen Experiments von drei durchgeführten, gestrichelt wurde die EC₅₀ eingezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf neue Antikörper gegen BoNT/E generiert (*Tab. 25*). E1346, E1447, E3128, E3194 und E3226 waren in der Lage, alle vorhandenen BoNT/E Subtypen sowohl mittels indirektem als auch mittels Sandwich ELISA zu detektieren.

Zusammen mit dem pAk KE97 wurden sensitive Sandwich ELISA für BoNT/E1, /E3 und /Ex entwickelt.

Tab. 25: Zusammenfassung der anti-H_C/E Antikörper

<i>Name</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Indirekter ELISA</i>	<i>Sandwich ELISA</i>	<i>Western Blot</i>	<i>Affinität K_D [nM]</i>
E1346	H _C /E1, /E3 > /Ex	IgG1	++	++	+++	57
E1447	H _C /E1, /E3 > /Ex	IgG2b	+++	+++	++	13
E3128	H _C /E1, /E3 > /Ex	IgG2b	+++	++	++	28
E3194	H _C /E1, /E3 > /Ex	IgG2b	+++	++	+	19
E3226	H _C /E1, /E3 >> /Ex	IgG2b	+++	++	+	44

Die neu generierten anti-BoNT/E Antikörper wurden mittels indirektem und Sandwich ELISA sowie im Western Blot untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf den jeweiligen mAk mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität; + entspricht 10-50 % relative Signalintensität. Zudem wurden der Isotyp mittels Isotyping Kits und die Affinität gegenüber H_C/E1 mittels SPR bestimmt.

3.3 Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen veterinärpathogene BoNT

3.3.1 Immunisierungsstrategie und Screening

Neben den humanpathogenen Serotypen BoNT/A, /B, /E und /F werden von bestimmten *Clostridien* Neurotoxine gebildet, welche natürlicherweise Botulismus in Tieren auslösen. Im Rahmen des GEFREASE-Projektes sollte ein immunologischer Test für die veterinärmedizinisch relevanten Botulinum Neurotoxine BoNT/C und /D aufgebaut werden. Neben diesen beiden Formen existieren Mosaiktoxine mit der Bezeichnung BoNT/CD und /DC (Abb. 5). Durch frühere Arbeiten in der Arbeitsgruppe standen bereits mAk zur Verfügung, die eine Antikörper-basierte monospezifische Detektion von BoNT/C, /CD und /D erlaubten. Dazu wurde jeweils ein mAk gegen die leichte Kette von BoNT/C bzw. /CD (C394) oder von BoNT/D (D63) verwendet. Mit Hilfe des biotinylierten Detektionsantikörper C9 (gegen H_C/C) gelang der Nachweis von BoNT/C, mit dem biotinylierten Detektionsantikörper D967 der Nachweis von BoNT/CD und /D [265, 266]. Auf Basis dieser mAk konnten drei der vier veterinärpathogenen BoNT-Moleküle detektiert werden, der exklusive Nachweis von BoNT/DC war mit den vorhandenen Antikörpern nicht möglich.

Durch geeignete Immunisierungs- und Screeningsstrategien wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, diese Detektionslücke zu schließen. Dazu sollten monoklonale Antikörper generiert werden, die den C-terminalen Teil der schweren Kette von BoNT/C und /DC binden (siehe Abb. 5). Die Sequenzhomologie liegt hier bei ca. 74 %, so dass ein gemeinsames Epitop erwartet wurde.

Eine BALB/c-Maus wurde mit dem rekombinant hergestellten H_C/C Fragment immunisiert (Immunisierungsschema in 9.1.3, die H_C/DC-Domäne stand nicht rekombinant zur Verfügung). Nach drei Immunisierungen war ein stabiler Titer gegen H_C/C messbar (9.1.3), nach sechs Immunisierungen mit je 50 µg Toxinfragment in Adjuvans und drei kurz vor der Fusion durchgeführten Injektionen des Antigens in PBS wurde die Milz entnommen und mit Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert. Es wurden mittels indirektem ELISA ca. 4400 Hybridoma-Überstände auf Reaktivität gegen natives, gereinigtes BoNT/C und /DC getestet. Es wurden zehn Hybridomaklone mit herausragender Affinität und Spezifität gegen BoNT/C identifiziert. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technik wurden die besten drei (HcC141/18/13, HcC515/24/11 und HcC1304/1/3), die gegen zwei verschiedene Epitope gerichtet waren (siehe 9.6), ausgewählt und expandiert. Alle Hybridoma-Überstände wurden zusätzlich gegen BoNT/DC eingesetzt, dabei wurde unter 4400 genau ein Antikörper mit Reaktivität gegen BoNT/DC gefunden (HcC2378/20/12).

3.3.2 Charakterisierung der anti-BoNT/C und /DC Antikörper

Zur Überprüfung der Reaktivität und Spezifität gegenüber diversen Toxinen wurden die generierten Antikörper mittels indirektem ELISA untersucht. Die mAk HcC141, HcC515 und HcC1304 erkannten BoNT/C, BoNT/C Komplex und rekombinantes scBoNT/C (*Abb. 28*). Der Antikörper HcC2378 zeigte Reaktivität gegen die genannten Toxine, zusätzlich etwas schwächer gegen BoNT/DC und den zugehörigen Komplex und keine gegen rekombinantes BoNT/D, wie zu erwarten war.

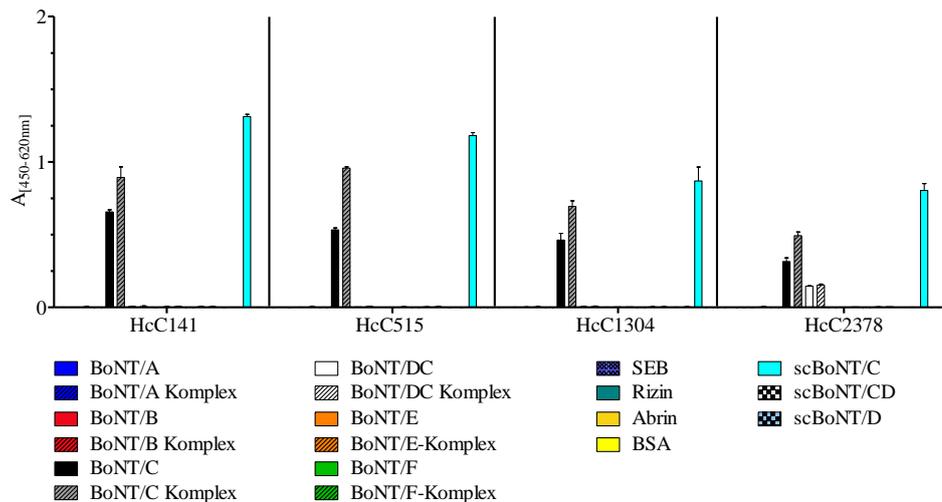


Abb. 28: Reaktivität der anti-H_C/C Antikörper

Die angegebenen Toxine wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die mAk HcC141, HcC515, HcC1304 und HcC2378 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

Die gereinigten mAk wurden im Western Blot (*Abb. 29*) auf Subkettenspezifität untersucht, wobei eine spezifische Bande für H_C/C bei etwa 50 kDa zu erkennen war. Die weiteren Toxinfragmente erzeugten keine Reaktion.

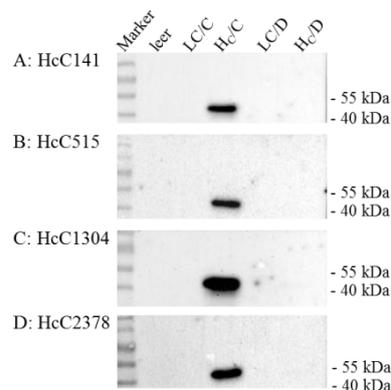


Abb. 29: Western Blot: Spezifität der anti-H_C/C Antikörper

Je 67 ng der rekombinanten Toxinfragmente LC/C, H_C/C, LC/D und H_C/D wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Blocken wurde jeweils 1 µg/ml HcC141, HcC515, HcC1304 und HcC2378 zugegeben. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörpers, Avidin-Alkalische Phosphatase und CDP-Star. Als Marker M wurde PageRuler prestained benutzt. Entwicklungsdauer: 3 bis 20 min.

Zur Charakterisierung der in dieser Fusion identifizierten Antikörper wurden detaillierte Messungen der Affinität mittels SPR durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper wie bei den anderen Messungen mittels Mouse-Capture-Kit auf der Goldoberfläche des Sensorchips immobilisiert und die Bindungskinetik gegen inaktives *single chain* BoNT/C (scBoNT/C_i) getestet. Es wurden Verdünnungsreihen von 200 nM bis 0,82 nM injiziert. Anhand der gemessenen Assoziations- und Dissoziationsraten wurde mit Hilfe eines 1:1 Langmuir Bindungsmodells die Affinität der Antikörper bestimmt (Abb. 30). Es wurde für HcC141 eine Affinität von 0,04 nM gegenüber scBoNT/C_i berechnet. Die Affinität der anderen Antikörper HcC515, HcC1304 und HcC2378 lag bei 0,5 nM, 1 nM und 0,02 nM (Tab. 26). Alle Antikörper wiesen somit eine hoch-affine Bindung gegen BoNT/C auf. Die Affinitätsbestimmung von HcC2378 gegenüber BoNT/DC konnte nicht durchgeführt werden, da dieses nicht in einer atoxischen Variante vorlag.

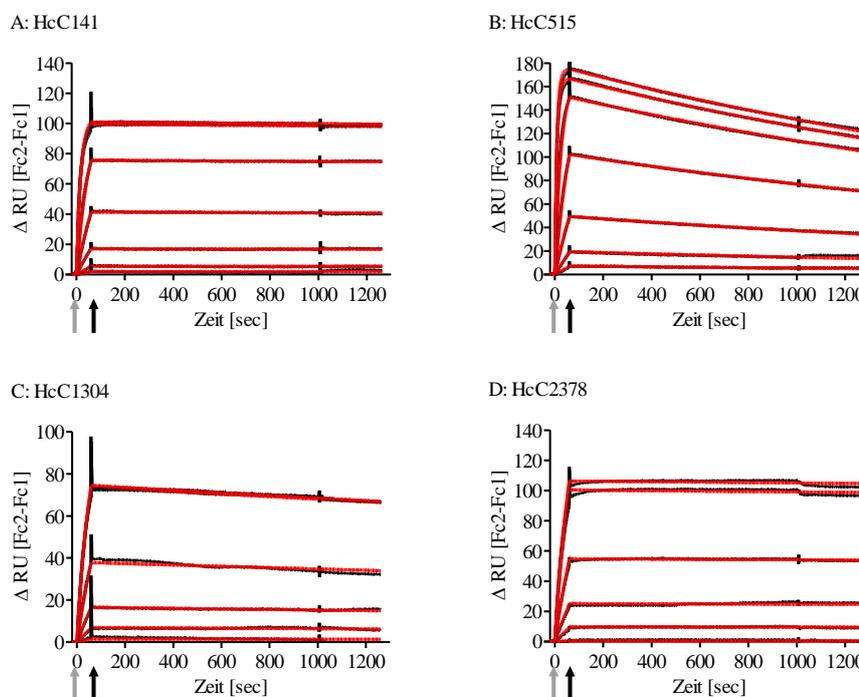


Abb. 30: Kinetische Charakterisierung von HcC141, HcC515, HcC1304 und HcC2378

Die Antikörper HcC141 (A), HcC515 (B), HcC1304 (C) oder HcC2378 (D) wurden mittels Mouse-Capture-Kit auf der Flusszelle 2 mit 100 bis 300 RU immobilisiert. Flusszelle 1 wurde als Negativkontrolle verwendet. ScBoNT/C_i wurde in einer 1:3 Verdünnungsreihe von 200 nM bis 0,82 nM für 60 sec injiziert (grauer Pfeil). Die Dissoziation der Antikörper-Antigen-Komplexe wurde durch die Injektion von HBS-EP+ gestartet (schwarzer Pfeil) und 1 200 sec beobachtet. In Schwarz sind die gemessenen Kurven dargestellt, in Rot der Fit der Kurven (1:1 Langmuir-Bindungsmodells mit lokalen R_{\max} , siehe 2.2.5.6)

Zusätzlich wurden die Epitopfamilien der Antikörper mittels SPR bestimmt. Die mAk HcC141, HcC1304 und HcC2378 erkannten unterschiedliche Epitope und konnten daher miteinander für einen spezifischen und sensitiven Nachweis des C-terminalen Teils der schweren Ketten von

BoNT/C kombiniert werden. Die mAk HcC141 und HcC515 detektierten ähnliche Epitope (Daten siehe 9.6).

3.3.3 Sandwich ELISA

Basierend auf diesen Antikörpern wurde ein ELISA etabliert, der spezifisch das H_C/C-Fragment nachweist. Alle vier Antikörper konnten untereinander sowie teilweise (HcC1304, HcC2378) mit dem bereits vorhandenen Antikörper C9 kombiniert werden. Aufgrund von Vorversuchen (Daten nicht dargestellt) wurde die Kombination HcC141 und HcC1304 ausgewählt. Wie in *Abb. 31* zu sehen, entstanden ELISA mit hoher Sensitivität. Die Detektion von BoNT/C (150 kDa) und dem Teilfragment H_C/C (50 kDa) gelang mit gleicher Sensitivität. Welcher Ak als Fänger oder Detektor eingesetzt wurde, spielte eine untergeordnete Rolle. Die halbmaximale Effektorkonzentration EC₅₀ lag bei allen Kurven bei 6 pM. Die LOD wurde auf 0,1 pM geschätzt, was etwa 15 pg/ml BoNT/C entspricht.

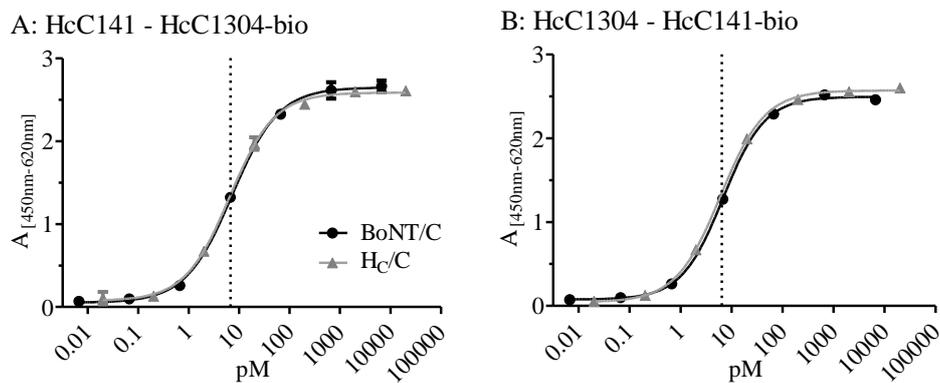


Abb. 31: Sandwich ELISA zum Nachweis von BoNT/C und H_C/C

Die Fängerantikörper HcC141 (A) bzw. HcC1304 (B, je 5 µg/ml) wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurden die Platten mit BoNT/C bzw. H_C/C in Konzentrationen von 0,01 bis 10 000 pM in 0,1 % BSA/PBS inkubiert. Nach Zugabe der biotinylierten Detektionsantikörper HcC141-biotin (B) oder HcC1304-biotin (A) wurde der ELISA mit Hilfe von Poly-HRP und TMB entwickelt. Dargestellt sind die Duplikate eines repräsentativen Experiments von zwei durchgeführten, gestrichelt ist die EC₅₀ markiert.

Mit Hilfe dieser Antikörper wurde untersucht, ob eine Differentialdiagnostik der tierpathogenen Botulinum Neurotoxine BoNT/C, /CD, /D und /DC möglich ist. Durch die aus früheren Arbeiten bereits vorhandenen Antikörper-Kombinationen wurden BoNT/C, /CD und /D nachgewiesen. Der mAk HcC2378 detektierte BoNT/DC (*Abb. 28*). Die Antikörper HcC141, HcC515 und HcC1304 waren spezifisch für H_C/C, erkannten allerdings nicht H_C/DC (*Abb. 28*). Um einen spezifischen Sandwich ELISA für BoNT/DC zu etablieren, wurde der in dieser Arbeit generierte mAk HcC2378 mit dem bereits vorhandenen mAk D63 (gegen LC/D) kombiniert. Der ELISA zum Nachweis von BoNT/DC erwies sich als sehr sensitiv (*Abb. 32*). Das Detektionslimit lag bei 26 pg/ml in Puffer, die EC₅₀ bei 1,6 ng/ml (entspricht 1,07 nM). Genauere Details zu diesem ELISA finden sich in *Tab. 30*.

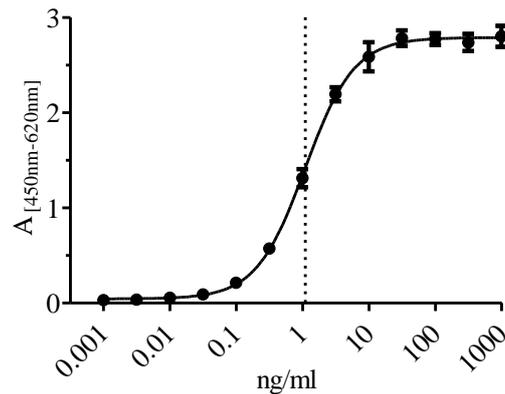


Abb. 32: Sandwich ELISA zum Nachweis von BoNT/DC

Der Fängerantikörper HcC2378 (5 µg/ml) wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurde die Platte mit einer seriellen Verdünnung von 1 pg/ml bis 1 µg/ml BoNT/DC in 0,1 % BSA/PBS inkubiert. Nach Zugabe des biotinylierten Detektionsantikörper D63-biotin (2,5 µg/ml) wurde der ELISA mit Hilfe von Poly-HRP und TMB entwickelt. Im Bild wurden drei ELISA jeweils in Triplikaten mit SD (Fehlerbalken) übereinandergelegt, gestrichelt wurde die EC_{50} eingezeichnet.

Tab. 26 fasst die neu generierten anti- H_C/C Antikörper zusammen. Durch die Immunisierung mit H_C/C ist es gelungen, hoch-affine und spezifische Antikörper gegen diese Toxindomäne zu erhalten. Einer der Antikörper war in der Lage, an H_C/C und H_C/DC zu binden und wurde daher für die Detektion von BoNT/DC in Kombination mit einem anti-BoNT/D Antikörper verwendet. Die neu etablierten Sandwich ELISA dienten zum Nachweis von BoNT/C, /DC und H_C/C .

Tab. 26: Zusammenfassung der anti- H_C/C Antikörper

Name	Spezifität	Isotyp	Indirekter ELISA	Sandwich ELISA	Western Blot	Affinität K_D [nM]
HcC141	H_C/C	IgG1	+++	+++	+++	0,04
HcC515	H_C/C	IgG2b	+++	++	++	0,5
HcC1304	H_C/C	IgG1	++	+++	+	1
HcC2378	$H_C/C, H_C/DC$	IgG1	+	+++	+	0,02

Die vier neu generierten anti- H_C/C Antikörper wurden mittels indirektem und Sandwich ELISA sowie mittels Western Blot untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf den jeweiligen mAk mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität, + entspricht 10-50 % relative Signalintensität. Zudem wurden der Isotyp mittels Isotyping Kits und die Affinität mittels SPR analysiert.

3.4 Generierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Abrin

Im Rahmen des GEFREASE-Projektes sollten monoklonale Antikörper gegen Abrin aus *Abrus precatorius* hergestellt werden. Abrin liegt in verschiedenen Isoformen (Abrin-a,-b,-c,-d; vergleiche 1.1.3) vor. Davon ist das nahverwandte, weniger toxische *Abrus* Agglutinin zu unterscheiden. Die biochemische Trennung der einzelnen Proteine ist aufgrund der Ähnlichkeit nicht trivial. *Abrus* Agglutinin und Abrin-a haben eine 67%ige Sequenzidentität auf Proteinebene in der A-Kette und 80 % in der B-Kette [210, 211]. Tab. 27 zeigt die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Extrakte, welche mittels Massenspektrometrie und SDS-PAGE charakterisiert wurden.

Tab. 27: Abrin Extrakte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Inhalt</i>	<i>Bemerkung</i>
Abrin Rohextrakt	Abrin-a, Abrin-b, <i>Abrus</i> Agglutinin und weitere Proteine	nach Lektin-Affinitätschromatographie
<u>nach Größenausschluss-Chromatographie</u>		
Abrin-a	Abrin-a	Reinheit > 90 %
<i>Abrus</i> Agglutinin	<i>Abrus</i> Agglutinin	Reinheit > 90 %
Abrin Mischung	Abrin-a, Abrin-b, <i>Abrus</i> Agglutinin	mittlere Fraktion der Chromatographie

Diese Extrakte wurden freundlicherweise von Dr. Sylvia Worbs (RKI) zur Verfügung gestellt.

In Vorarbeiten (Dr. Sylvia Worbs, unpublizierte Daten) wurden bereits die mAk AP406 und AP430 gegen Abrin-a isoliert und charakterisiert. Zwei weitere Antikörper, AP267 und AP476, detektierten *Abrus* Agglutinin. Mit diesem Set an Antikörpern war es nicht möglich, Sandwich ELISA aus zwei monoklonalen Antikörpern aufzubauen. Zur Detektion musste bisher auf einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen (KAP142), welcher durch Immunisierung mit toxoidiertem Abrin Rohextrakt erhalten worden war, zurückgegriffen werden.

3.4.1 Immunisierungsstrategie und Screening

Um weitere Abrin-spezifische monoklonale Antikörper zu erzeugen, wurde je eine BALB/c- und eine NMRI-Maus mit toxoidiertem Abrin Rohextrakt (siehe 2.2.3.1) und mit in einem Fall nativen Rohextrakt immunisiert. Die NMRI-Maus wurde viermal ausschließlich mit Toxoid immunisiert, die BALB/c-Maus wurde während des langen Zeitraums der Immunisierung insgesamt dreizehnmal mit Toxoid bzw. variablen Mengen des aktiven Toxins immunisiert (siehe Immunisierungsschema 9.1.4).

Nachdem ein zufriedenstellender Titer erreicht worden war (9.1.4), wurden Hybridomafusionen durchgeführt. Aus der NMRI-Maus wurden 255 Millionen Splenozyten isoliert, aus der BALB/c 95 Millionen Splenozyten. Die Zellen wurden mit Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert. Nach zehn Tagen wurde mit einem mehrstufigen Screening begonnen.

Als Erstes wurden die Überstände mittels indirektem ELISA auf Bindung eines immobilisierten Abrin Rohextrakts untersucht. Zeigte sich hier eine Bindung, wurden die Überstände als Zweites mittels SPR (*single cycle* Kinetik) und Sandwich ELISA analysiert.

Die aus der NMRI-Maus gewonnenen Hybridoma-Überstände wurden über Nacht auf einer MaxiSorp-Platte inkubiert. Nach dem Blocken unspezifischer Bindungen wurde Abrin Rohextrakt zugegeben. Der Nachweis erfolgte mit den biotinylierten Antikörpern AP430-bio und KAP142-bio. Bei keinem der über 700 getesteten Hybridoma-Überstände ergab sich im Sandwich ELISA ein positives Signal, obwohl diese Überstände im ersten Screening (indirekter ELISA auf immobilisierten Abrin Rohextrakt) positiv waren. Eine Bindung von nativem Abrin Rohextrakt schien nicht möglich. Technisch unabhängig wurde diese Aussage durch die SPR bestätigt. Hier war kein Antikörper in der Lage, Bestandteile des Abrin Rohextraktes in Lösung zu fangen. Aus dieser Fusion wurden dennoch vier Klone isoliert und die zugehörigen Antikörper gereinigt und charakterisiert (AP10/1/11, AP54/11/2, AP60/3/9 und AP69/3/3).

Die Antikörper aus der zweiten Fusion der BALB/c-Maus erwiesen sich als deutlich vielversprechender. Es wurden 3 800 Hybridoma-Überstände wie oben mittels indirektem ELISA untersucht. Bei einer Absorption $A_{450\text{nm}-620\text{nm}}$ größer als 0,1 wurden die entsprechenden Überstände mit SPR analysiert. Dabei wurden unter 200 getesteten Antikörpern vier mit Bindung an den nativen Abrin Rohextrakt entdeckt. Die zugehörigen Zellen wurden subkloniert und expandiert. Es wurden vier mAk gegen Abrin oder *Abrus* Agglutinin identifiziert (AP2573/16/7, AP3202/4/6, AP3659/6/8, AP3808/8/7), welche im folgenden Kapitel genauer charakterisiert werden.

3.4.2 Charakterisierung der anti-Abrin Antikörper

Die in beiden Fusionen identifizierten Antikörper wurden auf Spezifität gegenüber diversen Toxinen untersucht. Dazu wurden BoNT/A bis /F, die zugehörigen Komplexe, SEB, Rizin Rohextrakt und Abrin Rohextrakt auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die mAk zugegeben. Es ergab sich bei den Antikörpern AP54, AP60 und AP69 jeweils ein Signal für Abrin (Abb. 33). Der mAk AP10 erkannte Rizin genauso gut wie Abrin. Diese interessante Kreuzreaktivität könnte zukünftig als Basis für eine nicht-differenzierende Anreicherungsstrategie von Rizin und Abrin (z. B. für MS-basierte Identifizierung) genutzt werden.

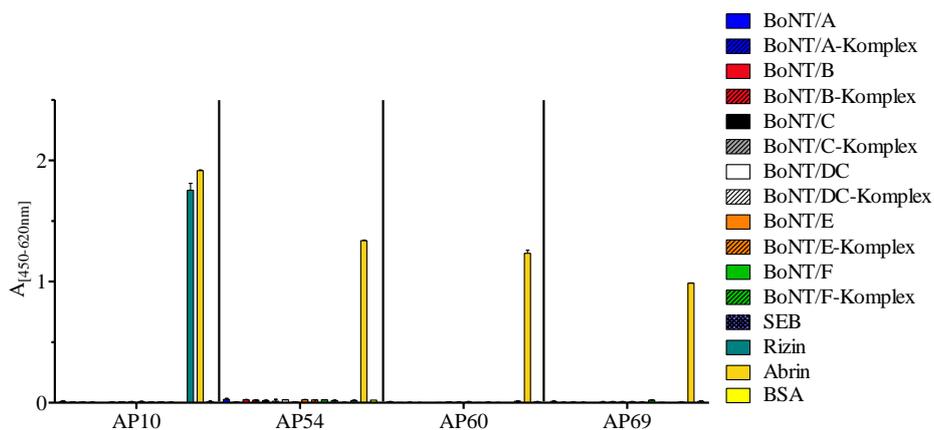


Abb. 33: Reaktivität der anti-Abrin Antikörper (1. Fusion, NMRI)

Die angegebenen Toxine wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die mAk AP10, AP54, AP60 und AP69 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

Die mAk AP2573, AP3202, AP3659 und AP3808 wurden auf gleiche Weise in einem indirekten ELISA untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass diese vier Antikörper spezifisch für Abrin waren (Daten nicht dargestellt).

Alle acht Antikörper wurden auf die Erkennung der gereinigten Fraktionen von Abrin Rohextrakt (vergleiche Tab. 27) getestet. Dazu wurden Abrin Rohextrakt, Abrin-a, *Abrus* Agglutinin sowie eine Mischung von *Abrus* Agglutinin, Abrin-a und -b (Mischfraktion aus der Größenauschluss-Chromatographie) mittels indirektem ELISA untersucht (Abb. 34).

AP10 erkannte alle untersuchten Extrakte gleich gut. Die beiden mAk AP54 und AP69 erkannten ebenso wie die Klone aus der zweiten Fusion AP3659 und AP3808 schwach Abrin-a und *Abrus* Agglutinin. Bei Auftrag einer Mischung aus Abrin-a, *Abrus* Agglutinin und Abrin-b zeigte sich ein hohes Signal. Es wurde daher vermutet, dass diese vier Klone Abrin-b erkannten. Dies konnte experimentell nicht verifiziert werden, da das Toxin nicht in gereinigtem Zustand vorlag. AP2573 erwies sich als spezifisch für *Abrus* Agglutinin, AP60 und AP3202 für Abrin-a.

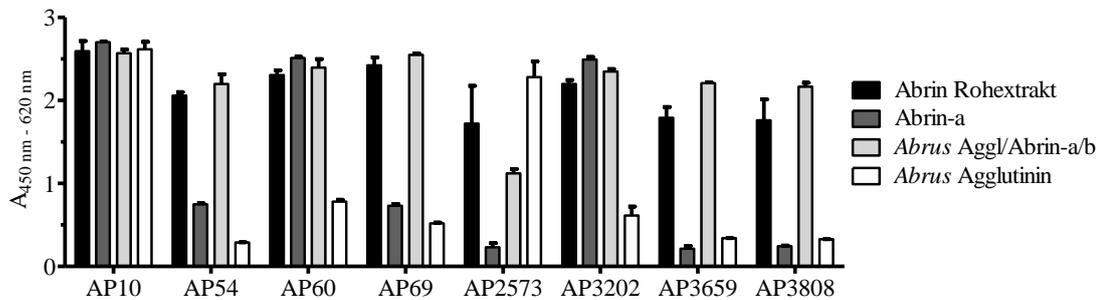


Abb. 34: Spezifität der anti-Abrin Antikörper

Die angegebenen Proteine wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde je 10 µg/ml der acht anti-Abrin Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

Die mAk AP3202 und AP2573 wurden zusätzlich mittels SPR untersucht (Abb. 35). Dabei wurde für AP3202 eine Verdünnungsreihe von Abrin-a injiziert, bei AP2573 wurde *Abrus* Agglutinin verwendet. Die Affinität lag bei 0,5 nM für AP3202 und bei 0,05 nM für AP2573. AP3808 und AP3659 konnten nicht getestet werden, da der potenzielle Interaktionspartner Abrin-b nicht in gereinigter Form vorlag.

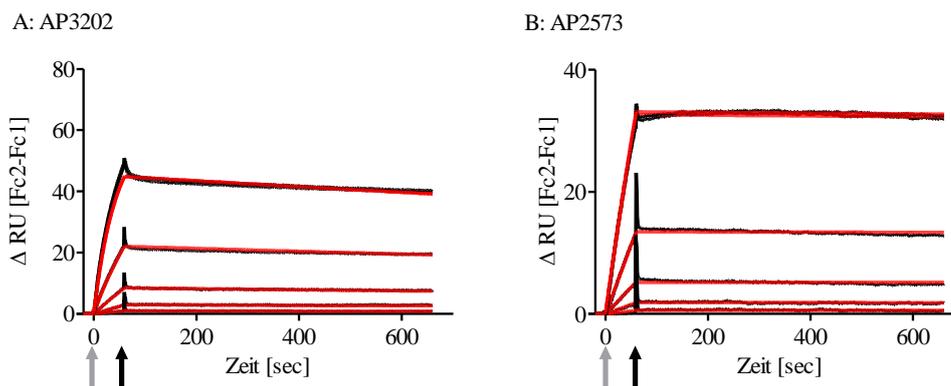


Abb. 35: Kinetische Charakterisierung von AP3202 und AP2573

Der Antikörper AP3202 (A) oder AP2573 (B) wurde mittels Mouse-Capture-Kit auf der Flusszelle 2 mit 100 bis 300 RU immobilisiert. Flusszelle 1 wurde als Negativkontrolle verwendet. Abrin-a (A) bzw. *Abrus* Agglutinin (B) wurde in einer 1:3 Verdünnungsreihe von 55,3 nM bis 0,23 nM für 60 sec injiziert (grauer Pfeil). Die Dissoziation der Antikörper-Antigen-Komplexe wurde durch die Injektion von HBS-EP+ gestartet (schwarzer Pfeil) und 600 sec beobachtet. In Schwarz sind die gemessenen Kurven dargestellt, in Rot der Fit der Kurven (1:1 Langmuir-Bindungsmodell mit lokalen R_{max} , siehe 2.2.5.6).

Die mAk AP10, AP54, AP60 und AP69 erwiesen sich als ungeeignet für eine Verwendung im Sandwich ELISA Format. Sie eigneten sich für Western Blot Analysen (beispielhaft gezeigt für AP54 und AP69 in Abb. 36). AP54 erkannte zwei Epitope des reduzierten Abrin Rohextraktes, es entstanden zwei Banden bei ca. 30 und bei ca. 25 kDa. AP69 detektierte hingegen nur ein Epitop bei 35 kDa. Bei beiden mAk vermutete man eine Spezifität für Abrin-b, der Western Blot zeigt, dass diese Ak nicht das gleiche Epitop erkannten.

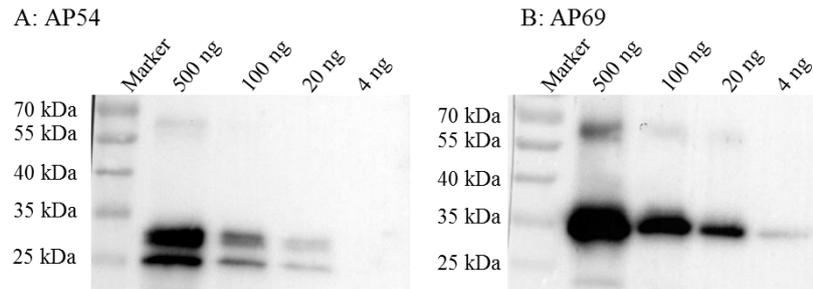


Abb. 36: Western Blot zweier anti-Abrin Antikörper

Auf einem 12 % SDS-Gel wurden unter reduzierenden Bedingungen folgende Mengen Abrin Rohextrakt aufgetrennt: 500 ng, 100 ng, 20 ng und 4 ng. Nach dem Blocken erfolgte die Entwicklung mit 1:10 verdünnten Hybridoma-Überstand von AP54 (A) und AP69 (B), biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörpers, Avidin-Alkalische Phosphatase und CDP-Star. Als Marker M wurde PageRuler prestained benutzt. Entwicklungsdauer: 3 min.

3.4.3 Sandwich ELISA

Die erzeugten Antikörper wurden für die Verwendung im Sandwich ELISA untersucht. In Vorversuchen (ELISA und SPR) zeigte sich, dass die mAk AP10, AP54, AP60 und AP69 bedingt zum Aufbau eines Sandwich ELISA geeignet waren, da sie mit Abrin Rohextrakt in Lösung schlecht interagieren konnten. Durch die Kombination dieser mAk mit den vorhandenen Antikörpern AP406 sowie dem polyklonalen KAP142 ergaben sich Sandwich ELISA mit sehr geringer Sensitivität (halbmaximale Effektorkonzentration EC_{50} zwischen 12 und 360 ng/ml Abrin Rohextrakt bei oft hohem Hintergrund, Daten nicht dargestellt).

Aus diesem Grund lag der Schwerpunkt auf den Antikörpern der 2. Fusion, AP2573, AP3202, AP3659 und AP3808. Die mAk AP3659 und 3808 erkannten vermutlich Abrin-b, welches nicht gereinigt zur Verfügung stand. Bei der Verwendung von Rohextrakt konnte kein sensitiver Sandwich ELISA aufgebaut werden. Daher wurde vorerst auf die Entwicklung eines Sandwich ELISAs gegen Abrin-b verzichtet.

Primäres Ziel war es, Sandwich ELISAs zur Detektion von Abrin-a und *Abrus* Agglutinin zu entwickeln. Zur Detektion von Abrin-a waren insgesamt drei mAks verfügbar, AP430 und AP406 aus einer vorhergehenden Fusion sowie AP3202. AP430 und AP406 ließen sich nicht miteinander zu einem sensitiven Nachweissystem kombinieren, da sich vermutlich die Epitope überdeckten. Der mAk AP3202 bildete mit beiden zuvor genannten ein Sandwich ELISA Pärchen. Das Detektionslimit für Abrin-a war am niedrigsten, wenn die Kombination AP430 als Fänger- und AP3202 als Detektionsantikörper eingesetzt wurden (Abb. 37 A). Die Nachweisgrenze lag bei etwa 10 pg/ml Abrin-a (schwarz), die EC_{50} bei ca. 150 pg/ml. Es zeigte sich bei hohen Konzentrationen (> 1 ng/ml) eine Reaktivität auf *Abrus* Agglutinin (grau, EC_{50} 25 ng/ml).

Für die Detektion von *Abrus* Agglutinin standen zwei monoklonale Antikörper zur Verfügung, AP476 und AP2573. Es wurde eine klare Verbesserung der Sensitivität erreicht, wenn AP476 als Fängerantikörper eingesetzt wurde (Abb. 37 B). Zusätzlich wurde die Kreuzreaktivität auf das nahverwandte Abrin-a bestimmt. Das Detektionslimit für *Abrus* Agglutinin wurde auf ca. 30 pg/ml geschätzt (grau), die EC₅₀ lag bei 900 pg/ml. Die Nachweisgrenze für Abrin-a lag ca. 2 Größenordnungen höher (schwarz).

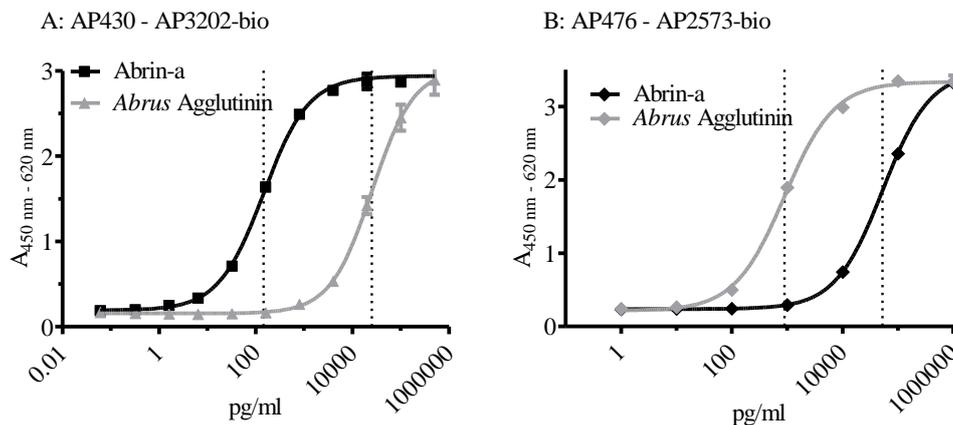


Abb. 37: Sandwich ELISA zur Detektion von Abrin-a und *Abrus* Agglutinin

Der Fängerantikörper AP430 (A) oder AP476 (B, je 5 µg/ml) wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Blockade der unspezifischen Bindungen wurde die Platte mit einer seriellen Verdünnungsreihe von 0,06 pg/ml bis 1 µg/ml Abrin-a (schwarz) bzw. *Abrus* Agglutinin (grau) in 0,1 % BSA/PBS inkubiert. Nach Zugabe des biotinylierten Detektionsantikörper AP3202-bio (A) oder AP2573-bio (B, je 2,5 µg/ml) wurde der ELISA mit Hilfe von Poly-HRP und TMB entwickelt. Dargestellt sind die Duplikate eines repräsentativen Experiments von zwei durchgeführten, gestrichelt wurde die EC₅₀ eingezeichnet.

3.4.4 ELLA

Der *enzyme-linked lectin assay* (ELLA) ist eine Variante des klassischen Sandwich *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). An die Stelle des Fängerantikörpers tritt ein Molekül, welches an seiner Oberfläche glykosyliert ist [285]. Asialofetuin (ASF), welches hier benutzt wurde, trägt drei Asparagin-verknüpfte komplexe Kohlenhydratketten mit terminalen N-Acetylgalactosamin-Einheiten [286]. Lektine wie Abrin oder das nahverwandte Rizin binden mit ihren Bindungstaschen an die N-Acetylgalactosamin-Einheiten. Die Anwesenheit der Toxine wird mit einem spezifischen Antikörper, an POD gekoppelten anti-Spezies Antikörper und TMB nachgewiesen.

Die vorhandenen Antikörper wurden durch diesen Test in zwei Gruppen eingeteilt (Abb. 38): Die erste Gruppe war in der Lage, den über Kohlenhydratgruppen gebundenen Abrin Rohextrakt zu detektieren. Bei diesen Antikörpern lag das Epitop also nicht an der gleichen Stelle wie die Zucker-Bindungstasche. Hierunter fielen die mAk AP476, AP2573, AP3202,

AP3659 und AP3808. Der polyklonale Antikörper aus Kaninchen KAP142 konnte ebenfalls zur Detektion eingesetzt werden.

Bei der zweiten Gruppe von mAks war eine Bindung nicht oder nur im geringen Ausmaß möglich. Hier fand keine bzw. geringe Interaktion der Antikörper mit ihrem Epitop statt und es kam zu keinen bzw. geringen Signalen. Dieses Bindungsverhalten ist erklärbar mit einer sterischen Hinderung, d. h. das vom mAk erkannte Epitop und die Kohlenhydrat-Bindungstasche überlappten vermutlich. Dazu gehörten die mAks AP406 und AP430. Antikörper, welche natives Abrin sehr schlecht banden, wie AP10, AP54, AP60 und AP69, gaben hier genauso ein negatives Signal.

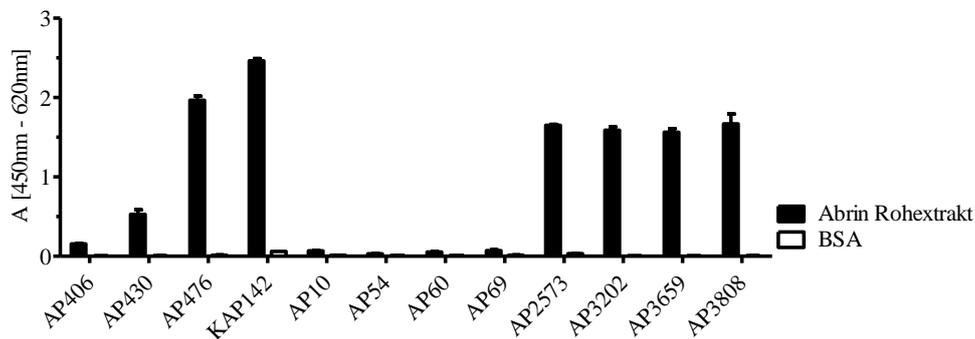


Abb. 38: Reaktivität der anti-Abrin Antikörper in einem ELLA

Asialofetuin wurde in einer Konzentration von 4 µg/ml über Nacht auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. 500 ng/ml Abrin Rohextrakt oder BSA wurden mit 5 µg/ml der angegebenen Antikörper für 90 min vorinkubiert. Nach der Blockade unspezifischer Bindungen wurde die Mischung auf die Asialofetuin-Platte überführt. Der ELLA wurde mit einem POD-gekoppelten anti-Spezies Antikörper und TMB entwickelt.

Tab. 28 fasst die neu generierten Ak gegen Abrin-a, -b und *Abrus* Agglutinin zusammen. AP3202 erkannte wie die bereits in der Arbeitsgruppe vorliegenden mAks AP406 und AP430 Abrin-a. Die Antikörper AP2573 und AP476 eigneten sich zur Detektion von *Abrus* Agglutinin. Der polyklonale Antikörper aus Kaninchen erfasste sowohl Abrin-a als auch *Abrus* Agglutinin. Zudem wurden mehrere Western Blot-taugliche Antikörper, AP10, AP54, AP60 und AP69, identifiziert. Die Antikörper mit vermuteter Reaktivität gegenüber Abrin-b konnten im Rahmen der Doktorarbeit nicht genauer charakterisiert werden.

Tab. 28: Zusammenfassung der anti-Abrin Antikörper

<i>Name</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Indirekter ELISA</i>	<i>Sandwich ELISA</i>	<i>Western Blot</i>	<i>ELLA</i>	<i>Affinität K_D [nM]</i>
AP10	Abrin-a+Aggl., Rizin	IgG2a	+++	+	++	-	n. d.
AP54	Abrin-b ¹	IgG1	++	-	++	-	n. d.
AP60	Abrin-a	IgG1	++	-	+++	-	n. d.
AP69	Abrin-b ¹	IgG1	++	-	+++	-	n. d.
AP2573	<i>Abrus</i> Aggl.	IgG1	++	+++	++	+++	0,05 ²
AP3202	Abrin-a	IgG1	+++	+++	++	+++	0,5 ³
AP3659	Abrin-b ¹	IgG2a	+++	++	+	+++	n. d.
AP3808	Abrin-b ¹	IgG2a	+++	++	+	+++	n. d.

Die neu generierten anti-Abrin Antikörper wurden mittels indirektem und Sandwich ELISA, im ELLA sowie mittels Western Blot untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf den jeweiligen mAk mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. + entspricht 10-50 % relative Signalintensität, - entspricht weniger als 10 % Reaktivität. Zudem wurden der Isotyp mittels Isotyping Kits und die Affinität mittels SPR analysiert. ¹ vermutet, aber nicht eindeutig experimentell bestätigt; ² gegenüber *Abrus* Agglutinin; ³ gegenüber Abrin-a; n. d. nicht durchgeführt.

3.5 Applikationsbeispiel: Differenzierung zwischen BoNT/C, /D und den Mosaik-Typen /CD und /DC

Botulismus in Tieren wird mit den Serotypen BoNT/C und /D assoziiert [128, 131]. Zusätzlich gibt es die Mosaikvarianten BoNT/CD und /DC, welche in Europa am häufigsten nachgewiesen wurden [120]. Eine sichere Detektion und Differenzierung der vier Mosaiktoxine war bisher nur auf genetischer Ebene möglich [120, 287]. Da Toxine in Abwesenheit eines Produzenten und seiner genetischen Information aktiv sein können, ist ein Nachweis auf Proteinebene zu bevorzugen.

Zu diesem Zweck wurden zwei Nachweissysteme auf immunologischer bzw. funktioneller Basis entwickelt: ein Sandwich ELISA und ein Endopep-MS Assay. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper gelang erstmals mit beiden Systemen eine Differenzierung der vier Mosaiktypen. Der Sandwich ELISA (3.5.1) ist einfach durchzuführen und sehr sensitiv. Bei Endopep-MS Assay (3.5.2) wird zusätzlich die Aktivität der Toxine nachgewiesen, allerdings ist diese Methode technisch anspruchsvoller und dauert zwei Tage.

3.5.1 Aufbau eines Sandwich ELISA Systems zur Differenzierung veterinärpathogener BoNTs

Um die veterinärpathogenen Toxine BoNT/C, /CD, /D und /DC zu unterscheiden, wurden monoklonale Antikörper gegen verschiedene Domänen der Toxine generiert (siehe *Abb. 5*). Dazu wurden Mäuse mit nicht-toxischen Varianten immunisiert, nach Bildung einer Immunantwort wurden die Milzen entnommen und die Splenozyten zu Hybridomazellen fusioniert. Nach Analyse der Spezifität und Affinität wurden die besten Hybridomazellen ausgewählt und die entsprechenden Antikörper charakterisiert.

Tab. 29 zeigt die relevanten Antikörper zur Differenzierung. Es handelte sich um vier Antikörper gegen BoNT/C und zwei gegen BoNT/D. Der mAk HcC10S wurde von L. Bellanger, CEA Frankreich, zur Verfügung gestellt. Die Spezifität wurde mittels Western Blot bestimmt (Daten siehe 9.7). C394 erkannte die leichte Kette von BoNT/C, die mAks C9, HcC10S und HcC2378 erkannten jeweils den C-terminalen Teil der schweren Kette von BoNT/C. Bei den beiden mAks für BoNT/D D63 und D967 lagen die Epitope auf zwei verschiedenen Fragmenten von BoNT/D (*Tab. 29*). Mittels SPR wurde die Affinität gegen scBoNT/C oder scBoNT/D_i analysiert, sie lag zwischen 0,1 und 0,4 nM. Eine Ausnahme davon war der mAk C394, dieser war deutlich affiner ($< 10^{-12}$ M).

Tab. 29: Überblick über die zur Differenzierung verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Isotyp	Affinität K_D [nM]	Ursprung	Spezifität			
					BoNT/C LC	BoNT/C H _C	BoNT/D LC	BoNT/D H _C
C394	Maus	IgG2b, λ	$< 10^{-3}$ ^(a)	RKI	+			
C9	Maus	IgG2b, κ	0,4 ^(a)	RKI		+		
HcC10S	Maus	IgG1, κ	0,1 ^(a)	CEA		+		
HcC2378	Maus	IgG1, κ	0,2 ^(a)	RKI		+		
D63	Maus	IgG2b, κ	0,4 ^(b)	RKI			+	
D967	Maus	IgG1, λ	0,1 ^(b)	RKI				+

Die Affinität wurde mittels SPR gegen (a) scBoNT/C oder (b) scBoNT/D_i bestimmt.

Aufgrund der Charakterisierung der Antikörper ([265, 266], unpublizierte Daten und diese Arbeit) wurden verschiedene mAk-Kombinationen gegen BoNT/C, /CD, /D und /DC untersucht. Dabei wurde immer ein mAk gegen die leichte Kette eines Toxins mit einem Antikörper gegen die H_C-Domäne kombiniert. Das Prinzip ist schematisch in *Abb. 39 A* dargestellt. Gleiche Antikörper werden in gleicher Farbe abgebildet.

Durch die mAk C394 und C9-bio war ein sensitiver Nachweis von BoNT/C möglich. Die Kombination C394 und D967-bio detektierte BoNT/CD, die Kombination D63 und D967-bio BoNT/D. Der Einsatz von HcC10S und D63-bio erlaubte den Nachweis von BoNT/DC, ebenso wie die Kombination HcC2378 und D63-bio (vergleiche *Abb. 32*). Der Antikörper HcC10S erkannte, wie der in dieser Arbeit beschriebene HcC2378, ein Epitop in der H_C-Domäne von BoNT/C und /DC. Da die Kombination HcC10S und D63-bio sensitiver war (ca. Faktor 2, siehe *Tab. 30*), wurde entschieden, die differenzierenden ELISAs mit diesen Antikörpern durchzuführen. Die vier ELISAs erkannten spezifisch das jeweilige Toxin (*Abb. 39 B-E*, linke Seite). Es zeigte sich selbst bei hohen Konzentrationen der anderen drei Toxine keine Kreuzreaktivität auf die nahverwandten Toxine. BSA führte ebenfalls zu keinen Signalen.

Auf der rechten Seite von *Abb. 39* ist eine Verdünnungsreihe der Toxine dargestellt. Aus insgesamt zehn Wiederholungen der Verdünnungsreihen ließen sich die Kenngrößen der ELISA bestimmen (siehe *Tab. 30*). Das Detektionslimit wurde berechnet aus dem Mittelwert der Negativkontrollen zuzüglich der 3,29fachen Standardabweichung. Die ELISA erreichten Nachweisgrenzen von 2 bis 27 pg/ml Toxin. Alle ELISA sind damit sensitiver als der „Goldstandard“ für die Detektion, der Maus Bioassay (LOD 167 pg/ml für BoNT/C bzw. 33 pg/ml für BoNT/DC [288]). Zudem wurden die oberen und unteren Quantifizierungsgrenzen LLOQ und ULOQ bestimmt (siehe 2.2.8.1). Diese lagen zwischen 0,21 und 0,51 ng/ml für die untere, zwischen 2,4 und 5,9 für die obere Grenze. Die EC₅₀ ist definiert als der Wendepunkt des sigmoidalen Vier-Parameter-Fits und bewegte sich zwischen 0,74 und 1,6 ng/ml. Bei eben

diesem Wert wurden die Variationskoeffizienten bestimmt, sowohl innerhalb eines ELISA (zehn Doppelbestimmungen auf einer ELISA Platte an einem Tag, CV% intra EC₅₀) als auch zwischen zehn gleichartigen ELISA, die an zehn Tagen durchgeführt wurden (CV% inter EC₅₀). Innerhalb eines Experiments lagen die Werte maximal 10 % auseinander, an verschiedenen Tagen schwankte die Präzision um höchstens 25 % (Tab. 30).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit der Etablierung dieser vier Sandwich ELISA erstmals gelungen ist, die BoNT Mosaiktypen C, /CD, /D und /DC eindeutig auf immunologischer Basis zu unterscheiden bei gleichzeitig sehr niedriger Nachweisgrenze.

Tab. 30: Validierung der Sandwich ELISA zur Differenzierung veterinärpathogener BoNTs

ELISA		Antigen	LOD [pg/ml]	LLOQ [ng/ml]	ULOQ [ng/ml]	EC ₅₀ [ng/ml]	CV% intra EC ₅₀	CV% inter EC ₅₀
Fänger	Bio-Ak							
C394	C9-bio	BoNT/C	11,5	0,37	4,4	1,3	5,8	24,4
C394	D967-bio	scBoNT/CD	23,8	0,22	2,4	0,75	3,3	17,1
D63	D967-bio	scBoNT/D	2,1	0,21	2,5	0,74	3,6	8,2
HcC10	D63-bio	BoNT/DC	16,1	0,32	4,3	1,1	6,4	24,0
HcC2378	D63-bio	BoNT/DC	26,4	0,51	5,9	1,6	10,1	8,6

Aus 10 Wiederholungen der Sandwich ELISA an 10 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Kenngrößen bestimmt. LOD: Detektionslimit; LLOQ: *lower limit of quantification*; ULOQ: *upper limit of quantification*; EC₅₀: halbmaximale Effektorkonzentration; CV%: Variationskoeffizient in % bestimmt als intra-assay und inter-assay Präzision bei der EC₅₀.

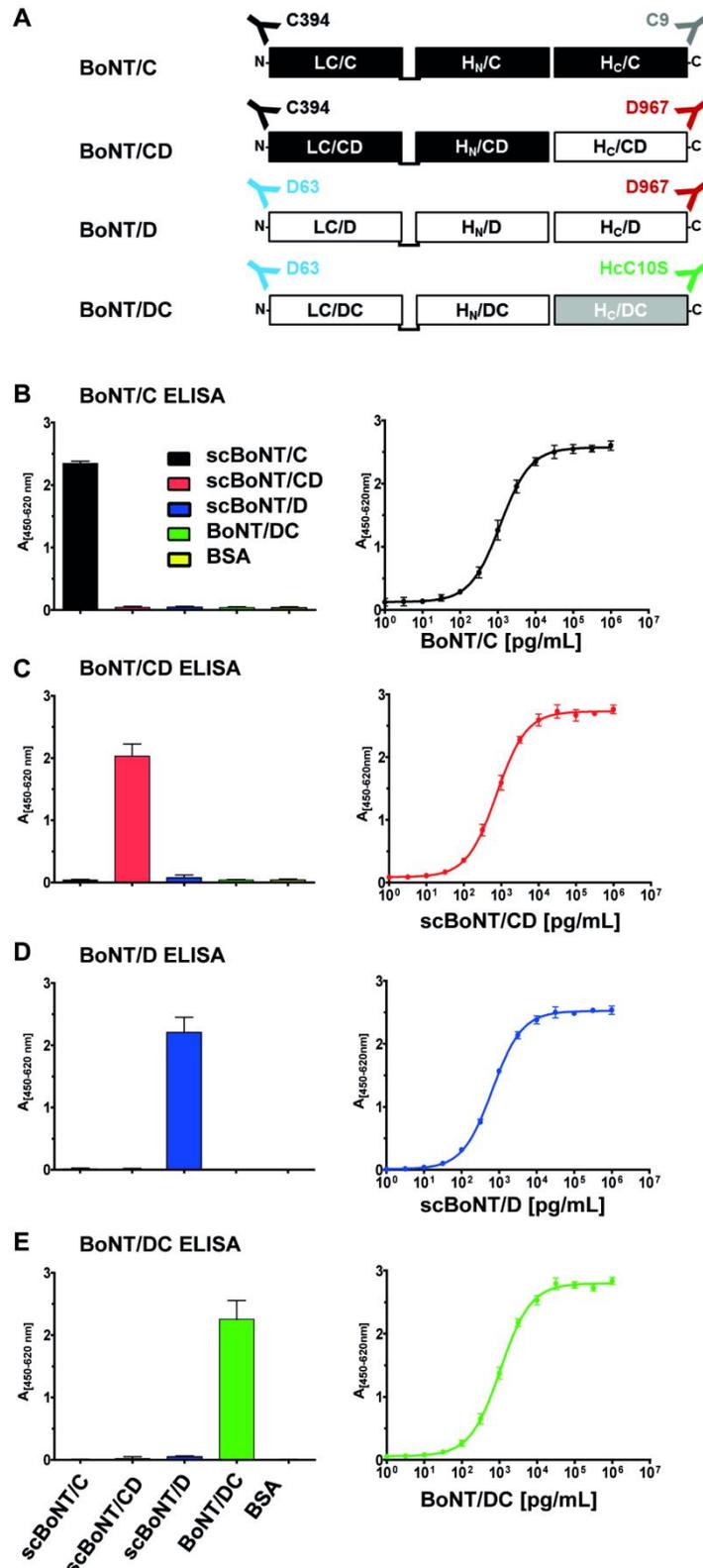


Abb. 39: Sandwich ELISA zur Differenzierung veterinärpathogener BoNTs

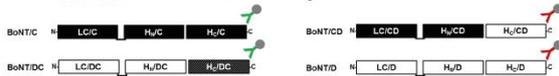
A: Schematische Darstellung der Mosaikstruktur der veterinärpathogenen BoNTs und Angabe der zur Detektion gewählten mAk mit Bindungsspezifität gegenüber der LC- oder H_C-Domäne der Mosaiktoxine; B: BoNT/C ELISA: mAk C394 und C9-bio; C: BoNT/CD ELISA: mAk C394 und D967-bio; D: BoNT/D ELISA: mAk D63 und D967-bio; E: BoNT/DC ELISA: mAk HcC10S und D63-bio. Für die ELISA B-E wurde der erstgenannte Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurden 200 ng/ml jedes Toxins oder BSA (links) bzw. serielle Verdünnungen der zugehörigen Toxine von 1 µg/ml bis 1 pg/ml (rechts) inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit einem biotinylierten Detektionsantikörper, wie angegeben, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und TMB. Die Graphen auf beiden Seiten beruhen auf je drei Messungen in Duplikaten mit SD als Fehlerbalken.

3.5.2 Differenzierung mittels Endopep-MS Assay

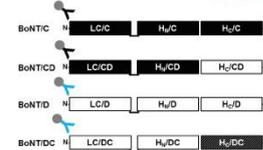
Die Sandwich ELISA aus *Abb. 39* ermöglichen die schnelle und sensitive Detektion von BoNT/C, /CD, /D und /DC, erlauben aber keine Einschätzung ihrer funktionalen Aktivität. Aus diesem Grund wurde mit den generierten Antikörpern ein Test entwickelt, der die biologische Aktivität von BoNT/C, /CD, /D und /DC nachweist. Alle Botulinum Neurotoxine sind Endopeptidasen. Die Zielproteine der BoNTs liegen im sog. SNARE-Komplex. Die LC von BoNT/C und /CD schneidet SNAP25, die LC von BoNT/D und /DC hingegen VAMP-2 (siehe 1.1.2). Die Endopeptidase-Aktivität der BoNTs wird in zwei verschiedenen Endopep-MS Assays ausgenutzt, welche sich in der Immunoanreicherung unterscheiden (*Abb. 40*).

Der erste Schritt zur Untersuchung der funktionalen Integrität der BoNTs war die Immunoanreicherung mittels verschiedener Antikörper. Im ersten Endopep-MS Assay wurden die Antikörper D967 (anti-H_C/D) und HcC2378 (anti-H_C/C) an magnetische Beads gekoppelt und in zwei getrennten Ansätzen mit den toxinhaltigen Lösungen inkubiert (Schritt 1 A in *Abb. 40*). Die Toxine BoNT/C und BoNT/DC haben eine ähnliche H_C-Domäne (73,8-74,0 %, siehe *Abb. 5*), welche vom Antikörper HcC2378 erkannt wurde. Die Toxine wurden mit diesem mAk angereichert, mit D967 fand keine Interaktion von BoNT/C und /DC statt. Bei den Toxinen BoNT/D und BoNT/CD (Ähnlichkeit von 91,5-95,6 % in der H_C-Domäne, *Abb. 5*) war es genau umgekehrt, diese wurden ausschließlich von D967 angereichert. Nach dem Waschen wurde das angereicherte Toxin in die Endopep-Lösung überführt. Diese beinhaltete ein verkürztes und modifiziertes VAMP-2- und SNAP25-Oligopeptid, eins von beiden wurde von den Toxinen durch ihre intrinsische Endopeptidase-Aktivität geschnitten (Schritt 2, *Abb. 40*). Die Zweiergruppen von Toxinen (BoNT/C und /DC sowie BoNT/CD und /D) unterschieden sich in ihrer leichten Kette, die die Endopep-Aktivität beinhaltet. Toxine mit einer BoNT/C-Aktivität (also BoNT/C und /CD) schnitten ausschließlich das SNAP25-Peptidsubstrat, Toxine mit einer BoNT/D-Aktivität (BoNT/D und /DC) das VAMP-2-Peptidsubstrat. Die Spaltprodukte des VAMP-2- und SNAP25-Oligopeptid wurden mittels Massenspektrometrie nachgewiesen (Schritt 3, *Abb. 40*). Die Spaltung des BoNT/C-Substrat führte zur Detektion zweier Spaltprodukte C-CT (BoNT/C-Substrat, C-terminal) und C-NT (BoNT/C-Substrat, N-terminal) bei m/z 1060 bzw. 1871. Aus dem BoNT/D-Substrat (m/z 4496) entstanden die C- und N-terminalen Spaltprodukte D-CT und D-NT bei m/z 1218 und 3297.

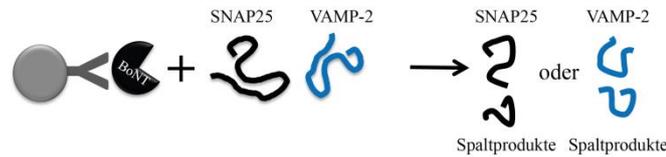
Aus der Kombination von Antikörper-Interaktion und Endopeptidase-Muster lässt sich mit Hilfe des ersten Endopep-MS Assay der Mosaiktyp differenzieren (Aussage 3 A, *Abb. 40*).

1 A. **Separate** Anreicherung durch H_C-Ak (2 Ansätze)1 B. Anreicherung durch **Mischung** der LC-Ak

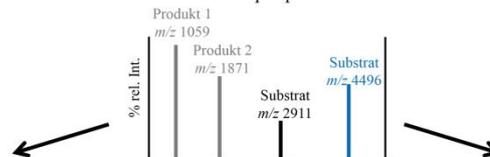
oder



2. Endopep-Assay mit beiden Peptidsubstraten



3. Nachweis der Spaltprodukte mittels MS



3 A. **Differenzierung** durch Bestimmung der H_C über Immunoanreicherung und Bestimmung der LC-Aktivität über Erfassung der Substrat-Spaltprodukte

3 B. Bestimmung der LC-Aktivität über Erfassung der Substrat-Spaltprodukte

Abb. 40: Schematische Darstellung des Endopep-MS Assays

Die veterinärpathogenen Toxine BoNT/C, /CD, /D und /DC wurden mittels an Beads gekoppelten anti-H_C (1 A) oder anti-LC Antikörpern (1 B) angereichert und in den Endopep-MS Assay überführt. Die Toxine schnitten das SNAP25- oder VAMP-2-Peptidsubstrat (2). Die Spaltprodukte wurden mittels MS nachgewiesen (3). Ansatz A diente zur Differenzierung der vier Mosaiktypen, in Ansatz B wurde die Aktivität der leichten Ketten bestimmt.

Ist man an der Aktivität der leichten Ketten ohne Differenzierung der Mosaiktypen interessiert, kann alternativ eine Immunoanreicherung mit einer Mischung der beiden mAKs für die LC, C394 und D63, durchgeführt werden (Schritt 1 B, *Abb. 40*). Alle weiteren Schritte wurden analog zur ersten Methode durchgeführt (Schritt 2 und 3, *Abb. 40*). Die Mosaiktoxine BoNT/C und /CD, welche eine Sequenzähnlichkeit von 96,6-97,7 % der LC besitzen, spalten SNAP25 an exakt derselben Stelle, daher konnte die Endopeptidase-Aktivität nicht zur Differenzierung der Mosaikvarianten benutzt werden. Analoges gilt für BoNT/D und /DC. Dieser zweite Endopep-MS Assay war bei gereinigtem Toxin von vergleichbarer Sensitivität wie die erste Methode. Wurden Überstände von Bakterienkulturen benutzt, bei denen das Toxin im Komplex vorlag, war die Anreicherung über die LC-Antikörper sensitiver (M. Skiba (RKI), Daten nicht dargestellt). Da die Immunoanreicherung über die LC der vier BoNTs nicht differenzierend ist, ist nur eine Aussage über die Aktivität der leichten Ketten möglich (Aussage 3 B, *Abb. 40*). Die Differenzierung mittels Endopep-MS Assay ist exemplarisch an vier verschiedenen Überständen von BoNT-Stämmen in *Abb. 41* dargestellt. Die vier Stämme NCTC8548, C6814, D4947 und Eppendorf produzierten BoNT/C, /CD, /D bzw. /DC. Dies wurde mittels der in dieser Arbeit etablierten Sets von vier differenzierenden ELISA eindeutig dargestellt (*Abb. 41*). Die Analyse der Stämme nach dem ersten, differenzierenden Endopep-MS-Verfahren (*Abb. 41* B) zeigte, dass jeder Stamm funktionell differenziert wurde. NCTC8548 wurde mit dem

Antikörper HcC2378 gegen H_C/C angereichert und führte zur Spaltung des SNAP25-Peptidsubstrates für BoNT/C. Es wurden beide Spaltprodukte bei *m/z* 1060 und 1871 mittels MS nachgewiesen. Eine Immunoanreicherung mit mAk D967 (gegen H_C/D) war nicht erfolgreich, es wurde keine Spaltung detektiert. So wurde bestimmt, dass BoNT/C in der Lösung vorliegen musste.

Bei dem Stamm C6814, der BoNT/CD produziert, gelang keine Anreicherung mit HcC2378 (gegen H_C/C), daher wurde keine Spaltung detektiert. Bei Verwendung des anderen mAk D967 wurde das Toxin in den Endopep-Ansatz überführt und das BoNT/C-Substrat gespalten. Aus der Kombination beider Informationen (Aktivität C-Typ und Interaktion mit H_C/D Antikörper) ergab sich nun der Rückschluss, dass das Toxin vom Typ CD sein musste. Analog wurden BoNT/D und /DC detektiert (Abb. 41).

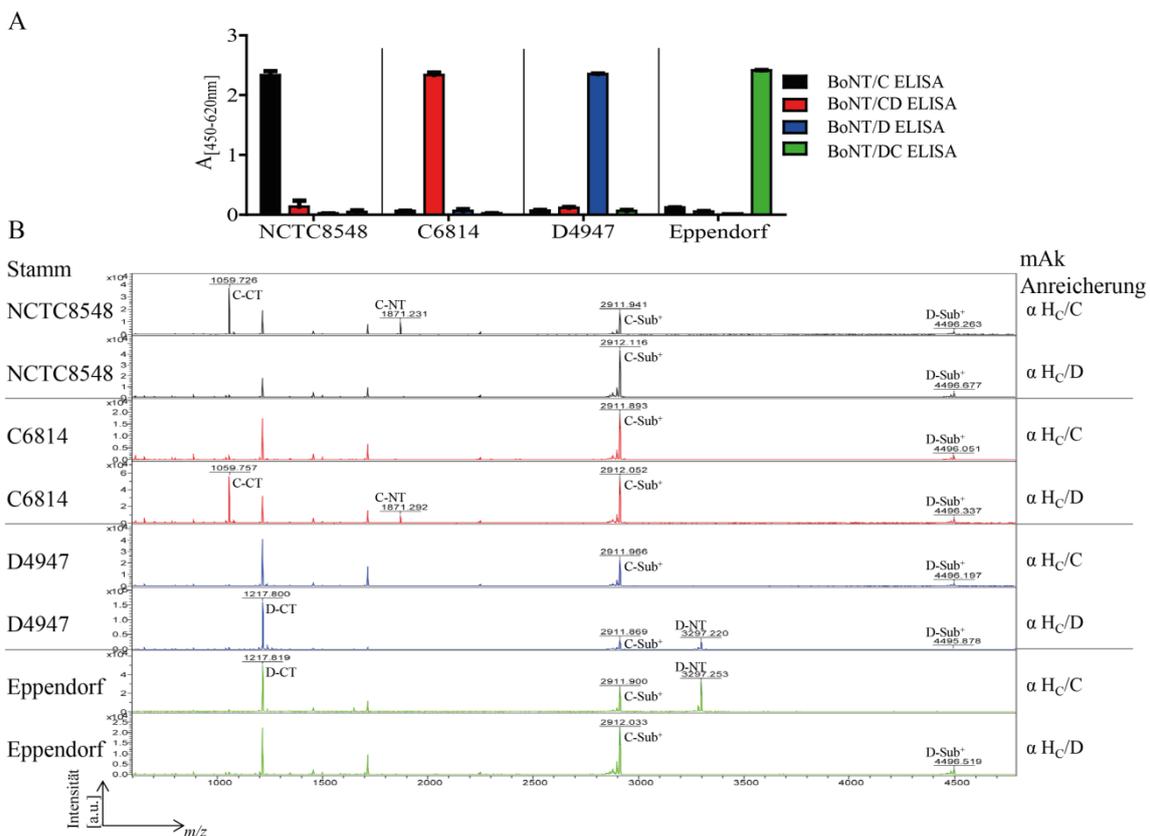


Abb. 41: Differenzierung von clostridialen Kulturüberständen mittels ELISA und Endopep-MS Assay

A) Sandwich ELISA zur Differenzierung von vier clostridialen Kulturüberständen: Für den BoNT/C ELISA wurden die Antikörper C394 mit C9-bio, für BoNT/CD C394 mit D967-bio verwendet. BoNT/D wurde mit D63 und D967-bio, BoNT/DC mit HcC10S und D63-bio nachgewiesen (analog zu Abb. 39). Die Kulturüberstände wurden 1:10 verdünnt eingesetzt. Dargestellt sind die Duplikate eines repräsentativen Experiments von drei durchgeführten.

B) Endopep-MS Assay: Die Toxine wurden aus Kulturüberstand jeweils mit einem Antikörper gegen die H_C/C- (HcC2378) oder gegen die H_C/D-Domäne (D967) angereichert und in den Endopep-Assay überführt. Die Toxine schnitten entweder das BoNT/C-Substrat (C-Sub⁺, SNAP25-Peptidsubstrat) oder das BoNT/D-Substrat (D-Sub⁺, VAMP-2-Peptidsubstrat). Die Spaltprodukte (C-CT, C-NT, D-CT, D-NT) wurden mittels MALDI nachgewiesen (Durchführung M. Skiba).

3.5.3 Validierung der Testsysteme zur Differenzierung von veterinärpathogenen BoNTs

3.5.3.1 BoNT/C, /CD, /D und /DC-haltige Kulturüberstände

Im ersten Schritt der Validierung wurden Überstände (ÜS) von isolierten veterinärpathogenen *C. botulinum*-Stämmen mit verschiedenen Techniken analysiert. 39 Bakterienkulturen wurden mit isolierten Stämmen oder mit Material aus verschiedenen tiermedizinischen Botulismusfällen angeimpft. Die neu entwickelten ELISAs (3.5.1) wurden zur Differenzierung der Toxine verwendet. Dabei wurden eindeutig sechs BoNT/C und zwei BoNT/D Toxintypen detektiert. Der Großteil der Toxine gehörte in die Gruppe der Mosaiktoxine, so wurden 4 BoNT/DC und 27 BoNT/CD Mosaiktypen gefunden. Zeitgleich wurde von Cédric Woudstra (Labor Patrick Fach, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ANSES, Maisons-Alfort, Frankreich) eine qPCR zur Bestimmung des Toxintyps auf DNA-Ebene durchgeführt [120, 287]. Diese verblindet durchgeführte Analyse führte zu einer 100%igen Übereinstimmung der Ergebnisse auf Protein- und DNA-Ebene. Zudem wurde, falls möglich, ein Maus Bioassay durchgeführt, welcher das Vorhandensein und die Aktivität von Toxin anzeigt, aber keine Typisierung erlaubt.

Zur weiteren Bestätigung wurde ein Endopep-MS Assay durchgeführt. Hierzu wurde mit den beiden Antikörpern gegen die leichten Ketten der Toxine (C394 gegen die LC von BoNT/C und /CD; D63 gegen die LC von BoNT/D und /DC) angereichert. Die Toxine wurden in den Endopep-Ansatz mit den beiden artifiziellen Substraten, wie in 2.2.6 und 3.5.2 beschrieben, überführt. Der Nachweis der C- und N-terminalen Spaltprodukte erfolgte mittels MS. Bei den BoNT/C- und /CD-haltigen ÜS wurde das BoNT/C-Substrat geschnitten, hier lag also die leichte Kette mit der enzymatischen Aktivität vom BoNT/C Typ vor. Analog wurde von BoNT/D und /DC das BoNT/D-Substrat gespalten.

Tab. 31: Spezifität der ELISA gegenüber Überständen von Bakterienkulturen

Bezeichnung	Ursprung	ELISA ^a	qPCR ^b	MBA ^c	Endopep-MS (LC Aktivität) ^d
14-044	Stamm	C	C	+	C-Typ
14-045	Stamm	C	C	+	C-Typ
14-046	Stamm	C	C	+	C-Typ
14-047	Stamm	C	C	+	C-Typ
NCTC8548	Stamm	C	C	+	C-Typ
12-149-01	Stamm	C	C	n. d.	C-Typ
14-048	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
14-049	Ente, Abstrich	CD	CD	+	C-Typ

<i>Bezeichnung</i>	<i>Ursprung</i>	<i>ELISA^a</i>	<i>qPCR^b</i>	<i>MBA^c</i>	<i>Endopep-MS (LC Aktivität)^d</i>
14-050	Truthahn, Abstrich	CD	CD	+	C-Typ
14-051	Truthahn, Milz	CD	CD	+	C-Typ
14-052	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
14-053	unbekannt	CD	CD	+	C-Typ
14-054	Huhn	CD	CD	+	C-Typ
14-055	Huhn	CD	CD	+	C-Typ
14-056	Ente, Fäzes	CD	CD	+	C-Typ
14-057	Huhn	CD	CD	+	C-Typ
14-058	unbekannt	CD	CD	n. d.	C-Typ
14-059	Geflügel	CD	CD	n. d.	C-Typ
14-060	Geflügel	CD	CD	n. d.	C-Typ
14-061	Geflügel	CD	CD	n. d.	C-Typ
14-062	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
14-063	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
14-064	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
14-065	Truthahn, Fäzes	CD	CD	+	C-Typ
14-066	Ente, Fäzes	CD	CD	+	C-Typ
14-067	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
14-068	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
14-069	Ente, Fäzes	CD	CD	+	C-Typ
14-070	Geflügel	CD	CD	+	C-Typ
C6814	Stamm	CD	CD	+	C-Typ
14-006-01	Rind	CD	CD	n. d.	C-Typ
14-007-01	Rind	CD	CD	n. d.	C-Typ
14-008-01	Rind	CD	CD	n. d.	C-Typ
14-071	unbekannt	D	D	+	D-Typ
D4947	Stamm	D	D	+	D-Typ
14-072	Rind, Fäzes	DC	DC	+	D-Typ
14-073	Rind, Fäzes	DC	DC	+	D-Typ
14-074	Rind, Fäzes	DC	DC	+	D-Typ
Eppendorf	Stamm	DC	DC	+	D-Typ

Die aufgelisteten ÜS wurden mittels ELISA, qPCR, MBA und Endopep-MS Assay untersucht. ^aBoNT/C, /CD, /D und /DC ELISA wie in *Abb. 39* dargestellt; ^bqPCR für Mosaiktypen BoNT/C, /CD, /D und /DC durchgeführt von C. Woudstra (ANSES) nach [120]; ^cMBA Maus Bioassay durchgeführt von M. Dorner (RKI) oder C. Woudstra (ANSES); ^dEndopep-MS Assay siehe 3.5.2 und *Abb. 40 B*; + positiv; n. d. nicht durchgeführt.

3.5.3.2 Selektivität gegenüber verwandten *Clostridien*

Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob die neu entwickelten Sandwich ELISA selektiv für die veterinärpathogenen Toxine BoNT/C, /CD, /D und /DC sind. Dazu wurden Überstände verwandter *Clostridien* hergestellt und mittels ELISA, qPCR und Maus Bioassay untersucht.

Zunächst wurden ÜS von *Clostridium botulinum* untersucht, welche die humanpathogenen Serotypen BoNT/A, /B, /E, /F sowie BoNT/G exprimierten. Die in der Arbeitsgruppe durchgeführte qPCR nach Kirchner *et al.* [150] wies das entsprechende *bont* Gen nach, der Toxinnachweis gelang über den Maus Bioassay. Diese ÜS führten alle in den ELISAs für BoNT/C, /CD, /D und /DC zu negativen Resultaten. Anschließend wurden die Bakterienkulturen von verwandten *Clostridien* analysiert, welche zu den nicht-toxischen Vertretern und zur Gruppe *C. novyi sensu lato* gehören. In diese Gruppe werden *C. botulinum* Gruppe III, *C. novyi* und *C. haemolyticum* aufgrund von Ähnlichkeiten auf genetischer und phänotypischer Ebene zusammengefasst [289]. Hier wurde sowohl im ELISA als auch in der PCR kein Toxin(gen) nachgewiesen.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die ELISA zur Differenzierung von BoNT/C, /CD, /D und /DC keinerlei Kreuzreaktivität zu anderen *Clostridien*-Überständen zeigt. Falsch-positive Proben wurden nicht gefunden.

Tab. 32: Spezifität der ELISA gegenüber Überständen verwandter *Clostridien*

Name	Spezies	ELISA ^a	qPCR ^b	MBA ^c
NCTC7272	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	A	+
NCTC2012	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	A	+
Chemnitz	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	A	+
Friedrichshain	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	A	+
NCTC7273	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	B	+
2293	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	B	+
KL34/08	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	B	+
Wittenmoor	<i>C. botulinum</i> (Gruppe II)	–	E	+
Beluga	<i>C. botulinum</i> (Gruppe II)	–	E	n. d.
REB1718B	<i>C. botulinum</i> (Gruppe II)	–	E	+
H092.2.01	<i>C. botulinum</i> (Gruppe II)	–	E	+
NCTC10281	<i>C. botulinum</i> (Gruppe I)	–	F	+
CECT4615	<i>C. botulinum</i> (Gruppe IV)	–	G	n. d.
13-119-01	<i>C. baratii</i>	–	–	n. d.
H173852A-01	<i>C. berijerinckii</i>	–	–	n. d.
11-053-20	<i>C. botulinum</i>	–	–	n. d.
	Gruppe II atoxisch			
13-028-01	<i>C. butyricum</i>	–	–	n. d.

<i>Name</i>	<i>Spezies</i>	<i>ELISA^a</i>	<i>qPCR^b</i>	<i>MBA^c</i>
13-040-01	<i>C. butyricum</i>	–	–	n. d.
13-118-01	<i>C. bifermentans</i>	–	–	n. d.
14-005-05	<i>C. difficile</i>	–	–	n. d.
12-108-01	<i>C. glycolicum</i>	–	–	n. d.
13-159-02	<i>C. hiranonis</i>	–	–	n. d.
12-109-01	<i>C. innocuum</i>	–	–	n. d.
12-019-01	<i>C. novyi</i>	–	–	n. d.
12-135-05	<i>C. paraputrificum</i>	–	–	n. d.
14-003-01	<i>C. perfringens</i>	–	–	n. d.
13-123-04	<i>C. sartagoforme</i>	–	–	n. d.
12-007	<i>C. scidens</i>	–	–	n. d.
09-038	<i>C. septicum</i>	–	–	n. d.
13-039-01	<i>C. sordellii</i>	–	–	n. d.
DSM1734	<i>C. sporogenes</i>	–	–	n. d.
13-151-02	<i>C. tertium</i>	–	–	n. d.
14-081-01	<i>C. subterminale</i>	–	–	n. d.
3642	<i>C. tetani</i>	–	–	n. d.

Die aufgelisteten ÜS wurden mittels ELISA, qPCR und MBA untersucht.

^aBoNT/C, /CD, /D und /DC ELISA wie in *Abb. 39* dargestellt; ^bqPCR für Serotypen BoNT/A, /B, /E und /F durchgeführt von M. Dorner (RKI) nach [150]; ^cMaus Bioassay durchgeführt von M. Dorner (RKI); + positiv, – negativ; n. d. nicht durchgeführt.

3.5.3.3 Untersuchungen von primärem Anzuchtmaterial

Bisher wurden mit den neu generierten Sandwich ELISA und Endopep-MS Assay Kulturüberstände von isolierten Stämmen untersucht. In einem letzten Schritt der Validierung wurden Überstände von primärem Anzuchtmaterial untersucht. Lag ein Verdacht auf Botulismus im Tierreich vor, wurden Gewebematerial oder Abstriche in eine anaerobe Kultur überführt. Hierbei wurden neben *Clostridien* auch andere Bakterien, die unter anaeroben Bedingungen wachsen, vermehrt. Im Vergleich zu den vorher analysierten Überständen von isolierten Einzelkulturen lag in den Mischkulturen eine komplexe Zusammensetzung von Proteinen und Stoffwechselprodukten vor.

23 Überstände von Botulismusfällen aus Europa wurde mit den Sandwich ELISAs aus *Abb. 39* analysiert. Dabei wurden in 21 Fällen BoNT/CD detektiert, alle diese Kulturen stammten von betroffenen Vögeln. In den beiden Kulturen, die aus Fäzes von Rindern gewonnen wurden, wurde BoNT/DC gefunden (*Tab. 33*). Zeitgleich wurde, wie in *Tab. 31*, von Cédric Woudstra und Patrick Fach eine qPCR zur Bestimmung des Toxintyps auf DNA-Ebene durchgeführt. Hier zeigte sich ebenfalls eine 100%ige Übereinstimmung. Der Endopep-MS Assay wurde zur Bestätigung der Aktivität der leichten Ketten der Toxine eingesetzt. Nach Anreicherung mit den

Antikörpern C394 und D63 für die leichten Ketten wurde 21mal BoNT/C-Typ Aktivität gefunden, in zwei Fällen wurde das BoNT/D-Substrat gespalten. Diese Resultate decken sich mit den zuvor erwähnten aus ELISA und qPCR.

Die neu entwickelten ELISA waren in der Lage, in primärem Anzuchtmaterial spezifisch die gesuchten Toxine zu detektieren. Ko-Kontaminationen mit anderen Bakterien und deren Stoffwechselprodukten führten nicht zu Störungen des Systems. Bei der Differenzierung dieser veterinären Botulismusfälle aus Europa wurden BoNT/CD und /DC gefunden, aber nicht BoNT/C und /D. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Woudstra *et al.* [120], dass die dominanten Toxinformen in Europa die Mosaiktoxine sind.

Tab. 33: Spezifität der ELISA gegenüber primären Bakterienkulturen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Quelle der anaeroben Kultur</i>	<i>ELISA^a</i>	<i>qPCR^b</i>	<i>Endopep-MS (LC Aktivität)^c</i>
14-220	Ente, Abstrich	CD	CD	C-Typ
14-221	Truthahn, Milz	CD	CD	C-Typ
14-222	Huhn, Darm	CD	CD	C-Typ
14-223	Truthahn, Leber	CD	CD	C-Typ
14-225	Huhn, Fäzes	CD	CD	C-Typ
14-226	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-228	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-229	Ente, Fäzes	CD	CD	C-Typ
14-230	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-231	Huhn, Fäzes	CD	CD	C-Typ
14-232	Huhn, Fäzes	CD	CD	C-Typ
14-233	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-234	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-235	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-236	Perlhuhn, Fäzes	CD	CD	C-Typ
14-237	Ente, Fäzes	CD	CD	C-Typ
14-238	Truthahn	CD	CD	C-Typ
14-240	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-241	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-242	Huhn	CD	CD	C-Typ
14-243	Ente, Fäzes	CD	CD	C-Typ
14-224	Rind, Fäzes	DC	DC	D-Typ
14-239	Rind, Fäzes	DC	DC	D-Typ

Die aufgelisteten ÜS wurden mittels ELISA, qPCR und Endopep-MS Assay untersucht. ^aBoNT/C, /CD, /D und /DC ELISA wie in *Abb. 39* dargestellt; ^bqPCR für Mosaiktypen BoNT/C, /CD, /D und DC durchgeführt von C. Woudstra (ANSES) nach [120]; ^cEndopep-MS durchgeführt von M. Skiba (RKI) siehe 3.5.2 und *Abb. 40 B*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ELISA zur Differenzierung von BoNT/C, /CD, /D und /DC sehr sensitiv und höchst selektiv sind. Es wurden sowohl Überstände von isolierten

Stämmen als auch Überstände von primärem Anzuchtmaterial erfolgreich analysiert. Zudem gab es keine Kreuzreaktivität zu anderen *Clostridien*. Die ELISA ergaben 100 % Übereinstimmung mit anderen Methoden auf genetischer (PCR) und auf funktionaler Ebene (Endopep-MS Assay).

3.6 Applikationsbeispiel: Vor-Ort-Detektion mittels pTD

Um ein Multiplex-Detektionssystem zum Vor-Ort-Nachweis von SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin-a zu entwickeln, wurden die generierten Antikörper aus den Kapiteln 3.1-3.4 in die pTD Plattform implementiert (siehe 1.2.2). Das pTD Nachweissystem, ein elektrischer Biochip, basiert auf dem gleichen Prinzip wie ein Sandwich ELISA. Auf einer beschichteten Goldelektrode mit 16 Positionen werden Fängerantikörper immobilisiert. Danach wird über ein Fluidiksystem die Probe automatisiert in die Reaktionskammer gepumpt. Anschließend wird ein biotinylierter Detektionsantikörper (bzw. mehrere als Mischung) injiziert, welcher spezifisch das Toxin erkennt. Zur Detektion wird Streptavidin-gekoppelte β -Galaktosidase benutzt, welche vom Substrat 4-Aminophenyl- β -D-Galactopyranosid die redox-aktive Gruppe 4-Aminophenol abspaltet (siehe *Abb. 11*). 4-Aminophenol durchläuft einen Redoxzyklus mit Chinonimin und überträgt dabei Elektronen. Der induzierte Elektrodentransfer ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Enzyms und damit der Menge des gebundenen Toxins. Als Messgröße wird der Anstieg des Stromflusses pro Zeiteinheit gemessen. Dies wird referenziert auf die Positiv- und Negativkontrollen, welche zusätzlich auf dem Chip integriert sind (siehe 2.2.8.2.). Dieser miniaturisierte Biochip erlaubt durch die automatisierte Durchführung einen simultanen und schnellen Nachweis verschiedener Toxine vor Ort.

3.6.1 Einzelnachweise der Toxine

Im ersten Schritt der Entwicklung des pTD Systems wurden die Toxine separat voneinander untersucht. Dazu wurden insgesamt drei Chipchargen mit Antikörpern über Thiol-Gold Interaktionen und hydrophobe Adsorption gespottet (je 0,5 mg/ml, durchgeführt von Analytik Jena). Es wurden jeweils geeignete Ak für ein bis zwei Toxine pro Charge immobilisiert und gegen ein Spektrum vorhandener Detektionsantikörper getestet. Die beste Kombination wurde daraufhin für die Multiplex-Detektion zur simultanen Detektion von SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin-a ausgewählt.

3.6.1.1 Detektion von SEA

Für die Detektion von SEA standen insgesamt drei monoklonale Antikörper zur Verfügung: SEA165, SEA388 und SEA2353. Diese wurden in drei Duplikaten auf einem Chip immobilisiert, zusätzlich wurden Antikörper gegen BoNT/E auf den freien Positionen immobilisiert (Biochip 1, siehe 9.2.1). In *Tab. 34* werden die in diesen Vorversuchen getesteten Kombinationen vorgestellt. Im ELISA hatte sich die Kombination SEA165 mit einer Mischung von SEA2353 und SEA388 als sensitivste Variante herausgestellt. Im pTD System wurde bestätigt, dass ein Einsatz aller drei Antikörper am sensitivsten zur Detektion von SEA geeignet war. Die Orientierung dieses Sandwiches im pTD spielte keine Rolle. Da bei der Kombination SEA388/SEA2353 als Fängerantikörper und SEA165-bio nur ein Antikörper für den

Detektionsmischung verwendet werden musste, wurde die in *Tab. 34* hervorgehobene Kombination für Multiplex-Versuche ausgewählt. Die mAk SEA388 und SEA2353 wurden für das Spotting zu gleichen Teilen gemischt (je 0,25 mg/ml). Je weniger Antikörper in der Detektionsmischung für die Multiplex-Versuche vorhanden sind, desto geringer ist die Gefahr der Kreuzreaktivität.

Tab. 34: pTD Vorversuche zur SEA Detektion

<i>Ak auf Chip</i>	<i>SEA165-bio</i>	<i>SEA388-bio</i>	<i>SEA388-bio/ SEA2353-bio</i>
SEA165	-	++	+++
SEA388	++	-	++
SEA2353	++	++	++
SEA388/SEA2353	+++	n. d.	n. d.

Verschiedene Kombinationen von anti-SEA mAk wurden hinsichtlich Sensitivität im pTD System untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf die jeweilige Antikörper-Kombination mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. - entspricht weniger als 10 % Reaktivität; n. d. nicht durchgeführt.

Die Sensitivität der ausgewählten Kombination wurde in weiteren Versuchen analysiert. Dazu wurde die Antikörpermischung SEA388/SEA2353 zu gleichen Teilen auf zwei Spots immobilisiert. Auf den Chips waren neben den anderen Toxin-Spots je drei Positiv- und drei Negativkontrollen enthalten (Layout Biochip 8, 9.2.7). Als Detektionsantikörper wurde ausschließlich SEA165-bio in einer Konzentration von 5 µg/ml benutzt.

Abb. 42 zeigt eine Verdünnungsreihe von SEA zum Einzeltoxinnachweis, gemessen mit dem pTD System und Biochip 8. Aufgetragen wurden jeweils die normalisierten Werte in % (A_{norm}) von zwei Messungen (mit je zwei technischen Replikaten). Die Schwelle zur Bestimmung des Detektionslimits wurde berechnet aus dem Mittelwert der Signale der toxinpezifischen Positionen bei Verwendung einer Leerprobe zuzüglich dreifacher Standardabweichung. Damit wurde das Risiko für falsch-positive Messungen minimiert, bei gleichzeitig hoher Sensitivität. Bei SEA ergab sich einen Schwellenwert von 2 % A_{norm} (gestrichelte Linie). Das Verfahren wurde für die anderen Toxine im Einzelnachweis analog durchgeführt.

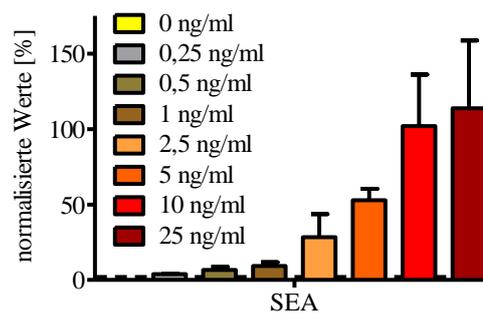


Abb. 42: Einzelnachweis von SEA

Auf dem Biochip 8 wurde eine Konzentrationsreihe von SEA gemessen. Als Fängerantikörper wurde eine Mischung von SEA388 und SEA2353 verwendet. SEA165-bio (5 µg/ml) wurde als Detektionsantikörper eingesetzt. Alle Werte wurden aus zwei unabhängigen Messungen bestimmt (insgesamt vier Elektroden) und mit SD aufgetragen.

Eine Konzentration von 0,25 ng/ml SEA wurde nachgewiesen, alle vier Messpunkte lagen über dem Schwellenwert von 2 % normalisierten Werten. Mit steigender Konzentration erhöhte sich das Signal deutlich.

3.6.1.2 Detektion von BoNT/E

Für die Detektion von BoNT/E standen sowohl mono- als auch polyklonale Antikörper zur Verfügung. Als Fängerantikörper wurde KE97 ebenso wie die mAk E136, E163, E173 und E1346 getestet (Tab. 35). Die vier erstgenannten Antikörper wurden zusammen mit den Antikörpern gegen SEA auf einem Chip immobilisiert (Layout Biochip 1, siehe 9.2.1). Der mAk E1346 wurde auf einem späteren Chip untersucht (Biochip 3, 9.2.3). E173 und E1346 konnten aufgrund ihrer geringen Affinität schlecht als Fängerantikörper benutzt werden. E163 war aufgrund seiner Monospezifität für BoNT/E3 nicht geeignet. Die weiteren monoklonalen Antikörper waren bedingt auf dem pTD Chip einsetzbar. Wie die Vorversuche zur ELISA Detektion zeigten, waren E1447, E3128, E3194 und E3226 nicht als Fängerantikörper geeignet. Der monoklonale Ak E136 zeigte als Fängerantikörper die höchste Signalstärke. KE97 aus Kaninchen konnte vermutlich nicht mit konstanter Qualität auf dem Biochip immobilisiert werden, hatte aber eine breite Erkennung der Subtypen. Daher wurde dieser als Detektionsantikörper ausgewählt. Die weiteren monoklonalen Detektionsantikörper, die zum Ende der Doktorarbeit entstanden, zeigten eine sehr hohe Nachweisgrenze mit E136 als Fängerantikörper und waren nicht für einen sensitiven Nachweis geeignet. E1447-bio mit KE97 als Fänger war ähnlich gut wie die ausgewählte Kombination, mit dem Nachteil der unsteten Immobilisierung von KE97.

Tab. 35: pTD Vorversuche zur BoNT/E Detektion

<i>Ak auf Chip</i>	<i>E136-bio</i>	<i>E163-bio</i>	<i>E173-bio</i>	<i>KE97-bio</i>	<i>E3128- bio</i>	<i>E1447- bio</i>
E136	-	++	-	+++	+	+
E163	++	-	-	++	n. d.	n. d.
E173	+	+	-	+	n. d.	n. d.
E1346	+	n. d.	n. d.	-	n. d.	n. d.
KE97	++	++	+	++	n. d.	+++

Verschiedene Kombinationen von anti-BoNT/E mAk wurden hinsichtlich Sensitivität im pTD System untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf die jeweilige Antikörper-Kombination mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. + entspricht 10-50 % relative Signalintensität, - entspricht weniger als 10 % Reaktivität; n. d. nicht durchgeführt.

Die Sensitivität der ausgewählten Kombination (fett markiert in Tab. 35) wurde in weiteren Versuchen getestet. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von BoNT/E (BoNT/E3 von Metabionics) mit dem pTD System in Doppelbestimmung vermessen. Der finale Biochip 8 mit dem Fängerantikörper E136 wurde in einer Bestimmung des Einzeltoxinnachweises von BoNT/E und dem einzelnen Detektionsantikörper KE97-bio verwendet (Abb. 43). Aufgetragen sind jeweils die normalisierten Mittelwerte von zwei Messungen (je zwei technische Replikate). Die Schwelle zur Bestimmung des Detektionslimits (Mittelwert des positionsspezifischen Leerwerts zuzüglich dreifacher Standardabweichung) wurde für BoNT/E auf 1 % normalisierten Werte (gestrichelte Linie) festgesetzt. Bei Einsatz von 10 ng/ml wurde dieser Schwellenwert bei allen Elektroden überschritten.

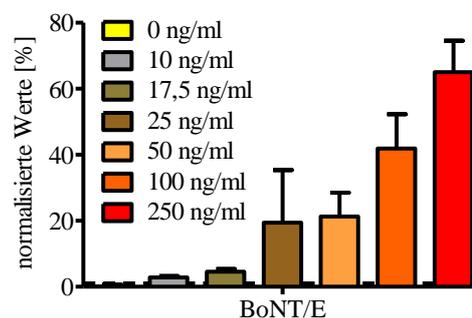


Abb. 43: Einzelnachweis von BoNT/E

Auf dem Biochip 8 wurde eine Konzentrationsreihe von BoNT/E gemessen. Als Fängerantikörper wurde E136 verwendet. KE97-bio (10 µg/ml) wurde als Detektionsantikörper eingesetzt. Alle Werte wurden aus zwei unabhängigen Messungen bestimmt (insgesamt vier Elektroden) und mit SD aufgetragen.

3.6.1.3 Detektion von BoNT/C

Durch Vorarbeiten und in dieser Arbeit neu beschriebenen Antikörpern konnte ein umfangreiches Spektrum an Antikörpern für den optimalen Einsatz im pTD System untersucht werden. Zum einen wurde ein polyklonaler Hühnchen-Antikörper (HCD115), zum anderen wurden monoklonale Antikörper gegen die leichte oder schwere Kette von BoNT/C auf den Chips immobilisiert. Zudem wurden auf der gleichen Chipcharge Antikörper gegen BoNT/D gespottet (Layout Biochip 2, siehe 9.2.2). In *Tab. 36* werden alle Kombinationen zur Detektion des Volllängen-Toxins dargestellt. Es wurde festgestellt, dass der polyklonale HCD115 Antikörper nicht zur Immobilisierung geeignet war, weil sich erst bei hohen Konzentrationen positive Signale ergaben. Die beiden mAks gegen die leichte Kette (C394 und C1916) zeigten gute Signale mit dem Detektionsantikörper C9-bio, einem mAk gegen die H_C/C-Domäne. Der zweite Detektionsantikörper gegen die schwere Kette, C1352-bio, war weniger sensitiv. Untersuchte man die Kombinationen in umgekehrter Orientierung, d. h. der anti-LC/C Antikörper C394 wurde als Detektionsantikörper verwendet, ergaben sich vergleichbare Sensitivitäten.

Tab. 36: pTD Vorversuche zur BoNT/C Detektion

<i>Ak auf Chip</i>	<i>C9-bio</i>	<i>C1352-bio</i>	<i>C394-bio</i>
HCD115	-	-	-
C394	+++	+	-
C1352	+	-	++
C1916	+++	+	++
C9	-	++	+++

Verschiedene Kombinationen von anti-BoNT/C Ak wurden hinsichtlich Sensitivität im pTD System untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf die jeweilige Antikörper-Kombination mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. + entspricht 10-50 % relative Signalintensität, - entspricht weniger als 10 % Reaktivität.

Für die Detektion von BoNT/C im Einzel- und Multiplex-Nachweis wurden die Antikörper nach strategischen Gesichtspunkten ausgewählt, weil die experimentell ermittelte Sensitivität der Ak-Kombinationen fast identisch war. Da neben BoNT/C die Mosaiktoxine /CD, /DC und BoNT/D existieren (siehe Einleitung 1.1.2, *Abb. 5* und 3.5), war es sinnvoll, Antikörper gegen die LC von BoNT/C und /D zu immobilisieren. In der LC liegt die enzymatische Aktivität der BoNTs, welche die Serotypen unterscheiden. Um eine Entscheidung für C-Typ-Aktivität oder D-Typ-Aktivität treffen zu können, wurden daher die Antikörper C394 und D63 auf verschiedenen Spots immobilisiert. Der Einzeltoxinnachweis wurde mit den biotinylierten mAks C9-bio (fett markiert in *Tab. 36*) und HcC2378-bio durchgeführt. Diese Mischung

erlaubte eine sensitive Detektion von BoNT/C und gleichzeitig die Möglichkeit des Nachweises von BoNT/DC (durch Kombination mit dem anderen mAk D63, vergleiche *Abb. 32* und 3.5).

Der Einzeltoxinnachweis von BoNT/C wurde mit dem gespotteten mAk C394 und einer Mischung der biotinylierten mAk C9-bio und HcC2378-bio durchgeführt (*Abb. 44*). Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von BoNT/C auf dem finalen Biochip 8 gemessen. Aufgetragen sind jeweils die normalisierten Mittelwerte von zwei Messungen. Die Schwelle zur Bestimmung des Detektionslimits (Mittelwert des positionsspezifischen Leerwerts zuzüglich dreifacher Standardabweichung) lag für BoNT/C bei 2,5 % A_{norm} (gestrichelte Linie). 5 ng/ml BoNT/C wurden sicher nachgewiesen. Im Gegensatz dazu lagen 2,5 ng/ml unterhalb des Schwellenwertes.

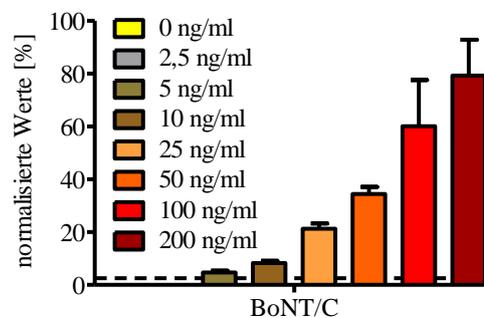


Abb. 44: Einzelnachweis von BoNT/C

Auf dem Biochip 8 wurde eine Konzentrationsreihe von BoNT/C gemessen. Als Fängerantikörper wurde C394 verwendet. Eine Mischung von C9-bio und HcC2378-bio (je 10 $\mu\text{g/ml}$) wurde als Detektionsantikörper eingesetzt. Alle Werte wurden aus zwei unabhängigen Messungen bestimmt (insgesamt vier Elektroden) und mit SD aufgetragen.

3.6.1.4 Detektion von BoNT/D

BoNT/D wurde mit zwei in der Arbeitsgruppe vorhandenen monoklonalen Antikörpern detektiert. Das Epitop von D63 lag in der leichten Kette, das von D967 in der H_C/D-Domäne. Auf dem Chiplayout (Biochip 2, 9.2.2) wurden beide mAKs immobilisiert und gegeneinander getestet. Die Orientierung D63 als Fänger- und D967 als Detektionsantikörper war am sensitivsten (Tab. 37, fett markiert).

Tab. 37: pTD Vorversuche zur BoNT/D Detektion

<i>Ak auf Chip</i>	<i>D63-bio</i>	<i>D967-bio</i>
D63	-	+++
D967	++	-

Anti-BoNT/D mAK wurden hinsichtlich Sensitivität im pTD System untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf die jeweilige Antikörper-Kombination mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. - entspricht weniger als 10 % Reaktivität.

Diese Variante wurde für den folgenden Einzeltoxinnachweis mit dem finalen Biochip 8 eingesetzt (Abb. 45). Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von BoNT/D mit dem pTD in Doppelbestimmung (vier Elektroden) vermessen. Als Fängerantikörper wurde D63 und als Detektionsantikörper D967-bio verwendet. Die Schwelle für eine als positiv gewertete Messung (Mittelwert des positionsspezifischen Leerwerts zuzüglich dreifacher Standardabweichung) lag bei 1 % normalisierten Werten (gestrichelte Linie). Die Nachweisgrenze lag bei 2,5 ng/ml BoNT/D. 1 ng/ml wurde nicht sicher bestimmt.

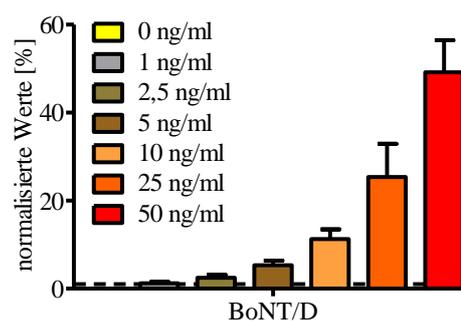


Abb. 45: Einzelnachweis von BoNT/D

Auf dem Biochip 8 wurde eine Konzentrationsreihe von BoNT/D gemessen. Als Fängerantikörper wurde D63 verwendet. D967-bio (10 µg/ml) wurde als Detektionsantikörper eingesetzt. Alle Werte wurden aus zwei unabhängigen Messungen bestimmt (insgesamt vier Elektroden) und mit SD aufgetragen.

3.6.1.5 Detektion von Abrin

Zur Detektion von Abrin wurden zwei verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde Abrin Rohextrakt eingesetzt, im zweiten Schritt wurde Abrin-a detektiert. Da der Antikörper AP3202 erst gegen Ende der Doktorarbeit isoliert wurde, wurden Vorversuche zur Detektion von Abrin Rohextrakt mit den bereits vorhandenen Antikörpern durchgeführt. Auf den Chips (siehe Biochip 4, 9.2.4) wurden daher die mAk AP10, AP267, AP476, AP406 und AP430 und der polyklonale Antikörper KAP142 aus Kaninchen immobilisiert (*Tab. 38*). Zusätzlich wurde Asialofetuin (ASF) auf den Chips gespottet. So konnte ein ELLA-Format auf den pTD Chips durchgeführt und mit dem Sandwich ELISA-Format verglichen werden.

Die mAk AP10, AP267 und AP476 waren mit allen getesteten Detektionsantikörpern nicht gut als Fängerantikörper geeignet. Mit diesen wurde Abrin Rohextrakt nur in hohen Konzentrationen (50 ng/ml und höher) nachgewiesen. Die beste Reaktivität der ersten untersuchten Kombinationen zeigte AP406 mit KAP142-bio.

Durch die Isolierung des Antikörpers AP3202 wurde die Detektion deutlich verbessert. Es war ein sensitiver Nachweis von gereinigten Abrin-a im einstelligen ng/ml-Bereich in Verbindung mit AP406 und AP430 möglich. Mit AP430 und AP3202-bio wurde das geringste Detektionslimit erreicht (fett markierte Kombination in *Tab. 38*).

Das ELLA-Format wurde ebenfalls erfolgreich auf die pTD Plattform übertragen. Mit den Detektionsantikörpern AP476-bio (gegen *Abrus* Agglutinin) und AP3202-bio (gegen Abrin-a) wurden gute Signale erzielt. Die Nachweisgrenze lag um ca. einen Faktor 5 höher als die mAk-mAk-Kombination (Daten nicht dargestellt).

Tab. 38: pTD Vorversuche zur Abrin Rohextrakt und Abrin-a Detektion

<i>Ak auf Chip</i>	<i>AP430- bio</i>	<i>KAP142- bio</i>	<i>AP476- bio</i>	<i>AP406- bio</i>	<i>AP267- bio</i>	<i>AP3202- bio¹</i>
AP10	-	-	-	-	-	-
AP267	-	+	-	-	-	+
AP476	-	+	-	-	-	-
AP406	+	++	-	-	+	+++
AP430	-	++	-	+	+	+++
KAP142	+	+	++	+	+	+
ASF	-	+	++	-	+	++

Verschiedene Kombinationen von anti-Abrin Antikörpern sowie Asialofetuin (ASF) wurden hinsichtlich Sensitivität im pTD System untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf die jeweilige Antikörper-Kombination mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. + entspricht 10-50 % relative Signalintensität, - entspricht weniger als 10 % Reaktivität. ¹diese Versuche wurden mit Abrin-a durchgeführt.

AP430 als Fängerantikörper mit dem einzelnen Detektor AP3202-bio wurde daher für die sich anschließenden Versuche zum Einzeltoxinnachweis eingesetzt. Eine Verdünnungsreihe von Abrin-a wurde mit dem pTD System auf dem finalen Biochip 8 vermessen (Abb. 46). Aufgetragen sind jeweils die normalisierten Mittelwerte von zwei Messungen mit Standardabweichung. Die Schwelle zur Bestimmung des Detektionslimits (Mittelwert des positionsspezifischen Leerwerts zuzüglich dreifacher Standardabweichung) wurde für Abrin auf 2,5 % A_{norm} festgesetzt (gestrichelte Linie). 1 ng/ml Abrin-a wurde damit sicher nachgewiesen.

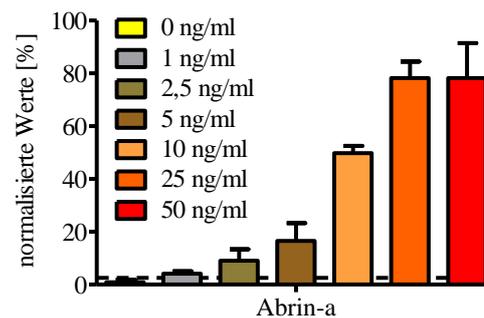


Abb. 46: Einzelnachweis von Abrin-a

Auf dem Biochip 8 wurde eine Konzentrationsreihe von Abrin-a gemessen. Als Fängerantikörper wurde AP430 verwendet. AP3202-bio (10 $\mu\text{g/ml}$) wurde als Detektionsantikörper eingesetzt. Alle Werte wurden aus zwei unabhängigen Messungen bestimmt (insgesamt vier Elektroden) und mit SD aufgetragen.

Ein sensitiver Nachweis lässt sich für alle fünf untersuchten Toxine etablieren (Tab. 39). Das Detektionslimit lag für alle einzeln untersuchten Analyten im unteren ng/ml-Bereich. Der Hintergrund bei 0 ng/ml Toxin auf allen Positionen des finalen Biochips 8 war zu vernachlässigen.

Tab. 39: Überblick Einzeltoxin-Nachweis

<i>Toxin</i>	<i>Fänger-Ak</i>	<i>Detektor-Ak</i>	<i>LOD</i> [ng/ml]	<i>Schwellenwert</i> A_{norm}
SEA	SEA388/SEA2353	SEA165-bio	0,25	2 %
BoNT/E	E136	KE97-bio	10	1 %
BoNT/C	C394	HcC2378-bio/C9-bio	5	2,5 %
BoNT/D	D63	D967-bio	2,5	1 %
Abrin-a	AP430	AP3202-bio	1	2,5 %

3.6.2 Multiplex-Nachweis der fünf Toxine

Im vorherigen Kapitel wurden jeweils einzelne Toxine auf einem Multiplex-Chip nachgewiesen. Dazu wurde immer exklusiv der passende biotinylierte Antikörper zu einem Analyten eingesetzt. In dem nun folgenden Kapitel werden Multiplex-Versuche durchgeführt. Dabei wurde ein zweistufiges Verfahren angewandt: Zunächst wurden die Toxine einzeln mit einer Mischung aller biotinylierten Antikörpern nachgewiesen (3.6.2.1), im zweiten Schritt (3.6.2.2) wurden alle Toxine gleichzeitig mit einer Mischung aller biotinylierten Antikörpern vermessen.

3.6.2.1 Untersuchungen der einzelnen Toxine

Die oben evaluierten Sandwich-Paar-Kombinationen zur Einzeldetektion von SEA, Abrin, BoNT/C /D und /E wurden für Multiplex-Versuche eingesetzt. In Vorversuchen wurden die ausgewählten Antikörper auf erste Multiplex-Chips gespottet. Dabei wurden beide Orientierungen getestet, d. h. jeder Antikörper wurde als Fänger- und als Detektionsantikörper verwendet. Die entstandenen Chips mit dem Layout Biochip 6 und 7 (siehe 9.2.6) dienten der ersten Untersuchung auf Kreuzreaktivitäten. Zudem wurde die optimale Orientierung des Sandwich ELISA-Paares untersucht sowie die Frage, ob Antikörper-Kombinationen zu falsch-positiven Signalen führten. Es zeigte sich keine Veränderung im Vergleich zum Einzeltoxinnachweis (3.6.1). Alle Orientierungen der Antikörper wurden übernommen, es mussten keine Fänger- und Detektionsantikörper getauscht werden. Kreuzreaktivitäten der Antikörper untereinander waren in diesen Vorversuchen zu vernachlässigen und lagen unter dem Schwellenwert von 3 % normalisierten Werten.

Mit dem entwickelten finalen Multiplex-Chip (Layout Biochip 8, siehe 9.2.7) wurden umfangreiche Testungen der einzelnen Toxine durchgeführt. Die Fängerantikörper wurden wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben auf dem Chip immobilisiert. Dazu wurden die biotinylierten Antikörper wie in *Tab. 40* angegeben vermischt und als Detektionsmischung verwendet. Der Schwellenwert wurde für alle Toxine auf 3 % normalisierte Werte festgesetzt. Dieser ergab sich aus der Mittlung aller Signale zuzügllicher der dreifachen Standardabweichung beim Einsatz von Pufferproben (n=10).

Tab. 40: Antikörper-Einsatz für den Multiplex-Toxinnachweis mit dem pTD System

<i>Toxin</i>	<i>Fänger-Ak</i>	<i>Konz</i> <i>[mg/ml]</i>	<i>Detektor-Ak</i> <i>Mischung</i>	<i>Konz.</i> <i>[µg/ml]</i>
SEA	SEA388/SEA2353	je 0,25	SEA165-bio	5
BoNT/E	E136	0,5	KE97-bio	10
BoNT/C	C394	0,5	HcC2378-bio/C9-bio	je 10
BoNT/D	D63	0,5	D967-bio	10
Abrin-a	AP430	0,5	AP3202-bio	10

Es wurde eine Standardreihe aller Toxine in Duplikaten vermessen (*Abb. 47*). Die Antigene SEA, Abrin-a, BoNT/C, /D und /E wurden einzeln in jeweils einer Konzentrationsreihe eingesetzt. Zudem wurde die Kreuzreaktivität auf nicht dem jeweiligen Toxin zugehörigen Spots beobachtet. Dabei zeigten sich selbst bei hohen Konzentrationen keine erhöhten Signale auf anderen Elektroden. Mit den Kombinationen der Antikörper wurde das jeweilige Toxin spezifisch detektiert. Kreuzreaktivitäten waren nicht zu beobachten. Signale bei einzelnen, nicht zugehörigen Elektroden waren auf Unregelmäßigkeiten im Stromverlauf (d. h. fehlerhafte Biochips) zurückzuführen. Im Vergleich zur Einzeltoxindetektion ergab sich bei Einsatz aller Detektionsantikörper eine leichte Verschlechterung des Detektionslimits mit Ausnahme von Abrin-a. Aufgrund des höheren Schwellenwertes von 3 % A_{norm} wurden höhere Signale und damit höhere Konzentrationen benötigt, damit ein positiver Nachweis erbracht wurde (*Tab. 41*). Bei SEA, BoNT/E, /C und /D wurde das LOD um etwa Faktor 2 erhöht.

In *Abb. 48* ist die Messung der einzelnen Elektroden im Einzeltoxinnachweis (ein Antigen, ein Detektions-Ak) schwarz, der Multiplex-Nachweis (ein Antigen, alle Detektions-Ak) rot dargestellt. Jeder Punkt steht für den Messwert einer Einzelelektrode, die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert bei 3 % normalisierten Werte für den Multiplex-Nachweis an. Die Kurvenverläufe und die Signalintensitäten der Konzentrationsreihen der einzelnen Toxine waren vergleichbar. Aufgrund des höheren Schwellenwerts verschob sich jedoch das Detektionslimit im Vergleich zum Einzeltoxinnachweis um bis zu einen Faktor 2 (vergleiche *Tab. 39* und *Tab. 41*).

Tab. 41: Überblick: Multiplex-Nachweis

<i>Toxin</i>	<i>Fänger-Ak</i>	<i>Detektor-Ak Gemisch</i>	<i>LOD</i> [ng/ml]	<i>Schwellen-</i> <i>wert A_{norm}</i>
SEA	SEA388/SEA2353		0,5	3 %
BoNT/E	E136	Mischung aus SEA165-	17,5	3 %
BoNT/C	C394	bio, HcC2378-bio, C9-	10	3 %
BoNT/D	D63	bio, D967-bio, KE97-bio,	5	3 %
Abrin-a	AP430	AP3202-bio	1	3 %

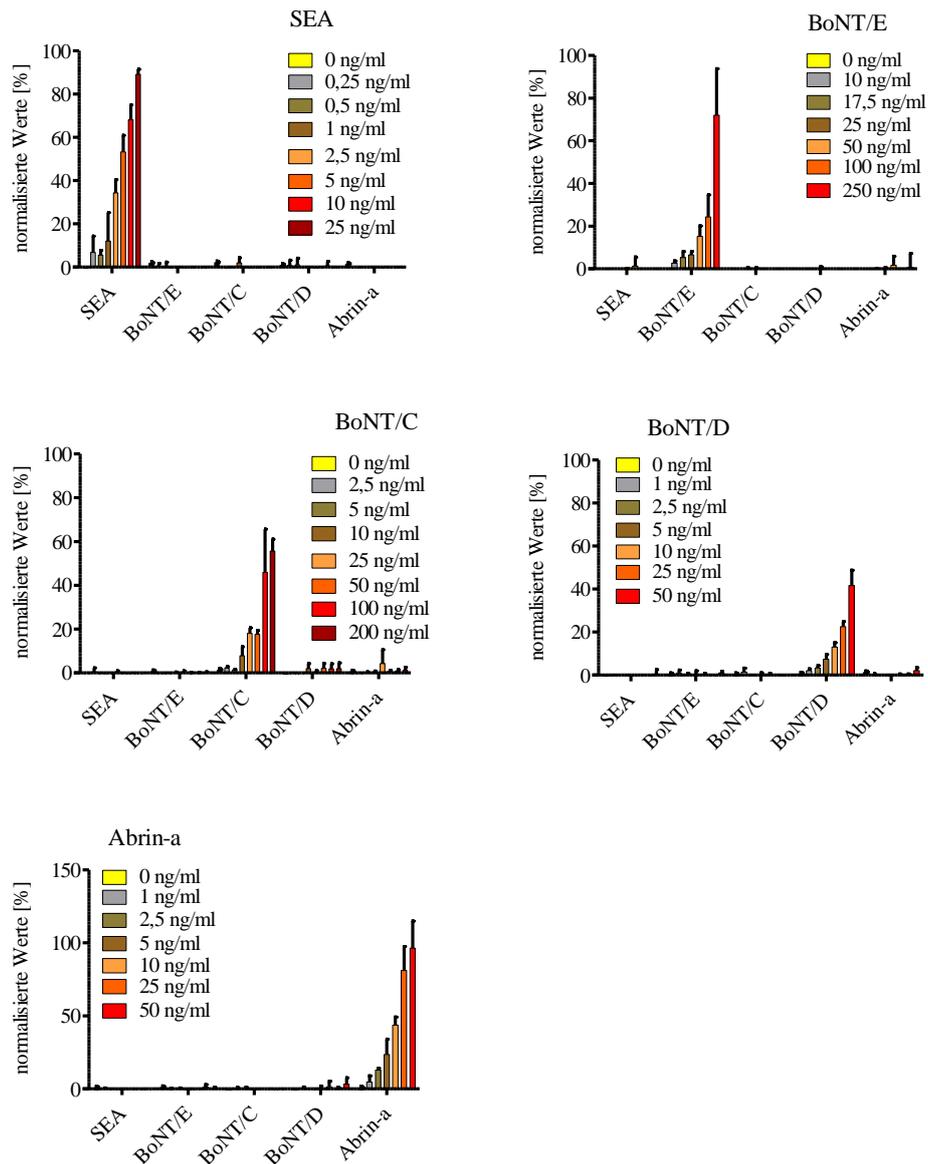


Abb. 47: Multiplex-Nachweis aller fünf Toxine einzeln

Die Fängerantikörper SEA388/SEA2353, E136, C394, D63 bzw. AP430 (Biochip 8) wurden zur Detektion einer Verdünnungsreihe von SEA, BoNT/E, /C, /D und Abrin-a (jeweils von links nach rechts, von oben nach unten) im pTD System verwendet. Zur Detektion wurde eine Mischung der Detektionsantikörper SEA165-bio, KE97-bio, C9-bio, HcC2378-bio, D967-bio bzw. AP3202-bio eingesetzt. Mittelwerte der Doppelbestimmung mit SD für alle Spots wurden abgebildet.

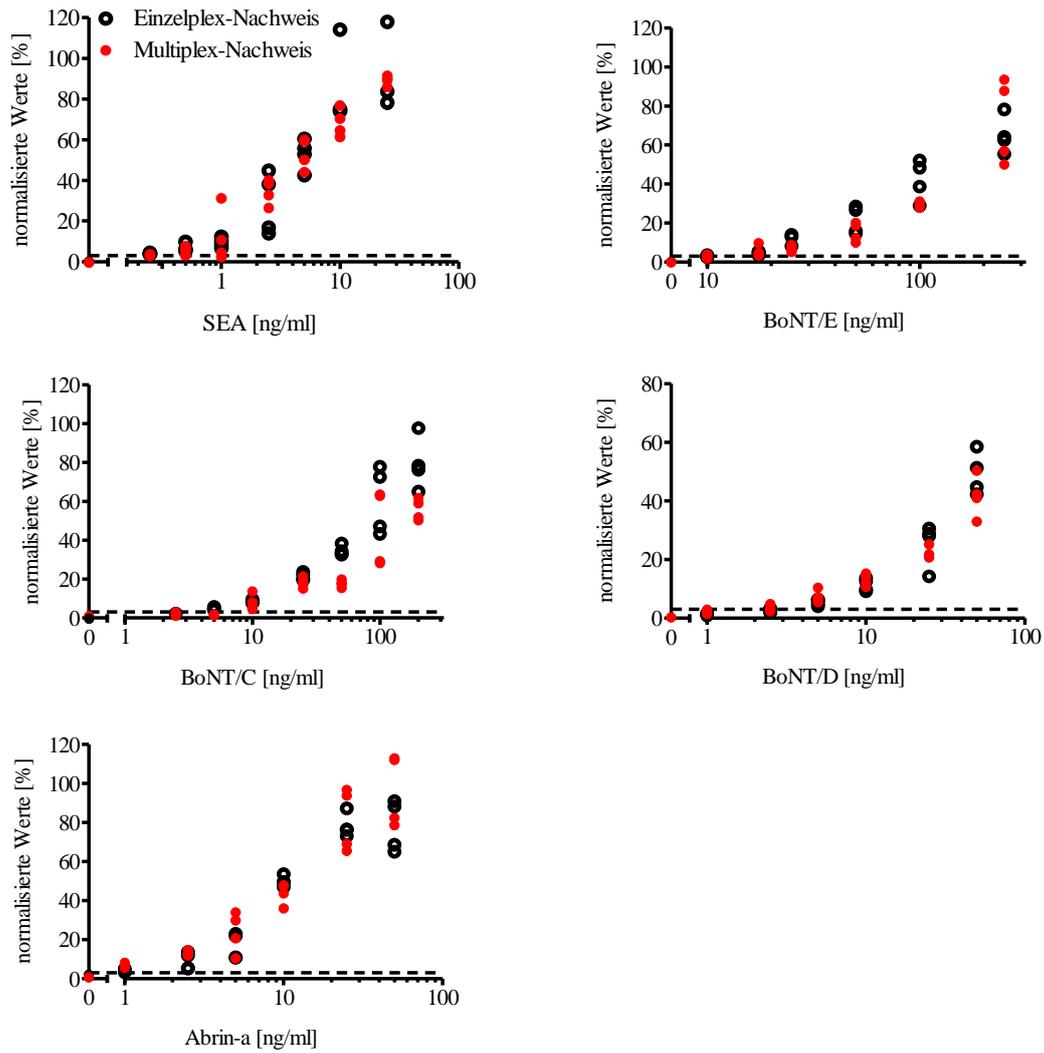


Abb. 48: Vergleich der Messung der einzelnen Analyten mit einem bzw. allen Detektions-Ak Die Fängerantikörper SEA388/SEA2353, E136, C394, D63 bzw. AP430 wurden zur Detektion einer Verdünnungsreihe von SEA, BoNT/E, /C, /D und Abrin-a (jeweils von links nach rechts, von oben nach unten) verwendet. Als biotinylierte Detektionsantikörper wurde jeweils einzeln SEA165-bio, KE97-bio, C9/HcC2378-bio, D967-bio oder AP3202-bio (schwarze Kreise) eingesetzt. Die Multiplex-Messwerte (rot) entstanden durch den Einsatz einer Mischung aller Detektionsantikörper, wie in *Tab. 40* angegeben. Gestrichelt wurde der Schwellenwert von 3 % norm. Werte für den Multiplex-Nachweis eingezeichnet.

3.6.2.2 Gleichzeitige Untersuchungen aller Toxine

Im zweiten Teil der Multiplex-Untersuchungen wurden alle Toxine simultan detektiert. Das Vorkommen aller Toxine in einer Probe ist kein realitätsnaher Fall, aber diese Art der Testung ist dennoch nötig, weil sich hier die Unabhängigkeit der Chip-Positionen zeigt: Die Messung mehrerer Antigene gleichzeitig sollte im optimalen Fall die Signalbildung auf einzelnen Spots nicht verändern. Zeigen sich hier Abweichungen zu den Messungen der einzelnen Toxine, aber mit allen Detektionsantikörpern (3.6.2.1), so kann auf Probleme bei der Signalgenerierung geschlossen werden.

Aus diesem Grund wurden mehrere Toxinmischungen vermessen. In der ersten Verdünnung wurden alle Toxine in der gleichen, höchsten Konzentration wie in den Einzeltoxinnachweisen und dem Multiplex-Nachweis eingesetzt. Daraus wurden serielle 1:2 Verdünnungen hergestellt und vermessen (Verdünnung 2 bis 6, Konzentrationen der einzelnen Toxine siehe *Tab. 42*). Als Detektor wurden alle biotinylierten Antikörper zusammen benutzt, wie in *Tab. 40* angegeben.

Tab. 42: Konzentrationen für den Multiplex-Nachweis

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>0 ng/ml</i>
SEA [ng/ml]	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0
BoNT/E [ng/ml]	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81	0
BoNT/C [ng/ml]	200,00	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25	0
BoNT/D [ng/ml]	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0
Abrin-a [ng/ml]	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0

Die Auswertung dieser Versuche zeigte, dass mit dem pTD System ein „echter“ Multiplex-Nachweis möglich war (*Abb. 49*). Der Schwellenwert für die LOD-Bestimmung wurde wie oben auf 3 % normalisierter Werte festgesetzt (gestrichelte Linie).

Die Messung mehrerer Toxine gleichzeitig behinderte nicht die Messung auf den einzelnen Toxinpositionen. Alle Toxine mit Ausnahme von BoNT/D und /E wurden in der niedrigsten Verdünnungsstufe 6 detektiert. 7,81 ng/ml BoNT/E sowie 1,56 ng/ml BoNT/D wurden nicht nachgewiesen, dies war auch in den anderen Ansätzen nicht möglich. Die Konzentrationen aus Verdünnungsstufe 6 für die anderen Toxine waren im Bereich des Detektionslimits der Einzeltoxinnachweise und des Multiplex-Nachweises mit allen biotinylierten Antikörpern. Das LOD blieb in diesen Versuchen gleich. Die Streuung der Messwerte war allerdings etwas höher als in den Multiplex-Versuchen mit einem Toxin. Die Signalintensität war vergleichbar zu den vorherigen Messungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dem pTD System ein Multiplex-Nachweis der Toxine SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin-a möglich ist. Es wurden mit gleichbleibender Sensitivität ein oder mehrere Toxine mit allen eingesetzten biotinylierten Ak detektiert. Abweichungen zu 3.6.1 und 3.6.2.1 wurden nicht festgestellt.

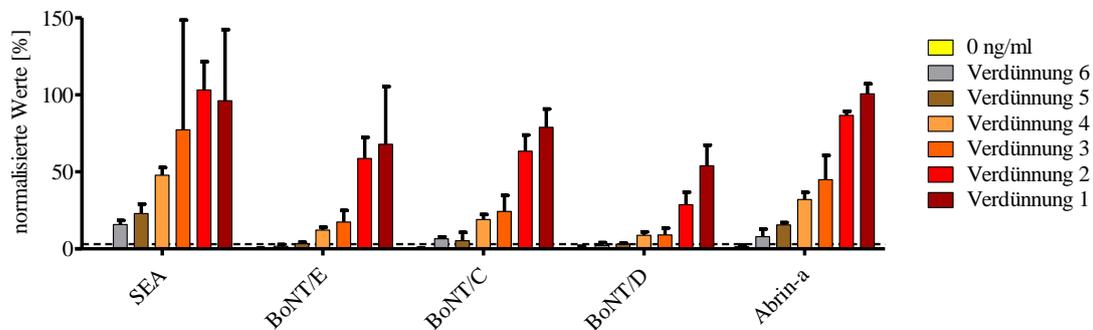


Abb. 49: Multiplex-Nachweis aller fünf Toxine gleichzeitig

Die Fängerantikörper SEA388/SEA2353, E136, C394, D63 bzw. AP430 wurden zur Detektion von SEA, BoNT/E, /C, /D und Abrin-a verwendet. Als biotinylierte Detektionsantikörper wurde eine Mischung von SEA165-bio, KE97-bio, C9/HcC2378-bio, D967-bio bzw. AP3202-bio eingesetzt. Alle Toxine wurden gleichzeitig mit dem pTD gemessen (Konzentrationen in Tab. 42). Mittelwerte der Doppelbestimmung mit SD für alle Spots wurden abgebildet.

3.6.3 Validierung des Vor-Ort-Toxinsnachweises in verschiedenen Matrices

Zur Validierung des etablierten Biochips wurden die Toxine nicht nur in Puffer, wie in den obigen Kapiteln, sondern auch in verschiedenen Matrices nachgewiesen. Mit dem pTD System als Vor-Ort-Nachweissystem sollten die Toxine aus komplexen Proben detektierbar sein.

Die ausgewählten Matrices wurden in standardisierter Form von allen Partner im GEFREASE-Projekt verwendet: Hausstaub, standardisierter Boden, Milch (1,5 % Fett, ultrahoherhitzt), Mineralwasser (Evian) und Luftkeimsammlerproben. Die Konzentration der Toxine wurde anhand der zuvor bestimmten Konzentrationsreihe so festgelegt, dass der normalisierte Wert der entsprechenden Verdünnung in Puffer (gestrichelte Linie, Abb. 50) zwischen 20-45 % lag, um gegebenenfalls Abweichungen nach oben und nach unten zu Pufferproben messen zu können.

Die Toxine wurden jeweils in eine 50%ige Lösung (v/v) der flüssigen Matrices gegeben. Die festen Matrices Boden und Staub wurden in neun Teile PBS/BSA Puffer (pH 6) aufgenommen (10%ige Lösung). Es wurde das entsprechende Toxin hinzugefügt, eine halbe Stunde rotierend inkubiert und feste Bestandteile mit Hilfe eines 0,8 µm Filters entfernt. Die Detektion erfolgte mittels pTD System mit allen biotinylierten Antikörpern (siehe Tab. 40).

Der Nachweis der Toxine aus den fünf Matrices gelang mit unterschiedlichem Erfolg und war sowohl vom Toxin als auch von der Matrix abhängig. Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige

Messungen mit insgesamt vier Einzelwerten und der zugehörigen Standardabweichung (Abb. 50).

SEA in einer Konzentration von 2,5 ng/ml ließ sich aus allen Matrizes gut nachweisen. Die Signale in Milch und Boden zeigten eine höhere Varianz als in Puffer (gestrichelte Linie). Bei Staub wurde ein niedrigeres Signal gemessen als bei den anderen Matrizes, was vermutlich auf die Adsorption des Toxins an die Staubpartikel zurückzuführen ist.

100 ng/ml BoNT/E wurde aus den flüssigen Matrizes nachgewiesen, jedoch nicht in Boden und Staub. Erst bei einer Konzentration von 250 ng/ml BoNT/E wurde ein erfolgreicher Nachweis aus diesen beiden Matrizes geführt, allerdings waren die normalisierten Werte weit unter den Messwerten in Puffer (gestrichelte Linie).

BoNT/C in einer Konzentration von 100 ng/ml wurde aus allen Matrizes positiv nachgewiesen. Bei den flüssigen Proben lagen die normalisierten Messwerte sogar über den Werten für 100 ng/ml Toxin in Puffer.

Bei BoNT/D traten ebenfalls keine Probleme beim Nachweis aus Staub, Boden, Milch, Mineralwasser und Luftkeimsammlerproben auf. Die Signalhöhe entsprach mit Ausnahme der Bodenprobe ungefähr den Signalhöhen in Puffer. Bei der Bodenprobe trat eine erhöhte Varianz innerhalb der einzelnen Messungen auf.

Abrin-a ließ sich aus den flüssigen Matrizes mit hoher Signalstärke nachweisen. Bei Boden und Staub waren die Signale reduziert, aber klar messbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die flüssigen Matrizes Milch, Mineralwasser und die Luftkeimsammlerprobe in Puffer zu keinen Problemen für die fünf Toxinnachweise führten. In Boden und Staub wurden die Signale für alle Toxine mit Ausnahme von BoNT/D reduziert. Die Toxine banden vermutlich unspezifisch an die Partikel und wurden durch den Filtrationsschritt entfernt. Der Nachweis für BoNT/E bei einer Konzentration von 100 ng/ml war nicht mehr möglich. Leerproben der fünf Matrizes führten zu keinen nennenswerten Hintergrundsignalen auf den jeweiligen Positionen.

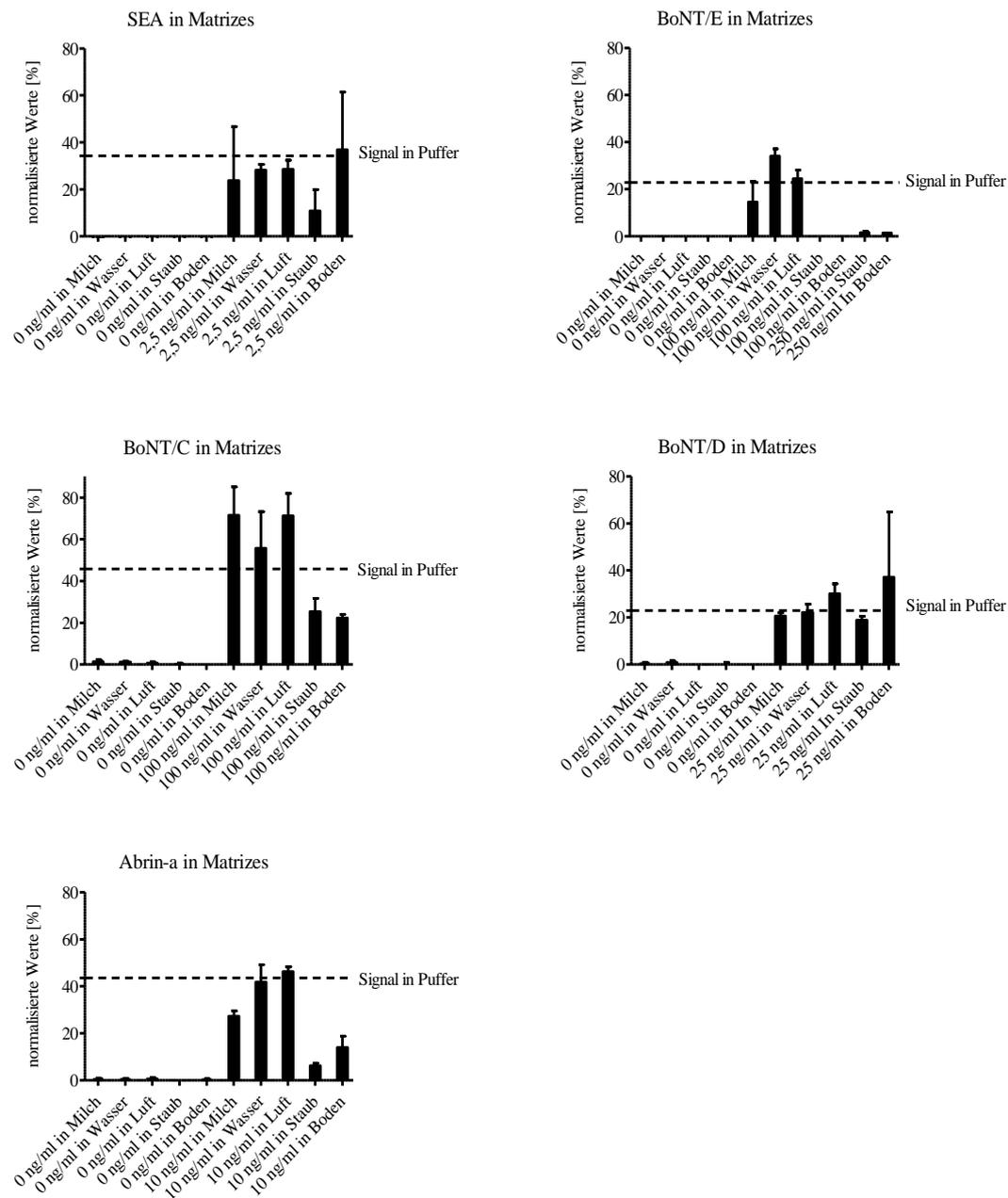


Abb. 50: Nachweis der fünf Toxine in fünf Matrices

Die Fängerantikörper SEA388/SEA2353, E136, C394, D63 bzw. AP430 wurden zur Detektion von SEA, BoNT/E, /C, /D und Abrin-a (jeweils von links nach rechts, von oben nach unten) verwendet, als biotinylierte Detektionsantikörper wurde eine Mischung von SEA165-bio, KE97-bio, C9/HcC2378-bio, D967-bio bzw. AP3202-bio eingesetzt (vergleiche Tab. 40).

SEA (2,5 ng/ml), BoNT/E (100 ng/ml), BoNT/C (100 ng/ml), BoNT/D (25 ng/ml) und Abrin-a (10 ng/ml) sowie Leerproben wurden mit dem pTD System aus den fünf Matrices Milch, Mineralwasser, Luftkeimsammlerprobe in PBS-T, Boden und Staub bestimmt.

3.6.4 Selektivität gegenüber verwandten Toxinen

In weiteren Versuchen wurde die Selektivität des Nachweissystems untersucht. Dazu wurden verwandte Toxine mit dem neu entwickelten Multiplex-Toxinnachweis im pTD System analysiert (Tab. 43). Es wurden gereinigte Toxine in einer Konzentration von 25 ng/ml eingesetzt. Zusätzlich wurden Überstände von verschiedenen *Clostridien*-Stämmen in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:100 untersucht. Hier wurde zuvor die Anwesenheit von Toxin mittels ELISA oder Maus Bioassay bestätigt (Daten nicht dargestellt). BoNT/A1, /B1, /F1, /G und die in den Überständen vorhandenen, entsprechenden BoNT-Komplexe führten zu keinen Signalen. Die zu Abrin-a nahverwandten Proteine Rizin, *Ricinus* Agglutinin und *Abrus* Agglutinin wurden ebenfalls negativ getestet. Zusätzlich wurde aus der Familie der SEs SEB und SEE untersucht, welche ebenfalls nicht nachgewiesen wurden. Rekombinantes SEA (rec. SEA) hingegen wurde positiv detektiert.

Der Nachweis der veterinärpathogenen BoNTs gelang mit dem neu entwickelten Nachweissystem. Sowohl die gereinigten Mosaiktoxine scBoNT/CD und /DC als auch entsprechende Kulturüberstände wurden positiv getestet (vergleiche 3.5).

Die humanpathogenen Subtypen von BoNT/E wurden teilweise erfolgreich detektiert. Rekombinant hergestelltes scBoNT/E1 wurde erst in einer Konzentration von 50 ng/ml nachgewiesen. Die BoNT-Komplexe, welche in den Überständen der Stämme mit den Subtypen /E1 und /E3 enthalten waren, führten zu positiven Signalen. Ein neu entdeckter, nicht publizierter Überstand mit der vorläufigen Bezeichnung /Ex wurde nicht detektiert. Dies erklärt sich daraus, dass der monoklonale Fängerantikörper E136 diesen Subtyp, welcher 8 % Unterschied auf Aminosäure-Ebene zu den anderen beiden Subtypen aufweist, bereits im ELISA-Format nicht erkannte.

Insgesamt erwies sich der neu entwickelte Toxinnachweis mit den in Tab. 40 angegebenen Antikörpern als spezifisch und zeigte keine Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen, verwandten Toxinen.

Tab. 43: Spezifität des pTD Nachweises gegenüber verwandten Toxinen

<i>Antigen</i>	<i>Konz./ Verdünnung</i>	<i>SEA</i>	<i>BoNT/C</i>	<i>BoNT/D</i>	<i>BoNT/E</i>	<i>Abrin</i>
				<i>Positionen</i>		
rec. SEA	25 ng/ml	+	-	-	-	-
SEB	25 ng/ml	-	-	-	-	-
SEE	25 ng/ml	-	-	-	-	-
BoNT/A1	25 ng/ml	-	-	-	-	-
ÜS BoNT/A1	1:10	-	-	-	-	-
BoNT/B1	25 ng/ml	-	-	-	-	-
ÜS BoNT/B1	1:10	-	-	-	-	-
ÜS BoNT/C	1:10	-	+	-	-	-
scBoNT/CD	25 ng/ml	-	+	-	-	-
ÜS BoNT/CD	1:10	-	+	-	-	-
ÜS BoNT/D	1:100	-	-	+	-	-
BoNT/DC	25 ng/ml	-	-	+	-	-
ÜS BoNT/DC	1:40	-	-	+	-	-
scBoNT/E1	25 ng/ml	-	-	-	-	-
	50 ng/ml	-	-	-	+	-
ÜS BoNT/E1	1:10	-	-	-	+	-
ÜS BoNT/E3	1:10	-	-	-	+	-
ÜS BoNT/Ex	1:10	-	-	-	-	-
BoNT/F1	25 ng/ml	-	-	-	-	-
ÜS BoNT/F1	1:10	-	-	-	-	-
BoNT/G	25 ng/ml	-	-	-	-	-
ÜS BoNT/G	1:10	-	-	-	-	-
Rizin	25 ng/ml	-	-	-	-	-
<i>Ricinus</i> Aggl.	25 ng/ml	-	-	-	-	-
<i>Abrus</i> Aggl.	25 ng/ml	-	-	-	-	-

ÜS Überstand, + Signal über 3 % A_{norm} , - Signal unter dem Schwellenwert von 3 % A_{norm} auf den entsprechenden Probenpositionen.

3.6.5 Applikation des pTD Systems in einer Anwenderübung

Kommt es zu intentionalen oder akzidentellen Kontaminationen mit biologischen Toxinen, ist eine schnelle und zuverlässige Detektion nötig, um zügig geeignete Gegenmaßnahmen einzuleiten. Die erste Detektion wird meist am Ort des Geschehens von speziell ausgebildeten Einsatzkräften (Feuerwehr, Polizei) durchgeführt. Diese werden in die verschiedenen Geräte eingewiesen, haben aber oft keine chemische oder biologische Berufsausbildung. Eine einfache Handhabung der Vor-Ort-Detektionsgeräte ist daher besonders wichtig. Zudem sollten die Geräte stabil und gut zu dekontaminieren sein. Die Messdauer ist ebenfalls eine wichtige Größe, gerade wenn ein großes Gebiet oder viele Proben auf mögliche Kontaminationen untersucht werden müssen (vergleiche 1.2).

Das pTD Gerät wurde als Vor-Ort-Detektionsgerät konzipiert. Die Handhabung und Leistungsfähigkeit des Geräts sollte abschließend unter Realbedingungen in einer Anwenderübung getestet werden.

Speziell ausgebildete Einsatzkräfte von Polizei und Feuerwehr sollten das pTD und eine alternative Plattform (KIM Plattform, Bertin Technologies) im Vergleich testen. Da diese Personengruppen in einem Übungsszenario nicht mit toxischen Stoffen im Kontakt kommen sollten, wurde das nicht-toxische H_C/C-Fragment als Toxinsurrogat eingesetzt.

Speziell für die Übung wurde ein Nachweis für H_C/C auf der pTD Plattform entwickelt. Hierfür wurde ein eigenes Chiplayout verwendet (Layout Biochip 3, siehe 9.2.3). Dazu wurden vier Antikörper gegen die H_C/C-Domäne auf einem Chip immobilisiert und die gleichen mAk als biotinylierte Antikörper getestet (Tab. 44). Die Kombination HcC141 als Fängerantikörper und HcC1304-bio erwies sich als die sensitivste Variante (fett markiert), welche in den untersuchten Matrices gut funktionierte. Im Hinblick auf die Anwenderübung, bei dem das nicht-toxische Fragment H_C/C eingesetzt wurde, wurde daher diese Kombination ausgewählt.

Tab. 44: pTD Vorversuche zur H_C/C Detektion

<i>Ak auf Chip</i>	<i>C9-bio</i>	<i>HcC141-bio</i>	<i>HcC1304-bio</i>	<i>HcC2378-bio</i>
C9	-	-	+++	++
HcC141	+	-	+++	++
HcC1304	++	++	-	++
HcC2378	++	++	++	-

Verschiedene Kombinationen von anti-H_C/C mAk wurden hinsichtlich Sensitivität im pTD System untersucht. Die Signalintensitäten werden auf einer relativen Skala angegeben, bezogen auf die jeweilige mAk-Kombination mit der höchsten Signalstärke. +++ bedeutet mehr als 75 % relative Signalintensität, ++ 75-50 % relative Signalintensität. + entspricht 10-50 % relative Signalintensität, - entspricht weniger als 10 % Reaktivität.

Zusätzlich wurde auf dem Chip ein Antikörper (SEA165) gegen das nicht-verwandte Toxin SEA immobilisiert, um mögliche unspezifische Signale zu erfassen. Diese konnten z. B. durch Interaktionen der Matrizes mit der Goldoberfläche des Chips entstehen.

Zusammen mit je vier Positiv- und vier Negativkontrollen wurde für die Anwenderübung ein eigenes Chiplayout mit den Antikörpern SEA165 und HcC141 entworfen (siehe Layout Biochip 5, 9.2.5). Dieses Layout wurde im Labor umfassend validiert. Neben Pufferproben wurden verschiedene Matrizes eingesetzt (vergleiche 3.6.3). Aus den fünf Matrizes Hausstaub, Boden, Milch, Mineralwasser und Luftkeimsammlerproben in Puffer wurden für die Anwenderübung drei ausgewählt: Luftkeimsammlerprobe, Milch und Boden. Diese wurden jeweils einmal als Leerprobe und einmal mit einer definierten Konzentration Toxinsurrogat dotiert angeboten. Dabei wurden jeweils Konzentrationen gewählt, die etwa fünffach über dem zuvor bestimmten Detektionslimit lagen. Zusätzlich wurden drei verschiedene Konzentrationen H_c/C in Puffer (0,1 % BSA in PBS pH 6) sowie eine Leerprobe vorbereitet (Tab. 45). Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass bei den Pufferproben eine Konzentration (15 ng/ml) knapp über dem LOD des pTD Systems lag. Die anderen Konzentrationen waren 50 bzw. 150 ng/ml H_c/C, welche aufgrund ihrer hohen Konzentration einfach zu detektieren sein sollten.

Tab. 45: Proben für die Anwenderübung

<i>Nummer</i>	<i>Matrix</i>	<i>Konzentration H_c/C</i>
1	Luftkeimsammlerprobe	25 ng/ml
2	PBS/BSA	0 ng/ml
3	Milch	100 ng/ml
4	PBS/BSA	50 ng/ml
5	Milch	0 ng/ml
6	Boden	300 ng/ml
7	Luftkeimsammlerprobe	0 ng/ml
8	PBS/BSA	15 ng/ml
9	Boden	0 ng/ml
10	PBS/BSA	150 ng/ml

Im November 2014 wurde die Anwenderübung an der Akademie für Krisenmanagement, Notfallplanung und Zivilschutz in Ahrweiler durchgeführt. Diese Einrichtung des assoziierten Partners Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (BBK) stellte geeignete Räumlichkeiten für ein Übungsszenario zur Verfügung.

Als Anwender wurden interessierte Feuerwehrleute aus Essen, Hamburg, Mannheim und Paris sowie zwei Personen vom Landeskriminalamt Berlin ausgewählt. Diese hatten bereits eine Vorausbildung für chemische Unfälle und gehörten zu den sogenannten *analytischen Task*

Force Chemie Einheiten. So brachten sie Vorwissen im Umgang mit Kontaminationen, persönlicher Schutzausrüstung, Chemie-Messtechnik und Dekontaminationsabläufen ein.

Am ersten Tag wurden die Einsatzkräfte in die Geräte pTDi und KIM eingewiesen. pTDi ist die mobile Variante des Laborgeräts pTD (*Abb. 12*). Die Probenvorbereitung wurde demonstriert, zudem wurde wichtiges Hintergrundwissen über biologische Gefahrstoffe vermittelt.

Am zweiten Tag führten die Einsatzkräfte die Messungen der zehn verblindeten Proben durch. Zusätzlich mussten die Geräte aufgebaut und vorbereitet werden. Um ein möglichst realistisches Szenario zu erhalten, wurden alle Schritte unter persönlicher Schutzausrüstung durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Anzüge der höchsten Kategorie 3 getestet: ein gasdichter Chemikalienschutzanzug mit außenliegendem Pressluftatmer (Typ 1b), ein Chemikalienschutzanzug (Typ 3) mit Vollmaske mit Kombinationsfilter (ABEK-P3) und ein Chemikalienschutzanzug (Typ 3b) mit Haube und Gebläsefiltersystem (TH3). So wurde die Gerätehandhabung unter unterschiedlichen Bedingungen analysiert. Gleichzeitig spiegelt diese Auswahl an persönlicher Schutzausrüstung den Ausrüstungsstand verschiedener Einsatzkräfte wider. Durch die eingeschränkte Sicht (aufgrund von Schutzmasken) und Bewegungsfreiheit ist die Bedienung der Geräte deutlich schwieriger als im Labor. Dies stellt besondere Anforderungen an die Anzeigen und Bedienelemente der Geräte. Zusätzlich ist die Feinmotorik vermindert, durch drei Paar Handschuhe werden selbst einfache Arbeiten wie das Aufschrauben von Röhrchen erschwert. Bei einem Vor-Ort-Detektionssystem sollten genau diese Einschränkungen bedacht werden, um die Bedienung so einfach wie möglich zu machen.

Bei der Auswertung der Anwenderübung wurden zwei verschiedene Aspekte betrachtet: Zum einen die Leistung des Gerätes beim Nachweis der biologischen Agenzien und zum anderen die Eignung als Vor-Ort-Detektionssystem.

Für den ersten Punkt wurde das pTDi System anhand der Leistung beim Nachweis des H_c/C-Fragments beurteilt. Das Toxinsurrogat wurde aus Puffer und komplexen Matrices nachgewiesen (*Tab. 46*). Mit dem pTDi wurden alle Proben richtig zugeordnet. Die Signale waren etwa denen mit dem Laborgerät pTD erzeugten Werten vergleichbar (Daten nicht dargestellt). Die Matrices führten nicht zu Problemen. Verschleppungen waren ebenfalls nicht festzustellen.

Tab. 46: Auswertung der Anwenderübung

<i>Nummer</i>	<i>Matrix</i>	<i>Konzentration H₀/C</i>	<i>Zuordnung</i>
1	Luftkeimsammlerprobe	25 ng/ml	✓
2	PBS/BSA	0 ng/ml	✓
3	Milch	100 ng/ml	✓ ^a
4	PBS/BSA	50 ng/ml	✓
5	Milch	0 ng/ml	✓
6	Boden	300 ng/ml	✓
7	Luftkeimsammlerprobe	0 ng/ml	✓
8	PBS/BSA	15 ng/ml	✓
9	Boden	0 ng/ml	✓
10	PBS/BSA	150 ng/ml	✓

Proben 1-10 wurden mit dem pTDi vermessen. ✓ bedeutet qualitativ richtige Zuordnung, ^a Messung musste aufgrund eines Software-Kommunikationsfehlers wiederholt werden

Im zweiten Teil der Auswertung wurde die Eignung des pTDi als Vor-Ort-Detektionssystem beurteilt. Am Ende des Messtages wurden die Einsatzkräfte gebeten, einen Fragebogen über die Eigenschaften und Handhabung des Gerätes auszufüllen. Hierbei wurden folgende Themenkomplexe abgefragt:

Anleitung, Vorbereitung der Messung, Probenaufbereitung, Durchführung der Messung, Dekontamination/Desinfektion, Stromversorgung, Handhabung, Ergebnisdarstellung, Transport, Datenmanagement und Software sowie Multiplex-Fähigkeit und Einbaumöglichkeit in Fahrzeuge. Zusätzlich sollte eine Gesamtbewertung zum Gerät abgegeben werden, ob es als feldtauglich eingeschätzt wurde. Die erstgenannten Faktoren wurden mit Hilfe eines vom BBK entwickelten Schemas in eine Punktetabelle umgerechnet (siehe Tab. 47). Maximal waren 95 Punkte zu erreichen. Das pTDi wurde mit im Mittel 70,4 (n=9) Punkten bewertet, die KIM Plattform mit 61,6. Das pTDi wurde aufgrund seiner Multiplex-Fähigkeit und den internen Positiv- und Negativkontrollen besser bewertet. Die unterschiedlichen persönlichen Schutzausrüstungen hatten keinen Einfluss auf die Bewertung der Geräte.

In einer Gesamtbewertung beurteilten fünf von neun Einsatzkräften das pTDi als absolut feldtauglich. Die anderen vier waren der Meinung, dass das pTDi besser in einem mobilen Labor eingesetzt werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das im Rahmen des GEFREASE-Projektes entwickelte pTD System sehr gut von Einsatzkräften am Ort einer biologischen Gefahrenlage benutzt werden kann. Die einfache Handhabung und ein robustes Gerätedesign bei gleichzeitig sensitivem und spezifischem Nachweis erleichtern die Beurteilung einer gefährlichen Situation deutlich.

Tab. 47: Auswertung des Fragebogens für Vor-Ort-Detektionsgeräte

<i>Kategorie</i>	<i>Maximale Punkte</i>	<i>Erreichte Punkte (pTD_i)</i>
Anleitung	8	7,4
Vorbereitung der Messung	12	7,9
Probenaufbereitung	14	7,8
Durchführung der Messung	14	10,9
Art des Tests	10	8,0
Dekontamination/Desinfektion	10	6,4
Stromversorgung	6	5,2
Handhabung	7	3,9
Ergebnisdarstellung	5	5,0
Transport	4	3,3
Datenmanagement und Software	5	4,2
Summe	95	70,4

Teilnehmer: Neun Einsatzkräfte; Diese Tabelle wurde freundlicherweise von Nahid Derakshani (BBK) zur Verfügung gestellt.

4 Diskussion

Der Nachweis von biologischen Toxinen ist aus mehreren Gründen anspruchsvoll: Ihre hohe Toxizität macht äußerst sensitive Detektionsmethoden mit Nachweisgrenzen im pg/ml- bis ng/ml-Bereich erforderlich. Zudem müssen die Toxine von anderen, nahverwandten Proteinen unterschieden werden. Gleichzeitig müssen Sequenzvariationen (Subtypen, Isoformen) des gesuchten Toxins erfasst werden. Im Fall von BoNT/A sollten zum Beispiel alle acht Subtypen erkannt werden, eine Kreuzreaktivität zu anderen BoNT Serotypen hingegen sollte nicht auftreten. Ein Nachweis der DNA der Toxinsequenz ist nicht ausreichend, da die Toxine unabhängig von ihrem produzierenden Organismus ihre Wirkung entfalten können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunologische Nachweissysteme für die biologischen Toxine SEA, Abrin und BoNT/A, /C, /D und /E aufgebaut. Antikörper-basierte Nachweise sind in der Regel robust, sensitiv, spezifisch, mit geringem technischem Aufwand durchzuführen und unempfindlich gegenüber vielen Störsubstanzen. Mäuse wurden mit atoxischen Surrogaten immunisiert, um daraus monoklonale Antikörper zu gewinnen. Die Antikörper wurden umfassend charakterisiert. Darauf aufbauend wurden spezifische und sensitive Sandwich ELISA für den Labornachweis der Toxine etabliert.

Die letzten beiden Kapitel des Ergebnisteils zeigten zwei Anwendungsbeispiele für die neu generierten Antikörper: Es gelang mit Hilfe der neuen mAk erstmals, ein ELISA- und ein MS-basiertes Testsystem zu entwickeln, mit dem BoNT/C, /CD, /D und /DC eindeutig differenziert werden können. Damit stehen für den veterinärmedizinischen Bereich Verfahren für den Einsatz im Routinelabor und für den Einsatz in Expertenlaboren zur Verfügung. Diese können zukünftig zur Untersuchung veterinärmedizinischer Botulismusfälle verwendet werden (z. B. zur Klärung von Intoxikationsketten oder epidemiologischer Fragestellungen).

Parallel wurden die Antikörper in ein elektrisches Biochipssystem, die pTD Plattform (Bruker Daltonik), übertragen, um einen Vor-Ort-Nachweis mit Detektionslimits im unteren ng/ml-Bereich aufzubauen. Zusätzlich wurde die Plattform einem Praxistest unterzogen, in dem Einsatzkräfte in einem Übungsszenario einen Toxinnachweis trainieren konnten.

4.1 Immunisierungs- und Screeningsstrategien

Biologische Toxine können meist nicht direkt zur Immunisierung verwendet werden, da sie zum Tod von Mäusen führen würden. Aus diesem Grund wurde mit Ausnahme von SEA keine direkte Immunisierung mit den aktiven Toxinen vorgenommen. Es wurden verschiedene Immunisierungsstrategien angewendet, abhängig vom Antigen. Zwischen 25 und 100 µg jedes Antigens wurde in Freund's Adjuvans appliziert ([290] und 9.1). Diese Wasser-Öl-Emulsion sorgt für eine hohe lokale Konzentration des Antigens (Depot-Wirkung) und somit für eine bessere Aufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen [279, 291]. Die Entwicklung eines zufriedenstellenden Titers bei den Mäusen nach den Immunisierungen wurde mittels indirektem

ELISA und Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie untersucht (siehe Anhang 9.1 sowie *Abb. 18*). Die Milzen wurden entnommen, Splenozyten isoliert und mit Myelomzellen zu sogenannten Hybridomazellen fusioniert [270].

Staphylokokken Enterotoxin A wies die geringste Toxizität der hier untersuchten Proteine auf [34]. Es wurde ohne weitere Inaktivierung direkt zur Immunisierung benutzt, ein Verfahren, das bereits in der Literatur beschrieben wurde [49]. Die Hybridomazellen, welche die Antikörper SEA165, SEA388 und SEA2353 produzierten, wurden aus zwei immunisierten Mäusen gewonnen.

Die Immunisierung von Mäusen mit Botulinum Neurotoxinen erwies sich als deutlich schwieriger. Aufgrund der hohen Toxizität konnten diese Proteine nicht direkt injiziert werden. Es gibt zwei Hauptmethoden, um Antikörper gegen BoNT zu generieren. Zum einem wird das Volllängen-Toxin inaktiviert (Toxoid), zum anderen werden Fragmente von BoNT zur Immunisierung benutzt [114, 125, 132, 292, 293].

Zur Inaktivierung der Volllängen-Toxine werden niedrige Konzentrationen Formaldehyd verwendet. Dieses Verfahren zur Herstellung der sogenannte Toxoide geht auf Paul Ehrlich und seine Studien zur Inaktivierung von Diphtherie-Toxin zurück [294]. Formaldehyd führt zur Quervernetzung der Seitenketten der Proteine und somit zur Polymerisierung [295]. Dieses Verfahren erschwert die Aufnahme in Zellen und vermindert die Toxizität deutlich. Der Einsatz von Volllängen-Toxinen hat den Vorteil, dass gebildete Antikörper gegen alle Domänen gerichtet sind. Man erzeugt damit in einem Tier Antikörper gegen die LC, die H_N- und die H_C-Domäne. Diese Technik wird seit mehr als fünfzig Jahren für die Generierung von Antikörpern gegen BoNTs angewandt [108, 125, 132]. Der Nachteil bei dieser Methode besteht darin, dass oft Antikörper mit hoher Reaktivität gegen das denaturierte Toxin gefunden werden, welche nicht mit dem nativen Toxin interagieren (Erfahrungen in der Arbeitsgruppe, [166]). Hier ist die richtige Screeningmethode entscheidend (siehe unten).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zweite Strategie zur Generierung monoklonaler Antikörper verwendet. Dazu wurden einzelne Domänen der BoNTs rekombinant exprimiert (Dr. A. Rummel, MHH). Da bereits Antikörper gegen die leichten Ketten von BoNT/C, /D und /E vorhanden waren, wurden Antikörper gegen den rezeptorbindenden Teil der schwere Kette (H_C-Domäne) erzeugt. Die isolierte H_N-Domäne konnte nicht im ausreichenden Maße stabil hergestellt werden (persönliche Kommunikation Dr. A. Rummel, MHH). Wie bereits in mehreren Publikationen gezeigt, eignete sich die H_C-Domäne sehr gut zur Herstellung monoklonaler Antikörper [114, 292, 293]. Die H_C-Domänen wurden Mäusen entweder einzeln injiziert, wie bei BoNT/C, oder in Kombinationen verschiedener H_C-Domänen. Auf diese Weise wurden hoch-affine Antikörper gegen H_C-Domänen von BoNT/A, /C, /DC und /E induziert.

Das Ribosomen-inaktivierende Protein Abrin wurde aufgrund seiner Toxizität nicht direkt zur Immunisierung verwendet. Abrin wurde vor der Immunisierung mit Formaldehyd inaktiviert [197, 224, 226]. Aus den immunisierten Tieren wurden die Milzen entnommen und Fusionen durchgeführt. Daraus entstanden die Antikörper AP10, AP54, AP60, AP69, AP2573, AP3202, AP3659 und AP3808.

Bei einem weiteren Tier wurde eine andere Immunisierungsstrategie angewandt. Hier wurde Abrin Rohextrakt an Tosyl-aktivierte magnetische Beads gekoppelt. Durch die Bindung an die Beads mit 2,8 μm Durchmesser wurde die Aufnahme des Toxins in Zellen verhindert. Die Ribosomen-inaktivierende Aktivität wurde so inhibiert und die Toxizität für das Tier reduziert. Gleichzeitig konnte die Immunogenität des nativen Toxins bewahrt und eine Immunantwort induziert werden. Diese Methode wurde in der Arbeitsgruppe zuvor für Rizin, BoNT/A und /B durchgeführt [166]. Hierbei wurden erfolgreich Hybridomazellen isoliert, die Antikörper mit der gewünschten Selektivität produzierten. Im Fall von Abrin war diese Immunisierungsstrategie (siehe 9.1.5) nicht zielführend. Die Maus entwickelte einen vielversprechenden Titer gegen Abrin. Von den 2500 getesteten Hybridoma-Überstände waren ca. 200 in der Lage, denaturiertes Abrin im indirekten ELISA zu erkennen. Mittels Sandwich ELISA und SPR zeigte sich allerdings keine Bindung von nativem Abrin.

Nach zehntägigem Wachstum der Hybridomazellen wurde der Überstand auf die Bildung der gewünschten Antikörper getestet. Die Wahl der richtigen Screeningmethode ist entscheidend, um mAk mit den gewünschten Eigenschaften zu isolieren. Zum Testen der etwa 2500 bis 4000 Überstände bleibt ein kurzer Zeitraum von wenigen Tagen, in dem die gewünschten Zellen gewählt werden müssen. So wurden Screening-Methoden mit hohem Durchsatz zur Vorauswahl der Klone ausgesucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu, wie beim Titerest, indirekte ELISAs, Suspensionsarrays und Sandwich ELISAs durchgeführt. Indirekte ELISA waren schnell und einfach durchzuführen, es konnten geringe Konzentrationen an Antikörpern getestet werden. Manche Klone erkannten das im Rahmen der Immobilisierung denaturierte Protein und zeigten keine Interaktionen gegenüber dem nativen Toxin. Beim Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie zum Screening ergaben sich die gleichen Vor- und Nachteile wie beim indirekten ELISA. Zusätzlich konnte hier simultan auf mehrere Antigene getestet werden, was im Fall der Immunisierung mit mehreren H_C -Domänen nötig war. Der Sandwich ELISA erwies sich als die beste Hochdurchsatz-Methode für das Screening. Diese Technologie konnte nur eingesetzt werden, wenn bereits ein Fängerantikörper gegen das Antigen aus einer anderen Spezies zur Verfügung stand. Dieser präsentierte das Antigen in einen nativen Zustand, sodass die Antikörper im Hybridoma-Überstand daran binden konnten. Diese Screeningmethode wurde für die anti-BoNT/E Antikörper (3.2.1.2) eingesetzt.

Als Bestätigungsmethode wurde die Oberflächenplasmonresonanz benutzt. Hierbei wurden die Antikörper auf ihre Affinität gegenüber dem Antigen in Lösung untersucht. So wurden erste Informationen über eine mögliche Verwendung der Antikörper in einem Sandwich ELISA gewonnen. Es konnten mit dieser Methode ca. 30 Hybridoma-Überstände pro Tag untersucht werden. Eine Vorauswahl mit den „klassischen“ Techniken war daher nötig.

Die ausgewählten Hybridomazellen wurden mehrfach subkloniert, um eine Klonalität sicherzustellen. Die Antikörper wurden aus Zellkulturüberständen gereinigt und weiter charakterisiert.

4.2 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Die neu generierten Antikörper wurden im Rahmen der Arbeit umfassend charakterisiert. Alle wurden mittels indirektem ELISA auf mögliche Kreuzreaktivitäten gegenüber verwandten und nicht-verwandten Toxinen getestet. Jeder mAk wurde zusätzlich auf seine Verwendbarkeit im Western Blot untersucht. Durch die Denaturierung der Toxine im SDS-Gel und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde das Protein entfaltet, so wurden zusätzliche Epitope freigelegt. Welche Epitope innerhalb eines Toxins/einer Toxindomäne die mAks genau erkannten, wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht. Dies könnte in weiterführenden Experimenten mit besonders interessanten mAks wie dem funktionsblockierenden mAk A2807 durchgeführt werden. Dazu stehen u. a. verschiedene Methoden zur Bestimmung des Epitops zur Verfügung: Peptidscans mittels *phage display* Methode oder Arrays, Kristallographie oder sogenannte Alanin-Scans [159, 296, 297]. Als dritter Parameter wurde die Affinität mittels Oberflächenplasmonresonanz bestimmt. Dazu wurde die Interaktion des Antikörpers mit dem jeweiligen Antigen in Lösung gemessen. Während dem Screening wurden sogenannte *single cycle* Kinetiken mit zwei Konzentrationen des Antigens bestimmt, mit dem gereinigtem mAk wurde eine umfassende kinetische Bestimmung mit sechs Konzentrationen aufgenommen [273]. Alle generierten Antikörper hatten eine zufriedenstellende Affinität im unteren nM Bereich oder darunter. In der Literatur wurden gute Antikörper mit einer Affinität im unteren nM Bereich, hoch-affine Antikörper mit einer Affinität im pM Bereich charakterisiert [298-300]. Je affiner ein Antikörper ist, desto geringer kann das Detektionslimit in verschiedenen Nachweissystemen werden [166, 299].

Mittels indirektem ELISA wurden alle generierten Antikörper auf eine mögliche Kreuzreaktivität getestet (*Abb. 14, Abb. 19, Abb. 24, Abb. 28, Abb. 33* und Daten nicht dargestellt). Der Antikörper HcC2378 erkannte neben dem ursprünglichen Antigen H_C/C auch H_C/DC und detektierte daher BoNT/DC (*Abb. 28*). Diese Funktionalität war gewünscht, um die Detektion der Mosaikvarianten von BoNT/C, /CD, /D und /DC durchzuführen. Die Kreuzreaktivität des anti-Abrin Antikörpers AP10 zu Rizin war ebenfalls gewünscht (*Abb. 33*),

dieser mAk könnte in Zukunft die Basis für eine generalisierte Detektion der RIPs darstellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Antikörper spezifisch für ihr jeweiliges Toxin waren und keine unspezifische Erkennung anderer Toxine auftrat.

In weiteren, indirekten ELISAs wurde die Spezifität der Antikörper genauer untersucht. Es zeigte sich, dass zwei der anti-SEA Antikörper das zu 81 % homologe SEE erkannten (*Abb. 14*). Die Stärke der Bindung reichte nicht für eine sensitive Detektion mittels Sandwich ELISA (*Abb. 17*). Hier sollte zukünftig auf ein spezifisches Nachweissystem für SEE zurückgegriffen werden, welches nicht Bestandteil dieser Arbeit war.

Die anti-BoNT/A Antikörper wurden in mehreren Versuchen auf ihre Subtyp-Spezifität untersucht (*Abb. 20, Abb. 21*). Dabei erkannten A185, A778 und A2807 alle bisher bekannten Subtypen A1-A8 [115], getestet als *single chain* Variante oder H_C-Fragment. Diese breite Reaktivität ist auf die Erkennung konservierter Epitope in den H_C-Domänen zurückzuführen. Allerdings wurden nicht alle Subtypen gleich gut erkannt. A185 und A778 banden BoNT/A6 und /A7 mit geringerer Affinität aufgrund einer erhöhten Dissoziationsrate. Der mAk A2807 zeigte dagegen eine schwächere Affinität zu BoNT/A2 und /A3. Zusätzlich detektierten alle neu generierten anti-BoNT/A Antikörper das Mosaiktoxin BoNT/H, welches vor kurzem entdeckt wurde [104, 110]. BoNT/H ist ein Mosaik aus BoNT/F und /A [111]. Die leichte Kette und die H_N-Domäne sind ähnlich zu BoNT/F, die H_C-Domäne hingegen ist nahe verwandt zu BoNT/A (84 % Sequenzidentität). Da die anti-BoNT/A Antikörper eine zwischen den Subtypen konservierte Region erkennen, ist diese Interaktion mit der H_C-Domäne von BoNT/H erklärbar. Sobald neue Subtypen von BoNT/A identifiziert werden, wäre eine Testung der Antikörper auf diesen sehr interessant. Die hier vorgestellten Antikörper tolerieren eine Sequenzvariabilität, wie sie bei den bekannten BoNT/A Subtypen mit 16 % auf Aminosäure-Ebene auftreten [119].

Die anti-BoNT/E Antikörper wurden ebenfalls auf ihre Subtyp-Spezifität untersucht (*Abb. 25*). Hier waren zwei der elf bekannten Subtypen in der Arbeitsgruppe verfügbar, nämlich BoNT/E1 und /E3 (*Abb. 4*). Diese unterscheiden sich auf Aminosäure-Ebene um 2 %. Zudem wurde der Bakterienüberstand eines neu isolierten Stammes mit der vorläufigen Bezeichnung /Ex, welcher 8 % Abweichung zu BoNT/E1 und /E3 aufweist, untersucht. Der anti-BoNT/E Antikörper E1346 aus den ersten Fusionen erkannte alle vorhandenen Subtypen. Die Antikörper E1447, E3128, E3194 und E3226 aus den Fusionen mit der Einzelimmunisierung waren ebenfalls in der Lage, diesen Überstand zu detektieren. Für eine zukünftige breite Verwendung der Antikörper wäre es nötig, weitere BoNT/E Subtypen zu testen.

Bei BoNT/C wurden keine Subtypen identifiziert, hier fand man die Mosaikstrukturen (*Abb. 5*). Die Antikörper HcC141, HcC515 und HcC1304 interagierten exklusiv mit der H_C/C-Domäne, HcC2378 band zusätzlich H_C/DC.

Bei Abrin liegen ebenfalls verschiedene Isoformen vor, nämlich Abrin-a, -b, -c und -d [201]. Mit der in der Gruppe etablierten Reinigungsvorschrift wurde Abrin-a mit ausreichender

Reinheit isoliert. Abrin-b wurde in einer Mischung mit Abrin-a und *Abrus* Agglutinin gefunden. Hier müssten neue Protokolle etabliert werden, um die Isoformen einzeln und mit ausreichender Reinheit zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit war dies nicht möglich. Es wurde untersucht, ob die Antikörper *Abrus* Agglutinin, Abrin-a oder ein Protein aus der Mischung erkannten (Tab. 27). Ein Antikörper, AP2573, reagierte mit *Abrus* Agglutinin, AP3202 und AP60 interagierten mit Abrin-a (Abb. 34). Die anderen Antikörper, welcher in dieser Arbeit generiert wurden, zeigten Bindung hauptsächlich an die Mischung. Hier müssten in der Zukunft weitere Versuche durchgeführt werden, um die genaue Spezifität bestimmen zu können.

Ergänzend wurden die Antikörper auf ihre Verwendbarkeit im Western Blot getestet. Grundsätzlich können alle Antikörper im Western Blot eingesetzt werden. Gut funktionierende Antikörper im Western Blot erwiesen sich als eher schlecht für die Verwendung im Sandwich ELISA. Beispiele dafür sind die anti-Abrin Antikörper AP54 und AP69 (Abb. 36). Diese waren sehr sensitiv im Western Blot und wiesen einstellige Nanogramm-Mengen Abrin Rohextrakt innerhalb von 3 min Entwicklungszeit nach. Im Sandwich ELISA ergaben sich sehr hohe Nachweisgrenzen. Daraus ist zu folgern, dass diese mAk eher ein lineares oder verdecktes Epitop erkannten, welches in der nativen 3D-Konformation in Lösung schlechter zugänglich war. Bei den anti-BoNT/A Antikörpern war es umgekehrt, diese gaben im Western Blot schwache Signale, was auf ein Konformationsepitop hindeutete (Tab. 24).

Als dritter Parameter wurde die Affinität der Antikörper zu ihrem jeweiligen Antigen bestimmt. Dazu wurde die Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt (Abb. 16, Abb. 21, Abb. 26, Abb. 30, Abb. 35). Alle generierten mAks mit Ausnahme der anti-H_C/E Antikörper wiesen eine Affinität K_D im einstelligen nM Bereich oder darunter auf. Antikörper mit schwächerer Affinität wurden im Screening verworfen. Für die Detektion von BoNT/E wurden die affinsten der verfügbaren Antikörper ausgewählt. Bei dem höchst affinen anti-BoNT/C Antikörper C394 lag die K_D unterhalb des Messbereiches, welcher bis 1 pM reicht (Tab. 29). Eine andere Arbeitsgruppe entwickelte ebenfalls Antikörper gegen BoNT/A mit einer Affinität von 8-60 pM. Die Bestimmung erfolgte hier mittels ELISA, daher sind die Zahlenwerte nur eingeschränkt vergleichbar [299].

Bei den anti-BoNT/A Antikörpern wurde zusätzlich die Neutralisationswirkung untersucht. Dazu wurde im *mouse phrenic nerve* Assay die Blockade der Wirkung von BoNT/A und /H getestet. Es zeigte sich, dass 100 nM A778 bzw. A185 6 pM BoNT/A neutralisierten (Abb. 22). Der mAk A2807 war sogar bei einer zehnfach höheren Verdünnung in der Lage, 6 pM BoNT/A effektiv *in vitro* zu neutralisieren. Dieser Antikörper hatte zudem die höchste Affinität gegenüber BoNT/A1 (Abb. 21 und Tab. 24). Beim Einsatz von 10 nM BoNT/H wurde für die

drei mAk (je 100 nM) eine Erhöhung der halbmaximalen Paralysezeit auf etwa 110 min (A185, A778) bzw. 170 min (A2807) gemessen. Einer anderen Arbeitsgruppe ist es mit Hilfe einer Kombination von drei monoklonalen anti-BoNT/A Antikörper gelungen, Überstand des BoNT/H-Stammes im Tierversuch zu neutralisieren [301].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die neu generierten Antikörper hoch-affin und spezifisch für ihr Zielantigen sind. Sie wurden im indirekten ELISA, im Western Blot und mit SPR untersucht. Die Antikörper, welche hervorragende Ergebnisse in der Charakterisierung zeigten, wurden für die weitere Entwicklung verschiedener Toxinnachweisverfahren verwendet.

4.3 Stationäre Einzeltoxinnachweise

Die Antikörper wurden für den Einzeltoxinnachweis im Labor verwendet. Dabei konnten verschiedene Formate realisiert werden. Die Antikörper wurden im Western Blot, im Sandwich ELISA, im Suspensionsarray oder für Immunoaffinitätsreinigung eingesetzt. Der Western Blot ist aufgrund seiner zweitägigen Dauer und seines geringen Probendurchsatzes nur als Bestätigungsdiagnostik für positive Verdachtsproben geeignet. Der Sandwich ELISA ist die einfachste und meist sensitivste Nachweisreaktion, daher wurde hier im Rahmen der Arbeit der Schwerpunkt gelegt. Etablierte Sandwich ELISA können meist mit leichten Anpassungen in den Suspensionsarray basierend auf der Luminex-Technologie übertragen werden (Daten nicht dargestellt). Schließlich wurden die neu generierten Antikörper für die Immunoanreicherung mit nachfolgenden Endopep-Assays benutzt.

Die drei Antikörper für SEA waren sehr gut geeignet für die Verwendung im Sandwich ELISA. Durch die Kombination aller drei Antikörper wurde ein Detektionslimit von etwa 2 pg/ml erreicht (*Abb. 17*). Dies lag weit unter der wirkungsauslösenden Dosis von 0,1 µg für einen erwachsenen Menschen [3]. Für SEA wurden in der Vergangenheit zwei kommerzielle ELISAs entwickelt, Vidas und Ridascreen [51]. Beide Nachweisgrenzen lagen bei weniger als 31 pg/ml SEA. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Sandwich ELISA zeigte hier eine etwas bessere Sensitivität. Der ELISA wurde bereits in einem anderen Projekt für die Detektion von SEA in Käse eingesetzt und lieferte hier verlässliche Ergebnisse (U. Fiebig (RKI), Daten nicht dargestellt). Weitere Matrices wurden noch nicht mittels des neu etablierten ELISAs untersucht.

Für BoNT/A wurde ebenfalls ein sensitiver Sandwich ELISA entwickelt. Um möglichst alle Subtypen (Sequenzunterschiede bis zu 16 %, siehe 1.1.2) zu erfassen, wurden drei Fängerantikörper eingesetzt. Die Antikörper A185 und A778 detektierten BoNT/A6 und /A7 aufgrund einer erhöhten Dissoziationsrate schwächer, A2807 detektierte aus dem gleichen Grund BoNT/A2 und /A3 schwächer. Durch Mischung der erwähnten Antikörper (=oligoklonal) wurden diese Nachteile ausgeglichen. Oligoklonale Mischungen von Antikörpern verbesserten

die Detektion auch in anderen Nachweissystemen oder die Neutralisierung [57, 302]. Als Detektionsantikörper wurde A120 verwendet, welcher die H_N-Domäne erkannte. So kam es zu keiner sterischen Hinderung mit den H_C-spezifischen Fängerantikörpern. Mit Hilfe dieses Sandwich ELISAs wurden die BoNT/A Subtypen A1-A5 sowie A8 nachgewiesen (Abb. 23).

BoNT/A6 und /A7 lagen nicht als Volllängen-Toxine vor. BoNT/A1 und /A3 wurden am sensitivsten mit einer geschätzten Nachweisgrenze von 10 pg/ml detektiert, was vergleichbar oder besser als publizierten Daten ist [160, 303]. BoNT/A2, /A5 und /A8 wurden etwa gleich gut erkannt. Die halbmaximale Effortkonzentration lag bei 1,0 bis 2,4 ng/ml Toxin. BoNT/A4 ließ sich schlechter detektieren, die EC₅₀ lag bei 4,3 ng/ml. Ein Sandwich ELISA mit umfassender Subtypenerkennung von BoNT/A wurde bisher nicht publiziert. ELISA für BoNT/A, /B, /E und /F, welche in den *Centers for Disease Control and Prevention* in Atlanta (USA) entwickelt wurden, wurden auf Subtyp-Erkennung getestet. Für BoNT/A1 (zwei Stämme), /A2, /A3 und bivalente Stämme mit BoNT/A und /B ergaben sich zum Teil Kreuzreaktivitäten mit dem BoNT/F-Nachweis [156]. Kalb *et al.* untersuchten die Affinitäten von 16 mAks gegen BoNT/A1, /A2 und /A3 [300]. Diese wurden für Aktivitätsbestimmungen mittels Endopep-MS Assay, aber nicht für immunologische Nachweissysteme verwendet.

Für BoNT/E wurde ein sehr sensitiver Sandwich ELISA mit einem LOD von ca. 20 pg/ml etabliert (Abb. 27). Es zeigte sich, dass der Einsatz des pAk KE97 die Detektion im Vergleich zum mAk E1346 deutlich verbesserte. Eine Kombination mit ähnlicher Sensitivität, welche nur aus monoklonalen Antikörpern besteht, wurde nicht gefunden. Andere veröffentlichte ELISA wiesen Detektionslimits von 19 pg/ml und 107 pg/ml bzw. 163 pg/ml Komplex auf, dabei wurde die Subtypenerkennung nicht spezifiziert [154, 160]. Der hier vorgestellte ELISA wies die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Subtypen BoNT/E1, /E3 und den noch nicht publizierten Subtyp /Ex (8 % Abweichung auf Aminosäure-Ebene zu BoNT/E1 und /E3) nach. Weitere Subtypen konnten mangels Verfügbarkeit nicht getestet werden.

Für die Detektion von Toxinen aus *Abrus precatorius* wurden zwei sensitive Sandwich ELISA entwickelt. Für die Detektion von Abrin-a wurde ein Sandwich ELISA mit den Antikörpern AP430 und AP3202 als Detektionsantikörper aufgebaut (Abb. 37). Dieser hatte eine exzellente Nachweisgrenze von ca. 10 pg/ml. Andere ELISA detektierten 100-500 pg/ml [223, 226] oder waren weniger sensitiv [224, 225]. Die Abrin Detektion, welche im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, ist deutlich sensitiver als die bisher publizierten Verfahren.

Mit Hilfe der Antikörper AP476 und AP2573-bio ließ sich *Abrus* Agglutinin mit einer Nachweisgrenze von ca. 30 pg/ml detektieren (Abb. 37). Bislang wurde ein ELISA mit Lama-Antikörpern publiziert, welcher ein LOD von 1,6 ng/ml *Abrus* Agglutinin aufweist [304]. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA verbessert die Detektionsmöglichkeiten deutlich.

Beide ELISA zeigten eine leichte Kreuzreaktivität auf das jeweils andere Protein, allerdings musste dafür eine mindestens hundertfach höhere Konzentration eingesetzt werden. Da Abrin-a und *Abrus* Agglutinin etwa zu 95 % rein sind, könnten diese Signale von den 5 % Verunreinigung mit dem jeweils anderen Molekül stammen. Dies gilt es weiter mit einer reineren Proteinpräparation zu prüfen. In der Zukunft sollten diese ELISAs für den Einsatz in Lebensmittelmatrizes und klinischen Proben untersucht werden.

4.4 Applikationsbeispiel: stationäre Differenzierung veterinärpathogener BoNT mittels ELISA und Endopep-MS Assay

Botulismus in Tieren wird mit den Mosaiktoxinen BoNT/C, /CD, /D und /DC assoziiert. Eine eindeutige Differenzierung war bislang nur auf genetischer Ebene möglich [120, 134]. Auf immunologischer Ebene mittels Sandwich ELISA und Endopep-MS wurden die vier veterinärpathogenen Toxine erstmals im Rahmen dieser Arbeit differenziert.

Für BoNT/C, /CD, /D und /DC wurden vier hervorragende ELISA etabliert. Mit Hilfe von fünf Antikörpern (C394, C9, D63, D967 und HcC10S) wurden vier Sandwich ELISA aufgebaut, die jeweils spezifisch eines der vier verwandten Toxine detektieren (*Abb. 39*). Einer der Antikörper war jeweils gegen die leichte Kette gerichtet, der andere gegen den C-terminalen Teil der schweren Kette. C394 und C9-bio bzw. D967-bio wurden für die Detektion von BoNT/C bzw. /CD benutzt. BoNT/D wurde mit Hilfe von D63 und D967-bio nachgewiesen, BoNT/DC mit HcC10S und D63-bio. Statt HcC10S konnte HcC2378 eingesetzt werden, allerdings war hier die Nachweisgrenze etwas höher (*Tab. 30*). Kreuzreaktivität zu den jeweils anderen, nahverwandten Toxinen wurde nicht beobachtet. Gleichzeitig waren diese ELISA sehr sensitiv mit Detektionslimits zwischen 2 und 24 pg/ml. Damit sind sie deutlich sensitiver als der Maus Bioassay, welcher 167 pg/ml BoNT/C bzw. 33 pg/ml BoNT/DC detektiert [288]. Ein kürzlich vorgestellter ELISA im Mikroarray-Format erreichte ähnlich gute Nachweisgrenzen für BoNT/C und /DC [161], ältere Publikationen berichteten von Nachweisgrenzen zwischen 0,25 und 1,5 ng/ml [158, 305]. Andere ELISA sind nicht in der Lage, die Mosaikvarianten bzw. BoNT/C und /D zu unterscheiden [153, 158, 306, 307]. Die hohe Spezifität und Sensitivität der hier entwickelten Sandwich ELISA stellt einen wesentlichen Fortschritt dar. Eine Differenzierung aller vier Toxine auf immunologischer Ebene gelang erstmals in Rahmen dieser Arbeit.

Zusätzlich wurde eine umfassende Validierung der ELISAs durchgeführt, um die in *Tab. 30* zusammengefassten Kenngrößen zu ermitteln. Die Quantifizierungsgrenzen umfassten ungefähr zwei Größenordnungen. Die Präzision der ELISAs wurde am Wendepunkt der 4-parametrischen Kurve (EC_{50} -Wert) bestimmt. Innerhalb eines Versuchs ergaben sich Variationskoeffizienten

zwischen 3,3 und 6,4 %, an verschiedenen Tagen lagen die CV% bei 8,2 bis 24,4 %. Diese Werte waren vergleichbar oder besser als Daten anderer Publikationen [161, 166, 303].

Die ELISAs für BoNT/C, /CD, /D und /DC wurden sowohl mit gereinigten Toxinen als auch mit Bakterienüberständen durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Schritt 39 Bakterienüberstände von isolierten *C. botulinum*-Stämmen aus Botulismusfällen aus Europa untersucht (Tab. 31). Mit Hilfe der vier ELISA wurden 6 BoNT/C, 27 BoNT/CD, 2 BoNT/D und 4 BoNT/DC-Stämme detektiert. Diese Zuordnung wurde durch eine unabhängige, verblindet durchgeführte PCR im Labor von Woudstra und Fach bestätigt [120]. Zusätzlich wurde ein Endopep-MS Assay zur Bestimmung der leichten Ketten-Aktivität durchgeführt. Diese Ergebnisse deckten sich mit den anderen Methoden und werden unten ausführlicher diskutiert. Im zweiten Schritt wurden Bakterienüberstände verwandter *Clostridien* untersucht (Tab. 32). Dazu wurden Überstände von *C. botulinum* Gruppe I, II und IV Stämmen, welche die BoNT Serotypen A, B, E, F, und G exprimieren, sowie nicht-toxische Stämme und Stämme aus der *C. novyi sensu lato* Gruppe mittels ELISA und PCR getestet. Es ließen sich keine falsch-positiven Signale finden. Im dritten Schritt wurden die Überstände von primärem anaerobem Anzuchtmaterial im ELISA untersucht (Tab. 33). Diese wurden direkt aus dem verdächtigen Material oder Organen hergestellt und anaerob kultiviert, sodass diverse anaerob lebende Bakterien und deren Stoffwechselprodukte im Überstand zu finden waren [119, 158]. Hier fand keine Selektion und Vereinzelung der Bakterien statt. Aus diesem Grund musste *Clostridium botulinum* und das produzierte Toxin unter verschiedenen anaeroben Bakterien und Stoffwechselprodukten detektiert werden. Trotzdem wurden 100 % Übereinstimmung zwischen PCR und ELISA erreicht. Es wurden 21 BoNT/CD und 2 BoNT/DC produzierende Kulturen detektiert.

Neben den vorgestellten ELISAs wurde der Endopep-MS Assay weiterentwickelt. Mit dieser Technik wird die funktionale Aktivität der BoNTs überprüft. Im ersten Schritt wurden die veterinärpathogenen BoNT/C, /CD, /D und /DC mittels spezifischer Antikörper aus den Bakterienüberständen angereichert. Hierzu eigneten sich anti-H_C- und anti-LC Antikörper gleichermaßen. Wichtig ist, dass die mAKs die Funktionalität der Endopeptidase nicht blockieren. In der Literatur wurde daher oft auf Antikörper gegen die schwere Kette zurückgegriffen [268, 288, 300]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die Anreicherung von BoNT-Komplexen mit den mAKs gegen die leichte Kette (C394, D63) besser funktionierte. Vermutlich war dieses Epitop leichter zugänglich als die H_C-Domäne, welche im nativen Komplex von NTNHA umgeben ist [93]. Im zweiten Teil des Versuchs wurde das artifizielle Substrat zu den angereicherten Toxinen zugegeben. BoNT/C und /CD schnitten ein Derivat von SNAP25 [267], wohingegen für /D und /DC ein VAMP-2-Peptidsubstrat verwendet wurde [268]. Die C- und N-terminalen Schnittprodukte wurden im dritten Teil mittels MALDI-TOF-

MS nachgewiesen. So ließ sich ein Nachweis der enzymatischen Aktivität erzielen. Durch die Kombination aus Antikörper gegen die schwere Kette (HcC2378 und D967) und Endopeptidase-Aktivität, wie in *Abb. 41* dargestellt, konnten die vier Toxine eindeutig differenziert werden. Eine andere Publikation führte die Differenzierung im Ausschlussverfahren durch [288]. Der Endopep-MS Assay zur Bestimmung der LC-Aktivität wurde mit dem Bakterienüberstand von isolierten Stämmen erfolgreich durchgeführt (*Tab. 31*). Die Überstände von primärem Anzuchtmaterial wurden ebenfalls mit dem Endopep-MS Assay getestet. Die Bestimmung der Aktivität der LC stimmte in allen Fällen mit der PCR und dem Sandwich ELISA überein (*Tab. 33*).

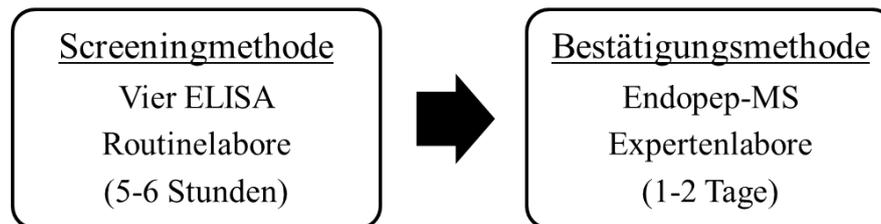


Abb. 51: Schematischer Ablauf der Diagnostik veterinärpathogener Botulismusproben

Im ersten Schritt sollen die vier neu entwickelten ELISAs von Routinelaboren zum Screening von veterinärmedizinischen Botulismusproben eingesetzt werden. Anschließend kann eine Bestätigung mittels Endopep-MS Assay in Expertenlaboren erfolgen.

Zusammen mit den neu etablierten ELISAs zur Differenzierung können nun die veterinärpathogenen BoNT/C, /CD, /D und /DC auf zwei verschiedene Arten differenziert werden (*Abb. 51*). Dabei können die vier ELISA in Routinelaboren innerhalb eines Arbeitstages durchgeführt und zukünftig kommerzialisiert werden. Aufgrund des hohen Probendurchsatzes können Screenings von verdächtigem Futterproben oder veterinärmedizinischem Probenmaterial durchgeführt werden. Für die Verwendung des Endopep-Assay ist ein Massenspektrometer notwendig, was die Anwendbarkeit auf Expertenlabore einschränkt. Dieser Assay bestätigt auf technisch unabhängige Weise die Aktivität des Toxins.

Mit Hilfe der neu entwickelten Tests können in Zukunft epidemiologische Studien zum Auftreten der Mosaiktypen durchgeführt werden. Im Moment ist wenig über die Wirkungen der molekularen Unterschiede auf das Erkrankungsbild und die betroffenen Tiergruppen bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämme deuten darauf hin, dass die Mosaikform BoNT/CD gehäuft bei Vögeln auftritt, während BoNT/DC bei Rinderbotulismus gefunden wurde (*Tab. 31* und *Tab. 33*). Für eine genauere Beantwortung dieser Fragestellung sollten in Zukunft größere epidemiologische Studien mit den neu entwickelten Tests durchgeführt werden.

4.5 Applikationsbeispiel: Multiplex- und Vor-Ort-Detektionsplattform pTD

Für den Multiplex-Nachweis mehrerer Toxine gleichzeitig gibt es stationäre und Vor-Ort-Detektionsmethoden. Ein Ziel dieser Arbeit war die Implementierung der generierten mAk in die Vor-Ort-Plattform pTD.

Die pTD Plattform wurde aus mehreren Gründen als geeignetes System angesehen: Die Inbetriebnahme der Plattform erfolgt sehr schnell. Gerade die neu entwickelte Koffervariante pTDi ist ohne stationäre Stromversorgung einsetzbar und kompakt zu transportieren (*Abb. 12*). Das Gerät kann bereits nach kurzer Einweisung von Einsatzkräften von Polizei und Feuerwehr betrieben werden. Es ist der zeitgleiche Nachweis mehrerer Antigene möglich. Zudem sind Positiv- und Negativkontrollen im Nachweis integriert, welche die Verlässlichkeit der Messung anzeigen.

Andere Vor-Ort-Detektionssysteme wie *lateral flow assays* und das ABICAP System haben im Gegensatz zur pTD Plattform einige Nachteile [308, 309]. So kann hier meist kein Multiplex-Nachweis durchgeführt werden. Zudem ist keine Negativkontrolle integriert. Vorteile der LFAs sind ihre geringen Kosten und die Einfachheit der Benutzung. Über die Sensitivität kann kein pauschales Urteil abgegeben werden, da dies immer von der Qualität der verwendeten Antikörper abhängt.

Aus diesem Grund wurde entschieden, im Rahmen des GEFREASE-Projektes die generierten monoklonalen Antikörper in das pTD System zu implementieren.

4.5.1 Einzeltoxindetektion mit dem pTD System

Um eine erfolgreiche Einzeltoxindetektion mit dem pTD System durchzuführen, mussten vorhandene Antikörper als Fänger- oder Detektionsantikörper getestet werden. Die neu entwickelten Sandwich ELISA-Kombinationen ließen sich in fast allen Fällen vom Mikrotiterplatten-Format auf die pTD Plattform übertragen. Bei BoNT/E musste eine andere Kombination ausgewählt werden, da der Antikörper E1447 erst am Ende der Arbeit identifiziert wurde.

Für SEA wurden zwei Fängerantikörper, nämlich SEA388 und SEA2353, zu gleichen Teilen vermischt und gespottet. Als Detektionsantikörper wurde SEA165-bio eingesetzt. Damit ließ sich eine Nachweisgrenze von 0,25 ng/ml SEA erreichen (*Abb. 42*). Vergleicht man diesen Wert mit anderen Biosensoren, so wurden einige Assays für SEB mit ähnlichen Nachweisgrenzen zwischen 0,1 und 1 ng/ml publiziert [59, 60]. Shlyapnikov *et al.* hingegen entwickelten einen ultrasensitiven Nachweis für SEA, hier wurden innerhalb von 10 min 0,1 pg/ml SEA detektiert

[64]. Der verwendete Mikroarray, welcher mit einer Kamera ausgelesen wurde, sollte in Zukunft ebenfalls in ein Vor-Ort-System eingebaut werden, ist allerdings erst in einem experimentellen Stadium. Das pTD System ist für SEA etwa genauso sensitiv wie ein LFA [56]. In Anbetracht der Tatsache, dass SEA erst ab ca. 100 ng eine Wirkung auf den Menschen hat [3], ist der Nachweis mit dem pTD System völlig zufriedenstellend.

Für BoNT/E wurde eine Kombination aus dem Fängerantikörper E136 und dem polyklonalen Detektionsantikörper KE97-bio ausgewählt. So wurde ein Detektionslimit von 10 ng/ml BoNT/E erreicht (*Abb. 43*). Andere Detektionssysteme wiesen vergleichbare LODs auf. Ein LFA detektierte 20 ng/ml BoNT/E in 15 min [162]. Im ABICAP-System wurden 5 ng BoNT/E in 500 µl Puffer, Milch und Trinkwasser nachgewiesen [241]. Die sensitivste ELISA Kombination KE97 und E1447-bio konnte nicht übertragen werden, da zum einen E1447 erst nach Abschluss der Validierung zur Verfügung stand und zum anderen der pAk KE97 aus unbekanntem Gründen nicht mit gleichbleibender Qualität gespottet werden konnte.

Der Nachweis des veterinärpathogenen BoNT/C gelang auf der pTD Plattform mit einer Nachweisgrenze von 5 ng/ml (*Abb. 44*). Zu diesem Zweck wurden der mAk C394 auf der Chipoberfläche immobilisiert. Als Detektionsantikörper wurde eine Mischung von C9-bio und HcC2378-bio verwendet, was die Detektion erleichterte.

In der Literatur konnten keine weiteren Biosensoren gefunden werden, welche BoNT/C detektierten. LFAs wurde bislang nicht publiziert. Der im ABICAP System entwickelte gleichzeitige Nachweis für BoNT/C und /D wies ca. eine mausletale Dosis nach, mit einer Inkubationszeit von 4 h. Wenn Sensitivitätsverluste akzeptabel waren, wurde die Durchführung auf 40 min verkürzt. Eine Umrechnung in eine Konzentration wurde nicht angegeben [242]. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte BoNT/C-Nachweis stellt eine der ersten mobilen Detektionsmöglichkeiten für das Toxin dar.

Zudem wurde im Rahmen des Projektes ein Nachweis für BoNT/D auf der pTD Plattform entwickelt. Der mAk D63 wurde immobilisiert und D967-bio als Detektor verwendet. Es ließ sich ein Detektionslimit von 2,5 ng/ml erzielen (*Abb. 45*). Für BoNT/D wurden noch keine vergleichbaren Biosensoren entwickelt. Ein entwickelter LFA hatte eine Nachweisgrenze von 50 pg/ml bei einer Inkubationszeit von 3,5 h, was für einen Vor-Ort-Nachweis sehr lange ist [164]. Der oben erwähnt ABICAP Assay erlaubt die Detektion von einer mausletalen Dosis [242].

Mit den vorgestellten Antikörper-Kombinationen ließen sich zusätzlich BoNT/DC oder /CD nachweisen. Mit dem immobilisierten mAk C394 und dem Detektionsantikörper D967-bio wurde BoNT/CD detektiert. Der Nachweis von BoNT/DC gelang mit D63 und HcC2378-bio.

Durch einzelne Zugabe der biotinylierten Antikörper, wie in Kapitel 3.6.1.3 und 3.6.1.4, wurde eine Differenzierung durchgeführt. Im anschließenden Multiplex-Nachweis 3.6.2 ließ sich nicht mehr unterscheiden: Ein gemessenes Signal bei C394 konnte von BoNT/C oder /CD stammen, BoNT/D und /DC führten zu Signalen bei D63. Dieser Effekt war beabsichtigt, da Mosaikvarianten die häufigeren in Europa sind [120].

Der Nachweis von Abrin-a gelang mit der gleichen Antikörper-Kombination wie im Sandwich ELISA, mit AP430 als Fänger- und AP3202-bio als Detektionsantikörper. Das Detektionslimit wurde auf 1 ng/ml festgesetzt (*Abb. 46*).

Ein anderer Biosensor, basierend auf Aptameren und katalytischen Goldpartikeln, erreichte eine Nachweisgrenze von 3 ng/ml, was vergleichbar mit dem hier entwickelten System ist [229]. Die publizierten LFAs waren ähnlich sensitiv und wurden für Lebensmittel und pulverförmige Matrices eingesetzt [218, 227]. Der Nachweis von Abrin-a mit dem pTD war daher gut geeignet, um als Vor-Ort-Detektion benutzt zu werden. Einschränkend muss festgestellt werden, dass die entwickelte Methode nur Abrin-a, aber keine anderen Isoformen nachweist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Einzelnachweise auf der pTD Plattform sensitiv bis zu einem Detektionslimit im unteren ng/ml-Bereich und in 20 min Laufzeit funktionieren. Die Kombinationen aus dem Sandwich ELISA wurden mit Ausnahme von BoNT/E übertragen, allerdings war die Sensitivität aufgrund der kürzeren Reaktionszeit um einen Faktor 100-1 000 im Vergleich zur stationären Messung im konventionellen ELISA-Format verringert. Durch längere Reaktionszeiten ließe sich dies verbessern, was den Probanddurchsatz vermindert. Die 20 min Laufzeit stellen daher einen Kompromiss zwischen Sensitivität und Geschwindigkeit der Messung dar.

4.5.2 Multiplex-Nachweis und Validierung des pTD Systems

Anschließend wurde ein Multiplex-Nachweis der fünf Toxine SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin durchgeführt. Es wurden alle Kombinationen aus dem Einzeltoxinnachweis in den Multiplex-Nachweis übernommen.

Im ersten Schritt wurden die Toxine einzeln mit allen biotinylierten Antikörpern untersucht. Hierdurch wurde analysiert, ob die Antikörper kreuzreaktiv auf andere Toxine waren. In diesem Falle würden sich Signale bei nicht dem jeweiligen Toxin zugehörigen Positionen ergeben. Hier fanden sich keine Auffälligkeiten (*Abb. 47*). Das LOD des Nachweises von SEA, BoNT/C, /D und /E verschlechterte sich geringfügig gegenüber dem Einzeltoxinnachweis (*Tab. 41*). Bei Abrin-a gelang die Detektion mit der gleichen Sensitivität. Die Änderung des Detektionslimits ließ sich auf eine Erhöhung des Schwellenwerts zurückführen, der sich aus dem Hintergrund bei

Pufferproben ergab. Der Schwellenwert wurde beim Multiplex-Nachweis aus allen Probenpositionen berechnet, im Gegensatz dazu wurde beim Einzeltoxin-Nachweis nur die toxinspezifische Position in die Berechnung einbezogen. Die normierten Signalintensitäten waren jedoch vergleichbar (Abb. 48). In einem laborbasierten Multiplex-Proteinarray-Format wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt [161]. Hierbei wurde eine hohe Konzentration jedes Toxins entweder mit dem passenden oder mit allen biotinylierten Antikörpern benutzt. Es zeigten sich wie im pTD System keine Kreuzreaktivitäten.

Im zweiten Schritt wurden alle Toxine zeitgleich nachgewiesen (Abb. 49). Veränderungen der Sensitivität wurden nicht festgestellt. Die Signalintensitäten waren vergleichbar mit den Einzeltoxinnachweisen mit einem bzw. allen biotinylierten Antikörpern. Das pTD System ist daher sehr gut für den Multiplex-Nachweis geeignet und kann mehrere Toxine aus einer Probe nachweisen. Ein vergleichbarer Versuch wurde in einem anderen Vor-Ort-Detektionssystem, dem ArrayTube System, durchgeführt. Hier änderten sich die Detektionslimits beim gleichzeitigen Nachweis von fünf biologisch relevanten Agenzien nicht bzw. stiegen um den Faktor 2-5 [310]. Weingart *et al.* zeigten in einem anderen Biochipsystem, dass beim simultanen Nachweis von BoNT/A, SEB und Rizin ebenfalls keine Änderung des LOD auftrat [61].

Der simultane Nachweis von SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin ist mit dem pTD mit hoher Sensitivität möglich. Durch die robuste Signalgenerierung traten keine Probleme beim Messen mehrerer Toxine gleichzeitig auf.

Im dritten Schritt wurde die Leistung des pTD beim Einsatz von Lebensmittel- und Umweltproben untersucht (Abb. 50). Komplexe Matrices stellen eine Herausforderung dar, weil hoher Fett-, Protein- oder Salzgehalt oder Variationen des pH-Wertes auftreten können. Zudem können Proteasen oder andere Enzyme vorliegen, welche das Ergebnis verfälschen [90].

Zur Analyse wurde Toxin in den Lebensmitteln Milch und Mineralwasser untersucht. Zudem wurden eine Luftkeimsammlerprobe sowie Boden und Staub mit Toxinen dotiert. Die Konzentration der Toxine ergab sich anhand der vorher bestimmten Konzentrationsreihe, so dass der normalisierte Wert der entsprechenden Verdünnung in Puffer zwischen 20-45 % lag. Auf diese Weise konnten Abweichungen nach oben und unten gemessen werden.

Die Toxine in den flüssigen Matrices wurden gut nachgewiesen. Die Signalintensitäten zeigten keine klare Tendenz, verglichen mit der Signalstärke in Puffer. Bei BoNT/C wurde ein erhöhtes Signal, bei den anderen Toxinen wurden ähnliche Signale oder leicht niedrigere als in Puffer gemessen. In anderen Publikationen finden sich Hinweise darauf, dass die Signalintensitäten oder LODs unterschiedlicher, aber verwandter Toxine in gleichen Matrices variieren. So zeigten BoNT/A und /B in den gleichen Lebensmitteln relativ betrachtet unterschiedliche Ergebnisse

[143, 154]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die limitierte Anzahl an getesteten Lebensmitteln keine Schwierigkeiten auftraten.

Bei den untersuchten Umweltproben musste zwischen den festen und der flüssigen Probe(n) differenziert werden. Die mit Toxin versetzte Luftkeimsammlerprobe, welche in PBS-T aufgenommen wurde, führte in allen Fällen zu einem sicheren Nachweis. Die festen Matrices Boden und Staub, welche als 10%ige Lösung eingesetzt wurden, ergaben eine deutliche Reduktion des Signals bei BoNT/E und Abrin-a. Es wurde angenommen, dass die Toxine unspezifisch an die Partikel banden und durch den Filtrationsschritt entfernt wurden [311]. Während Abrin-a bei der verwendeten Konzentration nachgewiesen wurde, wurde bei 100 ng/ml BoNT/E kein Signal detektiert. Erst bei Erhöhung auf 250 ng/ml wurde BoNT/E detektiert. Möglicherweise interagiert BoNT/E stärker als die anderen Toxine mit den festen Matrices oder der pAk KE97-bio wird durch die in der Probe gelösten Substanzen aus Boden und Staub gestört.

Der Nachweis von Toxinen aus Umweltproben ist mit dem pTD grundsätzlich möglich. Nach einer kurzen Probenvorbereitung, welche auch für Einsatzkräfte durchzuführen ist, wurden die Proben mit dem pTD vermessen. Komplexe Matrices wie Boden oder Staub führten je nach Toxin zu einer Erhöhung des Detektionslimits. Eine Testung weiterer Matrices, wie Sand, Lehm oder Flusswasser, wäre in der Zukunft wünschenswert, um die Einsetzbarkeit des pTD Systems zur Untersuchung von Umweltproben besser bewerten zu können.

Im letzten Schritt der Validierung wurde die Selektivität des neu entwickelten Toxinnachweises gegenüber verwandten Toxinen untersucht. Dazu wurden sowohl gereinigte Toxine und Proteine, wie auch Überstände von diversen *Clostridien*-Stämmen benutzt. Unter den getesteten SEs wurde rekombinantes SEA detektiert, SEB und SEE führten zu keinen Signalen. Bei den veterinärpathogenen BoNTs wurden die vier Toxine sowohl gereinigt als auch im Komplex vorliegend in den Überständen nachgewiesen. Durch die Detektionsmischung ist keine Differenzierung von BoNT/C, /CD sowie /D, /DC mehr möglich. Durch die Zuordnung der Signale auf die entsprechenden Positionen wurden die leichten Ketten unterschieden. BoNT/C und /CD ergaben ein Signal auf den Positionen mit mAk C394, BoNT/D und /DC mit D63. Diese Möglichkeit der Detektion ergänzte die in 3.5 vorgestellten laborbasierten Nachweisverfahren. Bei BoNT/E wurden die Subtypen /E1 und /E3 detektiert. Es wäre sehr interessant, weitere Subtypen zu untersuchen. Rizin, *Ricinus* sowie *Abrus* Agglutinin wurden negativ getestet. Die Selektivität des Detektionssystems wurde damit umfassend aufgezeigt.

Ähnlich umfassende Studien zur Selektivität wurden in wenigen anderen Vor-Ort-Systemen durchgeführt. Die LFAs zur Detektion von BoNTs wurden mit einer Vielzahl von *Clostridien*-Stämmen getestet und wiesen keine Kreuzreaktivitäten auf [154]. Im Gegensatz dazu waren die entwickelten ABICAP Systeme nicht zu 100 % selektiv [241].

Durch die Auswahl hoch-affiner und spezifischer Antikörper wurde ein gezielter Nachweis von SEA, BoNT/C, /D und /E sowie Abrin möglich. Der neu entwickelte Chip wurde umfassend validiert und kann bestehende Detektionslücken durch die bevorstehende Kommerzialisierung schließen.

4.5.3 Einsatzmöglichkeiten des pTD

Das pTD wurde für den Vor-Ort-Einsatz im Rahmen einer biologischen Gefahrenlage geplant. Es ist robust, einfach zu bedienen und im Fall der Koffervariante ohne Stromversorgung zu betreiben. Der Nachweis der biologischen Toxine erfolgt innerhalb von 20 min im unteren ng/ml-Bereich. Im Rahmen des GEFREASE-Projektes wurde das Spektrum erweitert: *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera* und *Variola major* wurden mit neu generierten Antikörpern, welche vom CEA zur Verfügung gestellt wurden, nachgewiesen (persönliche Kommunikation C. Pöhlmann, Bruker Daltonik).

Die Detektion biologischer Agenzien wurde in einer Anwenderübung simuliert und das pTD auf seine Einsatzfähigkeit getestet. Ausgewählte Einsatzkräfte von Polizei und Feuerwehr hatten Gelegenheit, die pTD Plattform unter Schutzausrüstung zu testen. Zu diesem Zweck wurden Chips entwickelt, welche das nicht-toxische Fragment H_C/C erkannten. Aufgrund der örtlichen Gegebenheiten (kein Labor mit Schutzeinrichtungen) und der fehlenden Ausbildung der Einsatzkräfte im Umgang mit biologischen Stoffen wurde auf nicht-toxische Surrogate zurückgegriffen. Um einen realistischen Einsatz zu simulieren, wurde die Detektion unter persönlicher Schutzausrüstung durchgeführt. Es wurden verschiedene biologische und chemische Schutzanzüge mit dazugehöriger Luftversorgung und entsprechenden Handschuhen von den Anwendern getragen. Durch diese Anzüge war die Durchführung einer Messung deutlich erschwert, da die Motorik sehr eingeschränkt war. Das begrenzte Sichtfeld führte zu Schwierigkeiten bei der Handhabung und dem Ablesen von Anzeigen. Trotzdem waren die Einsatzkräfte nach einer kurzen Einweisung in der Lage, das pTD sicher zu bedienen. Der Nachweis von H_C/C gelang aus Puffer, Boden, Milch und einer Luftkeimsammlerprobe (Tab. 46). Die verschiedenen Matrices stellten kein Problem dar, wie in Kapitel 3.6.3 gezeigt wurde.

Im Anschluss wurde die Plattform von den Einsatzkräften bewertet (Tab. 47). Das pTD wurde positiv beurteilt, da hier Multiplex-Nachweise möglich waren und es eine integrierte Positiv- und Negativkontrolle gab. Etwa die Hälfte der Personen stimmte für eine volle Feldtauglichkeit des pTD, d. h. Mitnahme des Geräts in den gefährdeten Bereich; die anderen waren der Meinung, dass das Gerät besser in einem mobilen Vor-Ort-Labor zum Einsatz kommen sollte. Dies hätte mehrere Vorteile: Das Gerät würde von Personen benutzt, die eine spezielle Einweisung bekommen und im günstigsten Fall eine biologische/chemische Vorbildung hätten. Zudem müssten nur die verdächtigen Proben im Chemikalien- oder biologischen Schutzanzug

gesammelt werden, die Messung könnte in Laborschutzausrüstung (Kittel, Handschuhe, Schutzbrille) durchgeführt werden. Weiterhin müsste das pTD nicht von außen dekontaminiert werden, was bei einem Einsatz in einer kontaminierten Umgebung eventuell nötig wäre. Der Einbau in ein Vor-Ort-Labor, z. B. ein entsprechend ausgerüstetes Auto oder ein Lastwagen, ist mit der Labor- und Koffervariante (Abb. 12) möglich. Weiteres Feedback wurde an die Hersteller des pTDs gegeben, um die Koffervariante im Detail für den Vor-Ort-Einsatz zu optimieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das pTD in einer Anwenderübung seine Einsatzfähigkeit unter Beweis stellte und gut für einen Vor-Ort-Einsatz im Rahmen einer biologischen Gefahrenlage geeignet ist. Mit dem Nachweis der fünf Toxine SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin sowie den Pathogenen *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholera* und *Variola major* wird eine Vielzahl von biologischen Agenzien abgedeckt.

Weitere Vor-Ort-Detektionssysteme wie LFAs und das ABICAP-System sind ähnlich sensitiv, aber nicht in der Lage, mehrere Agenzien gleichzeitig nachzuweisen (siehe 4.5.1). Das ArrayTube System ist ebenfalls zu einem Multiplex-Nachweis fähig, allerdings dauert eine Messung mehr als dreimal so lange wie beim pTD [310]. Das pTD ist daher aufgrund seines sensitiven Nachweises und der breiten Detektionsmöglichkeiten unter den besten Vor-Ort- und Multiplex-Detektionssystemen einzuordnen.

4.6 Ausblick

Die generierten Antikörper wurden in den Kapiteln 3.1-3.4 ausführlich charakterisiert. Nicht abschließend beantwortet werden konnte die Frage der Subtyperkennung der einzelnen Antikörper, da nur 13 der bekannten 24 Sub- bzw. Mosaiktypen von BoNT/A, /C, /D und /E zur Verfügung standen. Mit den Antikörpern gegen die humanpathogenen Serotypen von BoNT sollten in der Zukunft weitere Subtypen, möglichst als Bakterienüberstände der natürlich vorkommenden *Clostridien*, untersucht werden. Um den Nachweis von Abrin breiter zu evaluieren, sollte versucht werden, weitere Kultivare von *Abrus precatorius* aus anderen Ländern zu untersuchen. Zudem müsste das Toxin-Reinigungsprotokoll modifiziert werden, um in Zukunft die Isoformen Abrin-b, -c und -d zu reinigen.

Im Rahmen der Diagnostik von veterinärpathogenen BoNTs wurden sehr viele Stämme mittels ELISA und Endopep-MS Assay positiv getestet, welche aus Botulismus-Ausbrüchen in Europa isoliert wurden. Woudstra *et al.* berichteten von Unterschieden der Flagellin-Gene der veterinärpathogenen *C. botulinum*-Stämme in Europa, USA und Afrika. Änderungen in den Epitopen der BoNTs sind daher nicht auszuschließen [135]. In der Zukunft könnten Stämme aus anderen Teilen der Welt untersucht werden, ob diese mit den entwickelten ELISAs erkannt werden. Die vier etablierten ELISA sollten zukünftig von Routinelaboren durchgeführt werden, um veterinärmedizinisch relevante Proben auf BoNTs zu untersuchen. So können epidemiologische Studien zu Intoxikationsketten oder Qualitätskontrollen von Futtermitteln durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollten die ELISA kommerzialisiert werden. Im Falle eines positiven Ergebnisses sollte eine Bestätigungsdiagnostik in Expertenlaboren mittels Endopep-MS Assay erfolgen.

Die generierten und umfassend charakterisierten Antikörper lassen sich für weitere Zwecke verwenden. Es wäre sehr interessant, diese in andere Vor-Ort-Detektionsplattformen wie *lateral flow assays* oder das ABICAP System zu implementieren. Zusätzlich könnten andere Plattformen, wie die in GEFREASE weiter entwickelte KIM Plattform von Bertin Technologies oder das kommerziell erhältliche RAPTOR-System, getestet werden. Die KIM Plattform konnte bisher SEB, Rizin und BoNT/C ebenfalls im niedrigen ng/ml-Bereich nachweisen (Kommunikation bei Projekttreffen). Das RAPTOR System, welches auf einer optischen Detektion der Antikörperbindung basiert [312], wurde bereits für Analysen von Lebensmitteln, Flusswasser und klinischen Proben verwendet [313].

In weiteren Versuchen sollte eine größere Anzahl an Matrices untersucht werden. Neben Boden, Staub, Luftkeimsammlerprobe, Mineralwasser und Milch könnten weitere Lebensmittelproben, wie verschiedene Getränke oder Fertignahrung, getestet werden. Die Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen in verschiedenen Lebensmitteln unterscheiden sich häufig deutlich [155, 161,

172]. Zusätzlich könnten klinische Proben wie Serum, Urin oder Stuhlproben untersucht werden. Auch weitere Umweltproben wie Flusswasser oder Sand wären denkbar.

Die im Rahmen des GEFREASE-Projektes erfolgreich weiter entwickelte pTD Plattform sollte in der Zukunft für ein breiteres Anwendungsfeld geöffnet werden. Dazu könnten zum Beispiel klinisch relevante Toxine wie *C. difficile* Toxine oder Shiga-Toxine nachgewiesen werden, für die es einen großen Markt im Bereich der medizinischen Diagnostika gibt. Die Plattform könnte außerdem für niedermolekulare Toxine (wie Saxitoxine) oder den Nachweis von DNA verschiedener Pathogene erweitert werden.

5 Zusammenfassung

Biologische Toxine sind aufgrund ihrer Toxizität und ihres Vorkommens von hoher Relevanz im Gesundheits-, Lebensmittel- und Sicherheitsbereich. Akzidentelle und intentionale Intoxikationen haben das Potential, schwerwiegende Krankheitsbilder zu induzieren, welche letal verlaufen können. Ein schneller, sensitiver und spezifischer Nachweis der auslösenden Proteine ist entscheidend, um adäquate Schutzmaßnahmen und Behandlungsoptionen zu ergreifen. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung von stationären und mobilen immunologischen Nachweissystemen für Staphylokokken Enterotoxin A (SEA), Abrin und die Botulinum Neurotoxine BoNT/A, /C, /CD, /D, /DC und /E. Technisch herausfordernd ist das sichere Erfassen von Toxinen, die in komplexen Gruppen nahverwandter, funktionell ähnlicher Moleküle vorkommen und – je nach Fragestellung – differenziert werden müssen.

Im Rahmen der Arbeit wurden, basierend auf 10 Hybridoma-Fusionen, insgesamt 25 monoklonale Antikörper (mAk), die die genannten Toxine spezifisch und hoch-affin binden, isoliert und umfassend charakterisiert. Die neuen Reagenzien wurden verwendet, um stationäre (laborbasierte) und mobile (vor Ort) Detektionsverfahren zu etablieren.

Für die humanpathogenen BoNT/A und /E gelang beispielsweise die Entwicklung von Sandwich ELISAs, welche alle in der Gruppe vorhandenen Subtypen nachweisen. Ausgewählte mAk waren in der Lage, BoNT/A sowie ein kürzlich neu identifiziertes Mosaiktoxin BoNT/H *in vitro* zu neutralisieren. Mit Hilfe der anti-Abrin mAk gelang die Differenzierung zwischen Abrin-a und dem nahverwandten, aber deutlich weniger toxischen *Abrus* Agglutinin. Alle etablierten Toxin-spezifischen Sandwich ELISAs erwiesen sich als äußerst sensitiv mit Nachweisgrenzen zwischen 2 und 30 pg/ml Toxin, was mehrere Größenordnungen unterhalb der halbletalen Dosen für Menschen liegt.

Durch die neu generierten Antikörper gegen veterinärpathogene BoNT (Serotypen C, D und ihre Mosaikvarianten CD und DC) gelang erstmalig eine eindeutige Differenzierung der Toxine auf Basis von vier Sandwich ELISAs. Die Ergebnisse konnten auf funktioneller Ebene bestätigt werden, indem die Mosaiktoxine einer Kombination aus Immunoaffinitätsanreicherung, enzymatischem Aktivitätstest und massenspektrometrischer Analyse unterzogen wurden. Eine umfassende Validierung der vier differenzierenden ELISAs im Vergleich zu funktionellen (Endopep-MS Assay) und genetischen Methoden (PCR) bei Testung von mehr als 90 *Clostridien*-Stämmen und veterinärpathogenen Realproben ergab eine 100%-ige Übereinstimmung der Ergebnisse.

Zur Etablierung eines schnellen und einfachen Multiplex-Detektionssystems, das von Einsatzkräften vor Ort eingesetzt werden kann, wurden die Antikörper gegen SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin in die vollautomatisierte Detektionsplattform pTD, einem elektrischen

Biochipsystem, implementiert. Die fünf Toxine konnten simultan oder einzeln innerhalb von 20 min Messzeit mit ausreichender Sensitivität und einem Detektionslimit zwischen 0,5 und 17,5 ng/ml detektiert werden. Das pTD System erfasste die Toxine in ausgewählten dotierten Umwelt- oder Lebensmittelproben ohne Kreuzreaktivitäten. In einer Anwenderübung wurde die pTD Plattform erfolgreich durch Einsatzkräfte von Polizei und Feuerwehr auf Praxistauglichkeit geprüft. Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse soll der hier entwickelte Biochip zur Detektion von SEA, BoNT/C, /D, /E und Abrin in Kürze durch den industriellen Kooperationspartner kommerzialisiert werden.

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit qualitativ hochwertige mAk zum Nachweis von SEA, Abrin, BoNT/A, /C, /CD, /D, /DC und /E etabliert und umfassend charakterisiert, mit denen bestehende Fähigkeitslücken im Bereich stationärer und mobiler Detektionssysteme geschlossen wurden.

6 Abstract

Biological toxins are relevant in the security sector as well as in the health and food sector due to their toxicity and availability. Inadvertent and intended intoxications potentially induce severe and possibly fatal diseases. Therefore, a rapid, sensitive, and specific detection of toxins is highly important in order to take adequate countermeasures. The aim of this thesis was to develop stationary and mobile detection methods for staphylococcal enterotoxin A (SEA), abrin, and the botulinum neurotoxins BoNT/A, /C, /CD, /DC, and /E. The fact that toxins occur in groups of highly related and functionally similar variants is technically challenging since all variants have to be detected and, if necessary, differentiated.

Based on 10 hybridoma fusions, a total number of 25 monoclonal antibodies (mAb) with high specificity and affinity were isolated and thoroughly characterized. Stationary (lab-based) and mobile (on-site) detection methods were established using the newly generated antibodies.

For example, sandwich ELISAs developed for the detection of serotypes BoNT/A and /E pathogenic to humans were able to detect all available subtypes. Furthermore, several mAbs showed *in vitro* neutralization of BoNT/A and of the recently identified mosaic toxin BoNT/H. Moreover, anti-abrin mAbs enabled the differentiation of abrin and the closely related, but less toxic *Abrus* agglutinin. In sum, all established sandwich ELISAs were highly specific and sensitive with detection limits between 2 and 30 pg/mL toxin, which corresponds to several magnitudes below half-lethal doses in humans.

For the first time, veterinary BoNT serotypes C, D and their mosaic toxins CD and DC were unambiguously differentiated by four distinct sandwich ELISAs based on highly specific mAbs. Additionally, results were verified on a functional level by a combination of immunoenrichment, enzymatic cleavage assays, and mass spectrometry analysis. The ELISAs were extensively validated and results showed 100% concordance with data obtained by functional (Endopep-MS assay) and genetic methods (PCR) using a panel of more than 90 *Clostridium* strains and real sample material from veterinary botulism outbreaks.

In order to establish a fast and reliable mobile detection system, which can be used by first responders, antibodies against SEA, abrin, BoNT/C, /D, and /E were implemented in the fully automated on-site detection platform pTD. With this electrical biochip system, the five toxins could be detected either separately or simultaneously within 20 min with detection limits ranging between 0.5 and 17.5 ng/mL. Closely related toxins showed no cross-reactivity. The system was suitable for detection of the mentioned toxins from selected environmental samples and beverages. The usability of pTD was successfully demonstrated in a training scenario by first responders from police and fire brigades. Based on these results, the newly established

biochip for the detection of SEA, BoNT/C, /D, /E and abrin will subsequently be commercialized by the industrial cooperation partner.

To conclude, dedicated monoclonal antibodies for the detection of SEA, abrin and the botulinum neurotoxins BoNT/A, /C, /CD, /DC, and /E were established and thoroughly characterized in this work in order to significantly improve stationary and mobile detection methods.

7 Literatur

1. Chakraborty A, Ghosh S, Chowdhary G, Maulik U, Chakrabarti S. 2011. DBETH: A Database of Bacterial Exotoxins for Human. *Nucleic Acids Research* 40:D615-620.
2. Roth L, Daunderer M, Kormann K. 1984. *Giftpflanzen: Pflanzengifte. Vorkommen, Wirkung, Therapie.* München, Ecomed Verlagsgesellschaft.
3. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 130:33-40.
4. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17:7-15.
5. Robert Koch-Institut. 2015. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2014.* Robert Koch-Institut, Berlin.
6. Wooten J, Pittman C, Blake T, Thomas J, Devlin J, Higgerson R, Johnson R. 2014. A Case of Abrin Toxin Poisoning, Confirmed via Quantitation of l-Abrine (N-Methyl-l-Tryptophan) Biomarker. *Journal of Medical Toxicology* 10:392-394.
7. Robb CS. 2015. The analysis of abrin in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 67:100-106.
8. Centers for disease control and prevention. Select agents and toxins. www.selectagents.gov. aufgerufen am 14.03.2016.
9. Planning Workgroup. 2000. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *MMWR* 49:1-14.
10. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. 2002. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 8:225-230.
11. Jansen HJ, Breeveld FJ, Stijnis C, Grobusch MP. 2014. Biological warfare, bioterrorism, and biocrime. *Clin Microbiol Infect* 20:488-496.
12. Australia Group. 2007. *Gegen die Verbreitung chemischer und biologischer Waffen - Für mehr Sicherheit.* http://www.australiagroup.net/de/agb_july2007.pdf. aufgerufen am 14.03.2016.
13. WuDunn S, Miller J, Broad WJ. 1998. SOWING DEATH: A special report; How Japan Germ Terror Alerted World, *In The New York Times.* The New York Times, New York.
14. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K. 2001. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *Jama* 285:1059-1070.
15. Danzig R. 2011. *Aum shinrikyo: insights into how terrorists develop biological and chemical weapons.* Center for a New American Security.
16. Lederberg J. 1999. *Biological weapons: limiting the threat.* MIT press.
17. Crompton R, Gall D. 1980. Georgi Markov - death in a pellet. *Med Leg J* 48:51-62.
18. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. 2010. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2:2177-2197.
19. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2:63-76.
20. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev* 36:815-836.
21. Khambaty FM, Bennett RW, Shah DB. 1994. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect* 113:75-81.
22. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10:505-520.
23. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 344:11-16.

24. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Witte W, Friedrich AW. 2014. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Euro Surveill 19.
25. Robert Koch-Institut. 1999. Empfehlung zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen. Bundesgesundheitsblatt 42:954–958.
26. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 13:4329.
27. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins (Basel) 2:1751-1773.
28. Carmo LSd, Dias RS, Linardi VR, Sena MJd, Santos DAd. 2003. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology 46:581-586.
29. Fetsch A, Contzen M, Hartelt K, Kleiser A, Maassen S, Rau J, Kraushaar B, Layer F, Strommenger B. 2014. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. Int J Food Microbiol 187:1-6.
30. Johler S, Weder D, Bridy C, Huguenin MC, Robert L, Hummerjohann J, Stephan R. 2015. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. J Dairy Sci 98:2944-2948.
31. Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 61:1-10.
32. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int J Food Microbiol 7:311-316.
33. Crawley GJ, Black JN, Gray I, Blanchard JW. 1966. Clinical Chemistry of Staphylococcal Enterotoxin Poisoning in Monkeys. Applied Microbiology 14:445-450.
34. Gill DM. 1982. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiol Rev 46:86-94.
35. Anderson PD. 2012. Bioterrorism: toxins as weapons. J Pharm Pract 25:121-129.
36. Rusnak JM, Kortepeter M, Ulrich R, Poli M, Boudreau E. 2004. Laboratory exposures to staphylococcal enterotoxin B. Emerg Infect Dis 10:1544-1549.
37. Hongmin Li, Andrea Llera, Emilio L. Malchiodi, Mariuzza RA. 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. Annual Review of Immunology 17:435-466.
38. Stiles BG, Krakauer T. 2005. Staphylococcal enterotoxins: A purging experience in review, Part I. Clinical Microbiology Newsletter 27:179-186.
39. Hu DL, Nakane A. 2014. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. Eur J Pharmacol 722:95-107.
40. Tranter HS. 1990. Foodborne staphylococcal illness. The Lancet 336:1044-1046.
41. Beery JT, Taylor SL, Schlunz LR, Freed RC, Bergdoll MS. 1984. Effects of staphylococcal enterotoxin A on the rat gastrointestinal tract. Infect Immun 44:234-240.
42. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. 2004. Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus*. Journal of Infectious Diseases 189:2334-2336.
43. Casman EP, Bergdoll MS, Robinson J. 1963. Designation of Staphylococcal Exterotoxins. J Bacteriol 85:715-716.
44. Ono HK, Sato'o Y, Narita K, Naito I, Hirose S, Hisatsune J, Asano K, Hu DL, Omoe K, Sugai M, Nakane A. 2015. Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. Appl Environ Microbiol 81:7034-7040.
45. Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect Immun 76:4999-5005.
46. Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, Jung WK, Kim JM, Park YH. 2007. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. International Journal of Food Microbiology 117:99-105.

47. Ostyn A, Prufer AL, Papinaud I, Hennekinne J-A, Assere A, Lombard B. Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in all types of food matrices. European screening method of the EU-RL.
48. Hu DL, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A, Shinagawa K. 2003. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Infect Immun* 71:567-570.
49. Techer C, Salmain M, Tranquet O, Echasserieau V, Le Moigne V, Hennekinne J-A, Gautier M, Val F. 2013. Detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. *Food Control* 32:255-261.
50. Poli MA, Rivera VR, Neal D. 2002. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. *Toxicon* 40:1723-1726.
51. Ostyn A, Guillier F, Prufer AL, Papinaud I, Messio S, Krys S, Lombard B, Hennekinne J-A. 2011. Intra-laboratory validation of the Ridascreen® SET Total kit for detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese. *Letters in Applied Microbiology* 52:468-474.
52. Park CE, Akhtar M, Rayman MK. 1994. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods. *Appl Environ Microbiol* 60:677-681.
53. Fujikawa H, Igarashi H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl Environ Microbiol* 54:2345-2348.
54. Tetracore. 2002. SEB BioThreat Alert Test Strip. Presseartikel.
55. Rong-Hwa S, Shiao-Shek T, Der-Jiang C, Yao-Wen H. 2010. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Food Chemistry* 118:462-466.
56. Jin W, Yamada K, Ikami M, Kaji N, Tokeshi M, Atsumi Y, Mizutani M, Murai A, Okamoto A, Namikawa T, Baba Y, Ohta M. 2013. Application of IgY to sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products. *J Microbiol Methods* 92:323-331.
57. Garber EA, Venkateswaran KV, O'Brien TW. 2010. 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* 58:6600-6607.
58. Tallent SM, Degrasse JA, Wang N, Mattis DM, Kranz DM. 2013. Novel platform for the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods. *Appl Environ Microbiol* 79:1422-1427.
59. Rasooly A, Bruck HA, Kostov Y. 2013. An ELISA Lab-on-a-Chip (ELISA-LOC). *Methods Mol Biol* 949:451-471.
60. Szkola A, Linares EM, Worbs S, Dorner BG, Dietrich R, Märtlbauer E, Niessner R, Seidel M. 2014. Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay. *Analyst* 139:5885-5892.
61. Weingart OG, Gao H, Crevoisier F, Heitger F, Avondet MA, Sigrist H. 2012. A bioanalytical platform for simultaneous detection and quantification of biological toxins. *Sensors (Basel)* 12:2324-2339.
62. Lian W, Wu D, Lim DV, Jin S. 2010. Sensitive detection of multiplex toxins using antibody microarray. *Anal Biochem* 401:271-279.
63. Cooper J, Yazvenko N, Peyvan K, Maurer K, Taitt CR, Lyon W, Danley DL. 2010. Targeted deposition of antibodies on a multiplex CMOS microarray and optimization of a sensitive immunoassay using electrochemical detection. *PLoS One* 5:e9781.
64. Shlyapnikov YM, Shlyapnikova EA, Simonova MA, Shepelyakovskaya AO, Brovko FA, Komaleva RL, Grishin EV, Morozov VN. 2012. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins. *Anal Chem* 84:5596-5603.
65. Dupre M, Gilquin B, Fenaille F, Feraudet-Tarisse C, Dano J, Ferro M, Simon S, Junot C, Brun V, Becher F. 2015. Multiplex quantification of protein toxins in human biofluids and food matrices using immunoextraction and high-resolution targeted mass spectrometry. *Anal Chem* 87:8473-8480.
66. Cai S, Singh BR, Sharma S. 2007. Botulism diagnostics: from clinical symptoms to in vitro assays. *Crit Rev Microbiol* 33:109-125.

67. Popoff MR. 1995. Ecology of neurotoxicogenic strains of clostridia. *Curr Top Microbiol Immunol* 195:1-29.
68. Peck MW. 2009. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Adv Microb Physiol* 55:183-265, 320.
69. Dolman CE, Chang E. 1972. Bacteriophages of *Clostridium botulinum*. *Can J Microbiol* 18:67-76.
70. Eklund MW, Poysky FT. 1974. Interconversion of type C and D strains of *Clostridium botulinum* by specific bacteriophages. *Appl Microbiol* 27:251-258.
71. Eklund MW, Poysky FT, Meyers JA, Pelroy GA. 1974. Interspecies conversion of *Clostridium botulinum* type C to *Clostridium novyi* type A by bacteriophage. *Science* 186:456-458.
72. Oguma K, Yamaguchi T, Sudou K, Yokosawa N, Fujikawa Y. 1986. Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their nontoxic derivatives. *Appl Environ Microbiol* 51:256-260.
73. Skulberg A, Hausken OW. 1965. The Differentiation of Various Strains of *Clostridium botulinum* and Transformation Experiments with Type E. *Journal of Applied Bacteriology* 28:83-89.
74. Bigalke H, Rummel A. 2005. Medical aspects of toxin weapons. *Toxicology* 214:210-220.
75. van Ermengem E. 1897. Ueber einen neuen anaeroben *Bacillus* und seine Beziehungen zum Botulismus. *Z Hyg* 26.
76. Centers for disease control and prevention. National Botulism Surveillance. <http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/botulism-surveillance.html>. aufgerufen am 21.12.2015.
77. Hartung M, Käsbohrer A. 2009. Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009, Berlin.
78. Hoffman RE. 1982. Type F Infant Botulism. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 136:270.
79. Rosow LK, Strober JB. 2015. Infant botulism: review and clinical update. *Pediatr Neurol* 52:487-492.
80. Koepke R, Sobel J, Arnon SS. 2008. Global occurrence of infant botulism, 1976-2006. *Pediatrics* 122:e73-82.
81. Davis JB, Mattman LH, Wiley M. 1951. *Clostridium botulinum* in a fatal wound infection. *J Am Med Assoc* 146:646-648.
82. Gonzales y Tucker RD, Frazee B. 2014. View from the front lines: an emergency medicine perspective on clostridial infections in injection drug users. *Anaerobe* 30:108-115.
83. Walton RN, Clemens A, Chung J, Moore S, Wharton D, Haydu L, de Villa E, Sanders G, Bussey J, Richardson D, Austin JW. 2014. Outbreak of type E foodborne botulism linked to traditionally prepared salted fish in Ontario, Canada. *Foodborne Pathog Dis* 11:830-834.
84. Dolman CE. 1957. Type E (fish-borne) botulism: a review. *Jpn J Med Sci Biol* 10:383-395.
85. Burke P, Needham M, Jackson BR, Bokanyi R, St Germain E, Englender SJ. 2016. Outbreak of Foodborne Botulism Associated with Improperly Jarred Pesto - Ohio and California, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:175-177.
86. Cheng LW, Onisko B, Johnson EA, Reader JR, Griffey SM, Larson AE, Tepp WH, Stanker LH, Brandon DL, Carter JM. 2008. Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A. *Toxicology* 249:123-129.
87. Weisemann J, Krez N, Fiebig U, Worbs S, Skiba M, Endermann T, Dorner MB, Bergström T, Muñoz A, Zegers I, Müller C, Jenkinson S, Avondet M-A, Delbrassinne L, Denayer S, Zeleny R, Schimmel H, Åstot C, Dorner BG, Rummel A. 2015. Generation and Characterization of Six Recombinant Botulinum Neurotoxins as Reference Material to Serve in an International Proficiency Test. *Toxins (Basel)* 7:5035-5054.
88. Arnon SS, Schechter R, Maslanka SE, Jewell NP, Hatheway CL. 2006. Human Botulism Immune Globulin for the Treatment of Infant Botulism. *New England Journal of Medicine* 354:462-471.
89. Rosow LK, Strober JB. 2015. Infant Botulism: Review and Clinical Update. *Pediatric Neurology* 52:487-492.

90. Cheng LW, Land KM, Stanker LH. 2012. Current methods for detecting the presence of botulinum neurotoxins in food and other biological samples. *Bioterrorism Rijeka, Croatia: Intech*:1-16.
91. Sakaguchi G. 1982. *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacol Ther* 19:165-194.
92. Montecucco C, Schiavo G. 1994. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol* 13:1-8.
93. Gu S, Rumpel S, Zhou J, Strotmeier J, Bigalke H, Perry K, Shoemaker CB, Rummel A, Jin R. 2012. Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science* 335:977-981.
94. Fujinaga Y, Inoue K, Shimazaki S, Tomochika K, Tsuzuki K, Fujii N, Watanabe T, Ohyama T, Takeshi K, Inoue K, Oguma K. 1994. Molecular construction of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin and its gene organization. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1291-1298.
95. Lee K, Gu S, Jin L, Le TT, Cheng LW, Strotmeier J, Kruel AM, Yao G, Perry K, Rummel A, Jin R. 2013. Structure of a bimodular botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS Pathog* 9:e1003690.
96. Montecucco C, Schiavo G. 1993. Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci* 18:324-327.
97. Rummel A. 2014. The Dual-Receptor Recognition of Botulinum Neurotoxins, p 129-150. *In* Foster KA (ed), *Molecular Aspects of Botulinum Neurotoxin*. Springer, New York.
98. Montecucco C. 1986. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends in Biochemical Sciences* 11:314-317.
99. Mahrhold S, Strotmeier J, Garcia-Rodriguez C, Lou J, Marks JD, Rummel A, Binz T. 2013. Identification of the SV2 protein receptor-binding site of botulinum neurotoxin type E. *Biochem J* 453:37-47.
100. Rummel A. 2015. The long journey of botulinum neurotoxins into the synapse. *Toxicon* 107:9-24.
101. Rowland LP. 2002. Stroke, Spasticity, and Botulinum Toxin. *New England Journal of Medicine* 347:382-383.
102. Popoff MR, Bouvet P. 2009. Clostridial toxins. *Future Microbiol* 4:1021-1064.
103. Brunger AT, Jin R, Breidenbach MA. 2008. Highly specific interactions between botulinum neurotoxins and synaptic vesicle proteins. *Cell Mol Life Sci* 65:2296-2306.
104. Barash JR, Arnon SS. 2014. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis* 209:183-191.
105. Poulain B, Popoff MR, Molgó J. 2008. How do the botulinum neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *The Botulinum Journal* 1:14-87.
106. Burke GS. 1919. Notes on *bacillus botulinus*. *J Bac*:555-571.
107. Prevot AR, Brygoo ER. 1953. [New investigations on botulinism and its five toxic types]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 85:544-575.
108. Dolman CE, Murakami L. 1961. *Clostridium Botulinum* Type F with Recent Observations on Other Types. *Journal of Infectious Diseases* 109:107-128.
109. Ciccarelli AS, Whaley DN, McCroskey LM, Gimenez DF, Dowell VR, Jr., Hatheway CL. 1977. Cultural and physiological characteristics of *Clostridium botulinum* type G and the susceptibility of certain animals to its toxin. *Appl Environ Microbiol* 34:843-848.
110. Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS. 2014. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J Infect Dis* 209:192-202.
111. Maslanka SE, Luquez C, Dykes JK, Tepp WH, Pier CL, Pellett S, Raphael BH, Kalb SR, Barr JR, Rao A, Johnson EA. 2016. A Novel Botulinum Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, Has a Hybrid-Like Structure With Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized With Serotype A Antitoxin. *J Infect Dis* 213:379-385.
112. Popoff MR. 2014. Botulinum neurotoxins: more and more diverse and fascinating toxic proteins. *J Infect Dis* 209:168-169.
113. Kalb SR, Baudys J, Raphael BH, Dykes JK, Luquez C, Maslanka SE, Barr JR. 2015. Functional characterization of botulinum neurotoxin serotype H as a hybrid of known serotypes F and A (BoNT F/A). *Anal Chem* 87:3911-3917.

114. Smith TJ, Lou J, Geren IN, Forsyth CM, Tsai R, Laporte SL, Tepp WH, Bradshaw M, Johnson EA, Smith LA, Marks JD. 2005. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun* 73:5450-5457.
115. Kull S, Schulz KM, Weisemann J, Kirchner S, Schreiber T, Bollenbach A, Dabrowski PW, Nitsche A, Kalb SR, Dorner MB, Barr JR, Rummel A, Dorner BG. 2015. Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype. *PLoS One* 10:e0116381.
116. Hill KK, Smith TJ, Helma CH, Ticknor LO, Foley BT, Svensson RT, Brown JL, Johnson EA, Smith LA, Okinaka RT, Jackson PJ, Marks JD. 2007. Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol* 189:818-832.
117. Chen Y, Korkeala H, Aarnikunnas J, Lindstrom M. 2007. Sequencing the botulinum neurotoxin gene and related genes in *Clostridium botulinum* type E strains reveals orfx3 and a novel type E neurotoxin subtype. *J Bacteriol* 189:8643-8650.
118. Raphael BH, Lautenschlager M, Kalb SR, de Jong LI, Frace M, Luquez C, Barr JR, Fernandez RA, Maslanka SE. 2012. Analysis of a unique *Clostridium botulinum* strain from the Southern hemisphere producing a novel type E botulinum neurotoxin subtype. *BMC Microbiol* 12:245.
119. Dorner MB, Schulz KM, Kull S, Dorner BG. 2013. Complexity of botulinum neurotoxins: challenges for detection technology. *Curr Top Microbiol Immunol* 364:219-255.
120. Woudstra C, Skarin H, Anniballi F, Fenicia L, Bano L, Drigo I, Koene M, Bayon-Auboyer MH, Buffereau JP, De Medici D, Fach P. 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78:3120-3127.
121. Macdonald TE, Helma CH, Shou Y, Valdez YE, Ticknor LO, Foley BT, Davis SW, Hannett GE, Kelly-Cirino CD, Barash JR, Arnon SS, Lindstrom M, Korkeala H, Smith LA, Smith TJ, Hill KK. 2011. Analysis of *Clostridium botulinum* serotype E strains by using multilocus sequence typing, amplified fragment length polymorphism, variable-number tandem-repeat analysis, and botulinum neurotoxin gene sequencing. *Appl Environ Microbiol* 77:8625-8634.
122. Centers for disease control and prevention. 1998. Botulism in the United States, 1899-1996, Atlanta, USA.
123. Johannsen A. 1965. *Clostridium botulinum* Type E in Foods and the Environment Generally. *Journal of Applied Bacteriology* 28:90-94.
124. Bennetts HW, Hall TB. 1938. Botulism of sheep and cattle in western Australia: its cause and its prevention by immunization. *Aust Vet J* 14:105-118.
125. Boroff DA, Raynaud M, Prevot AR. 1952. Studies of toxin of *Clostridium botulinum* type D. *J Immunol* 68:503-511.
126. Eleopra R, Tugnoli V, Quatrala R, Rossetto O, Montecucco C. 2004. Different types of botulinum toxin in humans. *Mov Disord* 19 Suppl 8:S53-59.
127. Smith GR. 1976. Botulism in waterfowl. *Wildfowl* 27:129-138.
128. Lindstrom M, Myllykoski J, Sivela S, Korkeala H. 2010. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50:281-304.
129. Galey FD. 2001. Botulism in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 17:579-588.
130. Lindstrom M, Nevas M, Kurki J, Sauna-aho R, Latvala-Kiesila A, Polonen I, Korkeala H. 2004. Type C botulism due to toxic feed affecting 52,000 farmed foxes and minks in Finland. *J Clin Microbiol* 42:4718-4725.
131. Skarin H, Tevell Aberg A, Woudstra C, Hansen T, Lofstrom C, Koene M, Bano L, Hedeland M, Anniballi F, De Medici D, Olsson Engvall E. 2013. The workshop on animal botulism in Europe. *Biosecur Bioterror* 11 Suppl 1:S183-190.
132. Oguma K, Syuto B, Iida H, Kubo S. 1980. Antigenic similarity of toxins produced by *Clostridium botulinum* type C and D strains. *Infect Immun* 30:656-660.
133. Moriishi K, Koura M, Abe N, Fujii N, Fujinaga Y, Inoue K, Ogumad K. 1996. Mosaic structures of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* types C and D organisms. *Biochim Biophys Acta* 1307:123-126.
134. Anniballi F, Auricchio B, Woudstra C, Fach P, Fiore A, Skarin H, Bano L, Segerman B, Knutsson R, De Medici D. 2013. Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecur Bioterror* 11 Suppl 1:S207-214.

135. Woudstra C, Le Marechal C, Souillard R, Bayon-Auboyer MH, Anniballi F, Auricchio B, De Medici D, Bano L, Koene M, Sansonetti MH, Desoutter D, Hansbauer E-M, Dorner MB, Dorner BG, Fach P. 2015. Molecular gene profiling of *Clostridium botulinum* group III and its detection in naturally contaminated samples originating from various European countries. *Appl Environ Microbiol* 81:2495-2505.
136. Hansbauer EM, Skiba M, Endermann T, Weisemann J, Stern D, Dorner MB, Finkenwirth F, Wolf J, Luginbühl W, Messelhäuser U, Bellanger L, Woudstra C, Rummel A, Fach P, Dorner BG. 2016. Detection, differentiation, and identification of botulinum neurotoxin serotypes C, CD, D, and DC by highly specific immunoassays and mass spectrometry. *Analyst* doi:10.1039/c6an00693k.
137. Lindstrom M, Korkeala H. 2006. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 19:298-314.
138. Capek P, Dickerson TJ. 2010. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxins (Basel)* 2:24-53.
139. Deutsches Institut für Normung. 1988. DIN 10 102 - Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum Toxin. Beuth.
140. Boyer AE, Moura H, Woolfitt AR, Kalb SR, McWilliams LG, Pavlopoulos A, Schmidt JG, Ashley DL, Barr JR. 2005. From the mouse to the mass spectrometer: detection and differentiation of the endoproteinase activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry. *Anal Chem* 77:3916-3924.
141. Barr JR, Moura H, Boyer AE, Woolfitt AR, Kalb SR, Pavlopoulos A, McWilliams LG, Schmidt JG, Martinez RA, Ashley DL. 2005. Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry. *Emerg Infect Dis* 11:1578-1583.
142. Kalb SR, Boyer AE, Barr JR. 2015. Mass Spectrometric Detection of Bacterial Protein Toxins and Their Enzymatic Activity. *Toxins (Basel)* 7:3497-3511.
143. Kalb SR, Krilich JC, Dykes JK, Luquez C, Maslanka SE, Barr JR. 2015. Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:1133-1141.
144. Kalb SR, Smith TJ, Moura H, Hill K, Lou J, Geren IN, Garcia-Rodriguez C, Marks JD, Smith LA, Pirkle JL, Barr JR. 2008. The use of Endopep-MS to detect multiple subtypes of botulinum neurotoxins A, B, E, and F. *International Journal of Mass Spectrometry* 278:101-108.
145. Wang D, Krilich J, Baudys J, Barr JR, Kalb SR. 2015. Enhanced detection of type C botulinum neurotoxin by the Endopep-MS assay through optimization of peptide substrates. *Bioorg Med Chem* 23:3667-3673.
146. Worbs S, Fiebig U, Zeleny R, Schimmel H, Rummel A, Luginbühl W, Dorner BG. 2015. Qualitative and Quantitative Detection of Botulinum Neurotoxins from Complex Matrices: Results of the First International Proficiency Test. *Toxins (Basel)* 7:4935-4966.
147. Bigalke H, Rummel A. 2015. Botulinum Neurotoxins: Qualitative and Quantitative Analysis Using the Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN). *Toxins (Basel)* 7:4895-4905.
148. Rasetti-Escargueil C, Jones RG, Liu Y, Sesardic D. 2009. Measurement of botulinum types A, B and E neurotoxicity using the phrenic nerve-hemidiaphragm: improved precision with inbred mice. *Toxicon* 53:503-511.
149. Szabo EA, Pemberton JM, Desmarchelier PM. 1993. Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 59:3011-3020.
150. Kirchner S, Kramer KM, Schulze M, Pauly D, Jacob D, Gessler F, Nitsche A, Dorner BG, Dorner MB. 2010. Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol* 76:4387-4395.
151. Anniballi F, Auricchio B, Delibato E, Antonacci M, De Medici D, Fenicia L. 2012. Multiplex real-time PCR SYBR Green for detection and typing of group III *Clostridium botulinum*. *Vet Microbiol* 154:332-338.
152. Fach P, Gibert M, Griffais R, Guillou JP, Popoff MR. 1995. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium spp.* and evaluation in food samples. *Appl Environ Microbiol* 61:389-392.

153. Notermans S, Dufrenne J, Kozaki S. 1982. The relation between toxicity and toxin-related-antigen contents of *Clostridium botulinum* types C and D cultures as determined by mouse bioassay and ELISA. *Jpn J Med Sci Biol* 35:203-211.
154. Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC. 2006. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl Environ Microbiol* 72:1231-1238.
155. Singh A, Datta S, Sachdeva A, Maslanka S, Dykes J, Skinner G, Burr D, Whiting RC, Sharma SK. 2015. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in selected food matrices. *Health Secur* 13:37-44.
156. Maslanka SE, Luquez C, Raphael BH, Dykes JK, Joseph LA. 2011. Utility of botulinum toxin ELISA A, B, E, F kits for clinical laboratory investigations of human botulism. *The Botulinum Journal* 2:72-92.
157. Liu Z, Zhang C, Li Y, Song C, Sun Y, Wei Y, Xu Z, Yang A, Xu Z, Yang K, Jin B. 2012. High sensitivity ELISA for detection of botulinum neurotoxin serotype F. *Hybridoma (Larchmt)* 31:233-239.
158. Brooks CE, Clarke HJ, Finlay DA, McConnell W, Graham DA, Ball HJ. 2010. Culture enrichment assists the diagnosis of cattle botulism by a monoclonal antibody based sandwich ELISA. *Vet Microbiol* 144:226-230.
159. Stanker LH, Scotcher MC, Cheng L, Ching K, McGarvey J, Hodge D, Hnasko R. 2013. A monoclonal antibody based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. *Toxins (Basel)* 5:2212-2226.
160. Simon S, Fiebig U, Liu Y, Tierney R, Dano J, Worbs S, Endermann T, Nevers MC, Volland H, Sesardic D, Dorner MB. 2015. Recommended Immunological Strategies to Screen for Botulinum Neurotoxin-Containing Samples. *Toxins (Basel)* 7:5011-5034.
161. Jenko KL, Zhang Y, Kostenko Y, Fan Y, Garcia-Rodriguez C, Lou J, Marks JD, Varnum SM. 2014. Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins. *Analyst* 139:5093-5102.
162. Sharma SK, Eblen BS, Bull RL, Burr DH, Whiting RC. 2005. Evaluation of lateral-flow *Clostridium botulinum* neurotoxin detection kits for food analysis. *Appl Environ Microbiol* 71:3935-3941.
163. Gessler F, Pagel-Wieder S, Avondet MA, Böhnelt H. 2007. Evaluation of lateral flow assays for the detection of botulinum neurotoxin type A and their application in laboratory diagnosis of botulism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:243-249.
164. Klewitz T, Gessler F, Beer H, Pflanz K, Scheper T. 2006. Immunochromatographic assay for determination of botulinum neurotoxin type D. *Sensors and Actuators B: Chemical* 113:582-589.
165. Yeh C-T, Liang C-C, Yang C-M, Wey J-J, Tsui P-Y, Wu H-L, Yu C-P, Shyu R-H. 2014. Comparison of immunostrips with mouse bioassay and bacterial culture in detecting botulinum toxins in bottles from suspected Taiwan high-speed rail bomber. *Forensic Toxicology* 32:258-265.
166. Pauly D, Kirchner S, Stoermann B, Schreiber T, Kaulfuss S, Schade R, Zbinden R, Avondet MA, Dorner MB, Dorner BG. 2009. Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *Analyst* 134:2028-2039.
167. Grate JW, Warner MG, Ozanich RM, Jr., Miller KD, Colburn HA, Dockendorff B, Antolick KC, Anheier NC, Jr., Lind MA, Lou J, Marks JD, Bruckner-Lea CJ. 2009. Renewable surface fluorescence sandwich immunoassay biosensor for rapid sensitive botulinum toxin detection in an automated fluidic format. *Analyst* 134:987-996.
168. Wang Y-L, Chu BH, Chen KH, Chang CY, Lele TP, Tseng Y, Pearton SJ, Ramage J, Hooten D, Dabiran A, Chow PP, Ren F. 2008. Botulinum toxin detection using AlGaIn/GaN high electron mobility transistors. *Applied Physics Letters* 93:262101.
169. Evans ER, Skipper PJ, Shone CC. 2009. An assay for botulinum toxin types A, B and F that requires both functional binding and catalytic activities within the neurotoxin. *J Appl Microbiol* 107:1384-1391.

170. Poras H, Ouimet T, Orng SV, Fournie-Zaluski MC, Popoff MR, Roques BP. 2009. Detection and quantification of botulinum neurotoxin type a by a novel rapid in vitro fluorimetric assay. *Appl Environ Microbiol* 75:4382-4390.
171. Joshi SG. 2012. Detection of biologically active botulinum neurotoxin A in serum using high-throughput FRET-assay. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65:8-12.
172. Dunning FM, Ruge DR, Piazza TM, Stanker LH, Zeytin FN, Tucker WC. 2012. Detection of botulinum neurotoxin serotype A, B, and F proteolytic activity in complex matrices with picomolar to femtomolar sensitivity. *Appl Environ Microbiol* 78:7687-7697.
173. Ruge DR, Dunning FM, Piazza TM, Molles BE, Adler M, Zeytin FN, Tucker WC. 2011. Detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using fluorogenic reporters. *Anal Biochem* 411:200-209.
174. Kalb SR, Baudys J, Wang D, Barr JR. 2015. Recommended mass spectrometry-based strategies to identify botulinum neurotoxin-containing samples. *Toxins (Basel)* 7:1765-1778.
175. Hedeland M, Moura H, Baverud V, Woolfitt AR, Bondesson U, Barr JR. 2011. Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS. *J Med Microbiol* 60:1299-1305.
176. Wang D, Baudys J, Krilich J, Smith TJ, Barr JR, Kalb SR. 2014. A two-stage multiplex method for quantitative analysis of botulinum neurotoxins type A, B, E, and F by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 86:10847-10854.
177. Wang D, Baudys J, Rees J, Marshall KM, Kalb SR, Parks BA, Nowaczyk L, 2nd, Pirkle JL, Barr JR. 2012. Subtyping botulinum neurotoxins by sequential multiple endoproteases in-gel digestion coupled with mass spectrometry. *Anal Chem* 84:4652-4658.
178. Kull S, Pauly D, Störmann B, Kirchner S, Stämmler M, Dorner MB, Lasch P, Naumann D, Dorner BG. 2010. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 82:2916-2924.
179. Garaniya N, Bapodra A. 2014. Ethno botanical and Phytopharmacological potential of *Abrus precatorius* L.: A review. *Asian Pac J Trop Biomed* 4:S27-34.
180. Olsnes S. 2004. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* 44:361-370.
181. Roxas Duncan VI, Smith LA. 2011. Of Beans and Beads: Ricin and Abrin in Bioterrorism and Biocrime. *Journal of Bioterrorism & Biodefense* s2.
182. Sabo T, Gal Y, Elhanany E, Sapoznikov A, Falach R, Mazor O, Kronman C. 2015. Antibody treatment against pulmonary exposure to abrin confers significantly higher levels of protection than treatment against ricin intoxication. *Toxicol Lett* 237:72-78.
183. Jang DH, Hoffman RS, Nelson LS. 2010. Attempted suicide, by mail order: *Abrus precatorius*. *J Med Toxicol* 6:427-430.
184. Alhamdani M, Brown B, Narula P. 2015. Abrin poisoning in an 18-month-old child. *Am J Case Rep* 16:146-148.
185. Dickers KJ, Bradberry SM, Rice P, Griffiths GD, Vale JA. 2003. Abrin poisoning. *Toxicol Rev* 22:137-142.
186. Subrahmanyam D, Mathew J, Raj M. 2008. An unusual manifestation of *Abrus precatorius* poisoning: a report of two cases. *Clin Toxicol (Phila)* 46:173-175.
187. Sahni V, Agarwal SK, Singh NP, Sikdar S. 2007. Acute demyelinating encephalitis after jequirity pea ingestion (*Abrus precatorius*). *Clin Toxicol (Phila)* 45:77-79.
188. Refsnes K, Olsnes S, Pihl A. 1974. On the toxic proteins abrin and ricin. Studies of their binding to and entry into Ehrlich ascites cells. *J Biol Chem* 249:3557-3562.
189. Olsnes S, Pihl A. 1973. Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains. *Eur J Biochem* 35:179-185.
190. Fodstad O, Olsnes S, Pihl A. 1976. Toxicity, distribution and elimination of the cancerostatic lectins abrin and ricin after parenteral injection into mice. *Br J Cancer* 34:418-425.
191. Eiklid K, Olsnes S, Pihl A. 1980. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res* 126:321-326.
192. Felder E, Mossbrugger I, Lange M, Wölfel R. 2012. Simultaneous detection of ricin and abrin DNA by real-time PCR (qPCR). *Toxins (Basel)* 4:633-642.

193. Domashevskiy AV, Goss DJ. 2015. Pokeweed antiviral protein, a ribosome inactivating protein: activity, inhibition and prospects. *Toxins (Basel)* 7:274-298.
194. Stirpe F, Battelli MG. 2006. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci* 63:1850-1866.
195. Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM. 2013. Ribosome-inactivating proteins: potent poisons and molecular tools. *Virulence* 4:774-784.
196. Olsnes S, Refsnes K, Pihl A. 1974. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* 249:627-631.
197. Pappenheimer AM, Jr., Olsnes S, Harper AA. 1974. Lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. I. Immunochemical relationships between toxins and agglutinins. *J Immunol* 113:835-841.
198. Olsnes S, Heiberg R, Pihl A. 1973. Inactivation of eucaryotic ribosomes by the toxic plant proteins abrin and ricin. *Mol Biol Rep* 1:15-20.
199. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. 1987. 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. *J Biol Chem* 262:5908-5912.
200. Olsnes S, Fernandez-Puentes C, Carrasco L, Vazquez D. 1975. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains. *Eur J Biochem* 60:281-288.
201. Lin JY, Lee TC, Hu ST, Tung TC. 1981. Isolation of four isotoxic proteins and one agglutinin from jequiriti bean (*Abrus precatorius*). *Toxicon* 19:41-51.
202. de Sousa M, Roberts LM, Lord JM. 1999. Restoration of lectin activity to an inactive abrin B chain by substitution and mutation of the 2 gamma subdomain. *Eur J Biochem* 260:355-361.
203. Wei CH, Hartman FC, Pfuderer P, Yang WK. 1974. Purification and characterization of two major toxic proteins from seeds of *Abrus precatorius*. *J Biol Chem* 249:3061-3067.
204. Hung CH, Lee MC, Lee TC, Lin JY. 1993. Primary structure of three distinct isoabrins determined by cDNA sequencing. Conservation and significance. *J Mol Biol* 229:263-267.
205. Kimura M, Sumizawa T, Funatsu G. 1993. 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* 57:166-169.
206. Hegde R, Karande AA, Podder SK. 1993. The variants of the protein toxins abrin and ricin. A useful guide to understanding the processing events in the toxin transport. *Eur J Biochem* 215:411-419.
207. Hegde R, Maiti TK, Podder SK. 1991. Purification and characterization of three toxins and two agglutinins from *Abrus precatorius* seed by using lactamyl-Sepharose affinity chromatography. *Anal Biochem* 194:101-109.
208. Hegde R, Podder SK. 1992. Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin. *Eur J Biochem* 204:155-164.
209. Olsnes S, Saltvedt E, Pihl A. 1974. Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *J Biol Chem* 249:803-810.
210. Bagaria A, Surendranath K, Ramagopal UA, Ramakumar S, Karande AA. 2006. Structure-function analysis and insights into the reduced toxicity of *Abrus precatorius* agglutinin I in relation to abrin. *J Biol Chem* 281:34465-34474.
211. Liu C-L, Tsai C-C, Lin S-C, Wang L-I, Hsu C-I, Hwang M-J, Lin J-Y. 2000. Primary Structure and Function Analysis of the *Abrus precatorius* Agglutinin A Chain by Site-directed Mutagenesis: Pro199 of amphiphilic α -helix H impairs protein synthesis inhibitory activity. *Journal of Biological Chemistry* 275:1897-1901.
212. Funatsu G, Taguchi Y, Kamenosono M, Yanaka M. 1988. The Complete Amino Acid Sequence of the A-Chain of Abrin-a, a Toxic Protein from the Seeds of *Abrus precatorius*. *Agricultural and Biological Chemistry* 52:1095-1097.
213. Fredriksson SA, Artursson E, Bergstrom T, Ostin A, Nilsson C, Åstot C. 2015. Identification of RIP-II toxins by affinity enrichment, enzymatic digestion and LC-MS. *Anal Chem* 87:967-974.
214. Worbs S, Skiba M, Söderström M, Rapinoja M-L, Zeleny R, Russmann H, Schimmel H, Vanninen P, Fredriksson SA, Dorner BG. 2015. Characterization of Ricin and *R. communis* Agglutinin Reference Materials. *Toxins (Basel)* 7:4906-4934.

215. Worbs S, Köhler K, Pauly D, Avondet MA, Schaer M, Dorner MB, Dorner BG. 2011. *Ricinus communis* intoxications in human and veterinary medicine-a summary of real cases. *Toxins (Basel)* 3:1332-1372.
216. Hayden E, Wadman M. 2013. US ricin attacks are more scary than harmful. *Nat News*.
217. Godal A, Olsnes S, Pihl A. 1981. Radioimmunoassays of abrin and ricin in blood. *J Toxicol Environ Health* 8:409-417.
218. Ramage JG, Prentice KW, Morse SA, Carter AJ, Datta S, Drumgoole R, Gargis SR, Griffin-Thomas L, Hastings R, Masri HP, Reed MS, Sharma SK, Singh AK, Swaney E, Swanson T, Gauthier C, Toney D, Pohl J, Shakamuri P, Stuchlik O, Elder IA, Estacio PL, Garber EA, Hojvat S, Kellogg RB, Kovacs G, Stanker L, Weigel L, Hodge DR, Pillai SP. 2014. Comprehensive laboratory evaluation of a specific lateral flow assay for the presumptive identification of abrin in suspicious white powders and environmental samples. *Bio Secur Bioterror* 12:49-62.
219. Antoine MD, Hagan NA, Lin JS, Feldman AB, Demirev PA. 2012. Rapid detection of ribosome inactivating protein toxins by mass-spectrometry-based functional assays. *International Journal of Mass Spectrometry* 312:41-44.
220. Johnson RC, Zhou Y, Jain R, Lemire SW, Fox S, Sabourin P, Barr JR. 2009. Quantification of L-abrine in human and rat urine: a biomarker for the toxin abrin. *J Anal Toxicol* 33:77-84.
221. Owens J, Koester C. 2008. Quantitation of abrine, an indole alkaloid marker of the toxic glycoproteins abrin, by liquid chromatography/tandem mass spectrometry when spiked into various beverages. *J Agric Food Chem* 56:11139-11143.
222. Garber EA. 2008. Toxicity and detection of ricin and abrin in beverages. *J Food Prot* 71:1875-1883.
223. Garber EA, Walker JL, O'Brien TW. 2008. Detection of abrin in food using enzyme-linked immunosorbent assay and electrochemiluminescence technologies. *J Food Prot* 71:1868-1874.
224. Li XB, Yang W, Zhang Y, Zhang ZG, Kong T, Li DN, Tang JJ, Liu L, Liu GW, Wang Z. 2011. Preparation and identification of monoclonal antibody against abrin-a. *J Agric Food Chem* 59:9796-9799.
225. Xu C, Li X, Liu G, Xu C, Xia C, Wu L, Zhang H, Yang W. 2015. Development of ELISA and Colloidal Gold-PAb Conjugate-Based Immunochromatographic Assay for Detection of Abrin-a. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 34:341-345.
226. Zhou Y, Tian XL, Li YS, Pan FG, Zhang YY, Zhang JH, Wang XR, Ren HL, Lu SY, Li ZH, Liu ZS, Chen QJ, Liu JQ. 2012. Development of a monoclonal antibody-based sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of abrin in food samples. *Food Chem* 135:2661-2665.
227. Gao S, Nie C, Wang J, Wang J, Kang L, Zhou Y, Wang JL. 2012. Colloidal gold-based immunochromatographic test strip for rapid detection of abrin in food samples. *J Food Prot* 75:112-117.
228. Yang H, Deng M, Ga S, Chen S, Kang L, Wang J, Xin W, Zhang T, You Z, An Y, Wang J, Cui D. 2014. Capillary-driven surface-enhanced Raman scattering (SERS)-based microfluidic chip for abrin detection. *Nanoscale Res Lett* 9:138.
229. Hu J, Ni P, Dai H, Sun Y, Wang Y, Jiang S, Li Z. 2015. Aptamer-based colorimetric biosensing of abrin using catalytic gold nanoparticles. *Analyst* 140:3581-3586.
230. Ostin A, Bergstrom T, Fredriksson SA, Nilsson C. 2007. Solvent-assisted trypsin digestion of ricin for forensic identification by LC-ESI MS/MS. *Anal Chem* 79:6271-6278.
231. Cho H, Jaworski J. 2014. A portable and chromogenic enzyme-based sensor for detection of abrin poisoning. *Biosens Bioelectron* 54:667-673.
232. Dodge AG, Carrasquillo K, Rivera L, Xu L, Wackett LP, Sadowsky MJ. 2015. Rapid method using two microbial enzymes for detection of L-abrine in food as a marker for the toxic protein abrin. *Appl Environ Microbiol* 81:1610-1615.
233. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD. 2004. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* 2:231-240.
234. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE. 2012. Point of care diagnostics: status and future. *Anal Chem* 84:487-515.
235. Yetisen AK, Akram MS, Lowe CR. 2013. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip* 13:2210-2251.

236. Yonekita T, Ohtsuki R, Hojo E, Morishita N, Matsumoto T, Aizawa T, Morimatsu F. 2013. Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 93:251-256.
237. Vijayan T, Chiller T, Klausner JD. 2013. Sensitivity and specificity of a new cryptococcal antigen lateral flow assay in serum and cerebrospinal fluid. *MLO Med Lab Obs* 45:16, 18, 20.
238. Hartmann H, Lubbers B, Casaretto M, Bautsch W, Klos A, Kohl J. 1993. Rapid quantification of C3a and C5a using a combination of chromatographic and immunoassay procedures. *J Immunol Methods* 166:35-44.
239. Slotved HC, Tanassi JT, Sparding N, Lindqvist A, Steenhard NR, Heegaard NH. 2013. Botulinum toxin field assays evaluated using cosmetic botox preparations. *Biosecur Bioterror* 11:280-286.
240. Attrée O, Guglielmo-Viret V, Gros V, Thullier P. 2007. Development and comparison of two immunoassay formats for rapid detection of botulinum neurotoxin type A. *Journal of Immunological Methods* 325:78-87.
241. Brunt J, Webb MD, Peck MW. 2010. Rapid affinity immunochromatography column-based tests for sensitive detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins and *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* 76:4143-4150.
242. Gessler F, Hampe K, Böhnel H. 2005. Sensitive detection of botulinum neurotoxin types C and D with an immunoaffinity chromatographic column test. *Appl Environ Microbiol* 71:7897-7903.
243. Braeckmans K, De Smedt SC, Leblans M, Pauwels R, Demeester J. 2002. Encoding microcarriers: present and future technologies. *Nat Rev Drug Discov* 1:447-456.
244. Kim JS, Taitt CR, Ligler FS, Anderson GP. 2010. Multiplexed magnetic microsphere immunoassays for detection of pathogens in foods. *Sensing and instrumentation for food quality and safety* 4:73-81.
245. Meyer H. 2002. Surface Plasmon Resonance – Biosensoren in der Proteomanalyse und der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung. *BIOspektrum* 8:532-535.
246. Fee CJ. 2013. Label-Free, Real-Time Interaction and Adsorption Analysis 1: Surface Plasmon Resonance, p 287-312. *In* Gerrard AJ (ed), *Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications*, Second Edition. Humana Press, Totowa, NJ.
247. Hodnik V, Anderluh G. 2009. Toxin Detection by Surface Plasmon Resonance. *Sensors* 9:1339.
248. Naimushin AN, Soelberg SD, Nguyen DK, Dunlap L, Bartholomew D, Elkind J, Melendez J, Furlong CE. 2002. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Biosens Bioelectron* 17:573-584.
249. Zhou H, Zhou B, Ma H, Carney C, Janda KD. 2007. Selection and characterization of human monoclonal antibodies against Abrin by phage display. *Bioorg Med Chem Lett* 17:5690-5692.
250. Stern D, Pauly D, Zydek M, Müller C, Avondet MA, Worbs S, Lisdat F, Dorner MB, Dorner BG. 2015. Simultaneous differentiation and quantification of ricin and agglutinin by an antibody-sandwich surface plasmon resonance sensor. *Biosens Bioelectron* 78:111-117.
251. Elsholz B, Wörl R, Blohm L, Albers J, Feucht H, Grunwald T, Jürgen B, Schweder T, Hintsche R. 2006. Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal Chem* 78:4794-4802.
252. Albers J, Grunwald T, Nebling E, Piechotta G, Hintsche R. 2003. Electrical biochip technology - a tool for microarrays and continuous monitoring. *Anal Bioanal Chem* 377:521-527.
253. Pöhlmann C, Elßner T. 2011. Simultaneous detection of biological toxins using the portable Toxin Detector pTD. Bruker Daltonik Leipzig, Germany. Presseartikel.
254. Kraus S, Kleines M, Albers J, Blohm L, Piechotta G, Puttmann C, Barth S, Nahrung J, Nebling E. 2011. Quantitative measurement of human anti-HCV Core immunoglobulins on an electrical biochip platform. *Biosens Bioelectron* 26:1895-1901.
255. Quiel A, Jürgen B, Greinacher A, Lassen S, Wörl R, Witt S, Schweder T. 2012. Sensitive detection of idiotypic platelet-reactive alloantibodies by an electrical protein chip. *Biosens Bioelectron* 36:207-211.

256. Quiel A, Jürgen B, Piechotta G, Le Foll AP, Ziebandt AK, Kohler C, Koster D, Engelmann S, Erck C, Hintsche R, Wehland J, Hecker M, Schweder T. 2010. Electrical protein array chips for the detection of staphylococcal virulence factors. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1619-1627.
257. Nebling E, Grunwald T, Albers J, Schafer P, Hintsche R. 2004. Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays. *Anal Chem* 76:689-696.
258. Jürgen B, Barken KB, Tobisch S, Pioch D, Wümpelmann M, Hecker M, Schweder T. 2005. Application of an electric DNA-chip for the expression analysis of bioprocess-relevant marker genes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 92:299-307.
259. Liu Y, Elsholz B, Enfors SO, Gabig-Ciminska M. 2007. Confirmative electric DNA array-based test for food poisoning *Bacillus cereus*. *J Microbiol Methods* 70:55-64.
260. Liu Y, Elsholz B, Enfors SO, Gabig-Ciminska M. 2008. Critical factors for the performance of chip array-based electrical detection of DNA for analysis of pathogenic bacteria. *Anal Biochem* 382:77-86.
261. Elsholz B, Nitsche A, Achenbach J, Ellerbrok H, Blohm L, Albers J, Pauli G, Hintsche R, Wörl R. 2009. Electrical microarrays for highly sensitive detection of multiplex PCR products from biological agents. *Biosens Bioelectron* 24:1737-1743.
262. Derakshani N. Forschungsprojekt GEFREASE erfolgreich abgeschlossen. <https://www.bbk.bund.de/SharedDocs/Kurzmeldungen/BBK/DE/2015/Forschungsprojekt-GEFREASE-erfolgreich-abgeschlossen.html>. aufgerufen am 23.02.16.
263. Baudry J, Rouzeau C, Goubault C, Robic C, Cohen-Tannoudji L, Koenig A, Bertrand E, Bibette J. 2006. Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:16076-16078.
264. Niederstadt L. 2012. Herstellung von DNA induzierten mono-/polyklonalen Antikörpern, zur Schnelldetektion von hochpathogenen viralen Erregern und bioterroristisch relevanten Toxinen. Doktorarbeit. Freie Universität Berlin.
265. Wolf J. 2011. Generierung und Charakterisierung monoklonaler und polyklonaler Antikörper gegen veterinärmedizinisch relevante Botulinum Neurotoxine. Diplomarbeit. Freie Universität Berlin.
266. Finkenwirth F. 2012. Herstellung monoklonaler Antikörper zur Detektion und Differenzierung von Botulinum-Neurotoxin-Serotypen C und D in immunologischen Nachweissystemen. Masterarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin.
267. Moura H, Terilli RR, Woolfitt AR, Gallegos-Candela M, McWilliams LG, Solano MI, Pirkle JL, Barr JR. 2011. Studies on botulinum neurotoxins type /C1 and mosaic/DC using Endopep-MS and proteomics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 61:288-300.
268. Kalb SR, Moura H, Boyer AE, McWilliams LG, Pirkle JL, Barr JR. 2006. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal Biochem* 351:84-92.
269. Phillips H, Terryberry J. 1957. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Experimental cell research* 13:341-347.
270. Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
271. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227:680-685.
272. Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *electrophoresis* 8:93-99.
273. Myszka DG. 1999. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12:279-284.
274. Johne B. 1998. Epitope mapping by surface plasmon resonance in the BIAcore. *Molecular biotechnology* 9:65-71.
275. Currie LA. 1968. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. *Analytical Chemistry* 40:586-593.
276. Armbruster DA, Pry T. 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 29 Suppl 1:S49-52.
277. Grubbs FE. 1969. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11:1.

278. Grubbs FE. 1950. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. *The Annals of Mathematical Statistics* 21:27-58.
279. Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Scholl I. 2010. The ABC of clinical and experimental adjuvants - a brief overview. *Immunol Lett* 128:29-35.
280. Murphy KM, Janeway C. 2014. *Janeway Immunologie*. Janeway's immunobiology dt, 7., Aufl., korrigierter Nachdr. ed. Springer Spektrum, Berlin [u.a.].
281. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. 2014. *Der Experimentator: Immunologie*. Springer-Verlag.
282. Roskos L, Klakamp S, Liang M, Arends R, Green L. 2008. Molecular Engineering II: Antibody Affinity, p 145-169, *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
283. Habermann E, Dreyer F, Bigalke H. 1980. Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission in vitro like botulinum A toxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 311:33-40.
284. Göschel H, Wohlfarth K, Frevert J, Dengler R, Bigalke H. 1997. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies - therapeutic consequences. *Exp Neurol* 147:96-102.
285. Vang O, Larsen K, Bog-Hansen T. 1986. A new quantitative and highly specific assay for lectin binding activity. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* Berlin: Walter de Gruyter & co:637-644.
286. Motoyama K, Nakashima Y, Aramaki Y, Hirayama F, Uekama K, Arima H. 2011. In Vitro Gene Delivery Mediated by Asialofetuin-Appended Cationic Liposomes Associated with γ -Cyclodextrin into Hepatocytes. *Journal of Drug Delivery* 2011:476137.
287. Woudstra C, Skarin H, Anniballi F, Auricchio B, De Medici D, Bano L, Drigo I, Hansen T, Lofstrom C, Hamidjaja R, van Rotterdam BJ, Koene M, Bayon-Auboyer MH, Buffereau JP, Fach P. 2013. Validation of a real-time PCR based method for detection of *Clostridium botulinum* types C, D and their mosaic variants C-D and D-C in a multicenter collaborative trial. *Anaerobe* 22:31-37.
288. Björnstad K, Tevell Aberg A, Kalb SR, Wang D, Barr JR, Bondesson U, Hedeland M. 2014. Validation of the Endopep-MS method for qualitative detection of active botulinum neurotoxins in human and chicken serum. *Anal Bioanal Chem* 406:7149-7161.
289. Skarin H, Hafstrom T, Westerberg J, Segerman B. 2011. *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC Genomics* 12:185.
290. Fuller SA, Takahashi M, Hurrell JGR. 2001. *Immunization of Mice*, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
291. Stills HF, Jr. 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Ilar j* 46:280-293.
292. Curran RM, Fringuelli E, Graham D, Elliott CT. 2009. Production of serotype C specific and serotype C/D generic monoclonal antibodies using recombinant H(C) and H(N) fragments from *Clostridium botulinum* neurotoxin types C(1) and D. *Vet Immunol Immunopathol* 130:1-10.
293. Gao YL, Gao S, Kang L, Nie C, Wang JL. 2010. Expression of Hc fragment from *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype B in *Escherichia coli* and its use as a good immunogen. *Hum Vaccin* 6:462-466.
294. Ehrlich P. 1897. *Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen*. G. Fischer, Jena.
295. Streitwieser A, Heathcock CH, Kosower EM, Corfield PJ. 1992. *Introduction to organic chemistry*. Macmillan New York.
296. Chen C, Wang S, Wang H, Mao X, Zhang T, Ji G, Shi X, Xia T, Lu W, Zhang D, Dai J, Guo Y. 2012. Potent neutralization of botulinum neurotoxin/B by synergistic action of antibodies recognizing protein and ganglioside receptor binding domain. *PLoS One* 7:e43845.
297. Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, Tarnovitski Freund N, Weiss Y. 2007. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs* 21:145-156.

298. Landry JP, Ke Y, Yu G-L, Zhu XD. 2015. Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *Journal of Immunological Methods* 417:86-96.
299. Stanker LH, Merrill P, Scotcher MC, Cheng LW. 2008. Development and partial characterization of high-affinity monoclonal antibodies for botulinum toxin type A and their use in analysis of milk by sandwich ELISA. *Journal of Immunological Methods* 336:1-8.
300. Kalb SR, Lou J, Garcia-Rodriguez C, Geren IN, Smith TJ, Moura H, Marks JD, Smith LA, Pirkle JL, Barr JR. 2009. Extraction and Inhibition of Enzymatic Activity of Botulinum Neurotoxins/A1, /A2, and /A3 by a Panel of Monoclonal Anti-BoNT/A Antibodies. *PLoS ONE* 4:e5355.
301. Fan Y, Barash JR, Lou J, Conrad F, Marks JD, Arnon SS. 2016. Immunological Characterization and Neutralizing Ability of Monoclonal Antibodies Directed Against Botulinum Neurotoxin Type H. *J Infect Dis* 213:1606-1614.
302. Nowakowski A, Wang C, Powers DB, Amersdorfer P, Smith TJ, Montgomery VA, Sheridan R, Blake R, Smith LA, Marks JD. 2002. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11346-11350.
303. Volland H, Lamourette P, Nevers M-C, Mazuet C, Ezan E, Neuburger L-M, Popoff M, Créminon C. 2008. A sensitive sandwich enzyme immunoassay for free or complexed *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Journal of Immunological Methods* 330:120-129.
304. Goldman ER, Anderson GP, Zabetakis D, Walper S, Liu JL, Bernstein R, Calm A, Carney JP, O'Brien TW, Walker JL, Garber EA. 2011. Llama-derived single domain antibodies specific for *Abrus* agglutinin. *Toxins (Basel)* 3:1405-1419.
305. Rocke TE, Smith SR, Nashold SW. 1998. Preliminary evaluation of a simple in vitro test for the diagnosis of type C botulism in wild birds. *J Wildl Dis* 34:744-751.
306. Thomas RJ. 1991. Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. *Aust Vet J* 68:111-113.
307. Brooks CE, Clarke HJ, Graham DA, Ball HJ. 2011. Diagnosis of botulism types C and D in cattle by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Vet Rec* 168:455.
308. Sajid M, Kawde A-N, Daud M. 2015. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* 19:689-705.
309. Slotved HC, Sparding N, Tanassi JT, Steenhard NR, Heegaard NH. 2014. Evaluating 6 ricin field detection assays. *Biosecur Bioterror* 12:186-189.
310. Huelseweh B, Ehrlich R, Marschall HJ. 2006. A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents. *Proteomics* 6:2972-2981.
311. Otten W, Gilligan CA, Thornton CR. 1997. Quantification of Fungal Antigens in Soil with a Monoclonal Antibody-Based ELISA: Analysis and Reduction of Soil-Specific Bias. *Phytopathology* 87:730-736.
312. Jung CC, Saaski EW, McCrae D, Lingerfelt BM, Anderson GP. 2003. RAPTOR: a fluoroimmunoassay-based fiber optic sensor for detection of biological threats. *Sensors Journal, IEEE* 3:352-360.
313. Mirski T, Bartoszcze M, Bielawska-Drozd A, Cieřlik P, Michalski AJ, Niemcewicz M, Kocik J, Chomiczewski K. 2014. Review of methods used for identification of biothreat agents in environmental protection and human health aspects. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM* 21:224-234.

8 Publikationen

Woudstra C, Le Marechal C, Souillard R, Bayon-Auboyer MH, Anniballi F, Auricchio B, De Medici D, Bano L, Koene M, Sansonetti M-H, Desoutter D, **Hansbauer E-M**, Dorner MB, Dorner BG, Fach P. 2015. Molecular gene profiling of *Clostridium botulinum* group III and its detection in naturally contaminated samples originating from various European countries. *Appl Environ Microbiol* 81:2495-2505

Hansbauer E-M, Skiba M, Endermann T, Weisemann J, Stern D, Dorner MB, Finkenwirth F, Wolf J, Luginbühl W, Messelhäuser U, Bellanger L, Woudstra C, Rummel A, Fach P, Dorner BG. 2016. Detection, differentiation, and identification of botulinum neurotoxin serotypes C, CD, D, and DC by highly specific immunoassays and mass spectrometry. *Analyst*, doi: 10.1039/c6an00693k.

Endermann T, **Hansbauer E-M**, Skiba M, Pöhlmann C, Dorner MB, Elßner T, Dorner BG. 2016. Portable electrochemical biosensor for rapid and sensitive multiplex detection of biological toxins from complex matrices (in Vorbereitung)

9 Anhang

9.1 Immunisierungen

9.1.1 SEA Immunisierung

Mausstamm: NMRI

Antigen: rekombinantes SEA (rSEA)

Getestete Hybridoma-Überstände: 2500

Isolierte Antikörper: SEA165 und SEA388

KFA: Komplettes Freund's Adjuvans, IFA: inkomplettes Freund's Adjuvans

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	25 µg rSEA	KFA
2	35	50 µg rSEA	IFA
3	63	50 µg rSEA	IFA
4	72	50 µg rSEA	-
5	73	50 µg rSEA	-
	74	FUSION	

Mausstamm: NMRI

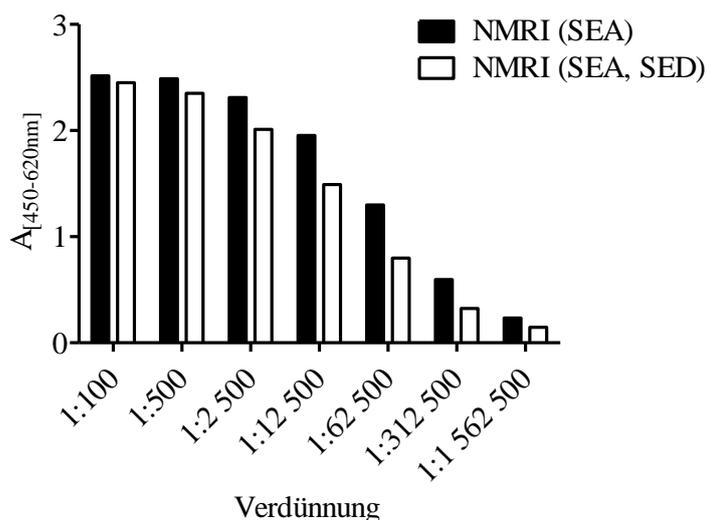
Antigen: rekombinantes SEA (rSEA) und SED

Getestete Hybridoma-Überstände: 2400

Isolierte Antikörper: SEA2353, SED928, SED1280

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	25 µg rSEA	KFA
2	35	50 µg rSEA	IFA
3	63	50 µg rSEA	IFA
4	101	20 µg SED	IFA
5	115	20 µg SED	IFA
6	133	je 12,5 µg rSEA und SED	-
7	134	je 12,5 µg rSEA und SED	-
8	135	je 12,5 µg rSEA und SED	-
	136	FUSION	

Titer test SEA Mäuse



SEA (gereinigt, Toxin Technologies) wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde das Serum der NMRI-Mäuse in den angegebenen Verdünnungen in Blockpuffer inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

9.1.2 BoNT/A und /E Immunisierung

Mausstamm: BALB/c

Antigen: H_C/A1, H_C/B1, H_C/E1 und H_C/F1

Getestete Hybridoma-Überstände: 2500

Isolierte Antikörper: B488, E1346 und F1726

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	je 20 µg H _C /B1 und H _C /F1	KFA
2	35	je 20 µg H _C /A1 und H _C /E1	IFA
3	67	je 20 µg H _C /A1 und H _C /B1	IFA
4	104	je 20 µg H _C /E1 und H _C /F1	IFA
5	145	je 10 µg H _C /A1, H _C /B1, H _C /E1 und H _C /F1	IFA
6	180	je 10 µg H _C /A1, H _C /B1, H _C /E1 und H _C /F1	IFA
7	228	je 10 µg H _C /A1, H _C /B1, H _C /E1 und H _C /F1	IFA
8	264	je 1 µg H _C /A1, H _C /B1, H _C /E1 und H _C /F1	-
	266	FUSION	

Mausstamm: NMRI

Antigen: H_C/A1, H_C/B1, H_C/E1 und H_C/F1

Getestete Hybridoma-Überstände: 1650

Isolierte Antikörper: A185, A778, A1103, A1121, A2807, F757

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	25 µg H _C /A1	KFA
2	34	25 µg H _C /E1	IFA
3	66	25 µg H _C /B1	IFA
4	96	25 µg H _C /F1	IFA
5	125	25 µg H _C /B1	IFA
6	153	25 µg H _C /A1	IFA
7	313	je 1 µg H _C /A1, H _C /B1, H _C /E1 und H _C /F1	-
	315	FUSION	

Titertest siehe *Abb. 18*

BoNT/E Immunisierung Tier 1

Mausstamm: NMRI

Antigen: H_C/E1 und scBoNT/E

Getestete Hybridoma-Überstände: 800

Isolierte Antikörper: E3128, E3194, E3226, E1447

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	25 µg H _C /E1	KFA
2	121	25 µg H _C /E1	IFA
3	169	25 µg H _C /E1 und 1 µg scBoNT/E	IFA
4	204	25 µg H _C /E1	-
5	205	25 µg H _C /E1	-
6	206	25 µg H _C /E1	-
	207	FUSION	

BoNT/E Immunisierung Tier 2

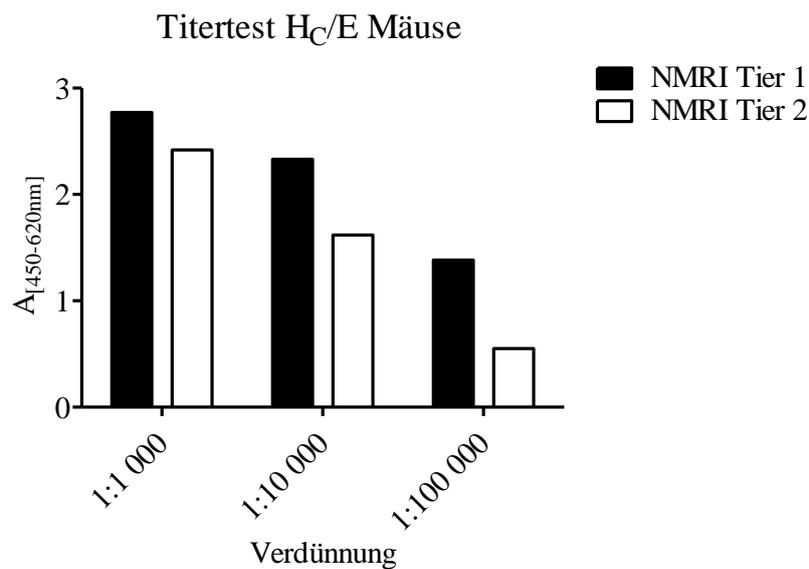
Mausstamm: NMRI

Antigen: H_C/E1 und scBoNT/E

Getestete Hybridoma-Überstände: 2800

Isolierte Antikörper: keine

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	25 µg H _C /E1	KFA
2	92	20 µg H _C /E1	IFA
3	128	25 µg H _C /E1	IFA
4	176	25 µg H _C /E1 und 1 µg scBoNT/E1	IFA
5	211	25 µg H _C /E1	-
6	212	25 µg H _C /E1	-
7	213	25 µg H _C /E1	-
	214	FUSION	



BoNT/E3 (Metabionics) wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen wurde das Serum der beiden NMRI-Mäuse in den angegebenen Verdünnungen in Blockpuffer inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

9.1.3 H_C/C Immunisierung

Mausstamm: BALB/c

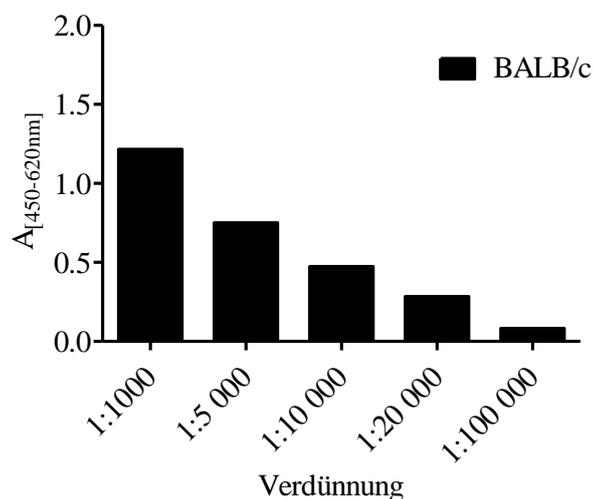
Antigen: H_C/C

Getestete Hybridoma-Überstände: 4400

Isolierte Antikörper: HcC141, HcC515, HcC1304 und HcC2378

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvants</i>
1	0	50 µg H _C /C	KFA
2	23	50 µg H _C /C	IFA
3	44	50 µg H _C /C	IFA
4	437	50 µg H _C /C	IFA
5	487	50 µg H _C /C	IFA
6	512	50 µg H _C /C	IFA
7	519	50 µg H _C /C	-
8	520	50 µg H _C /C	-
9	521	50 µg H _C /C	-
	522	FUSION	

Titertest H_C/C Maus



BoNT/C (Metabionics) wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde das Serum der BALB/c-Maus in den angegebenen Verdünnungen in Blockpuffer inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

9.1.4 Abrin Immunisierungen

Mausstamm: NMRI

Antigen: Abrin Rohextrakt Toxoid

Getestete Hybridoma-Überstände: 900

Isolierte Antikörper: AP10, AP54, AP60 und AP69

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	KFA
2	66	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	IFA
3	114	5 µg Abrin Rohextrakt	IFA
4	169	10 µg Abrin Rohextrakt	IFA
5	323	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	-
6	324	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	-
7	325	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	-
	326	FUSION	

Mausstamm: BALB/c

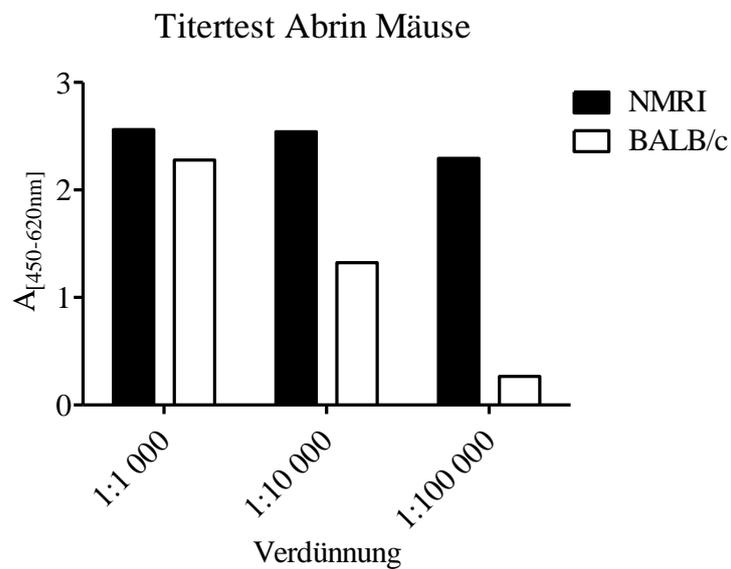
Antigen: Abrin Rohextrakt Toxoid und natives Abrin-a

Getestete Hybridoma-Überstände: 900

Isolierte Antikörper: AP2573, AP3202, AP3659 und AP3808

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	KFA
2	27	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	IFA
3	125	5 µg Abrin Rohextrakt	IFA
4	173	5 µg Abrin Rohextrakt	IFA
5	285	10 µg Abrin Rohextrakt	IFA
6	419	25 µg Abrin Rohextrakt Toxoid und 1 µg natives Abrin-a	IFA
7	453	25 µg Abrin Rohextrakt Toxoid und 1 µg natives Abrin-a	IFA
8	487	25 µg Abrin Rohextrakt Toxoid und 1 µg natives Abrin-a	IFA
9	537	11 µg Abrin Rohextrakt Toxoid und 2 µg natives Abrin-a	IFA
10	573	25 µg Abrin Rohextrakt Toxoid und 1 µg natives Abrin-a	IFA

11	599	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	-
12	600	25 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	-
13	601	50 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	-
	602	FUSION	



Abrin (Rohextrakt) wurde in einer Konzentration von 500 ng/ml auf einer Mikrotiterplatte in PBS mit 1 µg/ml BSA immobilisiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen wurde das Serum der BALB/c- und der NMRI-Maus in den angegebenen Verdünnungen in Blockpuffer inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen POD-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper und TMB.

9.1.5 Weitere durchgeführte Fusionen

Mausstamm: NMRI

Antigen: Abrin Rohextrakt gekoppelt an Beads

Getestete Hybridoma-Überstände: 2500

Isolierte Antikörper: keine

<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	10 µg Abrin Rohextrakt an Beads	KFA
2	34	10 µg Abrin Rohextrakt an Beads	IFA
3	68	10 µg Abrin Rohextrakt an Beads	IFA
4	118	10 µg Abrin Rohextrakt an Beads	IFA
5	159	25 µg Abrin Rohextrakt Toxoid	IFA
6	180	10 µg Abrin Rohextrakt an Beads	-
7	181	5 µg Abrin Rohextrakt an Beads	-
8	182	10 µg Abrin Rohextrakt an Beads	-
	183	FUSION	

Mausstamm: BALB/c

Antigen: H_C/E1

Getestete Hybridoma-Überstände: 3400

Isolierte Antikörper: keine

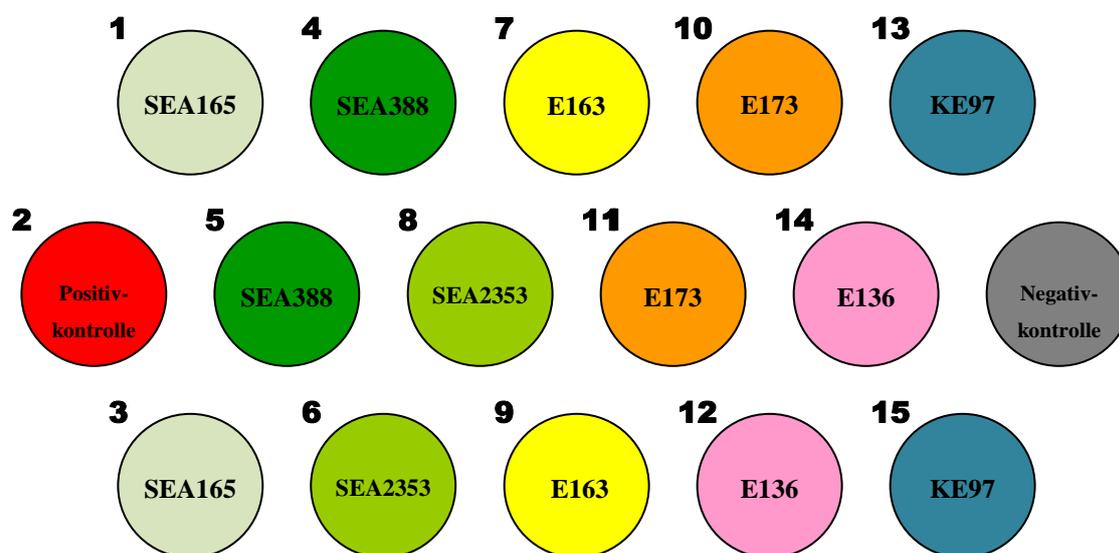
<i>Immunisierung</i>	<i>Tag</i>	<i>Antigen</i>	<i>Adjuvans</i>
1	0	35 µg H _C /E1	KFA
2	26	25 µg H _C /E1	IFA
3	54	20 µg H _C /E1	IFA
4	61	25 µg H _C /E1	-
5	62	25 µg H _C /E1	-
	63	FUSION	

9.2 Chiplayout für die pTD Plattform

Alle Antikörper wurden mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml (bei zwei Ak je 0,25 mg/ml) gespottet. Als Positivkontrolle wurde ein biotinylierter Kaninchen-Antikörper von Analytik Jena zur Verfügung gestellt. Die Negativkontrolle bei allen Chips war Maus Immunglobulin. Alle biotinylierten Detektionsantikörper wurden einzeln eingesetzt, soweit nicht anders angegeben.

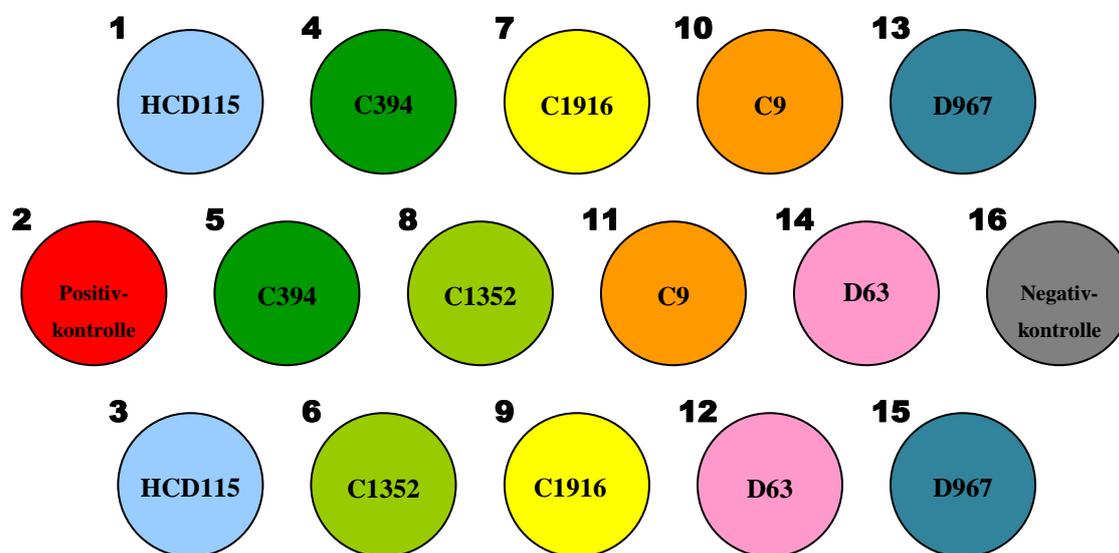
9.2.1 Layout zur Detektion von SEA und BoNT/E (Biochip 1)

Anzahl Chips: 80
 Verwendete Bio-Antikörper: SEA165-bio, SEA388-bio, Mischung aus SEA388-bio/
 SEA2353-bio, E136-bio, E163-bio, E173-bio, KE97-bio
 Zweck: Untersuchung von BoNT/E und SEA



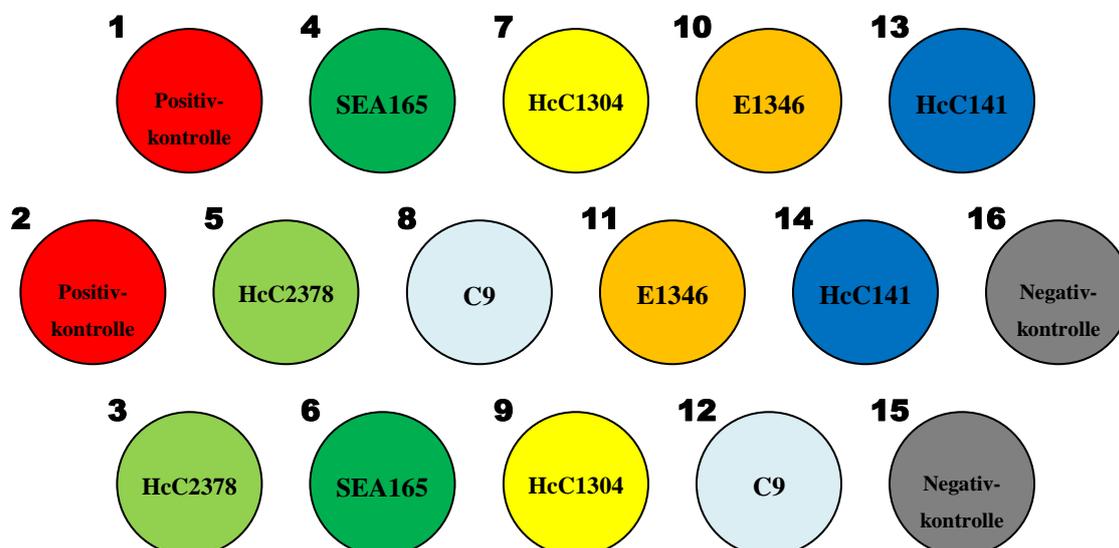
9.2.2 Layout zur Detektion von BoNT/C und /D (Biochip 2)

Anzahl Chips: 80
 Verwendete Bio-Antikörper: C9-bio, C1352-bio, C394-bio, D63-bio, D967-bio
 Zweck: Untersuchung von BoNT/C und /D



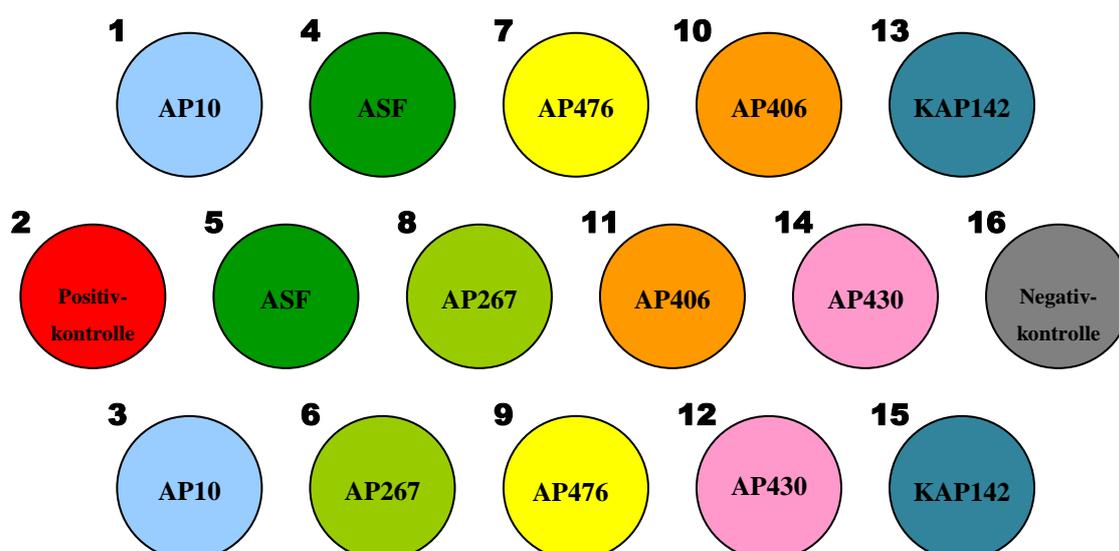
9.2.3 Layout zur Detektion von H_C/C (Biochip 3)

Anzahl Chips: 260 (zwei Lieferungen)
 Verwendete Bio-Antikörper: C9-bio, HcC141-bio, HcC1304-bio, HcC2378-bio, E136-bio, KE97-bio
 Zweck: Untersuchung von H_C/C, ergänzende Versuche zu BoNT/E



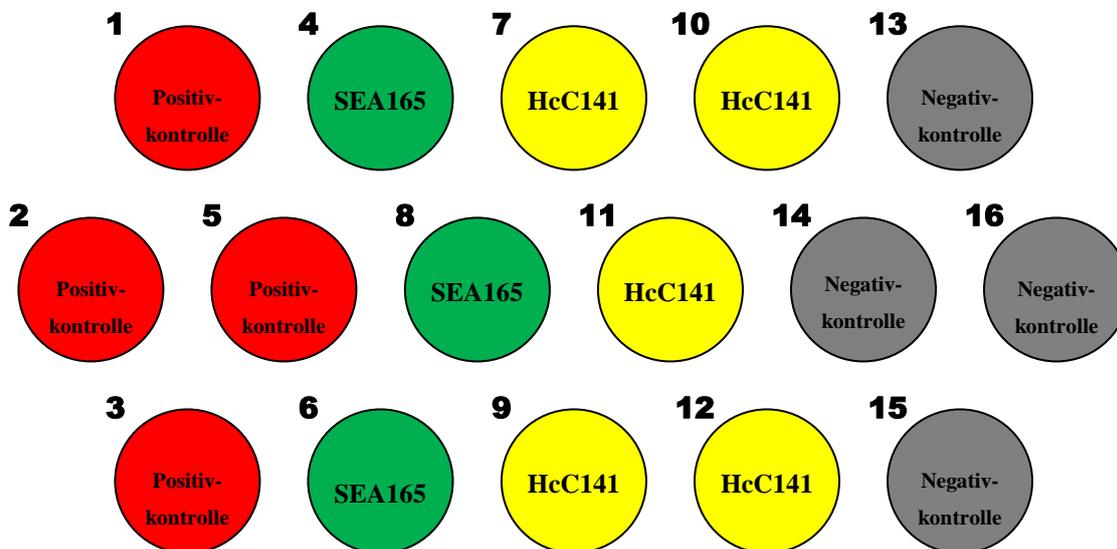
9.2.4 Layout zur Detektion von Abrin (Biochip 4)

Anzahl Chips: 80
 Verwendete Bio-Antikörper: AP430-bio, KAP142-bio, AP476-bio, AP406-bio, AP267-bio, AP3202-bio
 Zweck: Untersuchung von Abrin Rohextrakt und Abrin-a
 ASF: 0,5 mg/ml Asialofetuin



9.2.5 Layout für Anwenderübung (Biochip 5)

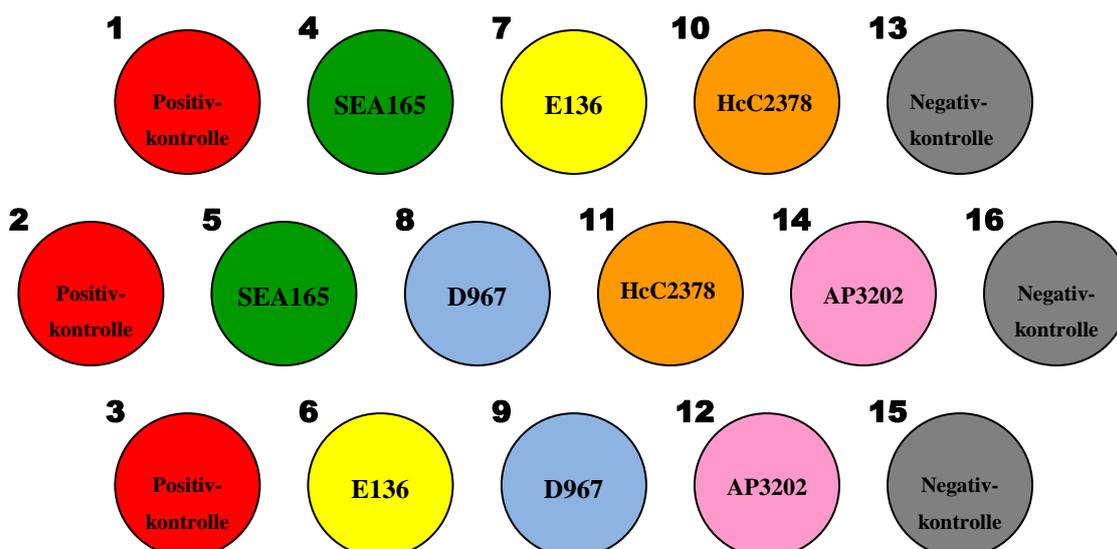
Anzahl Chips: 160
 Verwendete Bio-Antikörper: HcC1304-bio
 Zweck: Nachweis von Hc/C



9.2.6 Layouts zur Antikörperfindung für Multiplex-Chip (Biochip 6 und 7)

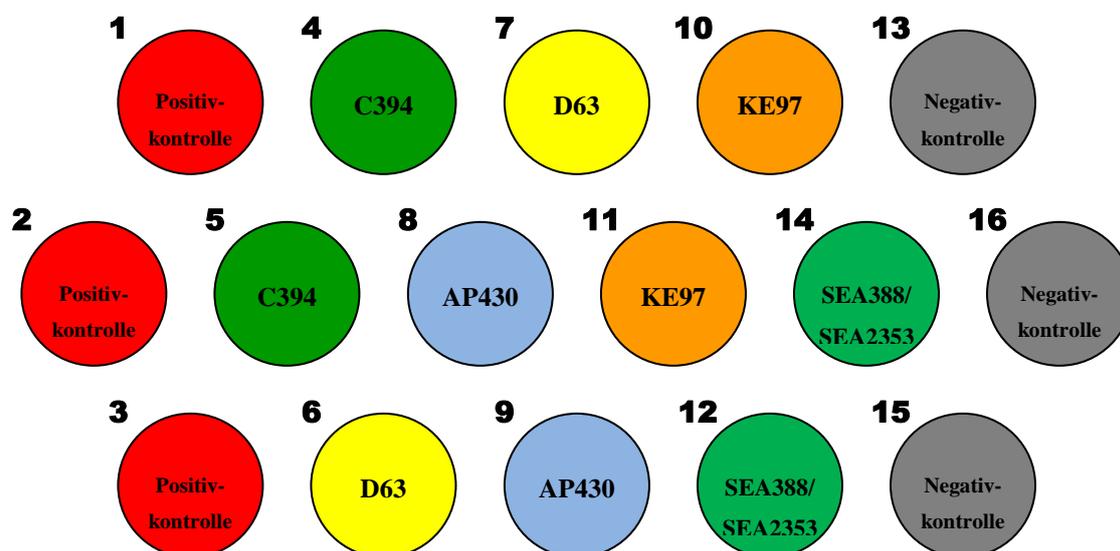
Biochip 6

Anzahl Chips: 80
 Verwendete Bio-Antikörper: C394-bio, D63-bio, KE97-bio, SEA388/SEA2353-bio, AP430-bio
 Zweck: Nachweis von SEA, Abrin-a, BoNT/C, /D und /E



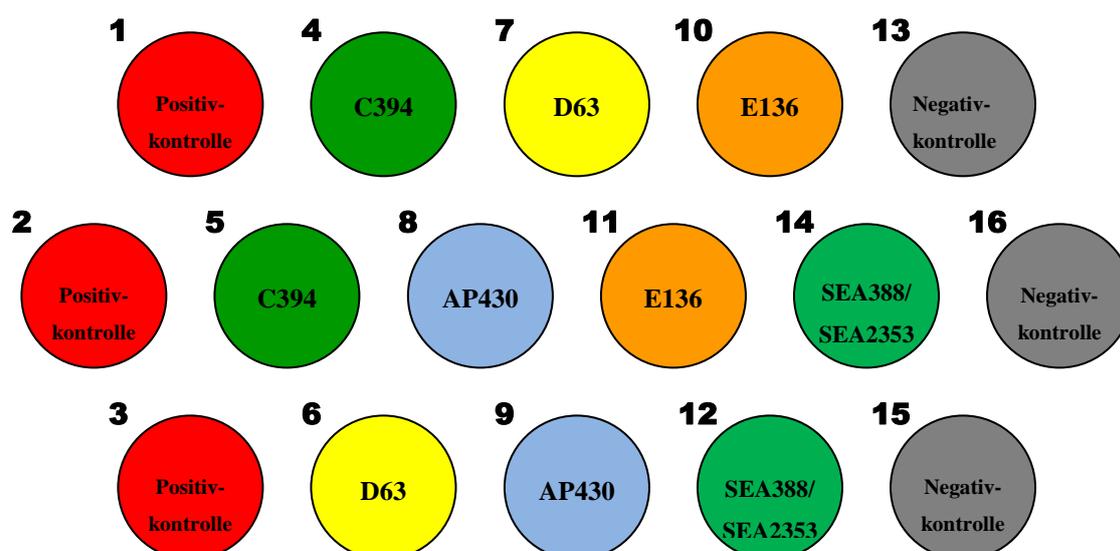
Biochip 7

Anzahl Chips: 80
 Verwendete Bio-Antikörper: HcC2378-bio, D967-bio, E136-bio, SEA165-bio, AP3202-bio, Mischung aus HcC2378-bio und C9-bio
 Zweck: Nachweis von SEA, Abrin-a, BoNT/C, /D und /E



9.2.7 Layout finaler Chip (Biochip 8)

Anzahl Chips: 500
 Verwendete Bio-Antikörper: Mischung aus HcC2378-bio, C9-bio, D967-bio, KE97-bio, SEA165-bio, AP3202-bio
 Zweck: Nachweis von SEA, Abrin-a, BoNT/C, /D und /E

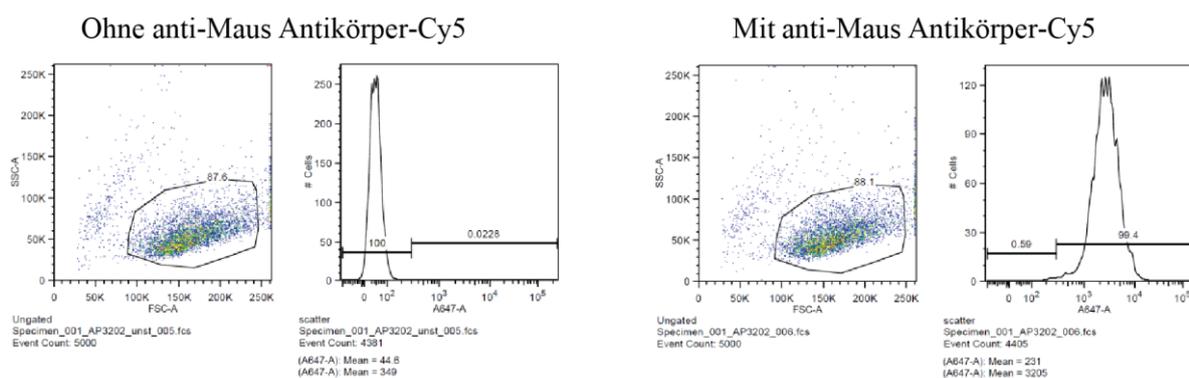


9.3 Überblick: Anti-BoNT/B und -BoNT/F Antikörper

Name	Spezifität	Isotyp	Indirekter	Sandwich	Western	Affinität
			ELISA	ELISA	Blot	K_D [nM]
B488	BoNT/B	IgG2a	+	+++	n. d.	9
F757	BoNT/F >> BoNT/A	IgG2b	++	++	-	3
F1726	BoNT/F	IgG1	++	+++	+	0,07

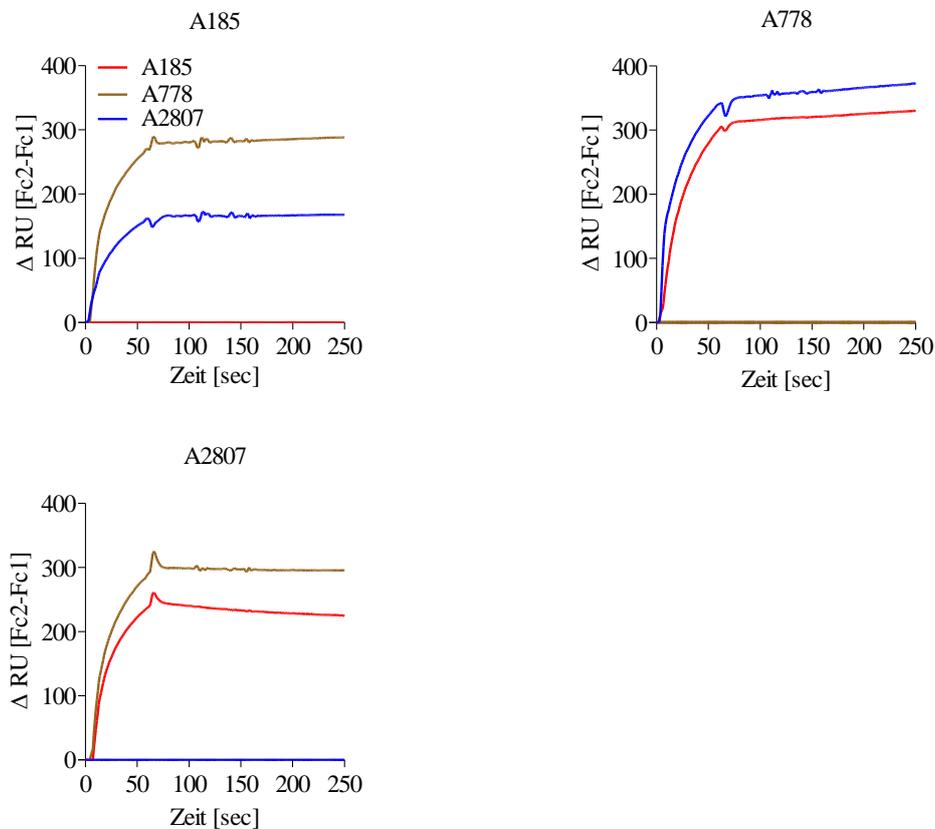
Die drei Antikörper gegen BoNT/B und /F wurden mittels indirektem und Sandwich ELISA sowie mittels Western Blot untersucht. +++ bedeutet sehr gute Reaktivität, ++ gute, + schlechte, - keine Reaktivität. Der Isotyp wurde mittels Isotyping Kits und die Affinität mittels SPR analysiert; n. d. nicht durchgeführt.

9.4 Nachweis der Klonalität mittels Durchflusszytometrie



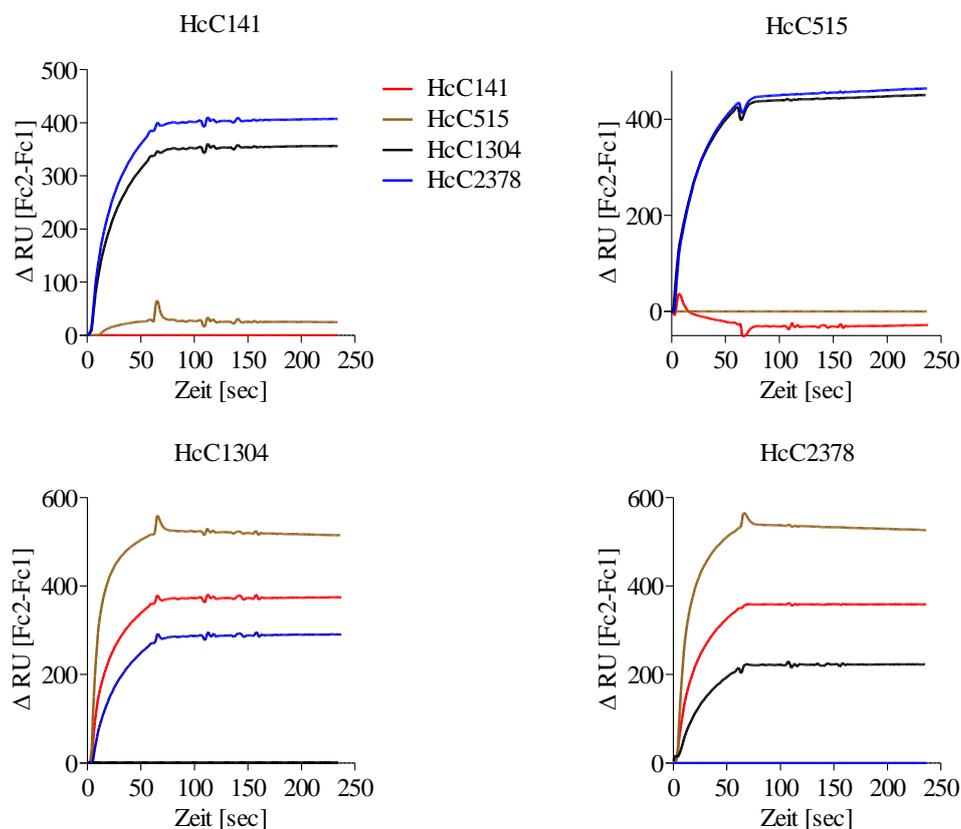
Um Hybridomazellen zu untersuchen, ob sie eine einheitliche klonale Population darstellen, wurde eine intrazelluläre Färbung der Antikörper durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe auch 2.2.3.7). Die Hybridomaklone wurden Formalin-fixiert, mit Saponin-Puffer permeabilisiert und intrazelluläre Ak wurden mit Cy5-markiertem anti-Maus IgG-spezifischem Antikörper angefärbt (rechts). Die linke Messung diente als Kontrolle ohne Färbung. Die Auswertung erfolgte an einem LSRII Durchflusszytometer. Anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurden fixierte Zellen ausgewählt (87,6 bzw. 88,1 % aller Zellen in der Beispielabbildung, jeweils links). Diese wurden anschließend auf Fluoreszenz analysiert: Bei der Kontrolle sind 0,022 % positiv, bei den gefärbten 99,4 %. Das Ergebnis wies auf eine einheitliche, klonale Population hin.

9.5 Untersuchung der Epitopfamilien der anti-H_C/A Antikörper



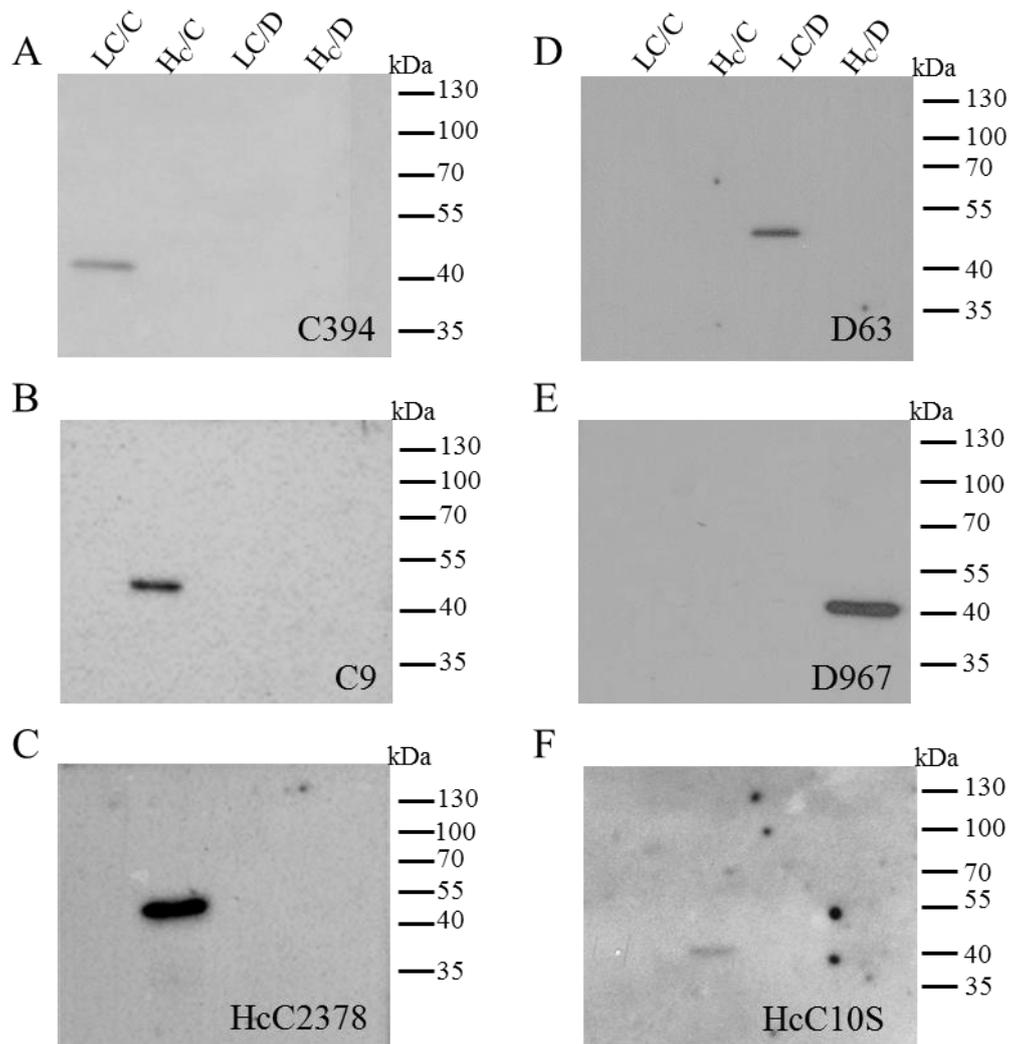
Für das Bestimmen der Epitopfamilien mittels SPR wurde der zu analysierende erste Antikörper über einen CM5 Chip mit Maus-Capture-Kit immobilisiert (oben links: A185; oben rechts: A778; unten links: A2807). Nach dem Blocken freier Bindungsstellen mit Maus IgG wurde H_CA1 injiziert. Anschließend wurde der zweite Antikörper (Zeitpunkt 0 sec; A185, rot; A778, braun; A2807, blau) zugegeben. Die Kurven wurden jeweils auf eine Doppelinjektion des gleichen Antikörpers referenziert (gleicher Antikörper als erster und zweiter Antikörper). Bei unterschiedlichen Epitopen wurde ein deutlicher Signalzuwachs gemessen, bei einer sterischen Hinderung nicht [274].

9.6 Untersuchung der Epitopfamilien der anti-H_C/C Antikörper



Für das Bestimmen der Epitopfamilien mittels SPR wurde der zu analysierende erste Antikörper über einen CM5 Chip mit Maus-Capture-Kit immobilisiert (oben links: HcC141; oben rechts: HcC515; unten links: HcC1304; unten rechts: HcC2378). Nach dem Blocken freier Bindungsstellen mit Maus IgG wurde H_C/C injiziert. Anschließend wurde der zweite Antikörper (Zeitpunkt 0 sec; HcC141, rot; HcC515, braun; HcC1304, schwarz; HcC2378, blau) zugegeben. Die Kurven wurden jeweils auf eine Doppelinjektion des gleichen Antikörpers referenziert (gleicher Antikörper als erster und zweiter Antikörper). Bei unterschiedlichen Epitopen wurde ein deutlicher Signalzuwachs gemessen, bei einer sterischen Hinderung (HcC141 und HcC515) nicht [274].

9.7 Western Blot: Spezifität der anti-BoNT/C und /D Antikörper



Je 67 ng der rekombinanten Toxinfragmente LC/C, H_c/C, LC/D und H_c/D wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Blocken wurde jeweils 1 µg/ml C394 (A), C9 (B), HcC2378 (C), D63 (D), D967 (E) und HcC10S (F) zugegeben. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörpers, Avidix-Alkalische Phosphatase und CDP-Star. Als Marker M wurde PageRuler prestained benutzt. Entwicklungsdauer: 2 bis 35 min.