

**Herstellung monoklonaler Antikörper gegen thermostabile
Antigene von *Bacillus anthracis* zur Anwendung in der
Anthraxdiagnostik**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**



Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik

vorgelegt von
Karen Anja Hilss

aus Nürtingen

2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Breer
1. berichtende Person: PD Dr. med. vet. habil. W. Beyer
2. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. H. Schmidt
Eingereicht am: 14. 12. 2012
Mündliche Prüfung am: 19. 03. 2013

Die vorliegende Arbeit wurde am 8. 02. 2013 von der Fakultät Naturwissenschaften an der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	V
Summary	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Bacillus anthracis</i>	1
1.2 <i>B. anthracis</i> spezifische Antigene	2
1.2.1 <i>B. anthracis</i> Toxine	2
1.2.2 <i>B. anthracis</i> vegetative Antigene	3
1.2.3 <i>B. anthracis</i> Sporenantigene	3
1.3 Diagnostik von <i>B. anthracis</i>	4
1.3.1 Koloniemorphologie von <i>B. anthracis</i>	5
1.3.2 Kulturelle Nachweismethoden für <i>B. anthracis</i>	5
1.3.3 Molekularbiologischer Nachweis von <i>B. anthracis</i>	5
1.3.4 Immunologischer Nachweis von <i>B. anthracis</i>	6
1.3.4.1 Ascoli Präzipitin Test.....	6
1.3.4.2 Anthraxin Hauttest	7
1.3.4.3 Immunoassays zum Nachweis von Antigenen	7
1.3.4.4 Immunoassays zum Nachweis von Antikörpern	8
1.4 Herstellung monoklonaler Antikörper	9
1.4.1 Hybridomtechnik	9
1.4.2 Herstellung rekombinanter Antikörper	10
1.4.3 <i>In vitro</i> Selektion von Antikörperfragmenten durch Phagen-Display	11
1.4.4 Antikörper gegen <i>B. anthracis</i>	12
1.4.4.1 Monoklonale Antikörper gegen <i>B. anthracis</i>	12
1.4.4.2 Rekombinante Antikörper gegen <i>B. anthracis</i>	13
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Verwendete <i>Bacillus</i> ssp. Isolate.....	16
2.1.2 Zelllinien.....	16
2.1.3 Tiere und Tierhaltung	16
2.2 Herstellung der thermostabilen Antigenpräparationen	16
2.2.1 Ascoli Antigen Präparation (Isolat 4)	17
2.2.2 Anthraxin Präparation (Isolat 5).....	17

2.2.3	Vegetative thermostabile Antigenpräparationen der <i>Bacillus</i> ssp. (nicht-anthraxis) Isolate B197 und B334 (Isolate 7 und 8)	17
2.2.4	Vegetative thermostabile <i>B. anthracis</i> Antigenpräparation (Stamm A30, Isolat 3)	18
2.2.5	Thermostabile Sporenpräparationen (<i>B. anthracis</i> Stamm A93 bzw. A2 und <i>B. cereus</i> B10, Isolate 1 bzw. 2 und 6)	18
2.2.6	Gewinnung von Sporen für die Herstellung thermostabiler Sporenpräparationen	18
2.2.7	Analyse der thermostabilen Antigenpräparation	18
2.3	Allgemeine Proteintechniken	19
2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	19
2.3.2	Ammoniumsulfatfällung von Proteinen	19
2.3.3	Dialyse von Proteinlösungen.....	20
2.3.4	Aufkonzentrierung von Proteinen durch den Einsatz von Centricons®	20
2.4	Immunisierung der Kaninchen	20
2.5	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.6	Silberfärbung von Acrylamidgelen	23
2.7	Western Blot und Immundetektion	24
2.8	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	25
2.8.1	ELISA- Protokoll.....	25
2.8.2	Bestimmung des Antikörpertiters im ELISA.....	26
2.8.3	Bestimmung der Immunglobulinklasse	26
2.8.4	Screening der Hybridome im ELISA.....	26
2.8.5	Ermittlung der Spezifität der monoklonalen Antikörper	28
2.9	Anionenaustauschchromatographie (AEX) mittels FPLC	28
2.10	Affinitätschromatographie mittels FPLC.....	29
2.11	Herstellung monoklonaler Antikörper	30
2.11.1	Immunisierung der Mäuse.....	30
2.11.2	Herstellung muriner Knochenmark-Makrophagen als Feederzellen für Hybridome	32
2.11.3	Herstellung des konditionierten Kulturüberstand der L 929 Fibroblastenlinie („L-Zell-Überstand“)......	33
2.11.4	Herstellung und Kultivierung von Hybridomen.....	33
2.11.5	Fusion der B-Lymphozyten mit Myelomzellen zur Gewinnung von Hybridomen.....	34
2.11.5	Screening der Hybridome im ELISA.....	35
2.11.6	Nomenklatur der Hybridome	35

2.12	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper durch Squarix Biotechnology	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Immunisierung der Kaninchen	37
3.2	Auswertung der Kaninchenserum im Western Blot	39
3.3	Fraktionierung der Antigenpräparation durch Anionenaustausch- chromatographie mittels FPLC	47
3.4	Immunisierung der Mäuse	49
3.5	Untersuchung des Mausserums im Western Blot	50
3.6	Herstellung und Screening der Hybridome	51
3.7	Bestimmung der Immunglobulinklasse der sezernierten Antikörper	56
3.8	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand.....	56
3.8.1	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper durch Affinitäts-chromatographie mittels FPLC	56
3.8.2	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper durch die Firma Squarix Biotechnology	57
3.9	Antikörpertitration der gereinigten monoklonalen Antikörper	57
3.10	Bestimmung der Spezifität der gereinigten Antikörper	58
3.11	Stabilität und Lagerung der gereinigten monoklonalen Antikörper	61
4.	Diskussion	63
4.1	Identifizierung von <i>B. anthracis</i> spezifischen thermostabilen Antigenen	63
4.2	Fraktionierung der vegetativen thermostabilen Antigenpräparation von <i>B.</i> <i>anthracis</i>	66
4.3	Überprüfung der partiell gereinigten vegetativen <i>B. anthracis</i> Antigenpräparation.....	67
4.4	Herstellung und Screening der Hybridome	68
4.5	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	70
4.6	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper aus Zellkulturüberstand.....	71
4.7	Bestimmung der Spezifität der gereinigten monoklonalen Antikörper	71
4.8	Stabilität der gereinigten monoklonalen Antikörper	72
4.9	Schlussfolgerung	73
5	Literaturverzeichnis.....	75
6	Anhang.....	86
6.1	Geräte	86
6.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	86
6.2.1	Chemikalien	86
6.2.2	Verbrauchsmaterial	88
6.2.3	Nährmedien und Zusätze	89

6.2.4	Adjuvanzien	90
6.2.5	Medien und Zusätze für die Zellkultur	90
6.2.6	Antikörper und Immunseren	90
6.3	Verwendete <i>Bacillus</i> ssp. Isolate	91
6.4	Stammbäume der monoklonalen Antikörper	93
	Danksagung	98
	Selbständigkeitserklärung.....	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der vegetativen Zelle von <i>B. anthracis</i>	1
Abb. 2: Übersicht über die Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein.....	10
Abb. 3: Schematische Darstellung eines Immunglobulins und verschiedenen, daraus abgeleiteten Antikörperfragmenten.....	11
Abb. 4: Analyse der acht thermostabilen Antigenpräparationen, die für die Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden.....	19
Abb. 5: Übersicht über den Antikörpertiter der immunisierten Kaninchen nach der 4. Immunisierung und bei der Entblutung.....	37
Abb. 6: Übersicht über den Antikörpertiter der immunisierten Kaninchen nach der 4. Immunisierung und bei der Entblutung.....	38
Abb. 7: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der Ascoli Antigen Präparation immunisierten Tieres.....	39
Abb. 8: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der Anthraxin Präparation immunisierten Tieres.....	40
Abb. 9: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen <i>B. cereus</i> B197 Antigenpräparation immunisierten Tieres...	41
Abb. 10: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen <i>Bacillus</i> ssp. B334 Präparation immunisierten Tieres.....	42
Abb. 11: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen <i>B. anthracis</i> A30PBS Antigenpräparation immunisierten Tieres.....	43
Abb. 12: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen <i>B. anthracis</i> (A30Ph) Antigenpräparation immunisierten Tieres.....	44
Abb. 13: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der <i>B. anthracis</i> Ames Sporenpräparation immunisierten Tieres.....	45
Abb. 14: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der <i>B. cereus</i> B10 Sporenpräparation immunisierten Tieres.....	46
Abb. 15: Western Blot der AEX Fraktionen, entwickelt mit dem Serum des mit der <i>B. anthracis</i> A30PBS Antigenpräparation immunisierten Tieres.....	47
Abb. 16: Western Blot der aufgereinigten <i>B. anthracis</i> A30 PBS Antigenpräparation entwickelt mit sieben verschiedenen Kaninchenseren.....	48
Abb. 17: Antikörpertitration der mit der partiell gereinigten vegetativen <i>B. anthracis</i> A30PBS Antigenpräparation immunisierten Mäuse nach der 2. Immunisierung.....	49
Abb. 18: Western Blot mit der partiell gereinigten <i>B. anthracis</i> A30 PBS Antigenpräparation entwickelt mit dem Serum von Maus Nr. 3.....	50

Abb. 19: Western Blot der im ELISA eingesetzten Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum von Maus Nr. 3.....	51
Abb. 20: In den Screenings ermittelte OD _{414 nm} die zur Etablierung der monoklonalen Zelllinie BaV5 führten.....	53
Abb. 21: In den Screenings ermittelte OD _{414 nm} die zur Etablierung der monoklonalen Zelllinie BaV15 führten.....	54
Abb. 22: In den Screenings ermittelte OD _{414 nm} die zur Etablierung der monoklonalen Zelllinie BaV16 führten.....	55
Abb. 23: Silberfärbung eines 7,5 %-igen Acrylamidgels mit den mittels Affinitätschromatographie gereinigten IgMs am Beispiel der Zelllinie BaV16.....	57
Abb. 24: Antikörpertitration der gereinigten monoklonalen Antikörper gegen die vegetative thermostabile <i>B. anthracis</i> A30PBS Antigenpräparation.....	58
Abb. 25: Spezifität des gereinigten monoklonalen Antikörpers BaV15.....	59
Abb. 26: Spezifität des gereinigten monoklonalen Antikörpers BaV16.....	60
Abb. 27: Analyse der gereinigten monoklonalen Antikörper, die im ELISA keine Reaktivität mehr aufwiesen.....	61
Abb. 28: Antikörpertitration der Lagerproben zum Zeitpunkt 0 und nach 6 Monaten gegen die vegetative <i>B. anthracis</i> A30PBS Antigenpräparation.....	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Konzentration der thermostabilen Antigenpräparation für die 4. Immunisierung der Kaninchen.....	21
Tab. 2: Zusammensetzung der Acrylamidgele.....	22
Tab. 3: Übersicht über die Optimierung der Aufreinigung monoklonaler Antikörper mittels Affinitätschromatographie	30
Tab. 4: Übersicht über die Immunisierungsdosis der partiell gereinigten und aufkonzentrierten thermostabilen Antigenpräparation zur Immunisierung der Mäuse. ...	31
Tab. 5: Verwendete <i>Bacillus</i> ssp. Isolate	91
Tab. 6: Übersicht über die ersten 14 Screenings der Hybridome aus der Fusion von Milzzellen von Maus Nr. 3 und SP2/0-Ag14 Myelomzellen	93
Tab. 7: Übersicht über die Screenings der vegetativen Linie (V-Linie)	96
Tab. 8: Übersicht über die Screenings der Sporen-Linien (S-Linie).....	96

Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anion exchange chromatography = Anionenaustauschchromatographie
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BclA	<i>Bacillus</i> collagen-like protein of anthracis
EA1	extractable antigen = extrahierbares Antigen 1 der Oberflächenschicht
EF	Edema factor = Ödemfaktor
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay
Fab	fragment-antigen-binding = das antigenbindende Fragment eines Antikörpers
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Fv	Fragment variable = Fragment des variablen Teils eines Antikörpers
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IFA	Immunofluorescence assay = Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
LF	Lethal factor = Letalfaktor
NZW	New Zealand White
PA	Protektives Antigen
Ph	Phenol
scFv	single chain fragment of the variable region = Einzelketten- Antikörper aus der leichten und der schweren Kette des variablen Teils
ssp.	Subspezies

Zusammenfassung

Bei dem Ascoli Präzipitin Test (ASCOLI, 1911) handelt es sich um eine schnelle und kostengünstige Diagnostikmethode, bei der polyklonales Serum gegen thermostabile Antigene von *B. anthracis* eingesetzt wird. Allerdings ist dieser Test ungeeignet für Umweltproben, da Kreuzreaktionen mit anderen *Bacillus* Spezies auftreten. Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen spezifische thermostabile Antigene von *B. anthracis* könnte jedoch die Kreuzreaktivität mit anderen *Bacillus* Spezies eliminiert werden. In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen potentiell *B. anthracis* spezifische thermostabile Antigene hergestellt, die bei den getesteten *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) keine Kreuzreaktionen aufwiesen. Zu Beginn wurden thermostabile Antigenpräparationen von vegetativen *B. anthracis* und *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Kulturen, sowie Präparationen von *B. anthracis* und *B. cereus* Sporen hergestellt. Die insgesamt acht thermostabilen Antigenpräparationen wurden zur Immunisierung von Kaninchen verwendet und die gewonnenen polyklonalen Antiseren wurden im Western Blot auf Kreuzreaktionen zwischen *B. anthracis* und *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) untersucht. Nach Abschluss dieser Kreuzreaktivitätsversuche wurden zwei Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht von 30 bzw. 50 kDa identifiziert, welche spezifisch in Antigenpräparationen von *B. anthracis* vorhanden sind und nicht mit Seren von Kaninchen, die mit *Bacillus* ssp. Antigenpräparationen immunisiert worden waren, reagierten. Das 30 kDa große Protein ist in vegetativen Antigenpräparationen von *B. anthracis*, wie auch in *B. anthracis* Sporenpräparationen vorhanden, während das 50 kDa große Protein nur in vegetativen Antigenpräparationen von *B. anthracis* vorhanden ist. Diese potentiell *B. anthracis* spezifischen Proteine wurden aus der vegetativen *B. anthracis* thermostabilen Antigenpräparation durch Anionenaustauschchromatographie mittels FPLC fraktioniert und zur Immunisierung von BALB/c Mäusen verwendet. Die Milzzellen der Maus mit der höchsten spezifischen Antikörperbildung wurden mit Myelomzellen fusioniert und die dabei entstandenen Hybridomzellen in Kultur genommen. Im Screening mittels ELISA wurden die Klone auf die Produktion spezifischer Antikörper gegen die 30 bzw. 50 kDa großen potentiell *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigene getestet. Nach 14 Screenings erfolgte eine Trennung der positiven Klone in zwei Linien mit unterschiedlichen Auswahlkriterien. Die Klone der V- (vegetativ) Linie wurden auf spezifische Antikörper gegen vegetative *B. anthracis* Präparationen getestet, die Klone der S- (Sporen) Linie auf spezifische Antikörper gegen *B. anthracis* Sporenpräparationen. Nach zwei bzw. vier Screenings in der V-Linie konnten die drei monoklonalen Zelllinien BaV5, BaV15 und BaV16 etabliert werden. Die Bestimmung der Immunglobulinklasse ergab, dass es sich bei der Zelllinie BaV5 um eine Mischkultur mit mehreren unterschiedlichen Antikörpern handelte, bei den von den

Zelllinien Bav15 und BaV16 produzierten Antikörper handelte es sich um Immunglobuline der Klasse M. Bei der Bestimmung der Spezifität der von der Firma Squarix Biotechnology gereinigten monoklonalen Antikörper BaV15 und BaV16 konnten im ELISA keine Kreuzreaktionen mit den getesteten Antigenpräparationen von vegetativen Zellen und Sporen verschiedener *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) festgestellt werden. Allerdings erwiesen sich die gereinigten monoklonalen Antikörper der Klasse M als instabil. Versuche die Antikörper durch Zusätze zu stabilisieren, führten zu keinem Erfolg, so dass weiterführende Analysen zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper BaV15 und BaV16 nicht möglich waren.

Summary

The Ascoli test is a fast and inexpensive diagnostic tool, using polyclonal serum against thermostable antigens of *B. anthracis*. However, this test is not highly specific for *B. anthracis*, since the thermostable antigens, on which this test is based, are also present in other *Bacillus* species and therefore lead to cross-reactivity. By employing monoclonal antibodies against *B. anthracis* specific thermostable antigens, the cross-reactivity with other *Bacillus* species could be eliminated. The aim of this study was to generate monoclonal antibodies, which react specifically with the potential *B. anthracis* specific thermostable antigens. At the beginning thermostable antigen preparations from vegetative *B. cereus* and *B. anthracis* cultures, as well as from *B. cereus* and *B. anthracis* spores were prepared. These eight antigen preparations were used to immunise rabbits. The resulting polyclonal antisera were used to determine cross-reactivity between *B. cereus* and *B. anthracis* in Western Blot analysis. In these cross-reactivity tests two proteins with a molecular weight of approximately 30 and 50 kDa respectively, which are specifically present in antigen preparations of *B. anthracis* were identified. These proteins do not react with sera of rabbits, immunised with the *B. cereus* preparations. The 30 kDa protein is present in vegetative and spore preparations of *B. anthracis*, while the 50 kDa protein is only present in vegetative antigen preparations of *B. anthracis*. These potentially *B. anthracis* specific proteins in the vegetative antigen preparation of *B. anthracis* were partially purified with anion exchange chromatography using FPLC and were used to immunise three BALB/c mice. The spleen of the mouse with the highest specific antibody response was then used to fuse the B-cells with murine myeloma cells in order to generate hybridomas. The supernatants of the resulting hybridomas were screened to identify clones producing antibodies against the thermostable antigens of *B. anthracis*. After 14 screens the positive clones were divided into two different cell lines. The clones of the V- (vegetative) line were further tested for production of antibodies against the thermostable antigens of vegetative cells of *B. anthracis*. The S- (spores) line was screened for clones producing antibodies against *B. anthracis* spore preparations. After two and four screens, the three monoclonal cell lines BaV5, BaV15 and BaV16 were established. The determination of the immunoglobulin class revealed, that BaV5 is a mixed culture with several different antibodies. The cell lines BaV15 and BaV16 produce an immunoglobulin of class M. In determining the specificity of the monoclonal antibodies BaV15 and BaV16 purified from Squarix Biotechnology, no cross-reactivity with 20 vegetative and 10 spore preparations of different *Bacillus* ssp. (non-anthraxis) was found. The purified antibodies, which specifically detect vegetative cells of *B. anthracis*, were found to be unstable. Trying to stabilize the antibody by additives led to no success, so that further analyses for characterization of the antibodies were not possible.

1 Einleitung

1.1 *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis (*B. anthracis*) ist ein Gram-positives, sporenbildendes, nicht bewegliches Bakterium und der Erreger des Milzbrandes. Bei Milzbrand handelt es sich um eine weltweit vorkommende Zoonose, die hauptsächlich Herbivoren befällt (WHO, 1998; OIE, 2008).

Vegetative Zellen sind stäbchenförmig und bilden im Körper infizierter Tiere und Menschen, sowie in bikarbonathaltigen Nährmedien in einer CO₂-haltigen Atmosphäre eine Kapsel aus Poly-γ-D-Glutaminsäure (AVAKYAN et al., 1965; GREEN et al., 1985).

Neben der Zytoplasmamembran und der Peptidoglykanschicht besitzt *B. anthracis* eine zusätzliche Oberflächenschicht, die als „Surface-Layer“ bezeichnet wird (MESNAGE et al., 1998). Diese Oberflächenschicht enthält die Proteine EA1 = Extrahierbares Antigen 1 und Sap = Surface-Array-Protein (MESNAGE et al., 1997). In Abb. 1 ist der Aufbau einer vegetativen Zelle von *B. anthracis* dargestellt.

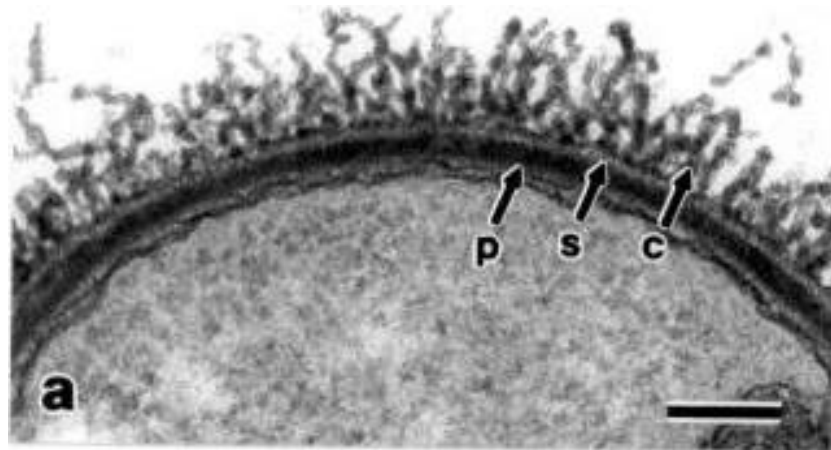


Abb. 1: Aufbau der vegetativen Zelle von *B. anthracis*.

p= Peptidoglykanschicht, s= Oberflächenschicht, c= Kapsel
(Quelle: http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus_2.html)

Die Pathogenität von *B. anthracis* beruht auf zwei plasmidkodierten Hauptvirulenzfaktoren (MAKINO et al., 1989). Der Syntheseapparat für die Poly-γ-D-Glutaminsäure Kapsel wird auf dem 60 MDa großen pXO2 Plasmid kodiert, diese Kapsel schützt das Bakterium vor Oponierung und Phagozytose durch Maskierung der Zellwand-Polysaccharide (EZZELL und WELKOS, 1999). Die Größe der Kapsel-Filamente beträgt *in vitro* zwischen 20 und 55 kDa, während sie *in vivo* 215 kDa beträgt (FOUET 2009).

Das zweite, 110 MDa große pXO1 Plasmid kodiert die Proteine Protektives Antigen (PA), Ödemfaktor (EF) und Letalfaktor (LF). Diese Proteine bilden die beiden binären Toxine

von *B. anthracis*: das Ödemtoxin (Protektives Antigen und Ödemfaktor) und das Letaltoxin (Protektives Antigen und Letalfaktor) (VODKIN et al., 1983; OKINAKA et al., 1999).

Das Protektive Antigen (83 kDa) bindet an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wo sich nach proteolytischer Spaltung das resultierende PA₆₃ zu einem Heptamer formiert. An diesem Heptamer erfolgt die Bindung von EF bzw. LF. Nach rezeptorinduzierter Endozytose formen sich die PA-Untereinheiten zu einer Pore und die Toxine werden ins Zytoplasma transloziert (BEAUREGARD et al, 2000).

Der Letalfaktor (LF; 90 kDa) ist eine Zink abhängige Metalloprotease, welche spezifisch die meisten Isoformen der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase proteolytisch spaltet und durch Unterbrechungen wichtiger Signalketten zum Tod der Zelle führt. Bei dem 89 kDa großen Ödemfaktor (EF) handelt es sich um eine Calcium und Calmodulin abhängige Adenylatzyklase. EF lässt das cytoplasmatische cAMP drastisch ansteigen und führt durch eine Störung des Wasserhaushaltes zu Ödemen (ABRAMI et al., 2005).

B. anthracis kann über Jahre im Boden als Spore persistieren und germiniert nach Aufnahme in den Organismus zu vegetativen Zellen. Die Sporen sind von einer ballonähnlichen Schicht, dem Exosporium umgeben, einer parakristallinen Basalschicht mit einer hexagonalen Gitterstruktur und haarähnlichen äußeren Regionen. Das *B. anthracis* Kollagen-ähnliche Sporenoberflächenprotein BclA (= Bacillus collagen-like protein of anthracis) ist die Hauptstrukturkomponente der haarähnlichen Filamente und das immunodominante Antigen des *B. anthracis* Exosporiums (SYLVESTRE et al., 2003; STEICHEN et al., 2003, REDMOND et al., 2004). Das BclA besteht aus einem 715 Da großen Tetrasaccharid und einem 324 Da großen Disaccharid. Das Tetrasaccharid besteht aus drei Rhamnose-Einheiten und einem endständigen, nichtreduzierenden Zucker, der 2004 von DAUBENSPECK et al. (2004) als Anthrose bezeichnet wurde (DAUBENSPECK et al., 2004).

1.2 *B. anthracis* spezifische Antigene

1.2.1 *B. anthracis* Toxine

Bei den Hauptantigenen von *B. anthracis* handelt es sich um die Toxinkomponenten PA, EF und LF. Das PA ist das Hauptantigen, das in immunisierten Tieren zum Schutz vor einer Infektion mit *B. anthracis* führt. Außerdem handelt es sich bei PA um den Hauptbestandteil der beiden in den USA und UK zugelassenen Vakzine (IVINS und WELKOS, 1986; BAILLIE, 2009). Bei Tieren, die mit PA immunisiert wurden, kann neben einem Anti-PA-Antikörpertiter auch ein Titer gegen die EF und LF Komponenten nachgewiesen werden, da selbst hoch gereinigtes PA mit geringen Mengen EF und LF versetzt ist (IVINS et al., 1986, LITTLE und KNUDSON, 1986).

1.2.2 *B. anthracis* vegetative Antigene

Bei dem Ascoli Antigen, einem hitzestabilen Antigengemisch aus dem vollvirulenten, toxischen *B. anthracis* Stamm „Letonice“ und Anthraxin, einem hitzestabilen Polysaccharid-Protein-Nukleinsäure-Komplex, der durch Essigsäurepräparation aus dem nichtvirulenten *B. anthracis* Stamm 34F2 (Sterne) hergestellt wird, handelt es sich um vegetative Antigenpräparationen, die nicht exakt definiert sind. Vor allem das kommerzielle Ascoli Antigen zeigt Kreuzreaktionen mit Vertretern anderer *Bacillus* Spezies (WHO, 1998; SHLYAKHOV et al., 1997).

Die Poly- γ -D-Glutaminsäure, der Hauptbestandteil der Kapsel ist nur schwach immunogen, löst aber durch eine kovalente Bindung mit Carrier-Proteinen die Bildung von Serumantikörper aus (KUBLER-KIELB et al., 2006). Die Kapsel ist gegenwärtig als vielversprechendes Antigen für die Entwicklung neuartiger Vakzine von Interesse (BOUZIANAS, 2010, FROUDE II et al., 2011).

Immunologische Untersuchungen von Tieren, die mit dem in der Veterinärmedizin eingesetzten Sterne Vakzin immunisiert wurden, zeigten, dass neben Anti-PA auch Antikörper gegen die Antigene EA1 und EA2 der Oberflächenschicht nachweisbar sind (SHLYAKHOV et al., 2004; EZZELL and ABSHIRE, 1988). DELVECCHIO et al. konnten 2006 das EA1 Protein im proteomischen Profil von *B. anthracis* Sporen nachweisen, nachdem WILLIAMS und TURNBOUGH 2004 das EA1 Protein als persistierenden Bestandteil in *B. anthracis* Sporenpräparationen identifizierten. Durch diese Persistenz des EA1 in Sporenpräparationen konnten UCHIDA et al. 2012 einen Schutz bei einer letalen Challenge mit *B. anthracis* Sporen durch intranasale Immunisierung mit rekombinantem EA1 bei Mäusen beobachten.

1.2.3 *B. anthracis* Sporenantigene

Die meisten Antikörper, die durch Immunisierung von Tieren mit Sporen von *B. anthracis* gebildet werden, reagieren mit BclA (STEICHEN et al., 2003, SWIECKI et al., 2006).

Anthrose, der endständige, nichtreduzierende Zucker der Tetrasaccharid-Seitenkette des BclAs ist spezifisch für *B. anthracis* Sporen, es wurde nicht in Sporen von *B. cereus* oder *B. thuringiensis* gefunden. Aus diesem Grund könnte Anthrose zur Entwicklung eines Vakzins gegen Sporen von *B. anthracis* eingesetzt werden (DAUBENSPECK et al., 2004).

Aufgrund der Tatsache, dass Zelloberflächen-Oligosaccharide nur sehr schwer von der Zelloberfläche zu isolieren sind, wurde in mehreren Arbeiten Anthrose synthetisch

hergestellt (ADAMO et al., 2005; WERZ AND SEEBERGER, 2005; SAKSENA et al., 2006; CRICH und VINOGRADOVA, 2007).

Die Immunisierung von Kaninchen mit Peressigsäure-inaktivierten Sporen von *B. anthracis* führt zur Bildung von Anti-Anthrose-Antikörpern. Dies deutet daraufhin, das Anthrose und damit das BclA die immundominante Komponenten der Sporen von *B. anthracis* darstellen (KUEHN et al., 2009). TAMBORRINI et al. stellten 2011 fest, dass Isolate aus westafrikanischen Rinderkadavern nicht von Anti-Anthrose-Antikörpern detektiert werden konnten. Sequenzanalysen ergaben, dass im Anthrose kodierenden Operon ein verfrühtes Stopcodon enthalten ist und damit die westafrikanischen Isolate keine Anthrose produzieren können.

1.3 Diagnostik von *B. anthracis*

Der Nachweis von *B. anthracis* gestaltet sich, durch die große genetische Verwandtschaft mit *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* und *B. pseudomycoides*, schwierig. Ein spezifischer serologischer Nachweis von *B. anthracis* ist durch eine Kreuzreaktivität sowohl von poly- als auch von monoklonalen Antikörpern erschwert (EDWARDS et al., 2006).

Die Kultivierung von *B. anthracis* stellt nur einen diagnostischen Hinweis auf *B. anthracis* dar, dieser muss durch weitere Methoden, wie PCR oder serologische Methoden verifiziert werden. Des Weiteren ist für die Diagnostik von *B. anthracis* mit konventionellen kulturellen Methoden eine hohe Konzentration von *B. anthracis* von Vorteil. Diese Voraussetzungen fehlen bei Umweltproben, in denen zusätzlich weitere *Bacillus* ssp. vorhanden sein können, so dass eine spezifische Identifizierung von *B. anthracis* nur durch weitere biochemische oder molekulare Techniken möglich ist (IRENGE und GALA, 2012).

Zur Identifizierung von *B. anthracis* in klinischen Proben werden kulturelle Diagnosetechniken, wie charakteristische Koloniemorphologie, die Ausbildung einer Kapsel unter bestimmten Wachstumsbedingungen und weitere Tests herangezogen. Bei komplexem Probenmaterial, wie z. B. Umweltproben, werden zusätzlich molekularbiologische Methoden zum Nachweis der Virulenzfaktoren eingesetzt. Gegebenenfalls kann im Tierversuch die Virulenz nachgewiesen werden (BEYER, 1992).

1.3.1 Koloniemorphologie von *B. anthracis*

B. anthracis wächst auf Blutagar als grauweiße Kolonien. Vegetative Zellen wachsen *in vitro* in langen Ketten, während *in vivo* einzeln liegende Zellen oder Fäden aus wenigen Zellen zu beobachten sind. Das sogenannte „Medusenhaupt“, bei dem am Kolonienrand fransige Ausläufer sichtbar werden, die bogenartig zur Kolonie zurücklaufen und die „Eiweißsteifigkeit“, die hochvisköse Konsistenz des Materials, die auf der Kettenbildung beruht sind nicht spezifisch für *B. anthracis*, können aber in Verbindung mit der fehlenden Hämolyse auf Blutagar zur Identifizierung von *B. anthracis* herangezogen werden.

Durch die, im Vergleich zu anderen *Bacillus* ssp. fehlende Hämolyse von *B. anthracis* ist Blutagar als Selektivagar dem von KNISELY 1966 vorgeschlagenen PLET-Agar (Polymyxin-Lysozym-EDTA-Thalliumazetat-Agar) vorzuziehen (BEYER, 1992).

1.3.2 Kulturelle Nachweismethoden für *B. anthracis*

Zur Unterscheidung des nicht beweglichen *B. anthracis* von anderen *Bacillus* ssp. dient der Beweglichkeitstest, der entweder als „hängender Tropfen“ in Hohlschliff-Objektträgern oder als Wachstumsprüfung auf halbfesten Agar durchgeführt werden kann.

Der γ -Phagentest gilt als wichtiges diagnostisches Hilfsmittel zur Identifizierung von *B. anthracis* (ABSHIRE et al., 2005). Der γ -Bacteriophage, der 1955 von BROWN und CHERRY isoliert wurde, lysiert spezifisch vegetative Zellen von *B. anthracis* (BROWN und CHERRY, 1955). Es sind allerdings *Bacillus* ssp. Isolate bekannt, die im γ -Phagentest ein falsch positives Ergebnis aufweisen.

Durch den Zusatz von Natriumbicarbonat zu den Nährmedien und Bebrütung bei 5 % CO₂ bilden vegetative Zellen von *B. anthracis* *in vitro* eine Kapsel aus. Diese Kapsel lässt sich durch die M'Fadyean Reaktion (Polychrom-Methylen-Blau-Färbung) sichtbar machen. Im Lichtmikroskop betrachtet ist die Kapsel pink, die Zellen sind dunkelblau gefärbt (OIE, 2004). Die Tuschkontrastierung ist keine Färbemethode im eigentlichen Sinne, aber schnell und kostengünstig durchzuführen. Die Kapsel kann durch diese Kontrastierung als transparenter Lichthof um die vegetative Zelle dargestellt werden (BEYER, 1992).

1.3.3 Molekularbiologischer Nachweis von *B. anthracis*

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann durch den Einsatz spezifischer Primer die An- bzw. Abwesenheit von Kapsel- und/oder Toxingenen nachgewiesen werden (OIE, 2008; TURNBULL 1999, BEYER, 1992). Eine Identifizierung von *B. anthracis*, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit der Plasmide, wird durch die zusätzliche Verwendung von chromosomalen Markern möglich (BEYER, 1992; ANTWERPEN, 2008).

1.3.4 Immunologischer Nachweis von *B. anthracis*

Für den immunologischen Nachweis von *B. anthracis* gibt es neben dem Ascoli Präzipitin Test und dem Anthraxin Hauttest eine Vielzahl an unterschiedlichen Immunoassays, wie ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), Immunfluoreszenz- oder Radioimmunoassays. Die unterschiedlichen Immunoassays wurden entwickelt, um *B. anthracis* Sporen, vegetative Zellen oder Toxinkomponenten nachzuweisen (RAO et al., 2010). Eine spezifische serologische Identifikation von *B. anthracis* ist aufgrund der Tatsache, dass sowohl polyklonale, als auch monoklonale Antikörper mit Antigenen anderer *Bacillus* ssp. kreuzreagieren können, erschwert (LONGCHAMP und LEIGHTON, 1999). Allerdings werden auf Antikörpern basierende Assays zurzeit am häufigsten zur Detektion von *B. anthracis* Sporen eingesetzt (IRENGE und GALA, 2012).

Der Nachteil von Immunoassays besteht darin, dass ein Antikörpertiter bzw. die drei Toxinkomponenten erst spät im Krankheitsverlauf im Blut nachweisbar sind, so dass eine effektive Behandlung nicht erreicht werden kann (EDWARDS et al., 2006).

ELISAs, die mittlerweile zu den Standardmethoden in der Diagnostik von *B. anthracis* gehören, da sie je nach Anwendung und Einsatzgebiet variiert oder kombiniert werden können, erfordern eine sorgfältige Qualitätskontrolle der eingesetzten Reagenzien. Zusätzlich nimmt die Durchführung eines ELISAs meist mehrere Stunden in Anspruch.

1.3.4.1 Ascoli Präzipitin Test

Bei dem Ascoli Präzipitin Test handelt es sich um eine schnelle und kostengünstige Diagnostikmethode, bei der polyklonales Serum gegen thermostabile Antigene von *B. anthracis* eingesetzt wird. Der Test wurde entwickelt, um Milzbrand in verendeten Tieren oder in Tierprodukten nachzuweisen (ASCOLI 1911). Der Ascoli Test ist nicht hochspezifisch für *B. anthracis*, da die thermostabilen Antigene, auf denen er basiert, auch in anderen *Bacillus* ssp. vorkommen und der Einsatz des polyklonalen Serums zu Kreuzreaktionen führen kann (WHO, 1998). Heute wird der Test nur noch in Osteuropa durchgeführt (OIE, 2008).

Das zu untersuchende Material wird zerkleinert, in Kochsalzlösung mit 10 % Essigsäure gekocht, filtriert und in einem Testgefäß auf das polyklonale Antiserum gegeben. Ein Extrakt gilt als positiv, wenn sich sofort an der Berührungsfläche zwischen Antiserum und Extrakt ein Präzipitinring ausbildet (WHO, 1998).

1.3.4.2 Anthraxin Hauttest

Der Anthraxin Hauttest wurde entwickelt, um eine zellvermittelte Immunität gegen *B. anthracis* beim Menschen zu detektieren. Durch diesen Hauttest lässt sich eine retrospektive Diagnose stellen, oder der Erfolg einer Immunisierung nachweisen (SHLYAKHOV und RUBINSTEIN, 1996; SHLYAKHOV et al., 1997; OIE, 2004). Der Test beinhaltet eine intradermale Injektion von Anthraxin, einem hitzestabilen Protein-Polysaccharid-Nukleinsäure-Komplex, aus dem nicht virulenten toxischen *B. anthracis* Stamm 34F2 (Sterne). Die injizierte Stelle wird 24 h später auf Hautrötungen und damit auf ein positives Ergebnis untersucht (SHLYAKHOV et al., 2004). Im OIE-Leitfaden aus dem Jahr 2008 wird der Anthraxin-Haut-Test als diagnostischer Test nicht mehr erwähnt.

1.3.4.3 Immunoassays zum Nachweis von Antigenen

Im ELISA können beispielsweise durch Anti-Anthrax Antikörper spezifisch Sporen (KUEHN et al., 2009) oder durch Anti-poly- γ -D-Glutaminsäure-Antikörper die Kapsel von *B. anthracis* in Seren infizierter Mäuse nachgewiesen werden (KOZEL et al., 2004).

Eine weitere Methode zum Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen ist der Latex Agglutinationstest. Nach Bindung des an Latex-Partikel gekoppelten Antikörpers an das spezifische Antigen ist eine Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes zu beobachten. Durch die Größe der Latex-Partikel ist die Agglutination des Antigen-Antikörper-Komplexes bereits mit bloßem Auge sichtbar, eine Auswertung ist damit nicht an technisches Equipment gebunden. Allerdings ist die Sensitivität durch die manuelle Auswertung erniedrigt (GELLA et al., 1991).

AUCOIN et al. (2009) entwickelten einen Latex Agglutinationstest, um die Poly- γ -D-Glutaminsäure der Kapsel im Serum von Mäusen und nicht-humanen Primaten mit Lungenmilzbrand nachzuweisen. Parallel zu diesen Untersuchungen wurde, zum Vergleich der Sensitivität, ein quantitativer ELISA zum Nachweis der Poly- γ -D-Glutaminsäure durchgeführt, wobei der Latex Agglutinationstest eine vergleichbare Sensitivität aufwies (AUCOIN et al., 2009).

Lateral Flow Assays oder immunochromatographische Tests stellen eine weitere Variante der Immunoassays dar. Hierbei werden Antikörper auf einer Membran in einem Teststreifen gebunden. Die zugegebene wässrige Probe wird mittels Kapillarkräfte durch den Teststreifen gezogen, der Nachweis erfolgt visuell durch die Ausbildung von Linien. Eine Probe gilt als positiv, wenn neben der Kontrolllinie auch die Testlinie sichtbar wird. Diese Teststreifen werden als kleine tragbare Einmalartikel angeboten und sind einfach

zu handhaben. Andererseits eignen sich die verfügbaren Teststreifen nicht für alle Arten von Probenmaterial.

Die Firma Tetracore bietet den RedLine Alert™ (Artikelnummer TC-5123-010) zur Identifizierung von *B. anthracis* auf Schafblut-Agar und den Anthrax BioThreat Alert™ Teststreifen (Artikelnummer TC-8004-025) zur schnellen qualitativen Bestimmung von *B. anthracis* in Umweltproben an.

Immunfluoreszenztest (IFA = immunofluorescence assay) basieren auf Antikörper, die mit einem fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind. Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop (EDWARDS et al., 2006).

Durch den Einsatz von Fluorescein-gekoppelten Immunglobulinen der Klasse M, die gegen das Galaktose-N-Acetylglucosamin-Polysaccharid der Zellwand gerichtet sind, konnten in IFAs vegetative Zellen von *B. anthracis* gefärbt werden. Allerdings zeigten sich bei zwei *B. cereus* Isolaten eine Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper (EZZELL et al., 1990).

Durch die Kombination eines Fluorescein-gekoppelten Antikörpers gegen das Polysaccharid-Antigen der Zellwand und eines Anti-Kapsel-Antikörpers konnten im IFA keine Kreuzreaktionen mit den getesteten *Bacillus* ssp. festgestellt werden. Damit eignet sich der IFA zur schnellen und spezifischen Diagnostik von *B. anthracis* in Kulturen und auch für die direkte Anwendung in klinischen Proben (DE et al., 2002).

1.3.4.4 Immunoassays zum Nachweis von Antikörpern

Serologische Assays können zu epidemiologischen Untersuchungen von Milzbrand in Tieren (TURNBULL et al., 1992) oder zum Nachweis von Antikörper gegen PA, EF, LF oder der Kapsel aus Serum infizierter Patienten eingesetzt werden (SIRISANTHANA et al., 1988; HARRISON et al., 1989; QUINN et al., 2002).

Bei dem kommerziellen ELISA Testkit „Serion ELISA classic *Bacillus anthracis* IgG“ handelt es sich um einen qualitativen und quantitativen indirekten Enzym-Immunoassay des Institutes Virion-Serion in Würzburg. Dieser Test kann für den Nachweis von humanen Anti-PA Antikörpern in Serum oder Plasma eingesetzt werden und ist zur Kontrolle des Impferfolgs und zur Bestimmung des Immunstatus vor der Immunisierung zugelassen (Packungsbeilage Firma Serion, Bestellnummer ESR140G).

1.4 Herstellung monoklonaler Antikörper

1.4.1 Hybridomtechnik

Das Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper geht auf G. KÖHLER und C. MILSTEIN zurück (KÖHLER & MILSTEIN, 1975). Diese Hybridomtechnik beruht auf der Fusion von Antikörper produzierenden B-Lymphozyten aus der Milz immunisierter Tiere mit Zellen einer Myelomzelllinie. Die dadurch entstandenen Hybride (= Hybridome) produzieren potentiell unbegrenzt Antikörper mit einer bestimmten Spezifität. Bei der Wahl der Myelomzelllinie ist darauf zu achten, dass diese selbst keine Immunglobuline produzieren. Um die Zellfusion zwischen B-Lymphozyten und Myelomzellen zu initiieren, wird meistens Polyethylenglykol verwendet. Die nicht fusionierten B-Lymphozyten können sich in der Zellkultur nicht vermehren und sterben innerhalb weniger Tage ab. Um nicht fusionierte Myelomzellen am Wachstum zu hemmen, wird am häufigsten die HAT-Selektion angewendet. Für diese Selektion wird dem Zellkulturmedium Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (= HAT-Medium) zugegeben. Das im Selektionsmedium enthaltene Aminopterin hemmt die *de Novo* Purin- und Pyrimidinsynthese. Thymidin und Hypoxanthin sind Substrate des „Salvage-Pathways“, eines Stoffwechselweges für die Wiederverwertung von Purinnukleotiden dessen Schlüsselenzym die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) darstellt. Durch die HGPRT-Enzymdefizienz der von SHULMAN et al 1978 etablierten Sp2/0-Ag14 Myelomzellen wird der „Salvage-Pathway“ bei nicht fusionierten Myelomzellen blockiert (SHULMAN et al., 1978). Durch diese Blockade und der zeitgleichen Hemmung der *de Novo* Purin- und Pyrimidinsynthese durch Aminopterin werden nicht fusionierte Myelomzellen am Wachstum gehindert. Hybridome, die aus der Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen entstanden sind, können durch das HGPRT der B-Lymphozyten und den im Medium enthaltenen Substraten Hypoxanthin und Thymidin den „Salvage-Pathway“ durchlaufen und sich trotz Hemmung der *de novo* Purin- und Pyrimidinsynthese durch Aminopterin vermehren (PETERS und BAUMGARTEN 1990). Die Hybridome, die den Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren werden selektiert, die sezernierten Antikörper gereinigt und charakterisiert.

Der Ablauf der Hybridomtechnik ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

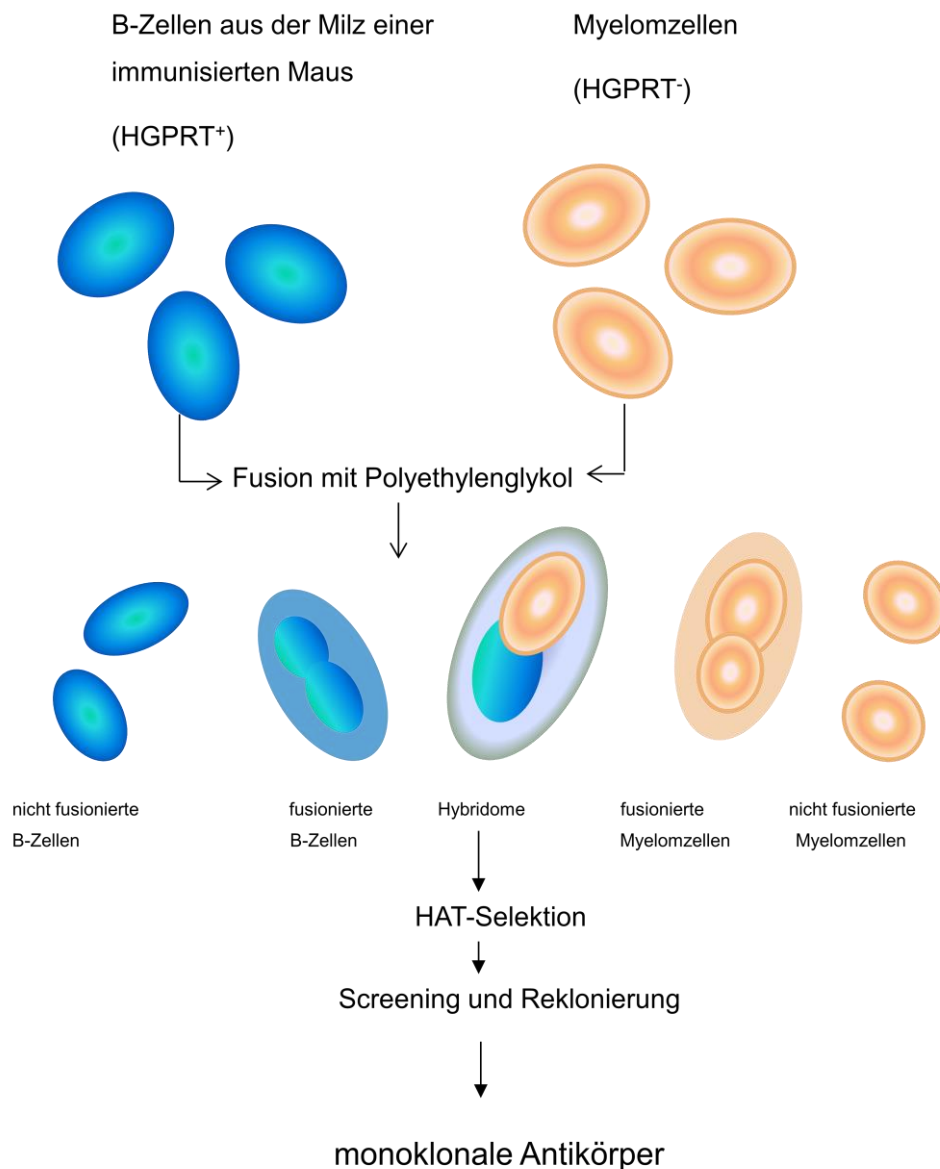


Abb. 2: Übersicht über die Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein.

1.4.2 Herstellung rekombinanter Antikörper

Bei rekombinanten Antikörpern handelt es sich um gentechnologisch hergestellte Antikörperfragmente, meist das antigenbindende Fragment (Fab-Fragment) des Antikörpers. Die Antikörper werden nicht mehr in einem Versuchstier, sondern *in vitro* in Bakterien hergestellt und bilden daher eine Alternative zu der klassischen Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern. Der kleinste rekombinante Antikörper, das Fragment des variablen Teils (Fv-Fragment), besteht nur noch aus den variablen Regionen der schweren und leichten Kette. Aufgrund des oft relativ schwachen Zusammenhalts des Fv-Fragments werden diese meist durch Peptidverbindungen stabilisiert und bilden das single-chain-Fv-Fragment (scFv-Fragment) (SCHMIEDL und DÜBEL, 2004).

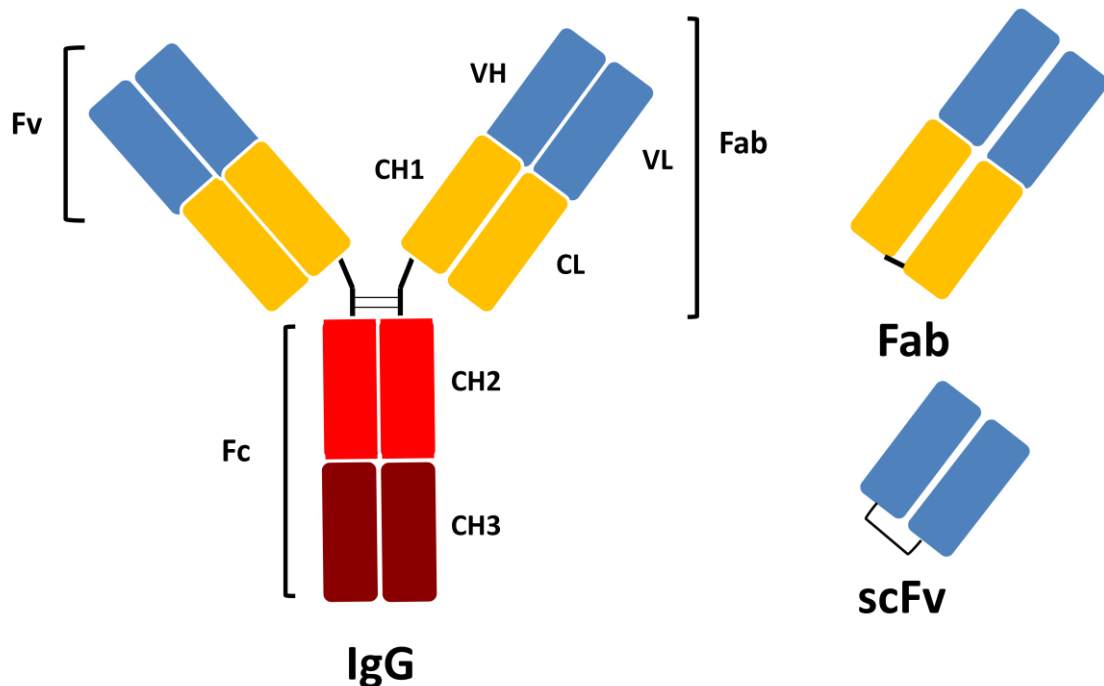


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Immunglobulins und verschiedenen, daraus abgeleiteten Antikörperfragmenten.

IgG= Immunglobulin der Klasse G, Fv= Fragment der variablen Region, Fc= konstantes Fragment, Fab= Fragment der Antigenbindung, CH/CL= konstante Region der schweren (heavy) bzw. leichten (light) Ig-Kette, VH/VL= variable Region der schweren (heavy) bzw. leichten (light) Ig-Kette; scFv-Fragment= single-chain-Fv-Fragment.

1.4.3 *In vitro* Selektion von Antikörperfragmenten durch Phagen-Display

Um Antikörperfragmente *in vitro* herzustellen, muss zuerst eine Genbibliothek erstellt werden. Genbibliotheken können entweder aus B-Lymphozyten-mRNA eines immunisierten Spenders oder aus einer Hybridomzelllinie gewonnen werden. Dazu werden durch PCR die Antikörpergene amplifiziert und mit dem Gen für das Hüllprotein eines Bakteriophagen fusioniert, wodurch das Fusionsprotein auf der Phagenoberfläche exprimiert wird. Phagen mit spezifischen Antikörperfragmenten werden durch festphasengebundenes Antigen selektiert und angereichert. Eine klonale Vervielfältigung dieser Phagen mit einem spezifischen Antikörper-Fusionsprotein erfolgt durch Infektion von *E. coli*. (BREITLING und DÜBEL, 1997a; SCHMIEDL und DÜBEL, 2004).

1.4.4 Antikörper gegen *B. anthracis*

1.4.4.1 Monoklonale Antikörper gegen *B. anthracis*

Die Mehrzahl der publizierten monoklonalen Antikörper gegen *B. anthracis* sind gegen die Toxin- oder Kapselkomponenten bzw. gegen Sporen gerichtet. Monoklonale Antikörper gegen vegetative Antigene sind dagegen nur selten beschrieben, da vegetative Antigene, wie z. B. Oberflächenstrukturen Kreuzreaktionen mit anderen *Bacillus* ssp. aufweisen können, während die Toxinkomponenten und die Kapsel spezifisch für *B. anthracis* sind. Bei monoklonalen Antikörpern gegen Komponenten von *B. anthracis* Sporen wurden teilweise auch Kreuzreaktionen mit Vertretern anderer *Bacillus* ssp. beobachtet.

Die von WITZMANN und BÖHM (1990) entwickelten monoklonalen Antikörper sind gegen ein nicht genauer charakterisiertes Oberflächenantigen der vegetativen Zellen gerichtet. Diese Antikörper wurden durch Immunisierung von Mäusen mit Formaldehyd-inaktivierten vegetativen Zellen eines Kapsel-negativen *B. anthracis* Stammes hergestellt und zeigten keine Reaktion mit Sporenantigenen. Allerdings zeigten einige dieser Antikörper Kreuzreaktionen mit anderen *Bacillus* Spezies.

Durch die Kombination des *B. anthracis* Poly- γ -D-Glutaminsäure- Antigens mit einem CD40-Antagonisten-Antikörper konnte in Mäusen eine spezifische Immunantwort hervorgerufen werden. Die so hergestellten monoklonalen Antikörper gegen die Kapsel von *B. anthracis* schützten über 90 % der Mäuse in einer intratrachealen Challenge mit *B. anthracis* Sporen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Möglichkeit, die Kapsel zur aktiven oder passiven Immunisierung einzusetzen. (KOZEL et al., 2004).

WANG et al. untersuchten 2009 mehrere *B. anthracis* spezifische monoklonale Antikörper, die durch Immunisierung von Mäusen mit Formaldehyd-inaktivierten Sporen erworben wurden. Überraschenderweise sind die hergestellten Antikörper gegen EA1, ein Protein der Oberflächenschicht der vegetativen Zellen, gerichtet. Wie bereits beschrieben handelt es sich bei EA1 um ein Protein, das als persistierender Bestandteil auch in Sporenpräparationen detektiert werden kann (WILLIAMS and TURNBOUGH, 2004). Dadurch könnte mit den von WANG et al. identifizierten monoklonalen Antikörpern ein Immunoassay entwickelt werden, der gleichzeitig beide Lebensformen von *B. anthracis*, vegetative Zellen und Sporen detektieren könnte.

Monoklonale Antikörper gegen das Anthrose enthaltende Tetrasaccharid des BclAs wurden durch Immunisierung von Mäusen mit dem synthetisch hergestellten Anthrosehaltigen Tetrasaccharid, gebunden an ein Trägerprotein hergestellt. Diese Antikörper detektierten in indirekten Immunfluoreszenzanalysen spezifisch native Sporen von *B. anthracis*. Bei Sporen von *B. cereus*, *B. subtilis* und *B. thuringiensis* konnte keine

Bindung nachgewiesen werden (TAMBORRINI et al., 2006). Allerdings zeigten diese Antikörper in Western Blots eine Kreuzreaktivität mit einigen der getesteten *B. cereus* Sporenllysate (TAMBORRINI et al., 2009). Diese Kreuzreaktionen wurden auch mit monoklonalen Antikörpern gegen ein synthetisches Anthrose-Rhamnose-Disaccharid beobachtet (TAMBORRINI et al., 2010).

Der Schwerpunkt der Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen die Toxine von *B. anthracis* liegt unter anderem in der Identifizierung von toxinneutralisierenden Antikörpern für den Einsatz als Milzbrand-Therapeutikum.

Toxinneutralisierende Antikörper können auf unterschiedliche Weise die einzelnen Toxinkomponenten neutralisieren. Murine Anti-PA und Anti-LF Antikörper können das Letaltoxin bzw. das Ödemtoxin *in vitro* neutralisieren, indem entweder die Bindung von PA an den Zellrezeptor bzw. die Bindung des LFs an zellgebundenes PA inhibiert wird (LITTLE et al., 1988; LITTLE et al., 1990), oder die proteolytische Spaltung des PAs durch Furin verzögert wird (RIVERA et al., 2006).

Eine passive Immunisierung mit einem Antikörper gegen die PA-Binde-Domäne des EFs und LFs schützt Mäuse zu 100 % in einer Challenge mit dem Letal- und dem Ödemtoxin, indem die physiologischen Effekte der Toxine neutralisiert werden. Diese Antikörper könnten in Kombination mit Antibiotika zur Immuntherapie gegen Milzbrand eingesetzt werden (KULSHRESHTHA and BHATNAGAR, 2011).

Die Generierung humaner monoklonaler Antikörper gegen PA und LF ist durch Verwendung peripherer Blutlymphozyten aus immunisierten Versuchspersonen und der Verwendung einer humanen-murinen Heteromyeloma-Zelllinie möglich. Obwohl die Anti-PA und Anti-LF Antikörper in den Seren der Versuchspersonen in einem Toxin-Neutralisationstest eine neutralisierende Aktivität aufwiesen, konnte nur ein monoklonaler Anti-LF Antikörper identifiziert werden, der *in vitro* eine toxinneutralisierende Aktivität aufwies (VOR DEM ESCHÉ et al., 2011).

1.4.4.2 Rekombinante Antikörper gegen *B. anthracis*

Die rekombinante Herstellung von Antikörpern und Antikörperfragmenten eröffnet viele neue Möglichkeiten. So können Antikörper durch Humanisierung, dem Austausch der speziesspezifischen konstanten Antikörperdomäne, verändert werden. Rekombinante Anti-Toxin Antikörper können zur Behandlung von *B. anthracis* Infektionen und in der klinischen Diagnostik eingesetzt werden. Für die spezifische Detektion von *B. anthracis* Sporen sind bereits scFv-Antikörper beschrieben (MECHALY et al., 2008), während rekombinante Antikörper gegen vegetative Antigene bisher nicht beschrieben wurden.

Humane rekombinante Antikörper können z. B. mittels PCR aus B-Lymphozyten, die Anti-PA-Antikörper produzieren hergestellt werden (MASRI et al. 2007). Das von STEINIGER et al. (2007) isolierte scFv-Fragment gegen zellgebundenes PA weist eine neutralisierende Aktivität gegen den zytotoxischen Effekt des Letaltoxins auf und könnte potentiell zur passiven Immunisierung im Falle einer Exposition mit *B. anthracis* verwendet werden.

Raxibacumab (Abthrax) ist ein humaner rekombinanter Anti-PA IgG₁, der die Bindung von PA an den Anthrax-Toxin-Rezeptor inhibiert. In klinischen Studien in Menschen konnten keine dosislimitierenden Nebenwirkungen beobachtet werden, dies unterstützt den Einsatz von Raxibacumab als neues Therapeutikum zur Behandlung einer Infektion mit *B. anthracis* (ADUSUMILLI, 2010; MAZUMDAR, 2009; MIGONE et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit der rekombinanten Herstellung von Antikörpern stellt die Bildung von bifunktionellen Antikörpern durch Fusion eines scFv-Fragments mit einem Protein dar. Bei diesen Proteinen kann es sich z. B. um eine alkalische Phosphatase handeln, die zwei Anti-PA-scFv-Fragmente miteinander verbindet und dadurch die Affinität erhöht (WANG et al., 2006). Eine Weiterentwicklung dieser Methodik stellt die von WYCOFF et al. (2011) erfolgte Fusion der extrazellulären Domäne des Toxin-Rezeptors und der humanen konstanten IgG Domäne dar. Dieses Fusionsprotein weist *in vitro* eine Toxin-neutralisierende Aktivität auf.

Schimpansen Immunglobuline sind nahezu identisch mit humanen Immunglobulinen, daher ist es möglich, aus Schimpansen gewonnene Antikörper ohne weitere Modifikationen in Menschen einzusetzen. Die Arbeitsgruppe um CHEN (2009 und 2011) isolierte aus immunisierten Schimpansen toxinneutralisierende Fab-Fragmente gegen LF bzw. gegen das Poly- γ -D-Glutaminsäure- Antigen der Kapsel und konvertierten diese zu vollständigen Immunglobulinen mit humaner konstanter Region. Diese humanisierten Fab-Fragmente gegen die Kapsel lieferten nicht nur einen prophylaktischen Schutz in einer murinen intratrachealen Challenge mit Sporen von *B. anthracis*, sondern können auch nach erfolgter Infektion mit *B. anthracis* einen signifikanten Schutz bieten. Eine Kombination aus Anti-Toxin und Anti-Kapsel Antikörper könnte die protektive Wirksamkeit und dadurch das Schutzspektrum bei der Behandlung einer *B. anthracis* Infektion erhöhen.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Der Einsatz von *B. anthracis* als biologische Waffe im Herbst 2001 in den USA verdeutlichte den Bedarf an schnellen und spezifischen Diagnostikmethoden. Zusätzlich wurden die Limitierungen von bestehenden molekularbiologischen und bakteriologischen Diagnosetechniken, bei verschiedenen untersuchten Proben, in der Praxis deutlich. Seitdem wurde eine Fülle neuer diagnostische Techniken, die auf Antikörper-Antigen-Reaktionen basieren, entwickelt. Allerdings sind viele in der Literatur beschriebenen Nachweismethoden an technische Ausrüstung oder an Labore der Biosicherheitsstufe 3 gekoppelt.

Bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten gegen *B. anthracis* liegt der Schwerpunkt bei der Identifizierung von toxinneutralisierenden Antikörpern, die sich als Therapeutikum bei einer Infektion mit *B. anthracis* einsetzen lassen oder bei der Diagnostik von *B. anthracis* Sporen. Bei vegetativen Antigenen sind, aufgrund von Kreuzreaktionen mit anderen Vertretern der *Bacillus* Gruppe, nur eine handvoll spezifischer Antigene in der Literatur beschrieben: das EA1-Antigen der Oberflächenschicht vegetativer Zellen und das Poly- γ -D-Glutaminsäure-Antigen der Kapsel.

Der Ascoli Präzipitin Test stellt eine schnelle und kostengünstige Diagnostikmethode dar, bei dem polyklonales Serum gegen eine thermostabile Antigenpräparation von *B. anthracis* eingesetzt wird (ASCOLI, 1911).

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *B. anthracis* spezifische thermostabile Antigene. Diese monoklonalen Antikörper könnten die bisher im Ascoli Präzipitin Test beobachteten Kreuzreaktionen mit anderen *Bacillus* ssp. eliminieren und dadurch eine schnelle und spezifische Diagnostik von *B. anthracis*, unter anderem auch in Umweltproben, die zusätzlich weitere *Bacillus* ssp. enthalten können, ermöglichen.

Weitere Vorteile eines auf thermostabilen Antigenen basierenden Diagnostikverfahrens sind zum einen die schnellere Durchführbarkeit des Tests, da das zu untersuchende Material direkt eingesetzt werden kann. Des Weiteren handelt es sich um eine kostengünstige Nachweismethode, bei der keine Geräte oder teure Chemikalien, wie z. B. bei molekularbiologischen Methoden notwendig, benötigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien kann den Anhängen 6.1 und 6.2 entnommen werden.

2.1.1 Verwendete *Bacillus* ssp. Isolate

Die *Bacillus* ssp. Isolate, die zur Identifizierung von *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen, im Screening der Hybridome und zur Ermittlung der Spezifität verwendet wurden, sind im Anhang 6.3 aufgelistet.

2.1.2 Zelllinien

Die L929 Fibroblastenlinie und die murinen Myelomzellen SP2/0-Ag14 stammen aus dem Institut für molekulare Medizin und Zellforschung, Tumormunologie/Vakzine, Prof. Dr. Bessler, Freiburg. Die murinen Knochenmark-Makrophagen wurden am Institut für Umwelt- und Tierhygiene aus BALB/c Mäusen gewonnen. Die Gewinnung dieser Zellen wurde als intern anzeigepflichtiger Tierversuch an den Tierschutzbeauftragten der Universität Hohenheim gemeldet und entsprechend dokumentiert.

2.1.3 Tiere und Tierhaltung

- New Zealand White (NZW) Kaninchen (weiblich)
- BALB/c- Mäuse (weiblich)

Alle Tiere stammen von Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln und wurden in der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Hohenheim gehalten.

2.2 Herstellung der thermostabilen Antigenpräparationen

Verwendete Medien und Puffer:

Blutagar:

Columbia-Agar mit 5 % Schafblut

MYA-Agar:

10 g/l	Pepton aus Fleisch
2 g/l	Hefeextrakt
40 mg/l	Mangansulfat
15 g/l	Agar

TSA mit NaHCO₃:

Trypton-Soja-Agar mit 7 % NaHCO₃

TSB-Medium:

Kaseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
0,9 mM	KH ₂ PO ₄
5,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
H ₂ O deion.	

Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Zusätze zu den Medien wurden nach Abkühlung auf ungefähr 50 °C zugegeben.

Für die Identifizierung von *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen wurden Antigenpräparationen von den im Anhang 6.3 aufgeführten Isolaten 1-8 hergestellt. Es wurden sowohl Präparationen von vegetativen Zellen (Isolate 3-5 und 7-8) als auch von Sporensuspensionen (Isolate 1-2 und 6) hergestellt.

2.2.1 Ascoli Antigen Präparation (Isolat 4)

Die Ascoli Antigen Präparation ist ein kommerziell erhältliches Produkt der Firma C. C. Pro, Oberdorla, das zusammen mit Maultier-Positivserum als Kit für die Ascoli Präzipitin Reaktion angeboten wurde. Nach Aussagen der Firma wird das Antigen nach OIE Standardmethoden aus dem vollvirulenten *B. anthracis* Stamm „Letonice“ extrahiert (OIE, 2004).

2.2.2 Anthraxin Präparation (Isolat 5)

Die Anthraxin Präparation stammt von Prof. Shlyakhov, Tel-Aviv, Israel und wurde aus dem nicht virulenten toxigenen *B. anthracis* Stamm 34F2 (Sterne) hergestellt. Die Bakterien wurden in „Brain Heart Infusion Agar“ mit Hefe-Extrakt angezogen, pelletiert und mit Äther und Chloroform entfettet. Das resultierende Pulver wurde für 3 h in 1 % Essigsäure gekocht und der resultierende Überstand filtriert (SHLYAKHOV et al., 2004).

2.2.3 Vegetative thermostabile Antigenpräparationen der *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Isolate B197 und B334 (Isolate 7 und 8)

Die Bakterien wurden auf Blutagar angezogen und in TSB überimpft. Am nächsten Tag wurden mit 8 ml der Übernachtskultur 200 ml TSB angeimpft und 6 h bei 37°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4000 x g für 20 min wurde das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und für 30 min bei 100°C im Thermoblock gekocht. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 x g für 20 min wurde der resultierende Überstand mit einem 45 µm Spritzenfilter sterilfiltriert.

2.2.4 Vegetative thermostabile *B. anthracis* Antigenpräparation (Stamm A30, Isolat 3)

Um die Kapselbildung des Stammes A30 zu gewährleisten, wurden die Bakterien auf TSA mit 7 % NaHCO₃ ausgestrichen und nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Kapselbildung durch eine Tuschekontrastierung verifiziert. Agaroberflächenkulturen wurden mit PBS abgespült und die Zellen pelletiert. Die weitere Präparation des Antigens entspricht der unter Punkt 2.2.3 beschriebenen Methode für vegetative *Bacillus* ssp. Antigenpräparationen. Die so hergestellte Präparation wird im folgenden als A30PBS bezeichnet. Eine weitere Präparation wurde mit 0,5 % Phenol in PBS gekocht, im folgenden als A30 Phenol (= A30Ph) bezeichnet. Um das Phenol aus der Präparation zu entfernen, wurden die Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt und dialysiert. Das Proteinpellet wurde in PBS aufgenommen und das Ammoniumsulfat mittels Dialyse gegen PBS entfernt.

2.2.5 Thermostabile Sporenpräparationen (*B. anthracis* Stamm A93 bzw. A2 und *B. cereus* B10, Isolate 1 bzw. 2 und 6)

Für die thermostabilen Antigenpräparationen aus Sporen wurden Sporensuspensionen mit ungefähr 5×10^8 – 5×10^9 Sporen abzentrifugiert und wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben in 2 ml PBS gekocht.

2.2.6 Gewinnung von Sporen für die Herstellung thermostabiler Sporenpräparationen

Vegetative Zellen wurden auf Blutagar angezogen, eine Einzelkolonie in 50 ml TSB überführt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit 3 ml dieser Übernacht-Kultur wurden Roux-Flaschen mit MYA-Agar beschichtet und bei 30 °C für 8-10 Tage bebrütet. Der Grad der Versporung wurde regelmäßig mikroskopisch überprüft. Um die Sporen zu gewinnen, wurden die Agaroberflächenkulturen mit PBS abgespült und bei 4000 x g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert, bei 120 °C für 20 min autoklaviert und erneut bei 4000 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem 45 µm Spritzenfilter steriltfiltriert. Die thermostabilen Sporenpräparationen wurden wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben hergestellt.

2.2.7 Analyse der thermostabilen Antigenpräparation

Die hergestellten thermostabilen Antigenpräparationen, die zur Immunisierung der Kaninchen und der anschließenden Identifizierung von *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen herangezogen wurden, hat Herr Yawar 2006 im Rahmen seiner

2. Material und Methoden

Masterarbeit in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), sowie einem Western Blot auf deren Komplexität und Immunogenität untersucht (siehe Abb. 4).

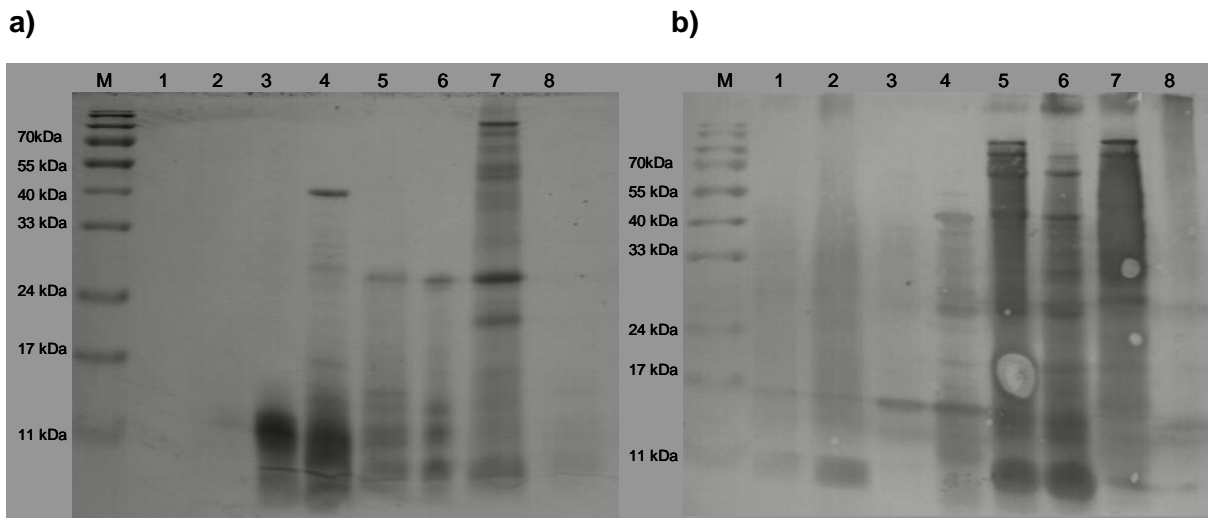


Abb. 4: Analyse der acht thermostabilen Antigenpräparationen, die für die Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden.

- a) Coomassie gefärbtes 12 % SDS PAGE Gel und
b) mit Ascoli Test Positivserum entwickelter Western Blot eines 12 % Acrylamidgeles

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

2.3 Allgemeine Proteintechniken

2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Antigenpräparationen wurde der Coomassie Protein Assay, basierend auf der Bradford Methode eingesetzt. Zur Kalibrierung der Farbreaktion wurde Bovines Serum Albumin (BSA) als Standardprotein in den Konzentrationen 0-500 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach Herstellerangaben bei 595 nm in Mikrotiterplatten.

2.3.2 Ammoniumsulfatfällung von Proteinen

Bei der Ammoniumsulfatfällung handelt es sich um eine einfache Methode zur Fällung und Konzentration von Proteinen. Für die Ammoniumsulfatfällung der vegetativen *B. anthracis* A30Phenol Antigenpräparation wurde zu der auf Eis stehenden Proteinlösung eine Anfangskonzentration von 65 % Ammoniumsulfat zugegeben. Über einen Zeitraum von einer Stunde wurde die Endkonzentration auf 70-85 % Ammoniumsulfat erhöht.

Durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 min wurden die gefällten Proteine pelletiert, in PBS resuspendiert und dialysiert.

Die Ammoniumsulfatfällung wurde auch zur Konzentrierung der Antikörper aus Zellkulturüberstand verwendet. Durch die Aufnahme des Pellets in kleineren Volumina ist somit eine Aufkonzentrierung der Antikörper möglich.

Die Zellkulturüberstände wurden für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert, die Überstände auf Eis gestellt und das gleiche Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (4 mol/l bei 4 °C) tropfenweise zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g für 30 min, das resultierende Pellet wurde in 4 ml PBS resuspendiert und über Nacht gegen PBS dialysiert.

2.3.3 Dialyse von Proteinlösungen

Durch die Verwendung eines semipermeablen Dialyseschlauches können Proteinlösungen entsalzt oder umgepuffert werden. Die Dialyseschläuche mit einer molekularen Ausschlussgröße von 2 kDa wurden zugeschnitten, mit Dialysepuffer benetzt und zu maximal 2/3 des Volumens mit der proteinhaltigen Lösung befüllt. Die Dialyse wurde auf einem Magnetrührer bei 4 °C durchgeführt. Ein Pufferwechsel erfolgte nach zweimal nach 1 h und ein drittes Mal nach 12 h.

2.3.4 Aufkonzentrierung von Proteinen durch den Einsatz von Centricons®

Mit Centricons®, kleinen Zentrifugalfiltereinheiten, können Proteinlösungen sehr schnell konzentriert und umgepuffert werden. Die verwendeten Centricons® enthalten eine Cellulosemembran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa. Laut Herstellerangaben kann das Volumen der Probe von max. 2 ml auf 25 µl reduziert werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.4 Immunisierung der Kaninchen

Um potentielle *B. anthracis* spezifische thermostabile Antigene zu identifizieren, wurden acht NZW-Kaninchen mit jeweils einer der acht unter Punkt 2.2 beschriebenen thermostabilen Antigenpräparationen immunisiert.

Die Tiere erhielten jeweils vier Immunisierungen, wobei die ersten drei Immunisierungen, im Abstand von 4 Wochen von Herr Yawar 2006 im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt wurden. Fünf bzw. 6 Monate nach Beginn der Immunisierung erfolgte die 4. Immunisierung. Bei jeder Immunisierung wurde das RIBI Adjuvans System (MPL®+ TDM+ CWS System) eingesetzt, das aus den Komponenten Monophosphoryl Lipid A

2. Material und Methoden

(MPL, isoliert aus *S. minnesota*), Trehalose Dicorynomycolat (TDM) und Zellwandskeletton (CWS, aus Mykobakterien) besteht. Als Vorbereitung für die Immunisierungen wurde eine Ampulle RIBI Adjuvans System in 2 ml endotoxinfreiem PBS rekonstituiert.

Jede Immunisierungsdosis bestand aus 0,5 ml RIBI Adjuvans und der in Tab. 1 aufgeführten Antigenkonzentrationen. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte subkutan, wobei eine Hälfte der Dosis in den Nacken und die zweite Hälfte in das Gesäß der Kaninchen injiziert wurde. Die Immunisierung der Kaninchen wurde als anzeigepflichtiger Tierversuch durch das Regierungspräsidium Stuttgart genehmigt und entsprechend dokumentiert.

Tab. 1: Übersicht über die Konzentration der thermostabilen Antigenpräparation für die 4. Immunisierung der Kaninchen.

4. Immunisierung		
Antigenpräparation	Eingesetztes Volumen	Antigenkonzentration
Ascoli Antigen (Isolat 4)	0,5 ml	36 µg
Anthraxin (Isolat 5)	0,5 ml	100 µg
A30PBS (Isolat 3)	0,5 ml	160 µg
A30Ph (Isolat 3)	0,5 ml	60 µg
B197 (Isolat 7)	0,5 ml	115 µg
B334 (Isolat 8)	0,5 ml	189 µg
Ames Sporen (Isolat 1)	0,5 ml	142 µg
B10 Sporen (Isolat 6)	0,5 ml	45 µg

Um den Anstieg des Antikörpertiters zu ermitteln hat Herr Yawar den immunisierten Kaninchen zu Beginn, sowie vor jeder weiteren Immunisierung Blut entnommen. Zwei Wochen nach der 4. Immunisierung wurde den Kaninchen ein letztes Mal Blut entnommen, bevor diese nach weiteren zwei Wochen entblutet wurden. Das abgenommene Blut wurde nach Koagulation bei Raumtemperatur für 10 min bei 4 °C bei 4000 x g zentrifugiert und anschließend das Serum abgenommen.

2.5 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Verwendete Puffer und Lösungen:

<u>1 x Probenpuffer (20 ml):</u>	
195 mM	DTT
0,07 mM	Bromphenolblau
20 %	10 % SDS
8 %	Sammelgelpuffer
12,5 %	Glycerin

2. Material und Methoden

Trenngelpuffer, pH 8,8 (100 ml):

1,5 M Tris-Base

H₂O deion.

Sammelgelpuffer, pH 6,8 (100 ml):

1 M Tris-Base

H₂O deion.

Gelelektrophoresepuffer (1 l), pH 8,3:

0,2 M Glycin

25 mM Tris-Base

0,1 % 10 % SDS

H₂O deion.

Für die Analyse der thermostabilen Antigenpräparationen wurden 15 %-ige Acrylamidgele mit einer Dicke von 0,6 mm eingesetzt. Die Zusammensetzung der Acrylamidgele ist in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Zusammensetzung der Acrylamidgele.

Lösungen	Sammelgel	Trenngel (15 %)
Acrylamid (40 %-ig)	900 µl	5,4 ml
Bisacrylamid (2 %-ig)	900 µl	3,99 ml
Trenngelpuffer	-	3,75 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-
SDS (10 %-ig)	100 µl	150 µl
Glycerin	-	1,5 ml
H ₂ O deion.	6,8 ml	60 µl
APS (10 %-ig)	75 µl	99 µl
TEMED	7,5 µl	9,9 µl

Für jede Probe wurden 0,5 µg Protein mit 1x Probenpuffer auf 20 µl aufgefüllt und für 5 min bei 99°C gekocht. Um das ungefähre Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde ein „prestained“ Marker mit einem Standardproteingemisch im Bereich von 11-170 kDa aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für 1,5 h.

Nach der Elektrophorese wurden eine Silberfärbung oder ein Western Blot durchgeführt.

2.6 Silberfärbung von Acrylamidgelen

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung (500 ml):

40 % Ethanol
10 % Essigsäure
H₂O deion.

Reduktionslösung (50 ml):

30 % Ethanol
0,25 % Glutardialdehyd
8,05 mM Natriumthiosulfat
829 mM Natriumacetat
H₂O deion.

Färbelösung (Silberlösung, 500 ml):

14,7 mM AgNO₃
H₂O deion.
bei 4 °C lagern,
20,5 µl/50 ml Formalin frisch dazugeben

Entwicklerlösung (500 ml):

236 mM Na₂CO₃
H₂O deion.
bei 4 °C lagern,
10,5 µl/50 ml Formalin frisch dazugeben

Stoplösung (500 ml):

39 mM Natrium-EDTA
H₂O deion.

Die Silberfärbung ist eine Methode, die bedeutend sensitiver ist als eine Coomassie Blau Färbung. Während bei der Coomassie Blau Färbung 0,1- 2 µg Protein pro Bande nachgewiesen werden können, lassen sich bei der Silberfärbung weniger als 1 ng Protein pro Bande nachweisen.

Das Acrylamidgel wurde 30 min mit Fixierlösung und anschließend 30 min in Reduktionslösung inkubiert. Nach drei Waschschritten für jeweils 5 min wurde das Gel für 20 min gefärbt und anschließend im Dunkeln mit Entwicklerlösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Eine weitere Entwicklung der Proteinbanden wurde durch Zugabe der Stoplösung unterbunden.

2.7 Western Blot und Immundetektion

Puffer und Lösungen für den Western Blot und die Immundetektion:

Transferpuffer (1 l):

38 mM Glycin
48 mM Tris-Base
1,3 mM SDS
20 % Methanol
H₂O deion.

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS, 1 l):

4 M NaCl
1 M Tris-Base, pH 7.4
H₂O deion.

TBST (TBS-Tween):

TBS + 0,05 % Tween[®] 20

Blockpuffer Stocklösung:

90 % Maleinsäurepuffer
10 % Blockierungsreagenz

Blockpuffer:

3 ml Blockpuffer Stocklösung und 17 ml TBS

Antikörper-Verdünnungs-Lösung:

0,5 ml Blockpuffer Stocklösung, 9,5 ml TBS

Maleinsäurepuffer, pH 7,5:

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
H₂O deion.
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

Citrat-Phosphat-Puffer (100 ml), pH 5:

38 mM Zitronensäure
168 mM Na₂HPO₄
H₂O deion.

AEC-Lösung:

200 µl Aminoethylcarbazol Stammlösung (10 mg/ml in Ethanol)
10 µl H₂O₂ (30 %)
10 ml Citrat-Phosphat-Puffer

Zur Vorbereitung des Western Blots wurden die Filterpapiere, die Acrylamidgele und die zuvor mit Methanol benetzte Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran in Transferpuffer getränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Semi-Dry-Blotkammer für 1 h bei 80 mA. Im Anschluss daran wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBS gewaschen und anschließend für 1 h mit Blockpuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit den polyklonalen Kaninchen- oder Mäuseseren inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte, nach drei Waschschritten, die einstündige Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper in einer Verdünnung von

2. Material und Methoden

1:1000. Im Anschluss daran wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen, mit deionisiertem Wasser abgespült und mit der frisch angesetzten AEC-Lösung entwickelt. Nach der Visualisierung der Proteine wurde die Reaktion mit deionisiertem Wasser abgestoppt und mittels Videokamera dokumentiert.

Als Sekundärantikörper wurden eingesetzt:

- Anti-Maus polyvalent Immunglobulin (IgG, IgA, IgM) Peroxidase Konjugat
- Ziege Anti-Kaninchen IgG (H& L) Peroxidase Konjugat

2.8 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Puffer und Lösungen für den ELISA:

Beschichtungspuffer (250 ml), pH 9,5:

100 mM NaHCO₃
34 mM Na₂CO₃
H₂O deion.

Waschpuffer (PBS-Tween), pH 7,4:

PBS und 0,05 % Tween[®] 20

Blockpuffer:

PBS mit 10 % FKS

Substratlösung (ABTS):

10 ml 10 x ABTS-Puffer
90 ml H₂O deion.
2 x 50 mg ABTS Tabletten

Mit Hilfe eines ELISAs kann zum einen der Antikörpertiter eines Serums bestimmt werden, des Weiteren kann durch Modifikation der eingesetzten Parameter auch die Immunglobulinklasse eines Antikörpers, sowie dessen Spezifität bestimmt werden.

2.8.1 ELISA- Protokoll

Jede Kavität einer Mikrotiterplatte wurde mit 0,4 µg der jeweiligen thermostabilen Antigenpräparation in 100 µl Beschichtungspuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Mikrotiterplatte zweimal mit Waschpuffer in einem Mikrotiterplatten-Waschgerät gewaschen und für 1 h mit Blockpuffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Tween wurden die zu untersuchenden Antikörper beziehungsweise Seren aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und jede Kavität mit 100 µl des 1:2000 in Blockpuffer verdünnten Antikörperkonjugats für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechs Waschschritten wurde in jede Kavität 100 µl ABTS Substratlösung

gegeben, für 30 min im Dunkeln inkubiert und die OD bei 414 nm im Mikrotiterplattenlesegerät ermittelt.

2.8.2 Bestimmung des Antikörpertiters im ELISA

Zur Antikörpertiterbestimmung wurden die Seren bzw. monoklonalen Antikörper in einer Verdünnung von 1:2 austitriert. Als Antikörperkonjugat wurden das Anti-Kaninchen Konjugat oder das Anti-Maus Konjugat verwendet.

Zur Auswertung und Bestimmung des Antikörpertiteranstiegs wurden die gemessenen Optischen Dichten graphisch dargestellt und der Antikörpertiter ermittelt. Als Antikörpertiter wurde der reziproke Wert der Serumverdünnung, bei der eine OD_{414nm} von $\geq 0,1$ gemessen wurde.

2.8.3 Bestimmung der Immunglobulinklasse

Ein wichtiges Charakteristikum von Antikörpern ist die Bestimmung der Immunglobulinklasse und der Immunglobulinsubklasse. Um diese zu bestimmen wurden die im Zellkulturüberstand vorhandenen monoklonalen Antikörper im ELISA mit den folgenden Antikörperkonjugaten in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert:

- . Ratte Anti-Maus IgG₁ Peroxidase Konjugat
- . Ratte Anti-Maus IgG_{2a} Peroxidase Konjugat
- . Ratte Anti-Maus IgM Peroxidase Konjugat

Da diese Antikörperkonjugate jeweils nur mit einem spezifischen Immunglobulinsubtyp reagieren, kann die Immunglobulinklasse und die Subklasse der monoklonalen Antikörper bestimmt werden.

2.8.4 Screening der Hybridome im ELISA

Wenn sich nach der Reklonierung positiver Hybridome erneut Zellklone gebildet hatten, wurden diese im ELISA erneut auf die Produktion spezifischer Antikörper gegen die thermostabilen Antigene von *B. anthracis* getestet.

In jedem Screening wurden mehrere ELISAs mit unterschiedlich beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt.

2. Material und Methoden

In den ersten 14 Screenings wurden folgende Antigenpräparationen eingesetzt:

- eine vegetative thermostabile *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (Isolat 3)
- eine Mischung aus 20 verschiedenen vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Isolaten („Bac-Mischung“), in Kombination mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation (Isolate 6-25), die ab dem 5. Screening eingesetzt wurde
- eine Antigenpräparation von Sporen des *B. anthracis* Ames bzw. A 2 Stamms (Isolate 1 bzw. 2), die ab dem 6. Screening eingesetzt wurde.

Bei den Screenings der V-Linie (vegetative Linie) wurden folgende Antigenpräparationen eingesetzt:

- eine vegetative thermostabile *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (Isolat 3)
- eine Mischung aus 20 verschiedenen vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Isolaten (= „Bac-Mischung“; Isolate 6-25)

Bei den Screenings der S-Linie (Sporenlinie) wurden folgende Antigenpräparationen eingesetzt:

- eine Antigenpräparation von Sporen des *B. anthracis* A2-Stamms (Isolat 2)
- eine Antigenpräparation von Sporen des *B. cereus* B10-Stamms (Isolat 6)

Alle Antigenpräparationen wurden wie unter Punkt 2.2 beschrieben hergestellt.

Die Zellkulturüberstände wurden unverdünnt eingesetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Als positive Kontrolle in den ELISAs wurden die folgenden Kaninchenserum in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt:

- Serum des mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisierten Tieres
- eine Mischung der Seren der mit den vegetativen *Bacillus* ssp. B197 und B334 Antigenpräparationen immunisierten Tiere
- Serum des mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation immunisierten Tieres
- Serum des mit der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation immunisierten Tieres

In den ersten 14 Screenings galten Klone als positiv, bei denen in dem mit der vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparation, sowie in dem mit der *B. anthracis* Sporenantigenpräparation beschichteten ELISA eine OD_{414nm} von deutlich über 0,1 ermittelt wurde. Zusätzlich sollten positive Klone bei dem ELISA, beschichtet mit der Mischung aus 20 verschiedenen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen,

2. Material und Methoden

sowie mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation, eine OD_{414nm} von deutlich unter 0,05 aufweisen.

Bei den V- und S-Screenings galten diejenigen Klone als positiv, die in dem mit den Antigenpräparationen von *B. anthracis* (vegetativ bzw. Sporen) beschichteten ELISAs die höchste OD_{414nm} und den niedrigsten Wert in dem ELISA, beschichtet mit den *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen ergaben.

Positiv getestete Klone wurden in einer Verdünnung von 1:600 jeweils auf einer neuen Mikrotiterplatte ausgesät und 7-10 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.8.5 Ermittlung der Spezifität der monoklonalen Antikörper

Für die Bestimmung der Spezifität der gereinigten monoklonalen Antikörper wurden die 20 vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) thermostabilen Antigenpräparationen (Isolate 6-25), die bereits in der sogenannten „Bac-Mischung“ im Screening der Hybridome eingesetzt wurden, einzeln untersucht. Zusätzlich wurden Sporenpräparationen von 10 verschiedenen *Bacillus* ssp (Isolate 6-8, 19, 26-31) hergestellt.

Alle thermostabilen Antigenpräparationen wurden wie unter Punkt 2.2 beschrieben hergestellt.

2.9 Anionenaustauschchromatographie (AEX) mittels FPLC

Verwendete Puffer und Lösungen:

Äquilibrationspuffer (500 ml):
20 mM Tris-base
H₂O deion.

Elutionspuffer (500 ml):
20 mM Tris-Base
1 M NaCl
H₂O deion.

Alle Puffer wurden vor der Anwendung über einen 0,45 µm Flaschenhalsfilter sterilfiltriert und anschließend entgast.

Um die identifizierten potentiell *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigene aus der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation zu fraktionieren, wurde eine Anionenaustauschchromatographie mittels FPLC durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde die vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation in Dialyseschläuchen mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 2 kDa gegen den Äquilibrationspuffer dialysiert. Die Anionenaustauschsäule HiTrap Q HP mit einem Säulenvolumen von 1 ml wurde mit einer

2. Material und Methoden

Durchflussrate von 1 ml/min mit 10 ml Äquilibrationpuffer vorbereitet. Nach der Zugabe der gefilterten vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation mit einer Proteinmenge von 1,5- 2 mg, wurde die Säule mit 5 ml Äquilibrationpuffer gewaschen. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden durch einen ansteigenden Salzgradienten eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Zur Auswertung der Reinigungsläufe wurde ein Western Blot oder eine Silberfärbung durchgeführt und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt.

2.10 Affinitätschromatographie mittels FPLC

Verwendete Puffer:

Bindepuffer, pH 7,5:

20 mM Na₂HPO₄

1 M K₂SO₄

Elutionspuffer (500 ml), pH 7,5:

20 mM Na₂HPO₄

H₂O deion.

Regenerationspuffer (500 ml):

20 mM Na₂HPO₄

30 % Isopropanol

H₂O deion.

Alle Puffer wurden vor der Anwendung über einen 0,45 µm Flaschenhalsfilter sterilfiltriert und anschließend entgast.

Zur Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberstand wird häufig eine Affinitätschromatographie an Protein G oder Protein A verwendet. Antikörper der Immunglobulinklasse M lassen sich im Allgemeinen nicht mit Hilfe von Protein G oder Protein A aufreinigen. Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper der Klasse M mit Hilfe der HiTrap-IgM-Purification-HP Säule (=IgM-Säule) aus den gesammelten Zellkulturüberständen aufgereinigt. Die IgM-Säule enthält ein thiophiles Adsorptionsmedium, das aus an Sepharose gekoppeltes Mercaptopyridin besteht und selektiv bestimmte Proteine, unter anderen auch Immunglobuline, adsorbiert (PORATH et al., 1985).

Die IgM-Säule wurde mit einem Säulenvolumen von 1 ml und einer Durchflussrate von 1ml/min mit 5 ml Bindepuffer äquilibriert. Nach Zugabe von 20 mM Na₂HPO₄ und 1 M K₂SO₄ zu ungefähr 120 ml Zellkulturüberstand, wurde dieser auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss daran wurde die Säule mit 15 ml Bindepuffer gewaschen. Die an die Säule gebunden IgM Antikörper wurden mit 12 ml Elutionspuffer eluiert und in

2. Material und Methoden

1 ml Fraktionen gesammelt. Im Anschluss daran wurden die IgM-Säule zur weiteren Verwendung mit 7 ml Regenerationspuffer gespült.

Um die in dieser Arbeit hergestellten IgM Antikörper aus Zellkulturüberstand aufzureinigen wurden die in Tab. 3 aufgeführten Modifikationen des Salzgehaltes im Bindepuffer und dem Zellkulturüberstand getestet.

Tab. 3: Übersicht über die Optimierung der Aufreinigung monoklonaler Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Variation	Salzkonzentration	
	Bindepuffer (20 mM Na ₂ HPO ₄), pH 7,5	Zellkulturüberstand
1	0,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄
2	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄
3	1 M K ₂ SO ₄	20 mM Na ₂ HPO ₄ 1 M K ₂ SO ₄

Zur Auswertung der Reinigungsläufe wurden die Fraktionen in einer 15 % - igen SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung aufgetrennt und die Reaktivität der gereinigten Antikörper in einem ELISA bestimmt.

2.11 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die thermostabilen Antigene von *B. anthracis* wurden Mäuse mit der partiell gereinigten vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisiert. Die in der Milz der immunisierten Maus enthaltenen B-Lymphozyten wurden mit der murinen SP2/0-Ag14 Myelomzelllinie mittels Hybri-Max™ Polyethylenglykol Lösung fusioniert und die entstandenen Hybridome im ELISA auf die Produktion spezifischer Antikörper getestet. Nach der Selektion einer monoklonalen Zelllinie wurden die produzierten monoklonalen Antikörper gereinigt und charakterisiert.

2.11.1 Immunisierung der Mäuse

Die aus der Anionenaustauschchromatographie stammende partiell gereinigte vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation wurde verwendet, um BALB/c Mäuse zu immunisieren. Wegen den zum Teil geringen Proteinkonzentrationen der erhaltenen Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie, wurden die Fraktionen mit Hilfe von Centricons® mit einer molekularen Ausschlussgröße von 2 kDa aufkonzentriert und dabei gleichzeitig in PBS umgepuffert. Mit dieser partiell gereinigten und aufkonzentrierten

2. Material und Methoden

Proteinpräparation wurden drei BALB/c Mäuse dreimal im Abstand von zwei Wochen subkutan immunisiert. Bei der 1. Immunisierung wurde als Adjuvans das bereits unter 2.4 beschriebene RIBI Adjuvans System (MPL[®]+ TDM+ CWS System) verwendet. Für die 2. und 3. Immunisierung wurde das Lipopeptid Adjuvans (EMC Microcollections) verwendet, da die Produktion des RIBI Adjuvans System von der Firma Sigma-Aldrich eingestellt wurde. Lipopeptide, die von Hauptkomponenten bakterieller Zellwänden abgeleitet sind, bilden ein starkes nichttoxisches Adjuvans (MITTENKÜHLER et al., 1997; HOFFMANN et al., 1990). Das Lipopeptid Adjuvans der Firma EMC Microcollections besteht aus einer Mischung der synthetischen Lipopeptide Pam3Cys (N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-Cystein) und Pam3Cys-Ser-Lys₄, die an ein T-Helferzell-Epitop gekoppelt sind. Diese synthetischen Lipopeptide sind starke Adjuvanzien der humoralen und zellulären Immunantwort. Zur Immunisierung wurde eine sterile Ampulle Lipopeptid Adjuvans in 1,5 ml steriler Kochsalzlösung gelöst und mit der jeweiligen, in Tab. 4 aufgelisteten Antigenmenge vermischt.

Die Immunisierung der Mäuse wurde als anzeigepflichtiger Tierversuch durch das Regierungspräsidium Stuttgart genehmigt und entsprechend dokumentiert.

Tab. 4: Übersicht über das verwendete Adjuvans, sowie die Konzentration der partiell gereinigten und aufkonzentrierten thermostabilen vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation zur Immunisierung der Mäuse

Immunisierung	Adjuvans	Eingesetztes Volumen	Antigenkonzentration
1. Immunisierung	150 µl RIBI Adjuvans System	330 µl Antigen	43 µg
2. Immunisierung	50 µl Lipopeptid Adjuvans	230 µl Antigen	72 µg
3. Immunisierung	50 µl Lipopeptid Adjuvans	200 µl Antigen	69 µg

Den Mäusen wurde nach der 2. Immunisierung Blut entnommen und der Anstieg des Antikörpertiters im Vergleich zum Nullserum ermittelt. Maus Nr. 3, die im ELISA den höchsten spezifischen Antikörpertiter zeigte, wurde zur Herstellung monoklonaler Antikörper ausgewählt.

2.11.2 Herstellung muriner Knochenmark-Makrophagen als Feederzellen für Hybridome

Verwendete Medien:

Kultivierungsmedium für Knochenmark-Makrophagen (100 ml):
15 % „L-Zell-Überstand“
10 % FKS
5 % Pferdeserum
1000 U/ml Penicillin und 1000 µg/ml Streptomycin
1 % Natriumpyruvat
0,04 % Mercaptoethanol
RPMI 1640

Makrophagen, die als Feederzellen zu frisch fusionierten Hybridomen zugegeben werden, entfernen durch Phagozytose abgestorbene Zellen und verbessern durch lösliche Stoffwechselprodukte die Kulturbedingungen für die Hybridome (PETERS und BAUMGARTEN 1990). Aus murinen Knochenmarkstammzellen differenzierte Makrophagen, die als Feederzellen eingesetzt werden, steigern die Anzahl an Antikörperproduzierenden Klonen nach der Fusion (HOFFMANN et al. 1996).

Die Gewinnung von murinen Knochenmarkstammzellen wurde als intern anzeigepflichtiger Tierversuch dem Tierschutzbeauftragten der Universität gemeldet und entsprechend dokumentiert.

Sechs bis acht Wochen alte BALB/c Mäuse wurden durch CO₂ getötet und mit Ethanol desinfiziert. Unter der Sterilbank wurden Femur und Tibia auf Eis freipräpariert, von Fett- und Muskelgewebe befreit und schließlich mit dem Skalpell geöffnet. Das Knochenmark wurde mit 2-5ml RPMI in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen, das 40 ml RPMI enthielt, gespült. Die gewonnenen Zellen wurden bei 600 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Sediment in 3 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden zwei VueLife® Zellkulturbeutel mit je 50 ml Kultivierungsmedium mit 6 x 10⁶ Zellen angesetzt. Die Zellen wurden 12-20 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (HOFFMANN et al., 1989).

Das Ernten der Zellen erfolgte einen Tag vor der geplanten Fusion. Der Inhalt der Säckchen wurde in ein auf Eis stehendes Zentrifugenröhrchen ausgegossen und bei 600 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 15 ml Hybridomamedium resuspendiert. Pro Kavität einer Mikrotiterplatte wurden 100 µl mit 1 x 10⁴ Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die frisch fusionierten Hybridome zu den Feederzellen gegeben.

2.11.3 Herstellung des konditionierten Kulturüberstand der L 929 Fibroblastenlinie („L-Zell-Überstand“)

Verwendetes Medium:

L-Zell-Medium (100 ml)
10 % FKS
100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
1 % nicht-essentielle Aminosäuren
RPMI 1640

Bei der L 929 Fibroblastenlinie handelt es sich um murine Bindegewebe-Fibroblasten. Diese Fibroblasten produzieren den Makrophagen-Differenzierungsfaktor M-CSF (macrophage colony stimulating factor). M-CSF im sogenannten „L-Zell-Überstand“ (= konditionierter Kulturüberstand der L929 Fibroblastenlinie mit Makrophagen-Differenzierungsfaktor M-CSF) wurde zur Stimulation und Differenzierung von murinen Knochenmark-Stammzellen zu Makrophagen eingesetzt.

Zur Gewinnung dieses Kulturüberstandes wurden 10^7 Fibroblasten in 100 ml Medium für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen für 15 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.11.4 Herstellung und Kultivierung von Hybridomen

Verwendete Medien:

Hybridomamedium (500ml):
100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
5 % L-Alanyl-L-Glutamin
10 % FKS
Hybridomamedium

HAT-Medium:
Hybridomamedium mit 4 x HAT-Supplement, bzw. 1x HAT-Supplement

Myelomzell-Medium (100 ml)
10 % FKS
100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
1 % nicht-essentielle Aminosäuren
RPMI 1640

Einfriermedium für Zellen:
90% FKS
10 % DMSO

2.11.5 Fusion der B-Lymphozyten mit Myelomzellen zur Gewinnung von Hybridomen

Nachdem bei den immunisierten Mäusen nach zwei Immunisierungen ein Anstieg des Antikörpertiters gegen die partiell gereinigte thermostabile vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation ermittelt wurde, erfolgte drei Tage nach der 3. Immunisierung die Fusion der Milzzellen von Maus Nr. 3 mit der murinen SP2/0-Ag14 Myelomzelllinie. Diese Zelllinie ist ein Hybrid aus BALB/c Milzzellen und der Myelomzelllinie P3X63AG8. SP2/0-Ag14 Zellen produzieren keine Immunglobuline und zeigen, durch einen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) Mangel kein Wachstum in Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-(HAT)-Medium (SHULMAN et al. 1978). Die Myelomzellen wurden parallel zur Immunisierung im Institut für molekulare Medizin und Zellforschung, Tumormunologie/Vakzine, Prof. Dr. Bessler, Freiburg kultiviert.

Am Tage der Fusion wurde Maus Nr. 3 entblutet und für die Präparation der Milz mit Ethanol desinfiziert. Die Milz wurde vorsichtig entfernt, in kaltes RPMI gegeben und zerkleinert. Die Milzzellen wurden dreimal mit RPMI gewaschen und für 10 min bei 600 x g bei 4 °C zentrifugiert. Nach Aufnahme der pelletierten Zellen in 20 ml RPMI erfolgte die Bestimmung der Zellzahl.

Die Lymphozyten der Milz und die Myelomzellen wurden im Verhältnis 2:1 gemischt und 10 min bei 1000 x g und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen im Pellet leicht aufgeklopft. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mit den Zellen in ein Becherglas mit 37 °C warmen Wasser gestellt. Nach Zugabe von 1 ml 37 °C warmer Hybri-Max™ Polyethylenglykol Lösung innerhalb 30 Sekunden wurde nach weiteren 30 Sekunden RPMI in folgenden Intervallen und Volumina zugegeben:

- 1 ml RPMI in 1 min
- 2 ml RPMI in 1 min
- 3 ml RPMI in 1 min
- 4 ml RPMI in 1 min
- 5 ml RPMI in 1 min

Im Anschluss daran wurde das Zentrifugenröhrchen mit RPMI auf 30 ml aufgefüllt. Das Gemisch aus fusionierten Hybridomzellen und nicht fusionierten Lymphozyten/Myelomzellen wurde 10 min bei 1000 x g und 20 °C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 50 ml Hybridomamedium aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit

Feederzellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden 50 μ l/Kavität HAT-Medium zur Selektion der Hybridome zugegeben.

2.11.5 Screening der Hybridome im ELISA

Nach 14 Tagen erfolgte das erste Screening, um die Hybridome auf die Produktion *B. anthracis* spezifischer Antikörper zu untersuchen. Die als positiv befundenen Kavitäten bzw. Klone wurden auf einer neuen Mikrotiterplatte in einer Verdünnung von 1:600 in Hybridomamedium ausgesät (rekloniert) oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Je nach Wachstum der Hybridome wurde erneut auf die Produktion spezifischer Antikörper getestet. Antikörperproduzierende Klone wurden rekloniert bis ein Klon als monoklonal identifiziert wurde. Ein Klon wurde als monoklonal angesehen, wenn alle Kavitäten einer Mikrotiterplatte, die durch Verdünnung eines Klons hergestellt wurde, im ELISA eine identische OD_{414nm} aufwiesen und sich diese Ergebnisse nach erneuter Subklonierung bestätigen ließen.

Nach der Etablierung der monoklonalen Zelllinien im ELISA wurden diese in Zellkulturflaschen kultiviert, um Zellkulturüberstand mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern zu erhalten. Als Zellkulturmedium wurde serumfreies Hybridomed DIF 1000 Medium verwendet. Bei jeder Subkultivierung wurde ein Teil der Zellen in frischem Medium aufgenommen und für 10 min bei $1000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 90 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt, um die darin enthaltenen monoklonalen Antikörper aufzureinigen.

2.11.6 Nomenklatur der Hybridome

Die Fusion der Milzzellen von Maus Nr. 3 mit SP2/0-Ag14-Myelomzellen erhielt den Namen M3. Der weitere Name leitet sich von der Mikrotiterplatte und der Kavität ab, in denen die Hybridome positiv getestet wurde.

Der Name der etablierten monoklonalen Zelllinien wurde aus Gründen der Übersicht abgeändert. Diese Zelllinien tragen den Namen BaV und eine Zahl. BaV steht für *B. anthracis* vegetativ, da diese Klone im ELISA spezifisch mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation reagierten. Die Zahlen verweisen auf die Mikrotiterplatten, in der sich die Zelllinien zum ersten Mal monoklonal verhalten hatten.

2.12 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper durch Squarix Biotechnology

Im ersten Schritt erfolgte eine Fällung der Immunglobuline durch die Zugabe von 29,2 g Ammoniumsulfat pro 100 ml Zellkulturüberstand. Nach einer Zentrifugation bei 4000 x g für 10 min wurden die pelletierten Immunglobuline in PBS/Azid aufgenommen und gegen PBS/Azid dialysiert. Mit diesem dialysierten Präzipitat wurde eine präparative Affinitätschromatographie an einer 5 ml HYDRA Anti-Maus-IgM Immunaффinitätssäule durchgeführt. Bei dieser Immunaффinitätssäule handelt es sich um eine von der Firma Squarix Biotechnology entwickelte aktivierte Affinitätsmatrix, an die Anti-Maus-IgM gekoppelt wurde. Das dialysierte Präzipitat des Zellkulturüberstandes wurde mit einer Flussrate von 3 ml/min auf die Immunaффinitätssäule gegeben. Um nicht gebundene Proteine aus der Säule zu entfernen, wurde im Anschluss mit PBS/Azid gewaschen, bis eine OD von ungefähr 0,05 erreicht wurde. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe von 75 mM Glycin und 0,5 M NaCl, pH 2,6. Die eluierten Proteine wurden in 1,75 ml Aliquots gesammelt und direkt durch die Zugabe von 250 µl 1 M Tris, pH 8,3 neutralisiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gepoolt, mittels Ultrafiltration konzentriert, mit PBS/Azid gewaschen und sterilfiltriert. Zur Überprüfung der Reinigung wurde eine analytische Gelfiltration an der Superdex 200 HR 10/30 durchgeführt. Als letztes wurde der Proteingehalt über UV_{280nm} Adsorption bestimmt.

In einer weiteren Reinigung der Zelllinie BaV16 wurden zusätzlich drei stabilisierte Lagerproben hergestellt. Zur ersten Lagerprobe wurde 50 % Glycerin zugegeben. Die zweite Lagerprobe wurde SpeedVac lyophilisiert und die dritte wurde mit einem Zusatz von 5 mg BSA lyophilisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Immunisierung der Kaninchen

Die acht NZW-Kaninchen wurden viermal mit jeweils einer der acht thermostabilen Antigenpräparationen immunisiert und vier Wochen nach der 4. Immunisierung entblutet. In den Abb. 5 und 6 sind die Antikörpertitrationen der einzelnen Kaninchenserum nach der 4. Immunisierung und zum Zeitpunkt der Entblutung, im Vergleich mit dem Nullserum, dargestellt.

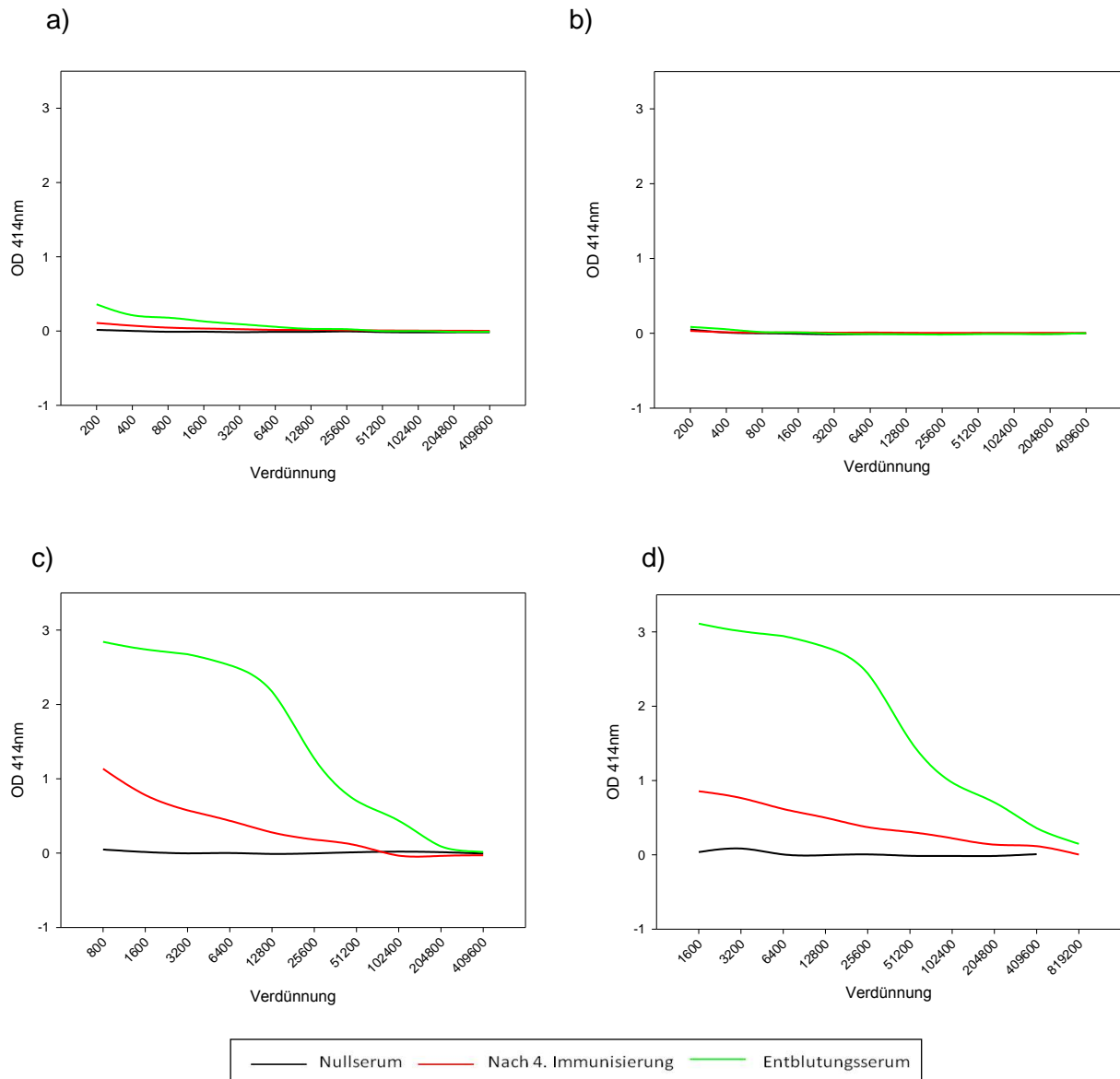


Abb. 5: Übersicht über den Antikörpertiter der immunisierten Kaninchen nach der 4. Immunisierung und bei der Entblutung.

- a) Immunisierung mit der Ascoli Antigen Präparation
- b) Immunisierung mit der Anthraxin Präparation
- c) Immunisierung mit der vegetativen *B. cereus* B197 Antigenpräparation
- d) Immunisierung mit der vegetativen *Bacillus* ssp. B334 Antigenpräparation

3 Ergebnisse

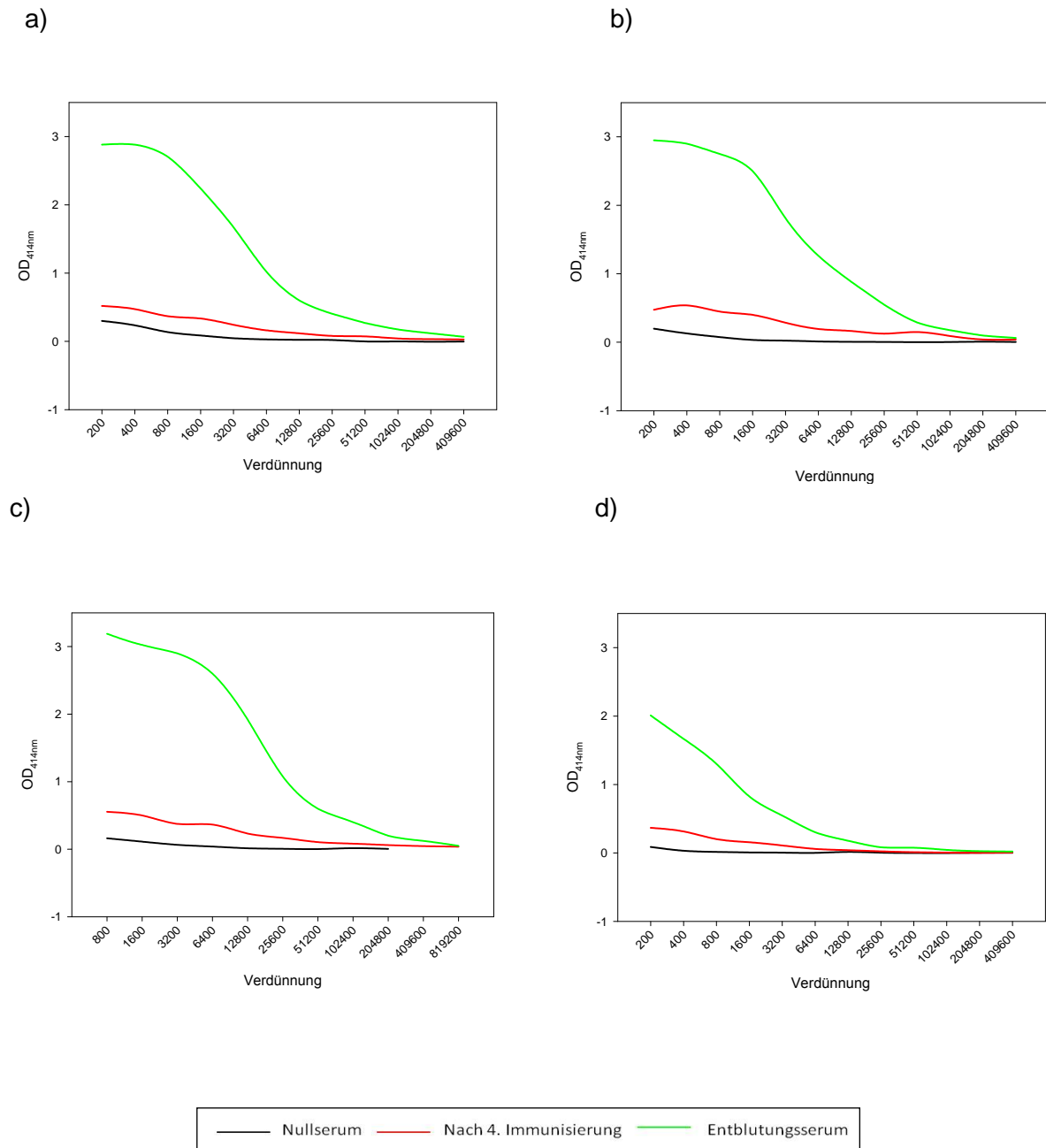


Abb. 6: Übersicht über den Antikörpertiter der immunisierten Kaninchen nach der 4. Immunisierung und bei der Entblutung.

- a) Immunisierung mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation
- b) Immunisierung mit der vegetativen *B. anthracis* A30Ph Antigenpräparation
- c) Immunisierung mit der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation
- d) Immunisierung mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation

3.2 Auswertung der Kaninchenserum im Western Blot

Die Entblutungsseren der acht immunisierten Kaninchen wurden im Western Blot auf Kreuzreaktionen untersucht (siehe 2.7). Dazu wurden die acht Antigenpräparationen aufgetragen und jeweils mit einem Serum entwickelt (Abb. 7-14). Diese Kreuzreaktionsversuche dienten der Identifizierung von potentiell *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen.

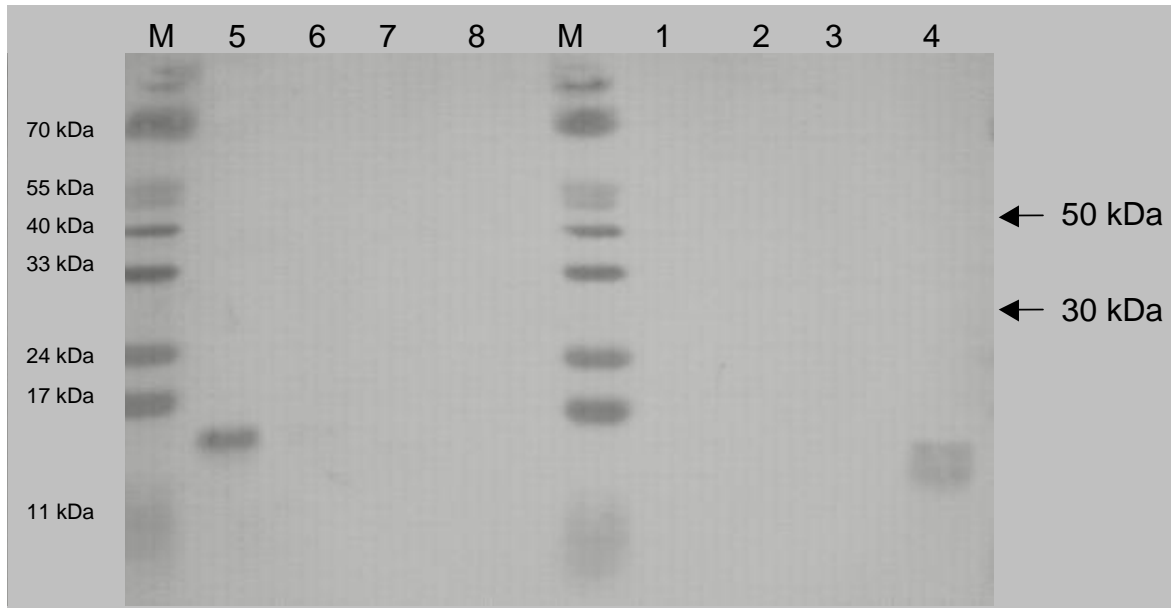


Abb. 7: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der Ascoli Antigen Präparation immunisierten Tieres.

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

Das Serum des mit der Ascoli Antigen Präparation immunisierten Kaninchens (Abb. 7) erkennt in der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (Spur 5) eine Proteinbande mit einem ungefähren Molekulargewicht von 15 kDa. Eine weitere, ebenfalls ungefähr 15 kDa große Proteinbande wurde in der vegetativen *Bacillus* ssp. B334 Antigenpräparation (Spur 4) detektiert.

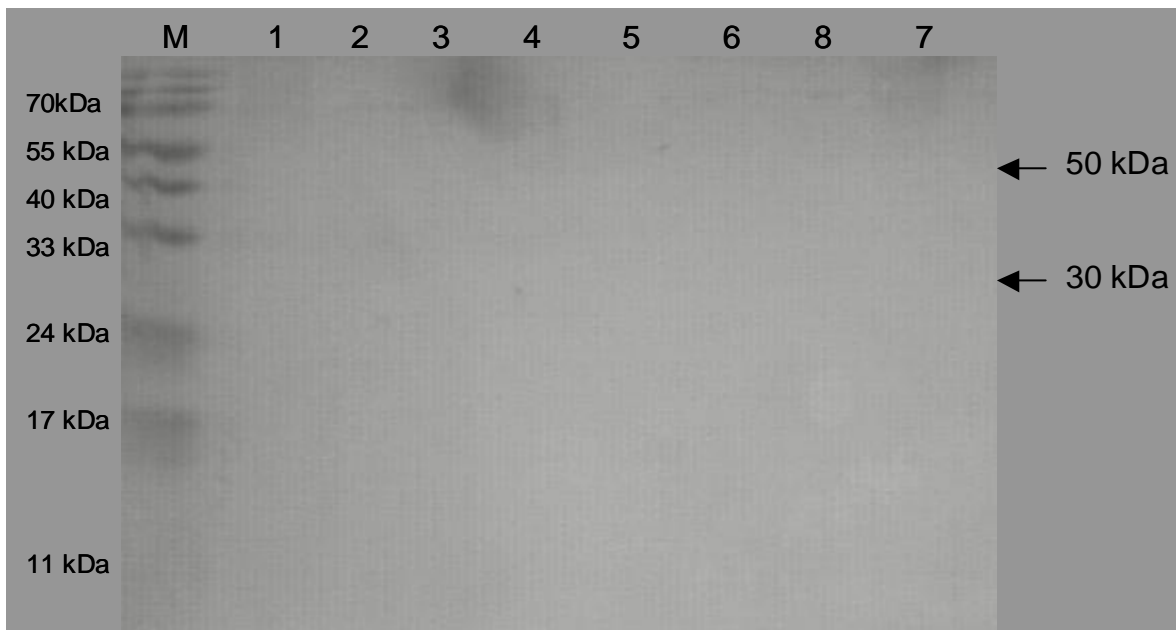


Abb. 8: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der Anthraxin Präparation immunisierten Tieres.

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

Im Western Blot, entwickelt mit dem Serum des mit der Anthraxin Präparation immunisierten Kaninchens (Abb. 8) konnte bei keiner der eingesetzten acht Antigenpräparationen eine Reaktion detektiert werden.

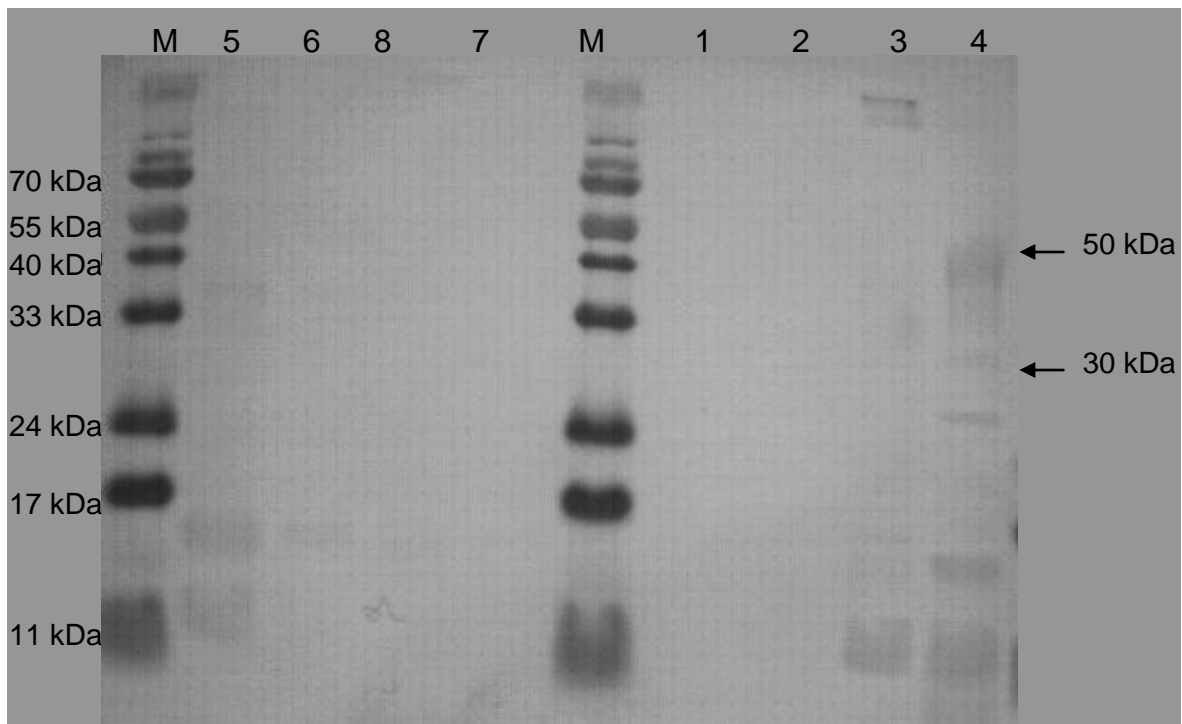


Abb. 9: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen *B. cereus* B197 Antigenpräparation immunisierten Tieres

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

Das Serum des Kaninchens, immunisiert mit der vegetativen *B. cereus* B197 Antigenpräparation, erkennt in den vegetativen *B. anthracis* (Spuren 5 und 6), sowie in den *Bacillus* ssp. Antigenpräparationen (Spuren 3 und 4) mehrere kreuzreagierende Banden mit einem Molekulargewicht im Bereich von 11- 15 kDa.

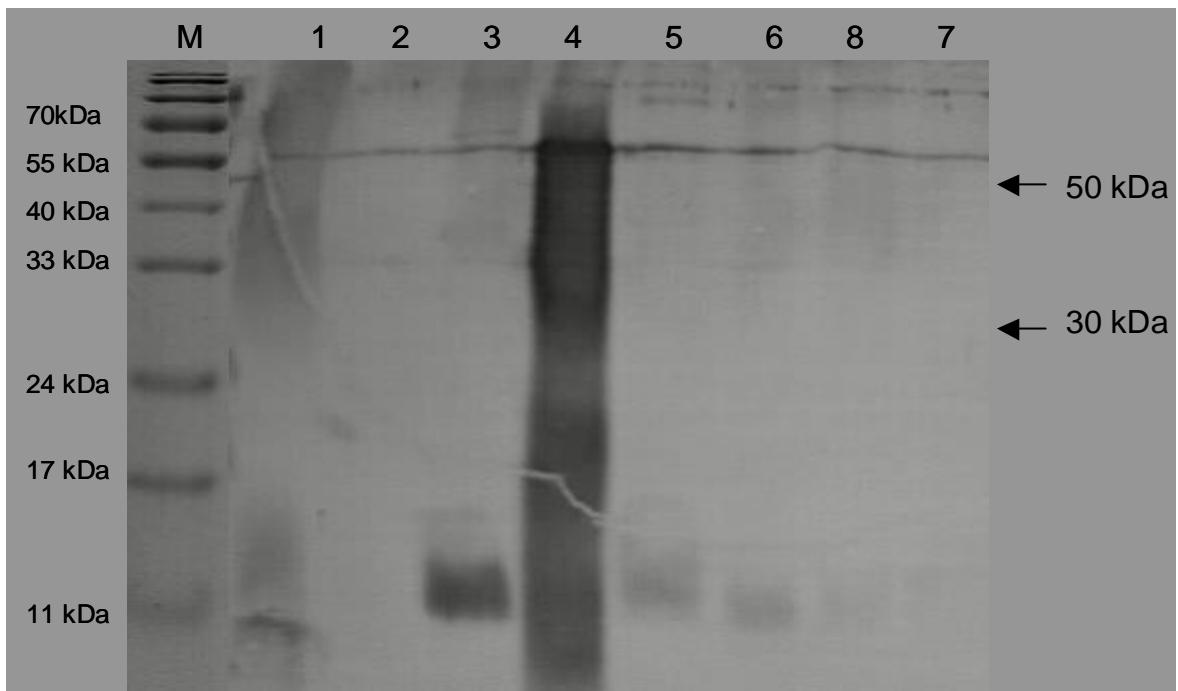


Abb. 10: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen *Bacillus* ssp. B334 Antigenpräparation immunisierten Tieres

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

Bei der Entwicklung des Western Blots der acht thermostabilen Antigenpräparationen mit dem Serum, des mit der vegetativen *Bacillus* ssp. B334 Antigenpräparation immunisierten Kaninchens (Abb. 10) konnte in den vegetativen *B. anthracis* und *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen erneut eine der bereits in Abb. 9 beobachteten kreuzreagierenden Proteinbanden mit einem Molekulargewicht im Bereich von 11- 15 kDa detektiert werden (Spuren 3-6).

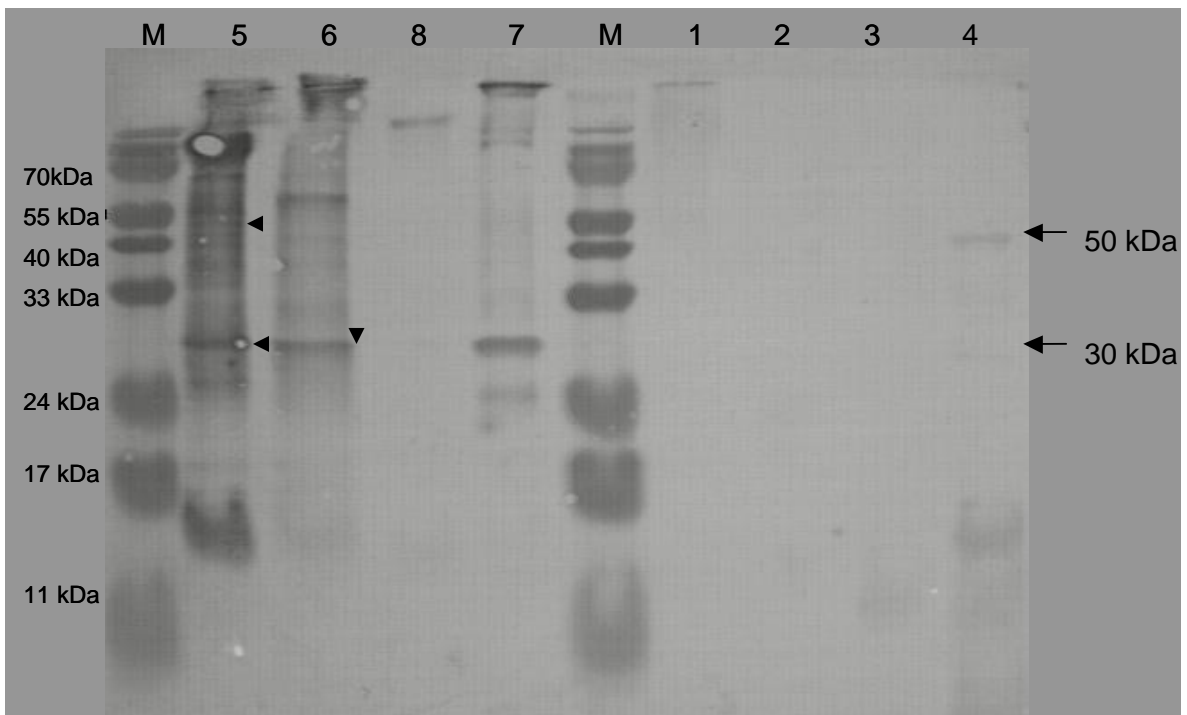


Abb. 11: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisierten Tieres

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

In Abb. 11 ist der Western Blot der acht thermostabilen Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum, des mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisierten Kaninchens dargestellt. Dieses Serum erkennt in den vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparationen eine 30 kDa große Proteinbande, die auch in der *B. anthracis* Ames Sporenpräparationen vorhanden ist (Spuren 5-7) und nicht in vegetativen Antigenpräparationen von *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis), sowie in der *B. cereus* B10 Sporenpräparation nachgewiesen werden konnte. Bei dieser 30 kDa Bande handelt es sich daher um ein potentiell *B. anthracis* spezifisches thermostabiles Antigen.

Eine weitere Proteinbande mit einer ungefähren Größe von 50 kDa wurde nur in den vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparationen detektiert (Spuren 5 und 6), wobei diese in der Abb. 11 schlecht zu sehen ist, als Nachweis der 50 kDa Bande dienen die Abb. 12 und 13. Allerdings konnte in der vegetativen *B. cereus* B334 Antigenpräparation eine Kreuzreaktion der 50 kDa Bande nachgewiesen werden (Spur 4).

3 Ergebnisse

Das A30PBS Serum erkennt die bereits detektierten kreuzreagierenden Proteinbanden im Bereich von 11- 15 kDa in vegetativen *B. anthracis* und *B. cereus* Antigenpräparationen (Spuren 4-6). In der Sporenpräparation der *B. cereus* B10 Antigenpräparation wurde eine kreuzreagierende Proteinbande mit einem Molekulargewicht von >170 kDa detektiert (Spur 8).

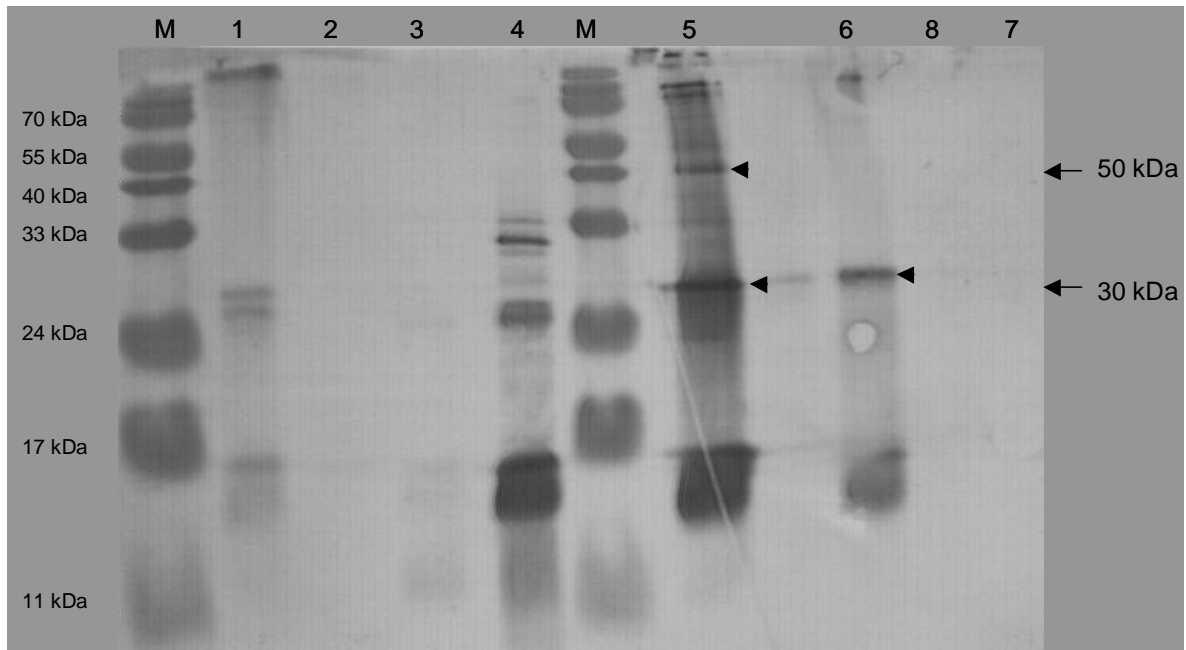


Abb. 12: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen *B. anthracis* (A30Ph) Antigenpräparation immunisierten Tieres

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

Die Ergebnisse des Western Blots, entwickelt mit dem Serum des mit der vegetativen *B. anthracis* A30Ph Antigenpräparation immunisierten Kaninchens in Abb. 12 entsprechen größtenteils den bereits beschriebenen Ergebnissen des Western Blots in Abb. 11, mit Ausnahme der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation, bei der keine Reaktion detektiert werden konnte. Bei der 50 kDa Bande, die vom vegetativen *B. anthracis* A30PBS Serum auch in der vegetativen *B. anthracis* A30Ph Antigenpräparation nachgewiesen wurde, konnte keine Reaktion detektiert werden (Abb. 11 und 12, jeweils Spur 6). Die in Abb. 11 beobachtete Kreuzreaktion der 50 kDa mit der vegetativen *Bacillus* ssp. B334 Antigenpräparation konnte durch das Serum des mit der vegetativen *B. anthracis* A30Ph Antigenpräparation nicht nachgewiesen werden. In der Ascoli Antigen Präparation wurde erstmals eine Reaktion mit hauptsächlich vier Proteinbanden mit einem ungefähren Molekulargewicht von 15, 25, 30 und >170 kDa detektiert.

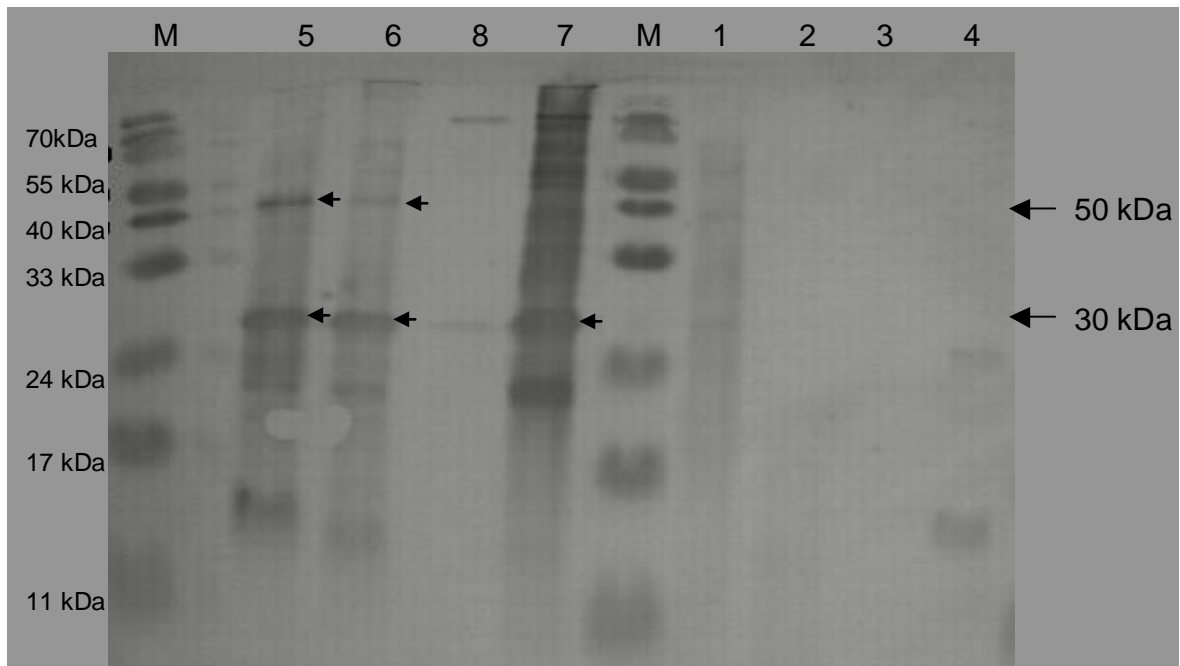


Abb. 13: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation immunisierten Tieres

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

Im Western Blot in Abb. 13 wurde Serum des Kaninchens, immunisiert mit der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation eingesetzt. In den vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparationen und der *B. anthracis* Sporenpräparation wurde erneut die potentiell *B. anthracis* spezifische 30 kDa Proteinbande detektiert (Spuren 5-7), die nicht in Präparationen von *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) nachgewiesen wurde (Spuren 3-4 und 8). Die zweite potentiell *B. anthracis* spezifische vegetative 50 kDa Bande wurde erneut nur in den vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparationen nachgewiesen (Spuren 5 und 6).

In der *B. cereus* B10 Sporenpräparation wurde erneut die kreuzreagierende Bande mit einem Molekulargewicht von > 170 kDa Bande detektiert (Spur 8). Bei den vegetativen *Bacillus* ssp. B334 und den vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparation in den Spuren 4-6 konnte eine Reaktion mit der kreuzreagierende 15 kDa große Proteinbande nachgewiesen werden.

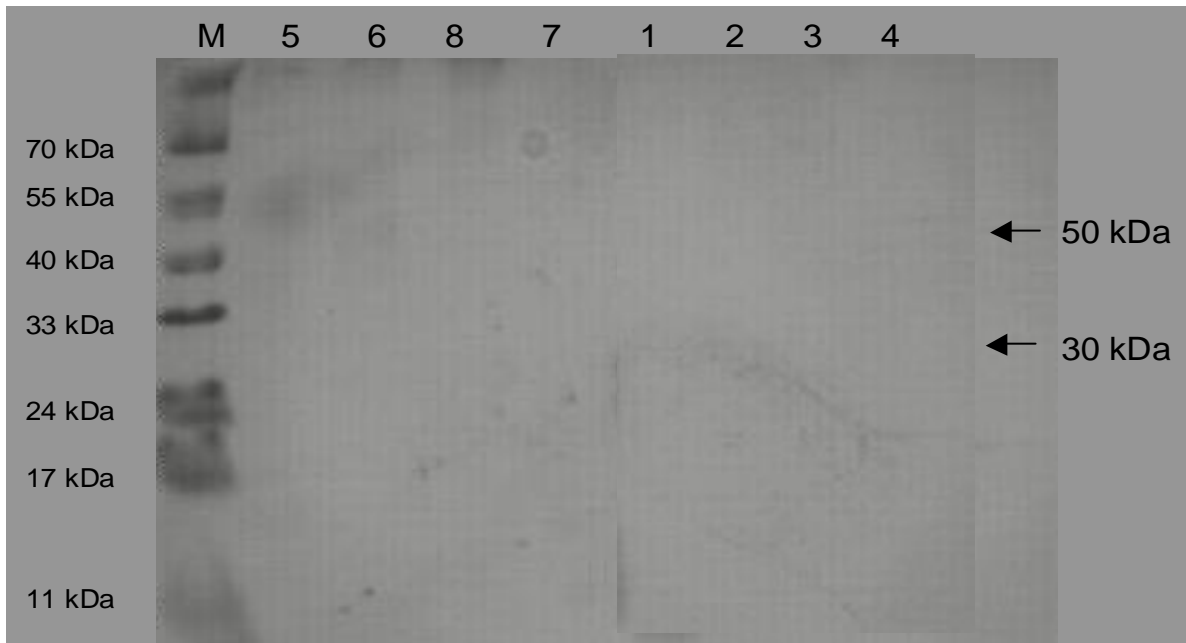


Abb. 14: Western Blot der acht Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum des mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation immunisierten Tieres

M= Größenstandard

1= Ascoli Antigen

3= vegetative *B. cereus* B197 Präparation

5= vegetative *B. anthracis* A30PBS Präparation

7= *B. anthracis* Ames Sporenpräparation

2= Anthraxin Präparation

4= vegetative *Bacillus* ssp. B334 Präparation

6= vegetative *B. anthracis* A30Ph Präparation

8= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

Bei der Analyse des Kaninchenserums, gewonnen durch Immunisierung mit einer *B. cereus* B10 Sporenpräparation, wurde im Western Blot (Abb. 14) bei keiner der eingesetzten acht Antigenpräparationen eine Reaktion detektiert.

In den Kreuzreaktionsversuchen mittels Western Blot wurde eine potentiell *B. anthracis* spezifische Proteinbande mit einem ungefähren Molekulargewicht von 30 kDa identifiziert (Abb. 11 und 12; Spuren 5 und 6). Bei dieser 30 kDa Bande handelt es sich um ein thermostabiles Antigen, dass sowohl in vegetativen als auch in Sporenpräparationen von *B. anthracis* vorhanden ist (Abb. 11 und 13; Spur 7) und nicht in vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen, sowie der *B. cereus* B10 Sporenpräparation nachweisbar ist.

Eine weitere, ungefähr 50 kDa große Proteinbande, die nur in vegetativen *B. anthracis* Präparationen nachweisbar ist, wurde trotz der Kreuzreaktion des Serums des mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisierten Kaninchens mit der vegetativen *Bacillus* ssp. B334 Antigenpräparation als ein weiteres potentiell *B. anthracis* spezifisches thermostabiles Antigen identifiziert.

3.3 Fraktionierung der Antigenpräparation durch Anionenaustauschchromatographie mittels FPLC

Die in der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation enthaltenen potentiell *B. anthracis* spezifischen 30 und 50 kDa großen Proteine wurden über eine Anionenaustauschchromatographie (AEX) mittels FPLC fraktioniert.

Die Elution der beiden potentiell spezifischen Proteine erfolgte in einem Bereich von ungefähr 0,3 bis 0,4 M NaCl (Fraktion 23 in Abb. 15). Die gesammelten Fraktionen wurden auf einem 15 % Acrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot mit dem *B. anthracis* A30PBS Kaninchenserum entwickelt.

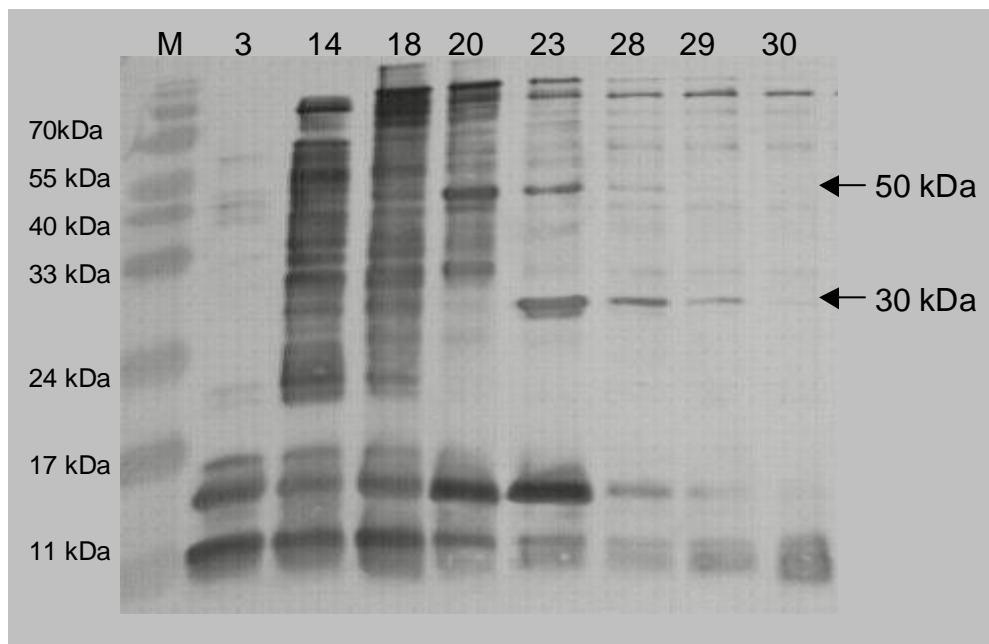


Abb. 15: Western Blot der AEX Fraktionen, entwickelt mit dem Serum des mit der *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisierten Tieres.

M= Größenstandard, die Zahlen entsprechen den Fraktionen der Chromatographie, die Pfeile markieren die beiden potentiell spezifischen Proteine

Durch die Entwicklung des Western Blots mit dem Serum des mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisierten Kaninchens sind nur die Proteinbanden sichtbar, die im Kaninchen eine humorale Immunantwort induzieren. Bei diesen immunogenen Proteinbanden handelt es sich um mehrere Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht von 11, 15, 30, 50, 130 und 170 kDa (Elution 23). Bei der 30 und 50 kDa Bande handelt es sich um die in den Kreuzreaktionsversuchen (Punkt 3.2) identifizierten potentiell *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigene, während es sich bei den 11, 15 und 170 kDa großen Proteinen um unspezifische, kreuzreagierende Proteine handelt, die ebenfalls bereits in den Kreuzreaktionsversuchen mittels Western Blot identifiziert wurden.

3 Ergebnisse

Die partiell gereinigten vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparationen aus der AEX wurden, wegen der geringen Proteinkonzentration, mit Hilfe von Centricons® konzentriert, zeitgleich in PBS umgepuffert und im Anschluss zur Immunisierung von BALB/c Mäusen verwendet.

Zur weiteren Überprüfung wurden die partiell gereinigte *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation gegen die Kaninchenseren im Western Blot getestet. In Abb. 16 ist das Ergebnis des Western Blots abgebildet.

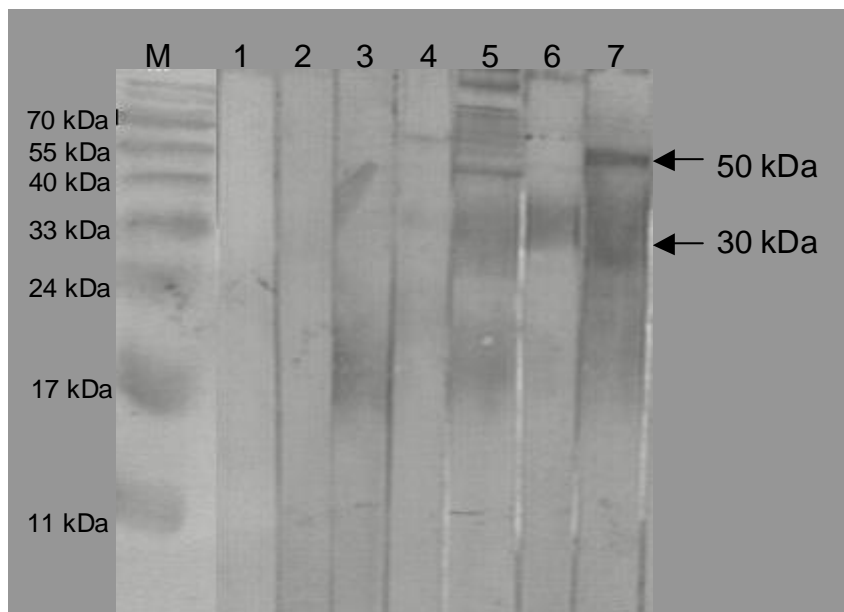


Abb. 16: Western Blot der aufgereinigten *B. anthracis* A30 PBS Antigenpräparation entwickelt mit sieben verschiedenen Kaninchenseren

M= Größenstandard

2= Anthraxin Serum,

4= *Bacillus* ssp. B334 Serum,

6= *B. cereus* B10 Sporens Serum,

1= Ascoli Serum

3= *B. cereus* B197 Serum

5= *B. anthracis* A30PBS Serum

7= *B. anthracis* Ames Sporens Serum

Die Ergebnisse des Western Blots in Abb. 16 entsprechen den bereits beschriebenen Ergebnissen der Kreuzreaktionsversuche mit Ausnahme des Serums des mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation immunisierten Kaninchens, welches hier erstmals eine Kreuzreaktion mit der 30 kDa Proteinbande aufwies (Spur 6).

3.4 Immunisierung der Mäuse

Drei BALB/c Mäuse wurden dreimal im Abstand von ca. 2 Wochen mit der partiell gereinigten vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisiert. Nach zwei Immunisierungen wurde den Mäusen Blut entnommen, um den Anstieg des Antikörpertiters im ELISA zu bestimmen. In Abb. 17 ist der Anstieg des Antikörpertiters im Vergleich mit dem Nullserum dargestellt.

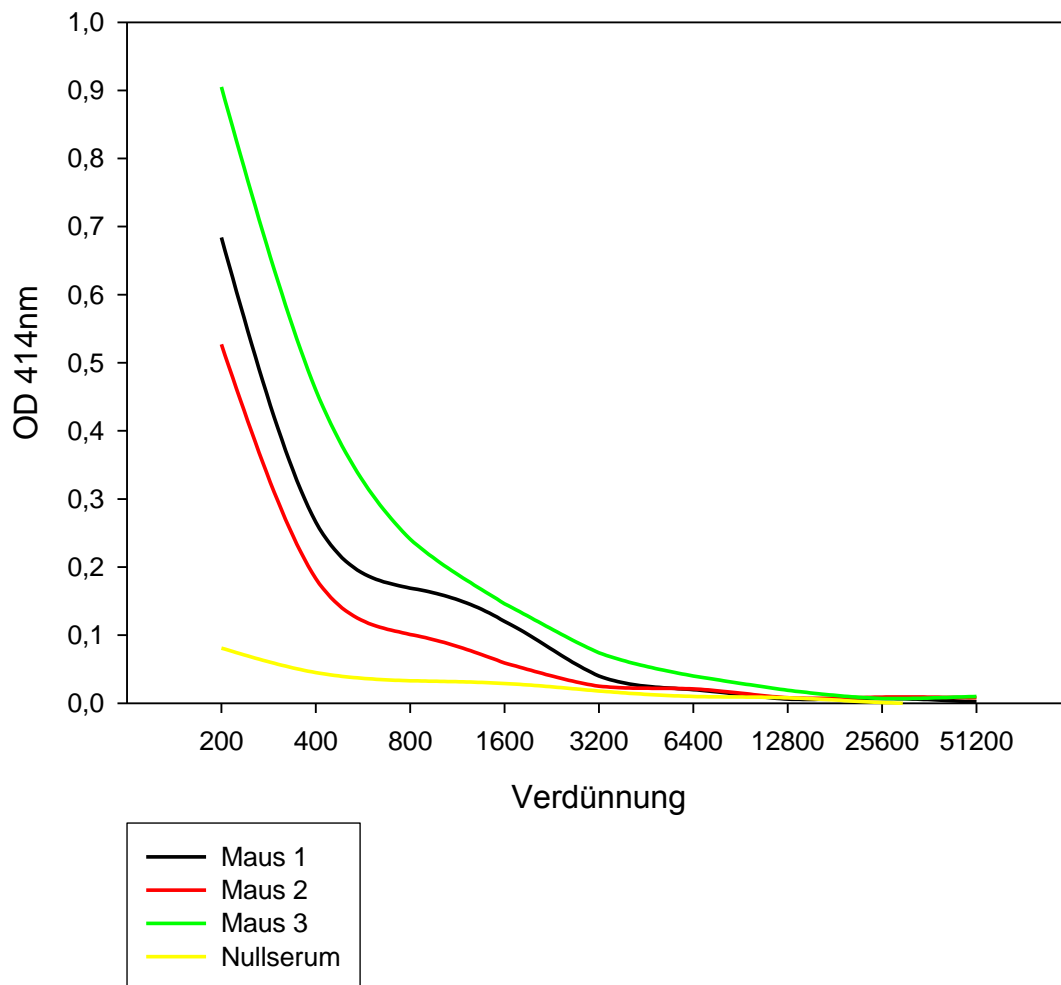


Abb. 17: Antikörpertitration der mit der partiell gereinigten vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation immunisierten Mäuse nach der 2. Immunisierung.

Drei Tage vor der Fusion der in der Milz enthaltenen B-Lymphozyten mit Myelomzellen zur Generierung von Hybridomen wurden die Mäuse zum 3. Mal immunisiert.

3.5 Untersuchung des Mausserums im Western Blot

Vor der Entnahme der Milz und der anschließenden Fusion wurde Maus Nr. 3, die Maus mit dem höchsten Antikörpertiter entblutet, um mit dem Serum weitere Analysen im Western Blot durchzuführen. In Abb. 18 ist ein Western Blot mit der partiell gereinigten vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation, mit der die Mäuse immunisiert wurden, entwickelt mit dem Mausserum dargestellt.

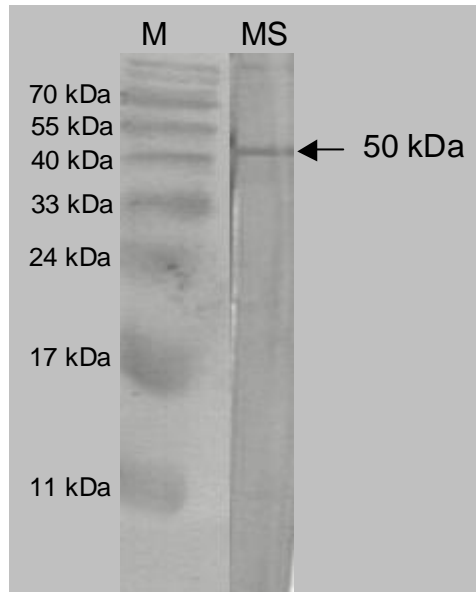


Abb. 18: Western Blot mit der partiell gereinigten *B. anthracis* A30 PBS Antigenpräparation entwickelt mit dem Serum von Maus Nr. 3.

M = Größenstandard, MS= Mausserum

In einem weiteren Western Blot (Abb. 19) wurden die Antigenpräparationen, die im Screening der Hybridome eingesetzt wurden, mit dem Mausserum entwickelt.

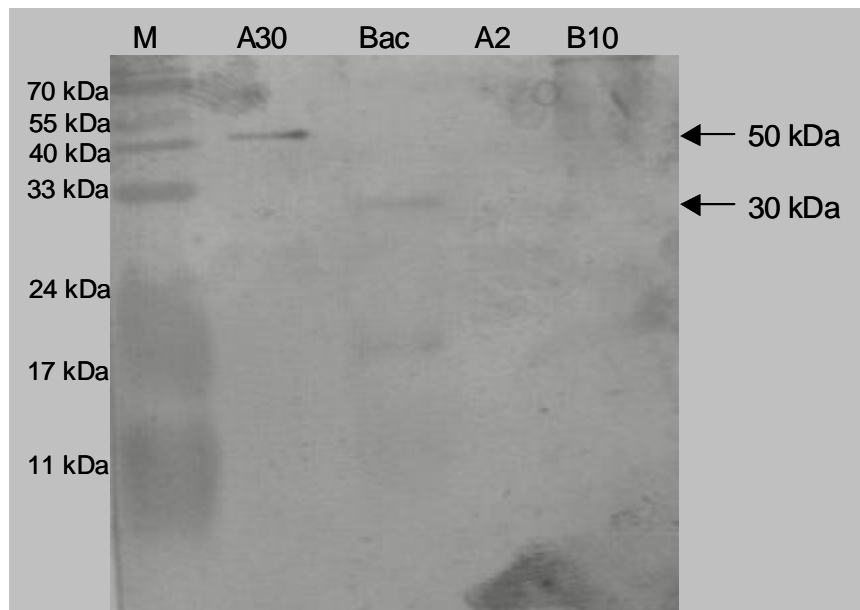


Abb. 19: Western Blot der im ELISA eingesetzten Antigenpräparationen, entwickelt mit dem Serum von Maus Nr. 3

M= Größenstandard

A30 = vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation

Bac= Antigenpräparation aus 20 verschiedenen vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht anthracis)

A2= *B. anthracis* A2 Sporenpräparation

B10= *B. cereus* B10 Sporenpräparation

3.6 Herstellung und Screening der Hybridome

Drei Tage nach der 3. Immunisierung wurden die in der Milz enthaltenen B-Lymphozyten von Maus Nr. 3 zur Herstellung von Hybridomen verwendet. Nach der Isolierung der Milzzellen lagen 20 ml mit 2×10^8 Zellen vor, die Zählung der parallel kultivierten SP2/0-Ag14 Myelomzellen ergab 10 ml mit $6,3 \times 10^7$ Zellen. Zur Fusion mit Hilfe der Hybri-Max™ Polyethylenglykol Lösung wurden 1×10^8 Milzzellen mit 5×10^7 Myelomzellen eingesetzt. Im Anschluss an die Fusion wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen/ 50µl pro Kavität mehrerer Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Im Abstand von 7-14 Tagen wurde der Zellkulturüberstand der Hybridome im ELISA auf die Produktion spezifischer Antikörper untersucht. Von den 900 Kavitäten, in denen die Hybridome nach der Fusion ausgesät wurden, wurden 36 Zellklone nach dem 1. Screening als positiv detektiert. Von diesen 36 Zellklonen wurden 10 ausgesucht und rekloniert, die verbleibenden 26 Zellklone wurden eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt getestet. Nach 14 Screenings, bei denen Hybridome rekloniert und ausgedünnt wurden, welche zum einen positiv mit vegetativen als auch mit Sporen

Antigenpräparationen von *B. anthracis* reagierten und zum anderen negativ mit einer Mischung von 20 verschiedenen *Bacillus* ssp. (nicht anthracis) Antigenpräparationen, in Kombination mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation lag, noch keine monoklonale Zelllinie vor. Die Screening-Strategie wurde daraufhin wie im Folgenden aufgeführt verändert. Positive Hybridome wurden in eine Sporen- und eine vegetative Linie (S- und V-Linie) aufgeteilt. Bei der V-Linie wurde weiter auf eine positive Reaktion mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation und eine negative Reaktion mit der Antigenpräparation aus 20 verschiedenen *Bacillus* ssp. (nicht anthracis) Isolat untersucht. Nach 2 bzw. 4 V- Screenings wurden die drei Zelllinien BaV5 a-e, BaV15 und BaV16 (*B. anthracis* vegetative Zelllinie bzw. monoklonaler Antikörper) etabliert, die sich im ELISA wiederholt monoklonal verhalten hatten. Diese Hybridome wurden in Zellkulturflaschen kultiviert, um größere Mengen an sezernierten monoklonalen Antikörper im Zellkulturüberstand zu erhalten.

In den Abb. 20- 22 sind die im ELISA ermittelten Optischen Dichten_{414nm} der einzelnen Reklonierungen, die zur Identifizierung der monoklonalen Zelllinien führten graphisch dargestellt. Die Zahlen-Buchstaben-Kombinationen entsprechen den jeweiligen Mikrotiterplatten, sowie den Kavitäten, deren Hybridome auf einer neuen Mikrotiterplatte subkloniert wurde.

Die komplette Auflistung aller durchgeführten Screenings befindet sich im Anhang 6.4, Tab. 6- 8.

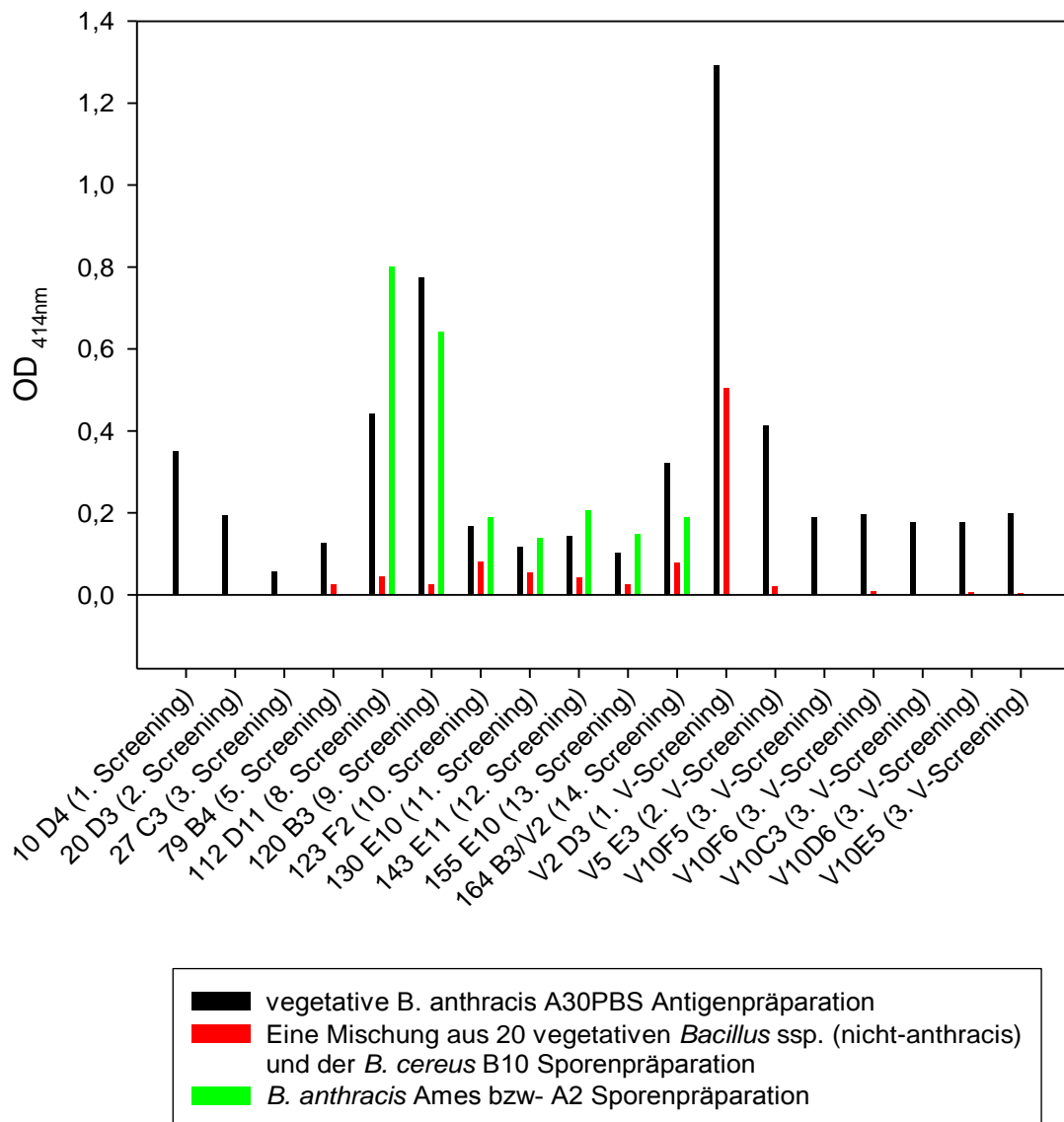


Abb. 20: In den Screenings ermittelte OD_{414 nm} die zur Etablierung der monoklonalen Zelllinie BaV5 führten.

Ab dem 5. Screening wurde neben der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (schwarz) zusätzlich eine Mischung aus 20 vegetativen *Bacillus* spp. (nicht-anthraxis) in Kombination mit einer *B. cereus* B10 Sporenpräparation eingesetzt. (rot). Zusätzlich wurde ab dem 6. Screening eine *B. anthracis* Ames bzw. A2 Sporenpräparation (grün) eingesetzt.

In den V-Screenings wurde die vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (schwarz) und die *B. anthracis* A2 Sporenpräparation eingesetzt.

Die Klone V10F5, V10F6, V10C3, V10D6 und V10E5 wurden im folgenden als monoklonale Zelllinie BaV5 a-e bezeichnet.

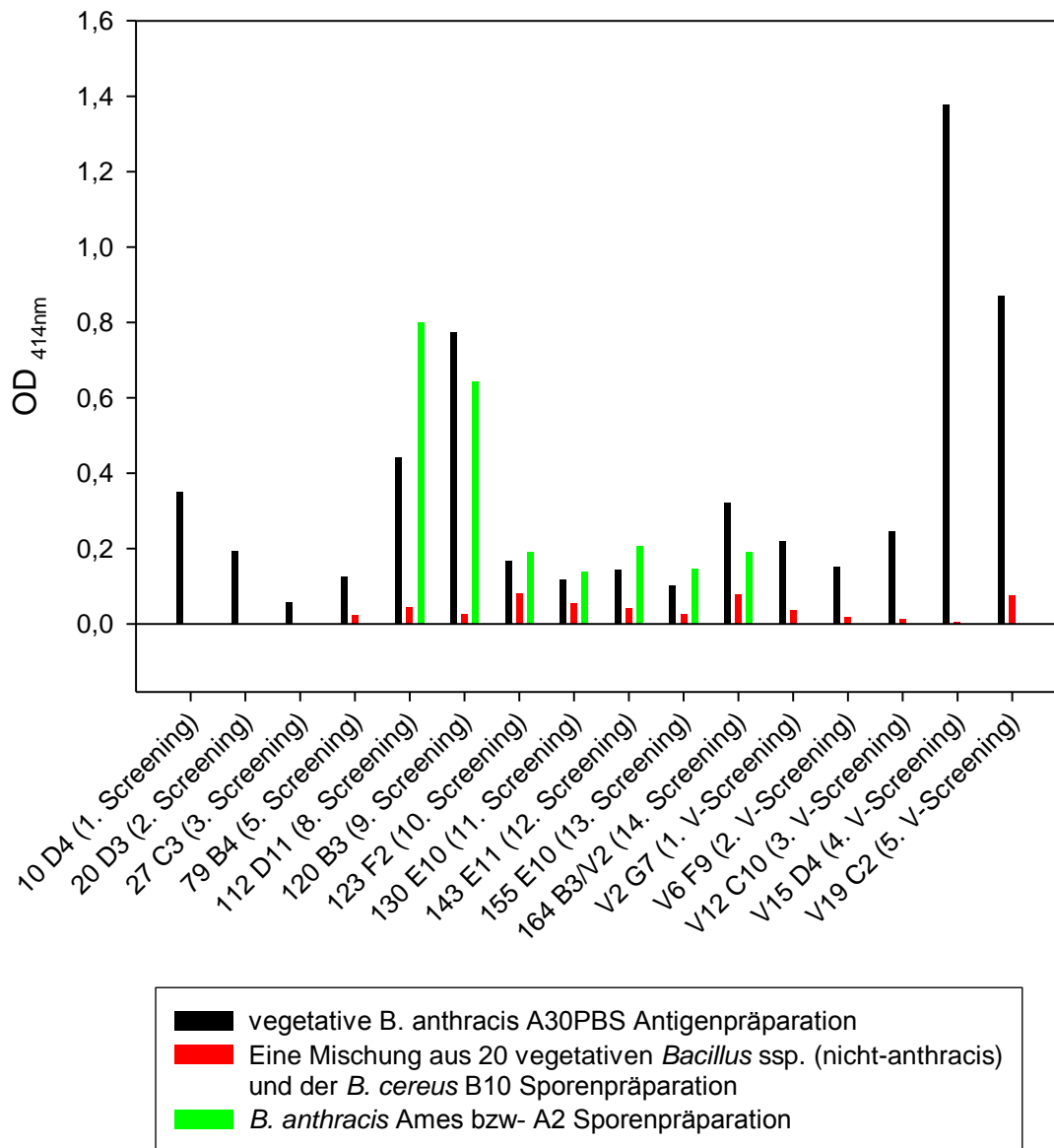


Abb. 21: In den Screenings ermittelte OD_{414 nm} die zur Etablierung der monoklonalen Zelllinie BaV15 führten.

Ab dem 5. Screening wurde neben der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (schwarz) zusätzlich eine Mischung aus 20 vegetativen *Bacillus* spp. (nicht-anthraxis) in Kombination mit einer *B. cereus* B10 Sporenpräparation eingesetzt. (rot). Zusätzlich wurde ab dem 6. Screening eine *B. anthracis* Ames bzw. A2 Sporenpräparation (grün) eingesetzt.

In den V-Screenings wurde die vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (schwarz) und die *B. anthracis* A2 Sporenpräparation eingesetzt.

Klon V19C2 wurde im folgenden als monoklonale Zelllinie BaV15 bezeichnet.

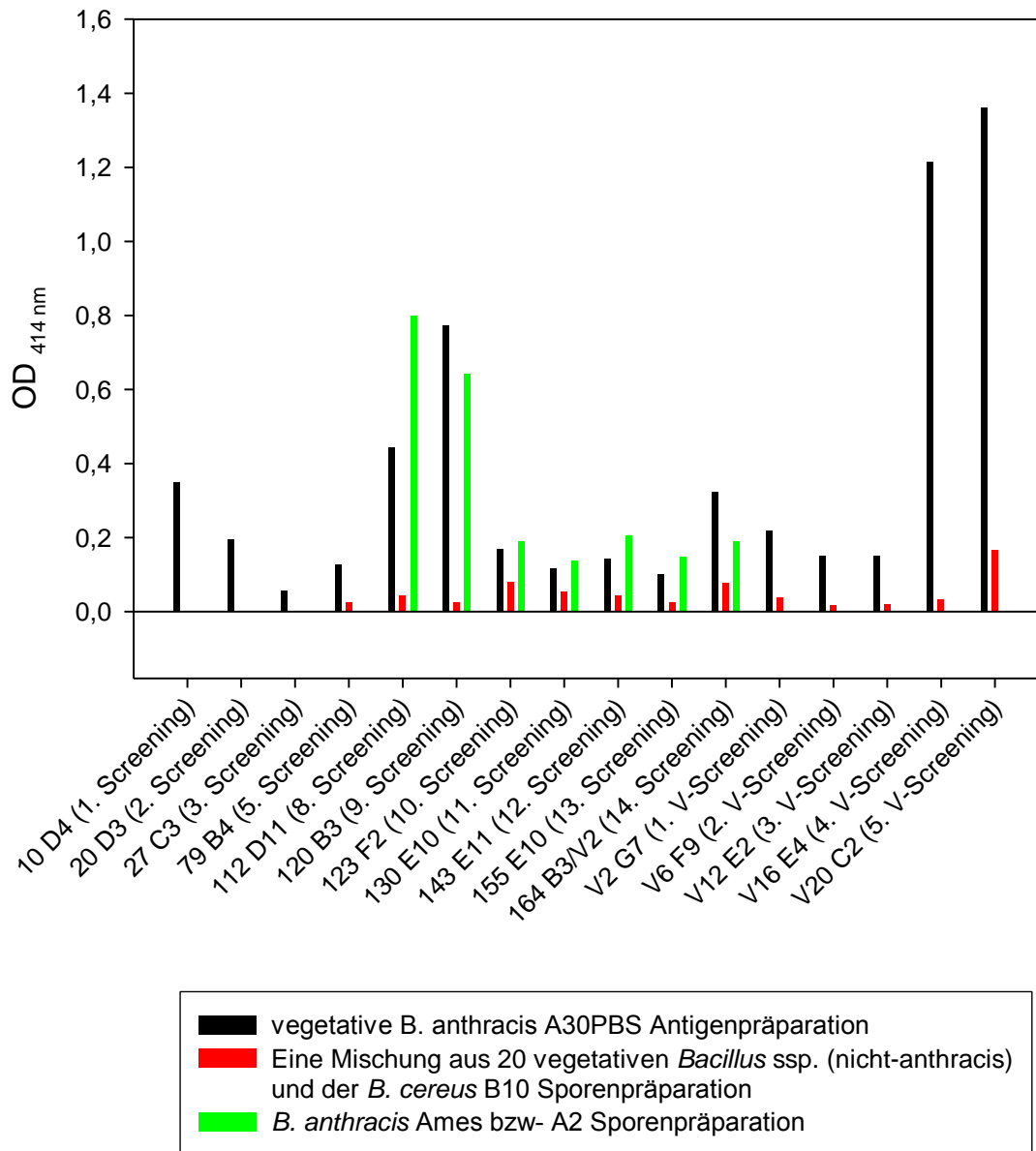


Abb. 22: In den Screenings ermittelte OD_{414 nm} die zur Etablierung der monoklonalen Zelllinie BaV16 führten.

Ab dem 5. Screening wurde neben der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (schwarz) zusätzlich eine Mischung aus 20 vegetativen *Bacillus* spp. (nicht-anthraxis) in Kombination mit einer *B. cereus* B10 Sporenpräparation eingesetzt. (rot). Zusätzlich wurde ab dem 6. Screening eine *B. anthracis* Ames bzw. A2 Sporenpräparation (grün) eingesetzt.

In den V-Screenings wurde die vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation (schwarz) und die *B. anthracis* A2 Sporenpräparation eingesetzt.

Klon V20C2 wurde im folgenden als monoklonale Zelllinie BaV16 bezeichnet.

In den Screenings der Hybridome der S-Linie, bei denen auf eine positive Reaktion mit der *B. anthracis* A2 Sporenpräparation und eine negative Reaktion mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation untersucht wurde, konnte kein Klon etabliert werden, der einen *B. anthracis* spezifischen Antikörper produziert.

3.7 Bestimmung der Immunglobulinklasse der sezernierten Antikörper

Bei den aus den V-Screenings etablierten monoklonalen Zelllinien BaV5, BaV15 und BaV16 wurde eine Bestimmung der Immunglobulinklasse der sezernierten Antikörper im Zellkulturüberstand mittels ELISA durchgeführt. Dafür wurde der Zellkulturüberstand mit Ammoniumsulfat gefällt, gegen PBS dialysiert und unverdünnt im ELISA eingesetzt. Die Durchführung der Bestimmung der Immunglobulinklasse erfolgte wie in Punkt 2.8.3 beschrieben. Bei den von den Zelllinien BaV15 und BaV16 produzierten Antikörpern handelt es sich um ein Immunglobulin der Klasse M. Die Ergebnisse der BaV5-Antikörper widersprechen sich, es handelt sich möglicherweise um eine Mischkultur, die mehrere unterschiedliche Antikörper produziert. Nach erneuter Reklonierung und mehreren Screenings konnte keine monoklonale Zelllinie, die einen Antikörper einer bestimmten Immunglobulinklasse produziert, etabliert werden. Weitere Arbeiten an dieser Zelllinie wurden eingestellt.

3.8 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand

3.8.1 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper durch Affinitätschromatographie mittels FPLC

Die monoklonalen Antikörper der Immunglobulinklasse M im Zellkulturüberstand der monoklonalen Zelllinien BaV15 und BaV16 wurden, wie unter Punkt 2.10 beschrieben, über eine 1 ml HiTrap IgM Säule gereinigt. Die Analyse der eluierten IgM-haltigen Fraktionen erfolgte in einem 7,5 %-igen Acrylamidgel.

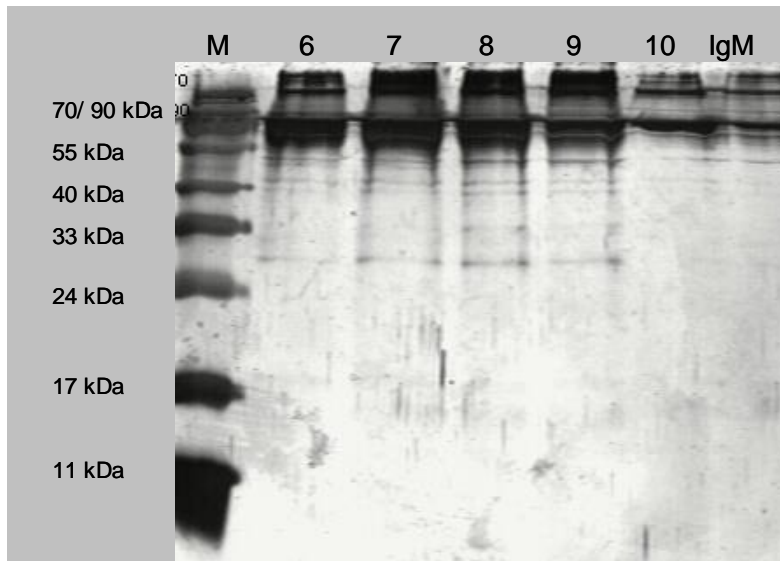


Abb. 23: Silberfärbung eines 7,5 %-igen Acrylamidgels mit den mittels Affinitätschromatographie gereinigten IgMs am Beispiel der Zelllinie BaV16.

M= Größenstandard, die Zahlen entsprechen den Fraktionen der Chromatographie, IgM = kommerzieller muriner IgM

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie konnte im ELISA keine Reaktivität der gereinigten Antikörper nachgewiesen werden. Die Aufreinigung der monoklonalen Antikörper BaV15 und BaV16 wurde aus diesem Grund an die Firma Squarix Biotechnology übergeben.

3.8.2 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper durch die Firma Squarix Biotechnology

Die Reinigung der Antikörper aus Zellkulturüberstand ergab für die Zelllinie BaV15 eine Proteinmenge von 293 µg gereinigter Antikörper in 2,272 ml PBS/Azid. Für die gereinigten Antikörper der BaV16 Zelllinie wurde eine Proteinmenge von 3,716 mg in 3,857 ml PBS/Azid ermittelt. Eine 2. Reinigung der Antikörper der Zelllinie BaV16 ergab eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml, allerdings präzipitierten die gereinigten Antikörper bereits in PBS (persönliche Mitteilung Fa. Squarix). Von einer erneuten Aufreinigung der Antikörper der Zelllinie BaV15 wurde, aufgrund der geringen Antikörperproduktionsrate abgesehen.

3.9 Antikörpertitration der gereinigten monoklonalen Antikörper

Mit den von der Firma Squarix Biotechnology gereinigten monoklonalen Antikörpern BaV15 und BaV16 wurde als erstes eine Antikörpertitration im ELISA durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die Antikörpertitration der 2. Aufreinigung der BaV16 Antikörper ist ebenfalls in Abb. 24 dargestellt.

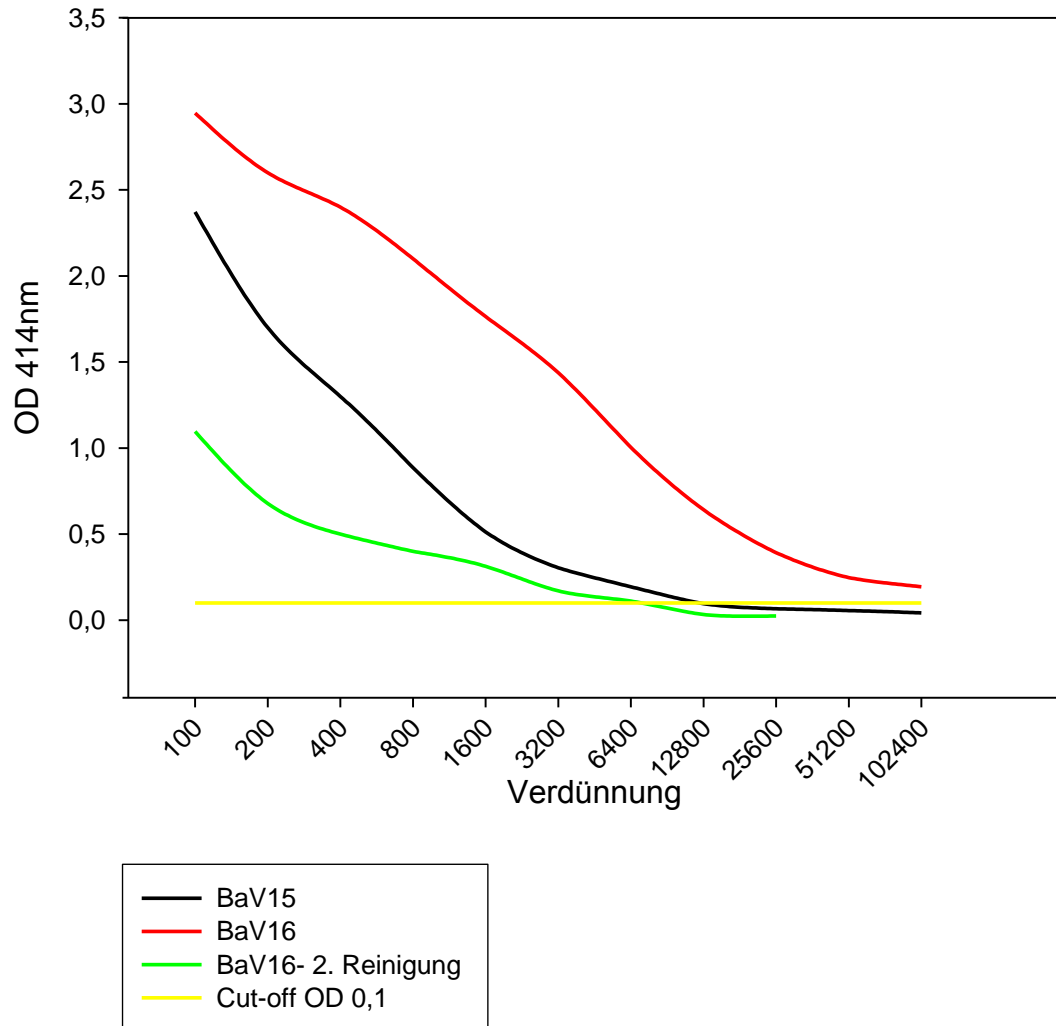
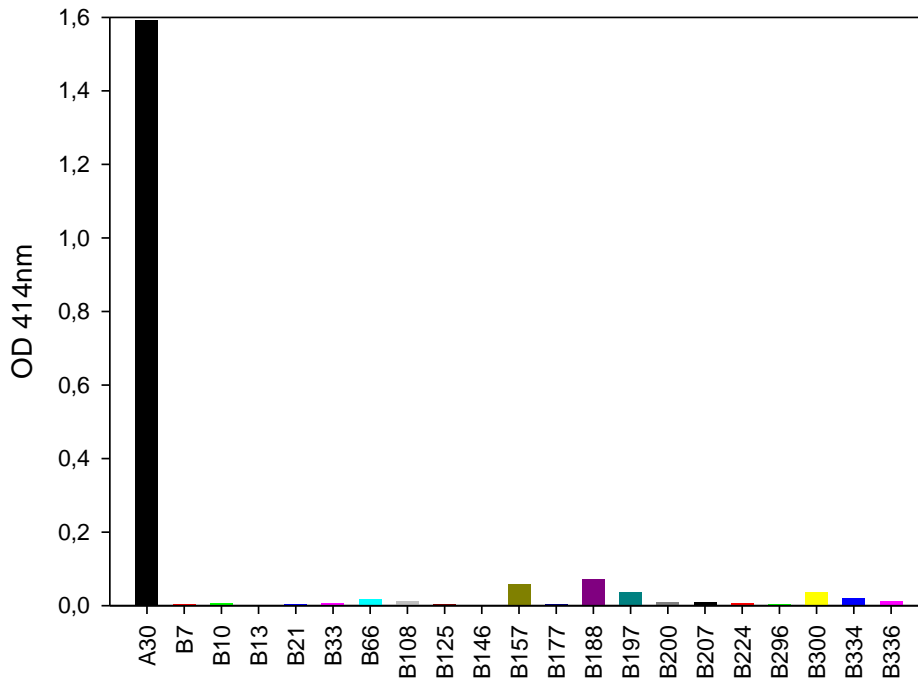


Abb. 24: Antikörpertitration der gereinigten monoklonalen Antikörper gegen die vegetative thermostabile *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation.

3.10 Bestimmung der Spezifität der gereinigten Antikörper

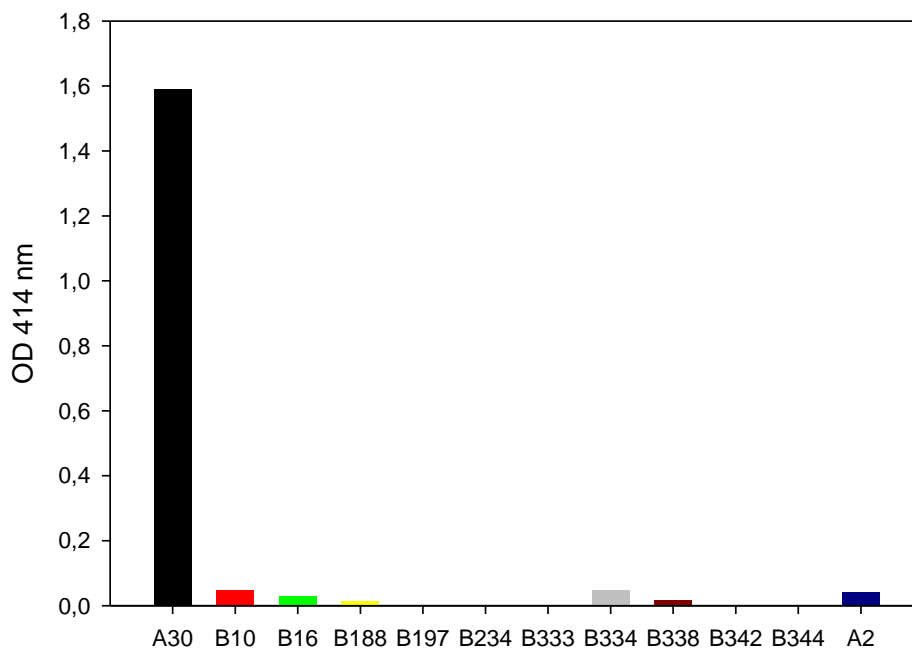
Die beiden monoklonalen Antikörper BaV15 und BaV16 wurden im ELISA mit den 20 vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen (Isolate 6-25), die im Screening der Hybridome als Antigenmischung eingesetzt wurden, sowie 10 *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Sporenpräparationen (Isolate 6-8, 19, 26-31) auf Kreuzreaktionen untersucht. Die gereinigten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 getestet. Die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchungen sind in den Abb. 25 und 26 dargestellt.

a)



vegetative *Bacillus* ssp. Antigenpräparationen

b)

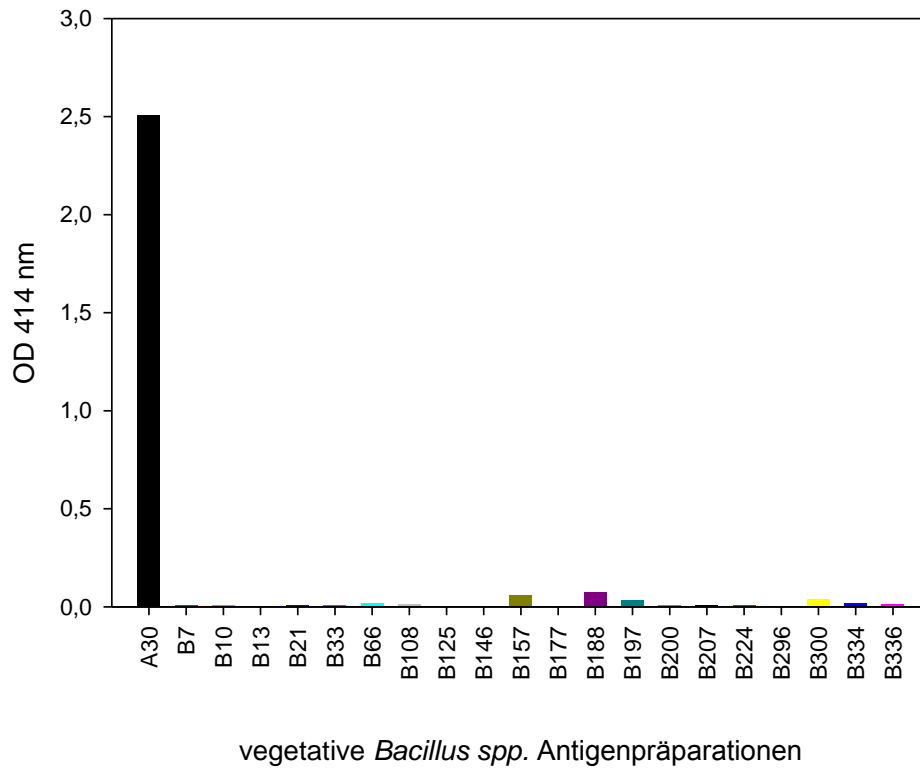


Bacillus ssp. Sporenpräparationen

Abb. 25: Spezifität des gereinigten monoklonalen Antikörpers BaV15

- a) vegetative Antigenpräparationen von 20 verschiedenen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) im Vergleich mit der *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation
- b) Sporenpräparationen von 10 verschiedenen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) im Vergleich mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation, sowie der *B. anthracis* A2 Sporenpräparation

a)



b)

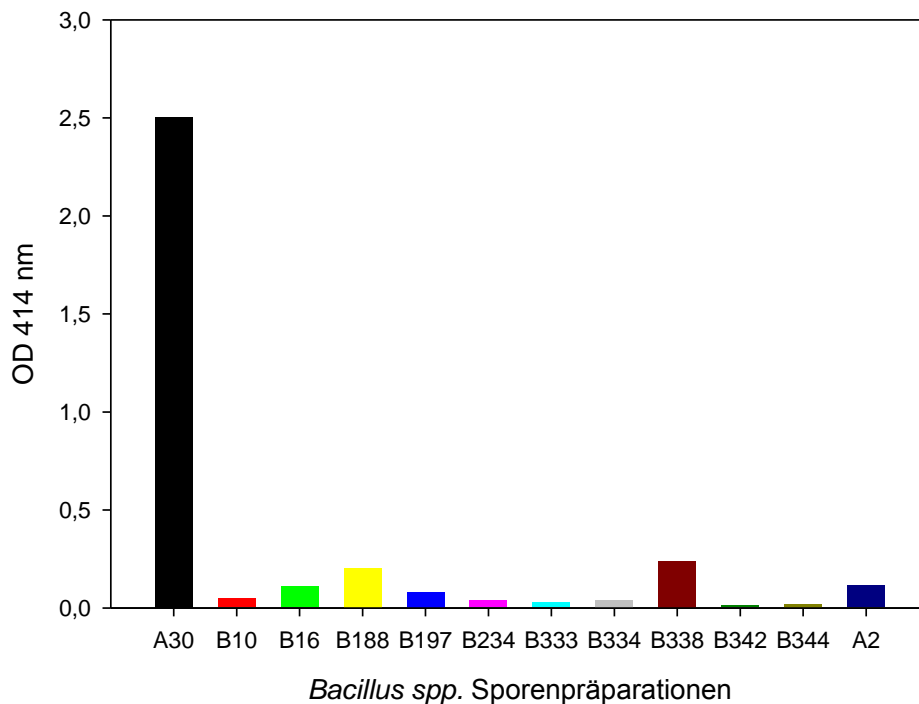


Abb. 26: Spezifität des gereinigten monoklonalen Antikörpers BaV16

- a) vegetative Antigenpräparationen von 20 verschiedenen *Bacillus* spp. (nicht-anthraxis) im Vergleich mit der *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation
- b) Sporenpräparationen von 10 verschiedenen *Bacillus* spp. (nicht-anthraxis) im Vergleich mit der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation, sowie der *B. anthracis* A2 Sporenpräparation

3.11 Stabilität und Lagerung der gereinigten monoklonalen Antikörper

Die von der Firma Squarix Biotechnology gereinigten monoklonalen Antikörper wiesen nach einiger Zeit im ELISA keine Reaktivität mehr auf. Bei einer Wiederholung der Antikörpertiterbestimmung im ELISA konnten bei einer Verdünnung von 1:100 keine messbaren Ergebnisse ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). In Abb. 27 ist die Degeneration der gereinigten monoklonalen Antikörper im Vergleich mit einem kommerziellen IgM dargestellt.

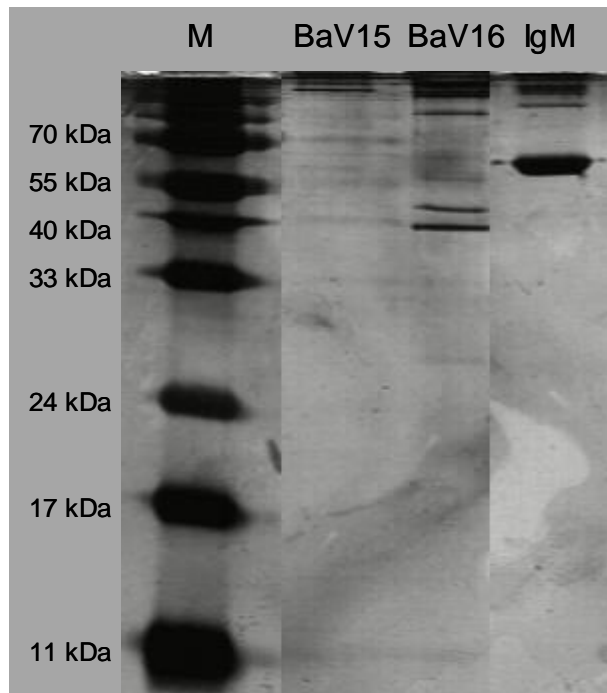


Abb. 27: Analyse der gereinigten monoklonalen Antikörper, die im ELISA keine Reaktivität mehr aufwiesen.

M= Größenstandard, BaV15 und BaV16 = gereinigte Antikörper, IgM= kommerzieller muriner IgM

Bei der erneuten Aufreinigung der Antikörper der Zelllinie BaV16 wurden zusätzlich drei unterschiedlich stabilisierte Lagerproben hergestellt (siehe Punkt 2.12). Mit diesen Lagerproben wurde direkt nach Herstellung und nach einer sechsmonatigen Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Antikörpertitration gegen die vegetative thermostabile *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Antikörpertitrationen sind in Abb. 28 dargestellt.

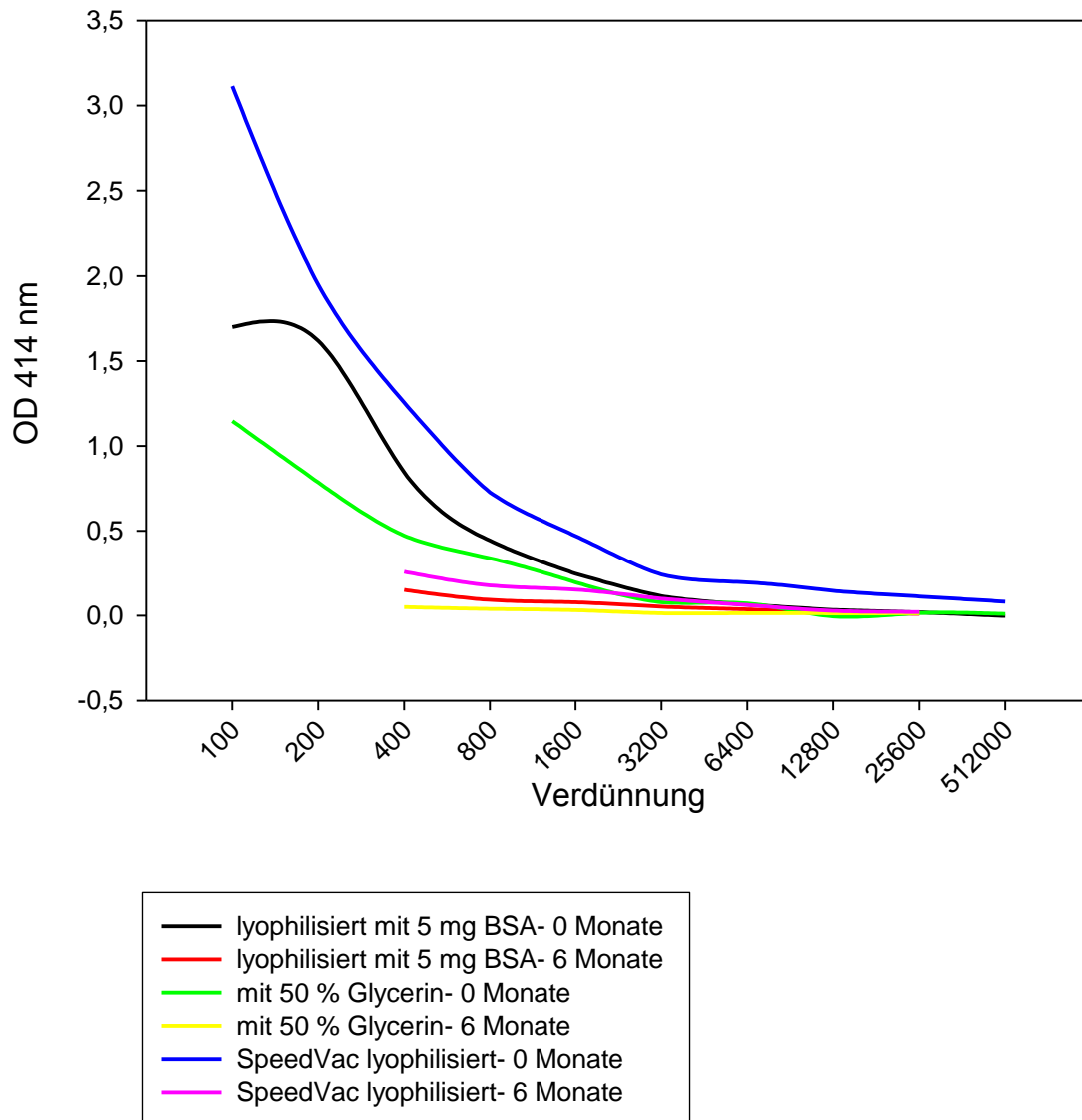


Abb. 28: Antikörpertitrations der Lagerproben gegen die vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation

Weiterführende Analysen zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper sind aufgrund der Instabilität der gereinigten Antikörper nicht möglich. Versuche, die gereinigten Antikörper durch unterschiedliche Zusätze, wie z. B. BSA oder Glycerin, zu stabilisieren führten zu keinem Erfolg.

4. Diskussion

Für eine spezifische Diagnostik von *B. anthracis* sind zahlreiche immunologische Techniken entwickelt worden. Die Mehrzahl dieser Techniken beruht auf dem spezifischen Nachweis von Sporen oder auf der Detektion der Toxinkomponenten. Zum schnellen und spezifischen Nachweis vegetativer Zellen ist neben dem RedLine Alert™ Teststreifen der Firma Tetracore nur der Ascoli Präzipitin Test als serologischer Test kommerziell erhältlich. Für den Ascoli Präzipitin Test, der für den Nachweis von *B. anthracis* in tierischem Gewebe entwickelt wurde, wird polyklonales Serum gegen thermostabile Antigene von *B. anthracis* eingesetzt. Diese thermostabilen Antigene sind nicht näher charakterisiert und reagieren, durch die nahe Verwandtschaft mit anderen Vertretern der *Bacillus* Gruppe, unspezifisch. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit monoklonale Antikörper hergestellt, die gegen potentiell *B. anthracis* spezifische thermostabile Antigene gerichtet sind und keine Kreuzreaktionen mit den getesteten *Bacillus* ssp (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen aufweisen. Diese monoklonalen Antikörper könnten die Spezifität des Ascoli Präzipitin Tests erhöhen und dadurch auch einen Nachweis von *B. anthracis* in Umweltproben, in denen zahlreiche andere *Bacillus* ssp. vorkommen können, ermöglichen.

4.1 Identifizierung von *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen

Um festzustellen, ob es *B. anthracis* spezifische thermostabile Antigene gibt, wurden aus der Stammsammlung des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene unterschiedliche *Bacillus* ssp. Isolate ausgewählt und zur Herstellung thermostabiler Antigenpräparationen durch einfaches Kochen in PBS verwendet. Analog zum kommerziellen Ascoli Antigen, das aus dem vollvirulenten *B. anthracis* Stamm „Letonice“ hergestellt wird, wurde zur Herstellung einer vegetativen Antigenpräparation der vollvirulente *B. anthracis* Stamm A30 ausgewählt, der beide Virulenzplasmide besitzt und daher bei bestimmten Wachstumsbedingungen eine Kapsel ausbildet. Von diesem Stamm wurde eine Präparation in PBS (A30PBS) hergestellt. In seiner Masterarbeit stellte Herr Yawar fest, dass der Zusatz von Phenol bei der Antigenpräparation zu einer höheren Proteinkonzentration führt, als eine Essigsäureextraktion, die bei der Herstellung des Ascoli Antigens und des Anthraxins eingesetzt wird (YAWAR, 2006). Aus diesem Grund wurde eine zweite Präparation des vollvirulenten *B. anthracis* Stamms A30 zu der zusätzlich Phenol zugegeben wurde hergestellt. Diese Präparation wurde im Weiteren als A30Ph bezeichnet.

Aufgrund der bereits beschriebenen Kreuzreaktionen des Ascoli Antigens mit anderen *Bacillus* ssp. und der nahen Verwandtschaft von *B. anthracis* mit anderen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) wurden zusätzlich zwei *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Isolate aus der

Stammsammlung ausgewählt, um unspezifische und daher kreuzreagierende thermostabile Antigene zu identifizieren. Bei diesen Isolaten handelt es sich zum einen um den *B. cereus* Stamm B197, der im γ -Phagentest eine falsch positive Reaktion aufweist und zum anderen um den *Bacillus* ssp. Stamm B334, ein Bodenprobenisolat, der im API50 eine 51,8 %-ige Identität mit *B. anthracis* aufweist und daher prädestiniert ist, in der Diagnostik fälschlicherweise als *B. anthracis* bestimmt zu werden.

Das bei der Ascoli Präzipitin Reaktion eingesetzte Antiserum wird nach Angaben des OIE und der WHO durch Immunisierung von Kaninchen mit unterschiedlichen vollvirulenten *B. anthracis* Stämmen in Kombination mit dem Sterne Vakzin gewonnen (WHO, 1998; OIE, 2008). Daher wurden zusätzlich Sporen des *B. anthracis* Stamm Ames bzw. A2 und Sporen des *B. cereus* Stamm B10 zur Herstellung thermostabiler Antigenpräparationen ausgewählt.

Zum Vergleich wurden neben den thermostabilen Antigenpräparationen aus unterschiedlichen Isolaten aus der Stammsammlung des Institutes das kommerzielle Ascoli Antigen, sowie das Anthraxin zur Identifizierung potentieller *B. anthracis* spezifischer thermostabiler Antigene herangezogen.

Nach der Auswahl der einzelnen *Bacillus* ssp. und der Herstellung thermostabiler Antigenpräparationen wurden die insgesamt acht Antigenpräparationen zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Diese Immunisierungen dienten der Gewinnung von polyklonalen Antiseren gegen die einzelnen thermostabilen Antigenpräparationen. Mit diesen Seren kann zum einen die Immunogenität der einzelnen Präparation bestimmen werden. Des Weiteren können diese Seren in Kreuzreaktionsversuchen in Western Blots zur Identifizierung von *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen herangezogen werden.

Nach Abschluss der Immunisierungen und der Entblutung hatten die meisten Kaninchen einen hohen Antikörpertiter, mit Ausnahme der Kaninchen, die mit dem kommerziellen Ascoli Antigen, und der Anthraxin Präparation immunisiert worden waren. Die Antigenkonzentrationen der Immunisierungsdosen der Ascoli Antigen Präparation, die aufgrund einer niedrigen Proteinkonzentration deutlich unter den anderen eingesetzten Antigenpräparationen lagen, waren eventuell zu gering, um eine messbare Antikörperbildung hervorzurufen. Der nicht messbare Antikörpertiter bei dem Kaninchen, das mit der Anthraxin Präparation immunisiert wurde, liegt darin begründet, dass es sich um ein bekanntermaßen sehr gutes zelluläres Antigen handelt, es jedoch eher eine schwache humorale Antwort vermittelt (SHLYAKHOV et al., 2004). Der Antikörpertiter des Kaninchens, das mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation immunisiert wurde, war deutlich geringer als die Antikörpertiter der anderen immunisierten Kaninchen. Auch diese

B. cereus B10 Sporenpräparation wies eine deutlich geringere Proteinkonzentration auf, was sich in der geringeren Antikörperbildung widerspiegelte.

Die aus den Immunisierungen der Kaninchen mit den acht thermostabilen Antigenpräparationen gewonnenen Seren wurden verwendet, um in Western Blots Antigene, die nicht mit Seren von *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) reagieren und daher potentielle *B. anthracis* spezifische thermostabile Antigene darstellen könnten, zu identifizieren. Hierfür wurden Western Blots mit allen acht thermostabilen Antigenpräparationen mit jeweils einem der Kaninchen-Entblutungsseren entwickelt.

In den vegetativen Antigenpräparationen von *B. anthracis* (A30 PBS und A30 Ph) und in der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation wurde eine ungefähr 30 kDa große Proteinbande detektiert, die sowohl von den vegetativen *B. anthracis* A30PBS und A30Ph, als auch durch das *B. anthracis* Ames Sporenseserum detektiert wurde. Bei den Antigenpräparationen der *Bacillus* ssp. (B197, B334 und B10) konnte keine Reaktion nachgewiesen werden. Bei diesem 30 kDa großen thermostabilen Antigen handelt es sich um ein potentiell *B. anthracis* spezifisches Antigen, das zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen thermostabile Antigene von *B. anthracis* verwendet werden könnte. Ein monoklonaler Antikörper, der gegen das 30 kDa große thermostabile Antigen gerichtet ist, könnte anhand der Western Blot Analysen sowohl vegetative Zellen, als auch Sporen von *B. anthracis* nachweisen.

Eine weitere, ungefähr 50 kDa große Bande wurde von den *B. anthracis* Seren nur in den vegetativen Antigenpräparationen von *B. anthracis* detektiert und nicht in der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation. In der vegetativen *B. cereus* B197, sowie der *B. cereus* B10 Sporenpräparation konnte eine Reaktion mit der 50 kDa Bande nicht nachgewiesen werden, während in der vegetativen *Bacillus* ssp. B334 Antigenpräparation eine Kreuzreaktion mit der 50 kDa Bande detektiert werden konnte. Wie bereits beschrieben handelt es sich bei diesem *Bacillus* ssp. Stamm um ein Bodenprobenisolat, das im API50 eine 51,8 %-ige Identität mit *B. anthracis* aufweist, so dass die detektierte Kreuzreaktion mit der 50 kDa Bande auf diese falsch-positive Reaktion zurückzuführen ist. Des Weiteren handelt es sich bei den Kaninchenseren um polyklonale Seren, die detektierte Kreuzreaktion könnte daher auf verschiedenen Epitopen des 50 kDa Proteins beruhen, so dass ein monoklonaler Antikörper gegen das 50 kDa spezifisch vegetative Zellen von *B. anthracis* detektieren könnte. Bei dem 50 kDa großen Protein handelt es sich daher um ein weiteres potentiell *B. anthracis* spezifisches thermostabiles Antigen, das zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *B. anthracis* spezifische thermostabile Antigene verwendet werden könnte.

Zusätzlich zu den potentiell *B. anthracis* spezifischen Antigenen wurden weitere kreuzreagierende Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht im Bereich von 11- 15 bzw. >170 kDa identifiziert, die sowohl in Antigenpräparationen von *B. anthracis* als auch in Antigenpräparationen von *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) nachgewiesen werden konnten.

In den Western Blots, entwickelt mit den Seren der mit der Anthraxin Präparation und der *B. cereus* B10 Sporenpräparationen immunisierten Kaninchen, konnten keine Reaktionen nachgewiesen werden. Bei dem Anthraxin Serum ist dies durch den nicht messbaren Antikörpertiter zu erklären, bei dem *B. cereus* B10 Sporenserum könnte der vergleichsweise niedrige Antikörpertiter zu einem verfälschten Ergebnis geführt haben. Diese Western Blots konnten daher nicht zur Identifizierung potentieller *B. anthracis* thermostabiler Antigene herangezogen werden. Das *B. cereus* vegetative B197 Serum erkennt in der Antigenpräparation, die zur Immunisierung des Kaninchens verwendet wurde, trotz eines hohen Antikörpertiters, nur zwei Proteinbanden mit einem ungefähren Molekulargewicht von 11 bzw. 170 kDa. Diese beiden Proteine wurden auch in vegetativen Antigenpräparationen von *B. cereus* und *B. anthracis* nachgewiesen und als kreuzreagierende Proteine identifiziert.

4.2 Fraktionierung der vegetativen thermostabilen Antigenpräparation von *B. anthracis*

Nach der Identifizierung zweier potentiell *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigene in vegetativen- und Sporenpräparationen von *B. anthracis* könnten diese direkt zur Immunisierung und zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden. Allerdings sind in diesen Präparationen zahlreiche weitere, teilweise kreuzreagierende Proteine enthalten, die später im Screening der Hybridome zu einem erhöhten Aufwand bei der Identifizierung von Klonen, die einen spezifischen Antikörper produzieren, führen könnten. Da bei den identifizierten potentiell *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen nur das Molekulargewicht bekannt ist und sonst keine Informationen vorliegen, ist die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen diese Antigene, im Vergleich mit der Generierung monoklonaler Antikörper gegen bereits beschriebene und bekannte Antigene, erschwert. Eine möglichst reine Antigenpräparation, die hauptsächlich die beiden potentiell *B. anthracis* spezifischen Antigene und kaum kreuzreagierende Antigene enthält, könnte die Identifizierung eines Klones, der spezifische Antikörper produziert erleichtern, da Antikörper, die gegen die kreuzreagierenden Antigene gerichtet sind, nicht bzw. kaum vorkommen. Deswegen wurde eine partielle Aufreinigung der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation durch Anionenaustauschchromatographie mittels FPLC durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches

Trennverfahren, bei dem Proteingemische anhand ihrer Ladung getrennt werden können. Durch den Einsatz der Anionenaustauschchromatographie konnte nur eine partielle Fraktionierung der vegetativen *B. anthracis* thermostabilen Antigenpräparation erreicht werden. Eine Optimierung der Aufreinigung wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

4.3 Überprüfung der partiell gereinigten vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparation

Zur Überprüfung der partiell gereinigten vegetativen Antigenpräparation, welche die beiden potentiell *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigene enthält, wurden erneut Analysen mit den Kaninchenseren im Western Blot durchgeführt. Diese Western Blots sollten sicherstellen, dass sich die Ergebnisse der vorrausgegangenen Kreuzreaktionsversuche durch den Einsatz einer partiell gereinigten *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation bestätigen lassen.

Die Analyse des Western Blots der partiell gereinigten *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation entspricht den bereits in Punkt 4.1 diskutierten Ergebnissen der Kreuzreaktionsversuche. Allerdings wurde erstmals eine Kreuzreaktion des *B. cereus* B10-Sporensersum mit der 30 kDa großen Proteinbande beobachtet. In den vorrausgegangenen Kreuzreaktionsuntersuchungen wurden jedoch geringere Mengen der nativen A30PBS Antigenpräparation verwendet. In Kombination mit dem vergleichsweise niedrigen Antikörpertiter des Kaninchens, immunisiert mit der *B. cereus* B10 Sporenpräparation, könnte in den vorhergehenden Kreuzreaktionsversuchen der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex unterhalb der Nachweisgrenze liegen, so dass eine Reaktion nicht detektiert werden konnte. Durch die verwendete höhere Proteinkonzentration bei der Analyse der partiell gereinigten *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation und des erhöhten Anteils der 30 kDa Bande in der gereinigten Antigenpräparation konnte daher bei dieser Analyse die Kreuzreaktion des *B. cereus* B10 Sporensersums mit der 30 kDa Proteinbande erstmals sichtbar gemacht werden.

Anhand dieser Ergebnisse wäre es möglich, dass ein monoklonaler Antikörper gegen das 30 kDa Protein Kreuzreaktionen mit Sporenpräparationen von *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) aufweist. Die Kreuzreaktionsversuche im Western Blot wurden allerdings mit polyklonalen Kaninchenseren durchgeführt, so dass die beobachteten Kreuzreaktionen der 30 kDa Bande auf unterschiedlichen Epitopen beruhen könnten. Ein monoklonaler Antikörper gegen ein *B. anthracis* spezifisches Epitop des 30 kDa Proteins würde keine Kreuzreaktionen mit anderen *Bacillus* ssp. aufweisen und könnte spezifisch vegetative Zellen und Sporen von *B. anthracis* detektieren.

Eine weitere Überprüfung der partiell gereinigten *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation erfolgte mit Serum der mit der partiell gereinigten *B. anthracis* A30PBS

Antigenpräparation immunisierter Maus, die den höchsten spezifischen Antikörpertiter aufwies und deren in der Milz enthaltene B-Lymphozyten verwendet wurden, um monoklonale Antikörper herzustellen. Zusätzlich wurde mit dem Mausserum ein weiterer Western Blot mit den Antigenpräparationen, die im ELISA zum Screening der Hybridome eingesetzt wurden, entwickelt. Diese Western Blot Analysen sollten erste Hinweise geben, ob die potentiell *B. anthracis* spezifischen Antigene, die im Kaninchen immunogen waren, auch in der Maus eine Antikörperbildung induzieren können. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob sich der Einsatz von Antigenpräparationen aus verschiedenen *Bacillus* ssp. im Screening zur Identifizierung von kreuzreagierenden Antikörpern eignet.

Das Mausserum erkennt in der partiell gereinigten und der nativen A30PBS Antigenpräparation nur eine Proteinbande mit einem ungefähren Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa, während die zweite *B. anthracis* spezifische 30 kDa Bande nicht vom Mausserum detektiert wurde. Möglicherweise ist durch den, im Vergleich mit den Kaninchen, geringeren Antikörpertiter des Mausserums, die Konzentration spezifischer Serumantikörper, die gegen das 30 kDa Proteinfragment gerichtet sind, nicht ausreichend, um eine Reaktion nachzuweisen.

Im Western Blot mit den Antigenpräparationen, die im Screening der Hybridome eingesetzt wurden, konnte eine Kreuzreaktion des Mausserums mit der sogenannten „Bac-Mischung“, einer Mischung aus thermostabilen Antigenpräparationen von 20 verschiedenen vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis), mit der 30 kDa Proteinbande nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion des potentiell *B. anthracis* spezifischen 30 kDa Antigens konnte bisher nur mit dem *B. cereus* B10 Sporens serum in der partiell gereinigten vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparation nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion des Mausserums mit dem *B. cereus* B10 Sporens serum konnte dagegen nicht beobachtet werden.

4.4 Herstellung und Screening der Hybridome

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen thermostabile Antigene von *B. anthracis* wurde die Hybridomtechnik, eine seit Jahren etablierte Methode, angewandt. Hierbei wurden die in der Milz der immunisierten Maus mit dem höchsten spezifischen Antikörpertiter enthaltene B- Lymphozyten mittels Polyethylenglykol mit murinen Myelomzellen fusioniert. Bei den verwendeten Methoden handelt es sich um Standardprotokolle, die bereits mehrfach erfolgreich in der Arbeitsgruppe von Prof. Bessler, Freiburg eingesetzt wurden.

Für die Immunisierung von Balb/c Mäusen zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die thermostabilen Antigene von *B. anthracis* wurde die partiell gereinigte vegetative *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation eingesetzt, in der die potentiell *B. anthracis* spezifischen Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht von 30 und 50 kDa enthalten sind. Nach der ersten Immunisierung musste das bisher eingesetzte RIBI Adjuvans ersetzt werden, da die Produktion dieses Adjuvans von der Firma Sigma-Aldrich eingestellt wurde. Für die weiteren Immunisierungen wurde das Lipopeptid Adjuvans der Firma EMC Microcollections verwendet. Nach Abschluss der Immunisierungen wurde Maus Nr. 3, aufgrund des höchsten gemessenen Antikörpertiters zur Herstellung monoklonaler Antikörper ausgewählt.

Nach der Fusion der B-Lymphozyten mit den SP2/0-Ag14 Myelomzellen erfolgte im Screening mittels ELISA die Selektion der Hybridome, die einen Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Um bei der Selektion einer monoklonalen Zelllinie Kreuzreaktionen mit *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) möglichst auszuschließend, wurden unterschiedliche Antigenpräparationen im ELISA eingesetzt. Neben der vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation, wurde eine Mischung aus 20 unterschiedlichen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen, in Kombination mit einer *B. cereus* B10 Sporenpräparation eingesetzt, da bereits in den Kreuzreaktionsversuchen mit den Kaninchenseren kreuzreagierende Proteinbanden in einem Bereich von 11- 15 kDa, sowie eine Kreuzreaktion der potentiell *B. anthracis* spezifischen 30 und 50 kDa Banden detektiert wurden. Durch diese „Bac“-Mischung sollten Zellklone, die einen nicht-spezifischen Antikörper produzieren, eliminiert werden. Zusätzlich wurden die Hybridome, trotz Immunisierung mit einer vegetativen Antigenpräparation, auf eine positive Reaktion mit einer *B. anthracis* Ames Sporenpräparation untersucht, da das potentiell *B. anthracis* thermostabile 30 kDa große Antigen auch in der *B. anthracis* Ames Sporenpräparation detektiert worden war.

Diese unterschiedlichen Antigenpräparationen, die im Screening eingesetzt wurden, sollten zur Identifizierung einer Zelllinie führen, die einen *B. anthracis* spezifischen monoklonalen Antikörper produziert, der vegetative Zellen und Sporen von *B. anthracis* detektiert.

Nach insgesamt 14 Screenings, bei denen neben der zur Immunisierung verwendeten vegetativen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation auch auf eine positive Reaktion mit *B. anthracis* Sporenantigenen getestet wurde, konnte keine monoklonale Zelllinie etabliert werden, die einen Antikörper produziert, der sowohl spezifisch vegetative Zellen, als auch Sporen von *B. anthracis* nachweist. Aus diesem Grund wurden die Screening-Strategie geändert. In der sogenannten vegetativen-Linie (V-Linie) wurden Klone rekloniert, die

positiv mit der vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparation und negativ mit der *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenmischung reagierten. Hybridome, die positiv mit der *B. anthracis* und negativ mit der *B. cereus* Sporenpräparation reagierten, wurden in der Sporen-Linie (S-Linie) rekloniert. Diese Strategie führte bei der V-Linie nach zwei Screenings zur Etablierung der monoklonalen Zelllinie BaV5 und nach weiteren zwei Screenings zu den monoklonalen Zelllinien BaV15 und BaV16. Dies erhärtet die Vermutung, dass die Identifizierung eines gegen thermostabile Antigene gerichteten monoklonalen Antikörpers, der sowohl vegetative Zellen und Sporen von *B. anthracis* spezifisch detektiert, nicht möglich ist.

Bei der S-Linie wurden nach insgesamt 12 Screenings weitere Reklonierungen aus Zeitgründen eingestellt, da zu diesem Zeitpunkt keine monoklonale Zelllinie etabliert werden konnte, obwohl die Ergebnisse durchaus auf einen *B. anthracis* Sporen spezifischen Antikörper hindeuten (Daten nicht gezeigt).

4.5 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Zur Typisierung eines monoklonalen Antikörpers gehört neben der Spezifität auch die Bestimmung der Immunglobulinklasse. Je nach Immunglobulinklasse muss für die Aufreinigung der Antikörper aus Zellkulturüberstand eine andere Methodik ausgewählt werden. Die Immunglobulinklasse lässt sich durch den Einsatz von anti-Immunglobulinklassen-Antikörperkonjugate im ELISA bestimmen.

Die Messungen bei der Zelllinie BaV5 ergaben sich widersprechende Ergebnisse, bei dieser Zelllinie scheint es sich um eine Mischkultur, die mehrere unterschiedliche Antikörper produziert, zu handeln. Weitere Reklonierungen, um eine monoklonale Zelllinie zu erhalten, führten nach fünf weiteren Subkultivierungen zu keinem Ergebnis. Aufgrund der Identifizierung von zwei weiteren monoklonalen Zelllinien wurden weitere Arbeiten an dieser Linie eingestellt.

Bei den Zelllinien Bav15 und BaV16 konnten die sezernierten Antikörper eindeutig der Immunglobulinklasse M zugeordnet werden. Bei Antikörpern der Klasse M handelt es sich um Antikörper der Primärantwort, nach mehreren Immunisierungen erfolgt in der Regel ein Klassenwechsel zu IgG. Durch die Wahl des Adjuvans, sowie durch Modifikationen des Immunisierungsschemas lässt sich bis zu einem gewissen Grad die Immunglobulinklasse beeinflussen. Das zur Immunisierung der Mäuse eingesetzte Lipopeptidadjuvans bewirkt *in vitro* und *in vivo* eine polyklonale Aktivierung, wobei vor allem Antikörper der Subklassen IgM und IgG₂ gebildet werden. (PETERS und BAUMGARTEN).

In der Literatur sind nur vereinzelt *B. anthracis* spezifische Antikörper der Klasse M beschrieben, die nicht weiter charakterisiert wurden, wenn zusätzlich ein Antikörper der Klasse G identifiziert wurde. Antikörper der Klasse M wurden nach Immunisierung von Mäusen mit Hitze- oder Formaldehyd inaktivierten *B. anthracis* Sporen oder der C-terminalen Domäne des BclAs identifiziert (PHILLIPS et al., 1988; WANG et al., 2009; NUTTALL et al., 2011). Es sind auch monoklonale Antikörper der Klasse M gegen vegetative Antigene, wie z. B. das Galactose-N-Acetylglucosamin der Zellwand, der poly- γ -D-Glutaminsäure oder das EF beschrieben (EZZELL et al., 1990; CHABOT et al., 2004; WINTERROTH et al., 2010).

4.6 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper aus Zellkulturüberstand

Um die sezernierten IgMs aus dem Zellkulturüberstand zu reinigen, wurde zunächst eine Affinitätschromatographie mittels FPLC durchgeführt. Bei der eingesetzten IgM-Säule handelt es sich um eine Chromatographiesäule, die speziell für die Aufreinigung von Antikörpern der Klasse M entwickelt wurde. Allerdings konnte im ELISA keine Reaktivität der gereinigten Antikörper festgestellt werden. Aufgrund der nur geringen Ausbeute der Reinigungsläufe könnte eine eventuelle Präzipitation der Antikörper und damit ein Reaktivitätsverlust nicht mit bloßen Auge sichtbar gewesen sein.

Die Aufreinigung der beiden IgMs aus dem Zellkulturüberstand wurde daher an die Firma Squarix Biotechnology übergeben. Eine erste Reinigung resultierte in 1 mg/ml gereinigte Antikörper der Zelllinie BaV16. Bei einer zweiten Aufreinigung der Linie BaV16 konnte bereits in PBS eine starke Präzipitation der gereinigten Antikörper beobachtet werden und einem, im Vergleich zur 1. Reinigung, niedrigeren Antikörpertiter. Bei der Linie BaV15 konnte nur eine sehr geringe Ausbeute von circa 130 μ g/ml gereinigter Antikörper erzielt werden. Es wäre möglich, dass ein zunehmender Anteil der Zellen keine Antikörper mehr produziert und es sich also um eine Mischung aus antikörperproduzierenden und nicht produzierenden Zellen handelt. Durch Subkultivierung wurde versucht, die antikörperproduzierenden Klone zu selektieren. Die Subkultivierungen der Linie BaV15 führten zu keiner Verbesserung der Produktionsrate, so dass weitere Arbeiten an dieser Linie eingestellt wurden.

4.7 Bestimmung der Spezifität der gereinigten monoklonalen Antikörper

Nach Erhalt der gereinigten monoklonalen Antikörper BaV15 und BaV16 wurde im Anschluss an die Antikörpertiterbestimmung eine Bestimmung der Spezifität durchgeführt. Hierfür wurden die 20 vegetativen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) Antigenpräparationen, die bereits im Screening der Hybridome in einer Mischung eingesetzt wurden, einzeln auf Kreuzreaktion mit den gereinigten Antikörpern getestet, da bereits im Western Blot mit der

„Bac-Mischung“ eine Kreuzreaktion des Mausserums mit der 30 kDa Bande beobachtet wurde. Zusätzlich wurden 10 Sporenpräparationen von verschiedenen *Bacillus* ssp. (nicht-anthraxis) und eine Präparation von Sporen des *B. anthracis* Stammes A2 hergestellt und im ELISA eingesetzt, da in den Kreuzreaktionsversuchen das potentiell *B. anthracis* spezifische 30 kDa große Antigen auch in Sporenpräparationen detektiert wurde.

Bei den getesteten 20 vegetativen Antigenpräparationen konnte bei keinem der beiden monoklonalen Antikörper eine Kreuzreaktion festgestellt werden. Bei den Sporenpräparationen wurde weder bei den *B. anthracis* noch bei den *Bacillus* ssp. Sporenpräparationen eine Reaktion nachgewiesen. Bei den monoklonalen Antikörpern BaV15 und BaV16 handelt es sich um *B. anthracis* spezifische monoklonale Antikörper, die spezifisch vegetative Zellen von *B. anthracis* detektieren.

Bei Spezifitätsuntersuchungen mit ammoniumsulfatgefälltem Zellkulturüberstand der beiden monoklonalen Zelllinien BaV15 und BaV16, bei denen 45 verschiedene vegetative *Bacillus* ssp. Antigenpräparationen eingesetzt wurden, konnten bei beiden Zelllinien Kreuzreaktionen mit einem bzw. zwei *Bacillus* ssp. Antigenpräparationen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese kreuzreagierenden *Bacillus* ssp. Isolate müssten in weiteren Untersuchungen mit den gereinigten monoklonalen Antikörpern getestet werden, um diese vorläufigen Kreuzreaktionen zu verifizieren. Allerdings waren diese weiteren Spezifitätsuntersuchungen aufgrund der Instabilität der gereinigten monoklonalen Antikörper nicht möglich.

4.8 Stabilität der gereinigten monoklonalen Antikörper

Bei einer Wiederholung der Antikörpertitration der gereinigten Antikörper nach ungefähr sechs Monaten konnte bereits bei einer Verdünnung von 1:100 im ELISA kein messbares Ergebnis ermittelt werden, was auf eine eventuelle Degeneration der IgMs hindeutete. Nach einer Analyse der gereinigten Antikörper in einem silbergefärbten Acrylamidgel konnte eine, im Vergleich mit einem kommerziellen murinen IgM, deutliche Degeneration der IgM festgestellt werden.

Bei einer erneuten Reinigung der Linie BaV16 wurden zusätzlich drei unterschiedliche Lagerproben, durch eine Lyophilisierung mit BSA, durch Zugabe von Glycerin oder durch SpeedVac-Lyophilisierung, hergestellt. Nach Angaben der Firma Squarix Biotechnology handelt es sich hierbei um Standardverfahren zur Stabilisierung von Antikörpern, wodurch eine längerfristige Lagerung ohne Reaktivitätsverlust ermöglicht werden soll. Die einzelnen Aliquots wurden direkt nach Herstellung, sowie nach sechsmonatiger Lagerung

bei -20 °C im ELISA getestet. Die Lagerproben, denen zur Stabilisierung der IgMs BSA bzw. Glycerin zugegeben wurde, wiesen bereits direkt nach Herstellung einen Antikörpertiter von ungefähr 1:3000 bzw. 1:1600 auf, nach sechs Monaten konnte kein Antikörpertiter mehr ermittelt werden. Bei der mittels SpeedVac-Lyophilisierung hergestellten Lagerprobe wurde direkt nach der Herstellung ein Antikörpertiter von ungefähr 1:25.000 ermittelt. Nach 6 Monaten Lagerzeit wurde jedoch ein deutlicher Abfall des Antikörpertiters auf ungefähr 1:3000 gemessen.

Trotz unterschiedlicher Ansätze, die IgMs zu stabilisieren, konnte bei keiner der untersuchten Lagerproben eine Stabilisierung erreicht werden.

4.9 Schlussfolgerung

Bei den in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörper handelt es sich um spezifische, gegen vegetative thermostabile Antigene von *B. anthracis* gerichtete Antikörper der Klasse M. Weiterführende Analysen sind aufgrund der Instabilität der Antikörper nicht möglich, auch Stabilisierungsversuche durch Zusätze, wie BSA oder Glycerin führten zu keinem Erfolg. Um nachzuweisen, gegen welches thermostabile Antigen der vegetativen *B. anthracis* Antigenpräparation die Antikörper der Klasse M gerichtet sind und danach dieses Antigen zu charakterisieren, müssten im nächsten Schritt die gereinigten Antikörper stabilisiert werden. Dies könnte durch Optimierung der Aufreinigung oder durch Testung weiterer Stabilisatoren erreicht werden.

Die rekombinante Herstellung von Antikörpern eröffnen völlig neue Möglichkeiten, wie z. B. die Umklonierung auf eine andere Immunglobulinklasse. Durch eine Umklonierung der IgMs auf ein Immunglobulin der Klasse G könnten die aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Reinigung und Lagerung eventuell verringert werden. Antikörper der Klasse G lassen sich in der Regel einfach über Protein A oder Protein G Chromatographiesäulen aufreinigen und die Zugabe von Azid ist normalerweise ausreichend, um die Antikörper über eine längere Zeit zu lagern.

Statt einer Umklonierung auf eine andere Immunglobulinklasse könnten die hergestellten Antikörper auch zu scFv-Fragmenten konvertiert werden. BREITLING und DÜBEL veröffentlichten 1997 eine Methode zur Klonierung und Expression von scFv-Fragmenten aus Maus- und Ratten Hybridomen (BREITLING und DÜBEL, 1997b). Hierbei können die Gene für die variable Region eines Hybridomaklons amplifiziert und Phagen-Bibliotheken erstellt werden. Mit dem exprimierten und gereinigten scFv-Fragment kann z. B. ein Western Blot durchgeführt werden, um zu ermitteln, ob es sich bei dem Epitop um das 30 oder das 50 kDa Antigen in der thermostabilen *B. anthracis* A30PBS Antigenpräparation

4 Diskussion

handelt. Eventuell lässt sich im Anschluss ermitteln, ob es sich bei dem Antigen um einen Zellwandbestandteil, oder um eine Komponente der Kapsel handelt.

Nach erfolgter Stabilisierung der IgMs oder der Konvertierung zu einem Immunglobulin der Klasse G oder einem scFv-Fragments könnten weitere Spezifitätsuntersuchungen durchgeführt werden, um die Kreuzreaktionen, die mit ammoniumsulfatgefälltem Zellkulturüberstand detektiert wurden zu verifizieren.

Nach Abschluss dieser weiterführenden Charakterisierung der monoklonalen Antikörper könnten diese in der Ascoli Präzipitin Reaktion oder einem Latex Agglutinationstest zur schnellen und spezifischen Diagnostik von vegetativen Zellen von *B. anthracis* eingesetzt werden.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Abrami, L., Reig, N. and van der Goot, F. G. (2005): Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *TRENDS Microbiol.* 13 (2), 72-78
- (2) Abshire, T. G, Brown, J. E., and Ezzell, J. W. (2005): Production and validation of the use of gamma phage for identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* 43 (9), 4780-4788
- (3) Adamo, R., Saksena, R. and Kovac, P. (2005): Synthesis of the beta anomer of the spacer-equipped tetrasaccharide side chain of the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Carbohydr. Res.* 340, 2579-2582
- (4) Adusumilli, S. (2010): Raxibacumab: Treatment of anthrax infection. *Drugs of the future* 35 (3), 179-182
- (5) Antwerpen, M. H., Zimmermann, P., Bewley, K., Frangoulidis, D., Meyer, H. (2008): Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *B. anthracis*. *Mol. Cell. Probes.* 22 (5-6), 313-315
- (6) Ascoli, A. (1911): Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand. *Zbl. Bakt. Parasit. Infekt.* 58, 63-70
- (7) AuCoin, D. P., Sutherland, M. D., Percival, A. L., Lyons, C. R., Lovchik, J. A., Kozel, T. R. (2009): Rapid detection of the poly- γ -D-glutamic acid capsular antigen of *Bacillus anthracis* by latex agglutination. *Diagn. Micr. Infect. Dis* 64, 229-232
- (8) Avakyan, A. A., Katz, L. N., Levina, K. N., and Pavlova, I. B. (1965): Structure and composition of the *Bacillus anthracis* capsule. *J. Bacteriol.* 90 (4), 1082-1095
- (9) Baillie, L. W. (2009): Is new always better than old? The development of human vaccines for anthrax. *Hum. Vaccin.* 5 (12), 806-816
- (10) Beauregard, K. E., Collier, R. J., and Swanson, J. A. (2000): Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalisation. *Cell. microbiol.* 2 (3), 251-258

- (11) Beyer, W. (1992): *Bacillus* ssp. In: Mikrobiologische Diagnostik, Bakteriologie-Mykologie- Virologie- Parasitologie, Hrsg: B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, P. Kimmig. 2. Auflage 1992, Thieme Verlag
- (12) Bouzianas, D. G. (2010): Current and future medical approaches to combat the anthrax Threat. J. med. Chem. 53 (11), 4305-4331
- (13) Breitling F. und Dübel S. (1997a): Rekombinante Antikörper. Aus der Reihe Labor im Fokus, Spektrum Verlag
- (14) Breitling, F. und Dübel, S. (1997b): Cloning and expression of single-chain fragments (scFv) from mouse and rat hybridomas. In: Methods in Molecular Medicine vol 13, Molecular diagnosis of infectious diseases, edited by U. Reischl, Humana Press Inc, Totowa, NJ
- (15) Brown, E. R. and Cherry, W. B. (1955): Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. J. Infect. Dis. 96 (1), 34-39
- (16) Chabot, D. J., Scorpio, A., Tobery, S. A., Little, S. F., Norris, S. L., Friedlander, A. M. (2004): Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. Vaccine, 23 (1), 43-47
- (17) Chen, Z., Moayeri, M., Crown, D., Emerson, S., Gorshkova, I., Schuck, P., Leppla, S. H., and Purcell, R. H. (2009): Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with ant-protective antigen antibody. Infect. Immun. 77(9), 3902-3908
- (18) Chen, Z., Schneerson, R., Lovchik, J., Lyons, C. R., Zhao, H., Dai, Z., Kubler-Kielb, J., Leppla, S. H., and Purcell, R. H. (2011): Pre- and postexposure protection against virulent anthrax infection in mice by humanized monoclonal antibodies to *Bacillus anthracis* capsule. Proc. Natl. Acad. Sci USA 109 (2), 739-744
- (19) Crich, D. and Vinogradova, O. (2007): Synthesis of the antigenic tetrasaccharide side chain from the major glycoprotein of *Bacillus anthracis* exosporium. J. Org. Chem. 72 (17), 6513-6520

- (20) Daubenspeck, J. M., Zeng, H., Chen, P., Dong, S., Steichen, C. T., Krishna, N. R., Pritchard, D. G., and Turnbough jr, C. L. (2004) Novel oligosaccharide side chain of the collagen-like region of BclA, the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J. biol. chem.* 279 (30), 30945-30953
- (21) De, B. K., Bragg, S. L., Sanden, G. N., Wilson, K. E., Diem, L. A., Marston, C. K., Hoffmaster, A. R., Barnett, G. A., Weyant, R. S., Abshire, T. G., Ezzell, J. W., and Popovic, T. (2002): Two-component direct fluorescent-antibody assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (10), 1060-1065
- (22) DelVecchio, V. G., Connolly, J. P., Alefantis, T. G., Walz, A., Quan, M. A., Patra, G., Ashton, J. M., Whittington, J. T., Chafin, R. D., Liang, X., Grewal, P., Khan, A. S., and Mujer, C.V. (2006): Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9), 6355-6363
- (23) Edwards, K. A., Clancy, H. A., Baeumner, A. J. (2006): *Bacillus anthracis*: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods. *Anal. bioanal. chem.* 384, 73- 84
- (24) Ezzell jr, J. W., and Abshire, T.G. (1988): Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 56 (2), 349-356
- (25) Ezzell jr, J. W., Abshire, T. G., Little, S. F., Lidderding, B. C., and Brown, C. (1990): Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose -N- acetylglucosamine polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 28 (2), 223-231
- (26) Ezzell jr, J.W., and Welkos, S. L. (1999): The capsule of *Bacillus anthracis*, a review. *J. appl. Microbiol.* 87, 250
- (27) Fouet, A. (2009): The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 30 (6), 374-385
- (28) Froude II, J. W., Thullier, P. and Pelat, T. (2011): Antibodies against Anthrax: Mechanisms of action and clinical applications. *Toxins* 3 (11), 1433-1452

- (29) Gella, F. J. Serra, C. and Gener, J. (1991): Latex agglutination procedures in immunodiagnosis. *Pure & Appl. Chem.* 63 (8), 1131-1134
- (30) Green, B. D., Battisti, L., Koehler, T. M., Thorne, C. B., and Ivins, B. E. (1985): Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 49 (2), 291-297
- (31) Harrison, L. H., Ezzell, J. W., Abshire, T. G., Kidd, S., Kaufmann, A. F. (1989): Evaluation of serologic tests for diagnosis of anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay. *J. Infect. Dis.* 160 (4), 706-710
- (32) Hoffmann, P., Jimenez-Diaz, M., Loleit, M., Tröger, W., Wiesmüller, K.-H., Metzger, J., Jung, G., Kaiser, I., Stöcklin, S., Lenzner, S., Peters, J. H., Grimm, R., Schäfer, E., and Bessler, W. G. (1990): Preparation of human and murine monoclonal antibodies: antigens combined with or conjugated to lipopeptides constitute potent immunogens for in vitro and in vivo immunizations. *Hum. Antibod. Hybridomas* 1 (3), 137-144
- (33) Hoffman, P., Wiesmüller, K.-H., Metzger, J., Jung, G. and Bessler, W. G. (1989): Induction of tumor cytotoxicity in murine bone marrow-derived macrophages by two synthetic lipopeptide analogues. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 575-582
- (34) Hoffmann, P., Jiménez-Díaz, M., Weckesser, J., Bessler, W. G. (1996): Murine bone marrow-derived macrophages constitute feeder cells for human B cell hybridomas. *J. Immunol. Methods* 196, 85-91
- (35) Irengé, L. M, Gala, J.-L. (2012): Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (4), 1411-1422
- (36) Ivins, B. E. and Welkos, S. L. (1986): Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.* 54 (1), 537-542
- (37) Ivins, B. E., Ezzell jr., J. W., Jemski, J., Hedlund, K. W., Ristoph, J. D., and Leppia, S. H. (1986): Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 52 (2), 454-458

- (38) Knisely, R. F. (1966): Selective medium for *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 92 (3), 784-786
- (39) Köhler, G., Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256 (5517), 495-497
- (40) Kozel, T. R., Murphy, W. J., Brandt, S., Blazar, B. R., Lovchik, J. A., Thorkildson, P. Percival, A., and Lyons, C. R. (2004): mAbs to *Bacillus anthracis* capsular antigen for immunoprotection in anthrax and detection of antigenemia. Proc. Natl. Acad. Sci USA 101 (14), 5042-5047
- (41) Kubler-Kielb, J., Liu, T.-Y., Mocca, C., Majadly, F., Robbins, J. B., and Schneerson, R. (2006): Additional conjugation methods and immunogenicity of *Bacillus anthracis* poly- γ -D-glutamic acid-protein conjugates. Infect. Immun. 74 (8), 4744-4749
- (42) Kuehn, A., Kovác, P., Saksena, R., Bannert, N., Klee, S. R., Ranisch, H., and Grunow, R. (2009): Development of antibodies against Anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. Clin. Vaccine Immunol., 16 (12), 1728-1737
- (43) Kulshreshtha, P., Bhatnagar, R. (2011): Inhibition of anthrax toxins with a bispecific monoclonal antibody that cross reacts with edema factor as well as lethal factor of *Bacillus anthracis*. Mol. Immunol. 48 (15-16), 1958-1965
- (44) Little, S. F. and Knudson, G. B. (1986): Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. Infect. Immun. 52 (2), 509-512
- (45) Little, S. F., Leppla, S. H., and Cora, E. (1988): Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of the *Bacillus anthracis* toxin. Infect. Immun. 56 (7), 1807-1813
- (46) Little, S. F., Leppla, S. H., and Friedlander, A. M. (1990): Production and characterization of monoclonal antibodies against the lethal factor component of *Bacillus anthracis* lethal toxin. Infect. Immun. 58 (6), 1606-1613

- (47) Longchamp, P., Leighton, T. (1999): Molecular recognition specificity of *Bacillus anthracis* spore antibodies. J. Appl. Microbiol. 87 (2), 246-249
- (48) Makino, S.-I., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, C., and Yoshikawa, M. (1989): Molecular characterization and protein analysis of the *cap* region which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 171 (2), 722-730
- (49) Masri, S. A., Rast, H., Hu, W.-G., Nagata, L. P., Chau, D., Jager, S., Mah, D. (2007): Cloning and expression in *E. coli* of a functional Fab fragment obtained from single human lymphocyte against anthrax toxin. Mol. Immunol. 44, 2101-2106
- (50) Mazumdar, S. (2009): Raxibacumab. MAbs 1 (6), 531-8
- (51) Mechaly, A., Zahavy, E., and Fisher, M. (2008): Development and implementation of a single-chain Fv antibody for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. Appl. Environ. Microbiol. 74 (3), 818-822
- (52) Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Mock, M., Gounon, P. and Fouet, A. (1997): Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is a major cell-associated antigen. Mol. Microbiol. 23 (6), 1147-1155
- (53) Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M., and Fouet, A. (1998): The capsule and S-Layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 180 (1), 52-58
- (54) Migone, T.-S., Subramanian, G. M., Zhong, J., Healey, L. M., Corey, A., Devalaraja, M., Lo, L., Ullrich, S., Zimmermann, J., Chen, A., Lewis, M., Meister, G., Gillum, K., Sanford, D., Mott, J., and Bolmer, S. D. (2009): Raxibacumab for the treatment of inhalational Anthrax. N. Engl. J. Med. 361 (2), 135-44
- (55) Mittenbühler, K., Loleit, M., Baier, W., Fischer, B., Sedelmeier, E., Jung, G., Winkelmann, G., Jacobi, C., Weckesser, J., Erhard, M. H., Hofmann, A., Bessler, W., and Hoffmann, P. (1997): Drug specific antibodies: T-cell epitope-lipopeptide conjugates are potent adjuvants for small antigens in vivo and in vitro. Int. J. Immunopharmac. 19 (5), 277-287

- (56) Nuttall, S. D., Wilkins, M. L., Streltsov, V. A., Pontes-Braz, L., Dolezal, O., Tran, H., and Liu, C.-Q. (2011): Isolation, kinetic analysis, and structural characterization of an antibody targeting the *Bacillus anthracis* major spore surface protein BclA. *Proteins*. 79 (4), 1306-1317
- (57) OIE (2004): Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 2.2.1 Anthrax
- (58) OIE (2008): Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 2.2.1 Anthrax
- (59) Okinaka, R. T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A. R., Hill, K. K., Keim, P., Koehler, T. M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, R., and Jackson, P. J. (1999): Sequence and organization of pX01, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J. Bacteriol.* 181 (20), 6509-6515
- (60) Peters, J. H und Baumgarten, J. H. (Hrsg.) (1990): Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung. 2. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York
- (61) Phillips, A. P., Campell, A. M. and Quinn, R. (1988): Monoclonal antibodies against spore antigens of *B. anthracis*. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1 (3), 169-178
- (62) Porath, J., Maisano, F. and Belew, M. (1985): Thiophilic adsorption- a new method for protein fractionation. *FEBS* 185 (2), 306-310
- (63) Quinn, C. P., Semenova, V. A., Elie, C. M., Romero-Steiner, S., Greene, C., Li, H., Stamey, K., Steward-Clark, E., Schmidt, D. S., Mothershed, E., Pruckler, J., Schwartz, S., Benson, R. F., Hesel, L. O., Holder, P. F., Johnson, S. E., Kellum, M., Messmer, T., Thacker, W. L., Besser, L., Plikaytis, B. D., Taylor jr, T. H., Freeman, A. E., Wallace, K. J., Dull, P., Sejvar, J., Bruce, E., Moreno, R., Schuchat, A., Lingappa, J.R., Marano, N., Martin, S. K., Walls, J., Bronsdon, M., Carlone, G. M., Bajani-Ari, M., Ashford, D. A., Stephens, D. S., and Perkins, B. A. (2002): Specific, sensitive, and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin protective antigen. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (10), 1103-1110

- (64) Rao, S. S., Mohan, K. V. K., Atreya, C. D. (2010): Detection technologies for *Bacillus anthracis*: Prospects and challenges. *J Microbiol Methods*. 82 (1), 1-10
- (65) Redmond, C., Baillie, L. W. J., Hibbs, S., Moir, A. J. G. and Moir, A. (2004): Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology* 150, 355-363
- (66) Rivera, J., Nakouzi, A, Abboud, N., Revskaya, E., Goldmann, D., Collier, R. J., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2006): A monoclonal antibody to *Bacillus anthracis* protective antigen defines a neutralizing epitope in domain 1. *Infect. Immun.* 74 (7), 4149-4156
- (67) Saksena, R., Adamo, R. and Kováč, P. (2006): Synthesis of the tetrasaccharide side chain of the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 615-617
- (68) Schmiedl, A. und Dübel, S. (2004): Rekombinante Antikörper & Phagen-Display. In: *Molekulare Biotechnologie*, Wiley-VCH, Hrsg: M. Wink
- (69) Shulman, M., Wilde, C. D., Köhler, G. (1978): A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276 (5685), 269-270
- (70) Shlyakhov, E., Rubinstein, E. (1996): Evaluation of the anthraxin skin test for diagnosis of acute and past human anthrax. *Eur. J. clin. Microbiol. Infect. Dis* 15, 242-245
- (71) Shlyakhov, E., Rubinstein, E. and Novikov, I. (1997): Anthrax post-vaccinal cell-mediated immunity in humans: kinetic pattern. *Vaccine* 15 (6-7), 631-636
- (72) Shlyakhov, E., Shoenfeld, Y., Gilburd, B. and Rubinstein, E. (2004): Evaluation of *Bacillus anthracis* extractable antigen for testing anthrax immunity. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (5)421- 424
- (73) Sirisanthana, T., Nelson, K. E., Ezzell, J. W., Abshire, T. G. (1988): Serological studies of patients with cutaneous and oral-oropharyngal anthrax from northern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36 (6), 575-581

- (74) Steichen, C., Chen, P., Kearney, J. F., and Turnbough jr, C. L. (2003): Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *J. Bacteriol.* 185 (6), 1903-1910
- (75) Steiniger, S. C. J., Altobell III, L. J., Zhou, B., Janda, K. D. (2007): Selection of human antibodies against cell surface-associated oligomeric anthrax protective antigen. *Mol. Immunol.* 44, 2749-2755
- (76) Swiecki, M., Lisanby, M. W., Shu, F., Turnbough jr, C. L., and Kearney, J. F. (2006): Monoclonal antibodies for *Bacillus anthracis* spore detection and functional analyses of spore germination and outgrowth. *J. Immunol.* 176 (10), 6076-6084
- (77) Sylvestre, P., Couture-Tosi, E., and Mock, M. (2002): A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol. Microbiol.* 45 (1), 169-178
- (78) Tamborrini, M., Werz, D. B., Frey, J., Pluschke, G., and Seeberger, P. H. (2006): Anti-carbohydrate antibodies for the detection of anthrax spores. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45 (39), 6581-2
- (79) Tamborrini, M., Oberli, M. A., Werz, D. B., Schürch, N., Frey, J., Seeberger, P. H. and Pluschke, G. (2009): Immuno-detection of anthrose containing tetrasaccharide in the exosporium of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1618-1628
- (80) Tamborrini, M., Holzer, M., Seeberger, P. H., Schürch, N., and Pluschke, G. (2010): Anthrax spore detection by a luminex assay based on monoclonal antibodies that recognize anthrose-containing oligosaccharides. *Clin. Vaccine Immunol.* 17 (9), 1446-1451
- (81) Tamborrini, M., Bauer, M., Bolz, M., Maho, A., Oberli, M. A., Werz, D. B., Schelling, E., Zinsstag, J., Seeberger, P. H., Frey, J., and Pluschke, G. (2011): Identification of an african *Bacillus anthracis* lineage that lacks expression of spore surface-associated Anthrose-containing oligosaccharide. *J. Bacteriol.* 193 (14), 3506-3511

- (82) Turnbull, P. C. B, Doganay, M., Lindeque, P. M., Aygen, B. and McLaughlin, J. (1992): Serology and anthrax in humans, livestock and Etosha national park wildlife. *Epidemiol. Infect.* 108, 299-313
- (83) Turnbull, P. C. B. (1999): Definitive identification of *Bacillus anthracis*- a review. *J. Appl. Microbiol.* 87, 237-240
- (84) Uchida, M., Harada, T., Enkhtuya, J., Kusumoto, A., Kobayashi, Y., Chiba, S., Shyaka, A., Kawamoto, K. (2012): Protective effect of *Bacillus anthracis* surface protein EA1 against anthrax in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421 (2), 323-328
- (85) Vodkin, M. H. and Leppla, S. H. (1983): Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Cell* 34, 693- 697
- (86) Vor dem Esche, U., Huber, M., Zgaga-Griesz, A., Grunow, R., Beyer, W., Hahn, U, Bessler, W. G. (2011): Passive vaccination with a human monoclonal antibody: generation of antibodies and studies for efficacy in *Bacillus anthracis* infections. *Immunobiology* 216 (7), 847-853
- (87) Wang, S.-H., Zhang, J.-B., Zang, Z.-P., Zhou, Y.-F., Yang, R.-F., Chen, J., Guo, Y.-C., You, F., and Zhang, X.-E. (2006): Construction of a single chain variable fragment (scFv) and BiscFv-Alkaline phosphatase fusion protein for the detection of *Bacillus anthracis*. *Anal. Chem.* 78, 997-1004
- (88) Wang, D.-B., Yang, R., Zhang, Z.-P., Bi, L.-J., You, X.-Y., Wei, H.-P., Zhou, Y.-F., Yu, Z., Zhang, X.-E. (2009): Detection of *B. anthracis* spores and vegetative cells with the same monoclonal antibody. *PLOS one* 4 (11): e7810
- (89) Werz, D. B. and Seeberger, P. H. (2005): Total synthesis of antigen *Bacillus anthracis* tetrasaccharide- creation of an anthrax vaccine candidate. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 6315-6318
- (90) WHO (1998): Guidelines for the surveillance and control of anthrax in human and animals. 3rd edition. Principal author: PCB Turnbull. WHO/EMC/ZDI/98.6

- (91) Williams, D. D. and Turnbough jr, C. L. (2004): Surface layer protein EA1 is not a component of *Bacillus anthracis* spores but is a persistent contaminant in spore preparations. J. Bacteriol. 182 (2), 566-569
- (92) Winterroth, L., Rivera, J., Nakouzi, A. S., Dadachova, E., and Casadevall, A. (2010): Neutralizing monoclonal antibody to edema toxin and its effect on murine anthrax. Infect. Immun. 78 (6), 2890-2898
- (93) Witzmann, C. and Böhm, R. (1990): Specificity of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus anthracis*. Salisbury medical bulletin, special supplement No 68, 25-26
- (94) Williams, D. D. and Turnbough jr, C. L. (2004): Surface layer protein EA1 is not a component of *Bacillus anthracis* spores but is a persistent contaminant in spore preparations. J. Bacteriol. 186 (2), 566-569
- (95) Wycoff, K. L., Belle, A., Deppe, D., Schaefer, L., Maclean, J. M., Haase, S., Trilling, A. K., Liu, S., Leppla, S. H., Geren, I. N., Pawlik, J., and Peterson, J. W. (2011): Recombinant anthrax toxin receptor-Fc fusion proteins produced in plants protect rabbits against inhalational anthrax. Antimicrob. Agents Chemother. 55 (1), 132-39
- (96) Yawar, S. A. (2006): Characterization of polyclonal antibodies against the thermostable antigens of *Bacillus anthracis*. Masterarbeit im Institut für Umwelt- und Tierhygiene, sowie Tierklinik der Universität Hohenheim

6 Anhang

6.1 Geräte

CO ₂ -Brutschrank:	Innova-CO-170, New Brunswick Scientific Deutschland GmbH, Nürtingen
Elektrophorese:	Minigel-Twin, Biometra, Göttingen
Fotodokumentation:	Videocopy processor P68E und CCD Video Camera Modul, Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen
Heizblock:	Thermoblock TB1, Biometra, Göttingen
Magnetrührer:	IKAMAG-RCT, IKA-Labortechnik, Staufen
pH-Meter:	pH526, WTW, Weilheim
Mikrotiterplatten- Lesegerät:	Microplate Reader, Model 680 mit Microplate Manager Software, Bio-Rad-Laboratories, München
Mikrotiterplatten- Waschgerät:	Immunowash, Model 1575, Bio-Rad-Laboratories, München
Mikroskop:	Wilovert Will, Wetzlar
Proteinreinigung:	ÄKTAprime mit Schreiber Rec112, GE Healthcare, Freiburg
Reinstwassersystem:	Milli-Q Biocel, Millipore, Eschborn
Schüttler:	Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sterilwerkbank:	Prettl Laminarflow + Prozesstechnik, Bempflingen
Stromquelle:	Computer controlled power supply 3000xi, Bio-Rad-Laboratories, München
Tiefkühlschrank:	Heraeus Hera Freeze Typ HFU 686 Basic, Kendro, Hanau
Vortex-Gerät:	REAX top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waage:	PT600, Sartorius, Göttingen
Western Blot:	Fastblot B44, Biometra, Göttingen
Zentrifuge:	Varifuge 3.2RS, Heraeus Sepatech, Osterode

6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

6.2.1 Chemikalien

- 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC): Artikelnummer A-5754, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- ABTS-Tabletten: Artikelnummer 11112422001, Roche Diagnostics, Mannheim
- ABTS-Puffer: Artikelnummer 11112597001, Roche Diagnostics, Mannheim

- Ammoniumperoxodisulfat (APS): Artikelnummer 9592, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄): Artikelnummer 1.01217, Merck KGaA, Darmstadt
- Ascoli Test Antigen: Artikelnummer VD-0015-S, C.C. Pro GmbH, Oberdorla
- Ascoli Test Positivserum (Maultierserum): VD-0016-R, C.C. Pro GmbH, Oberdorla
- Anthraxin: Prof. Shlyakhov, Tel Aviv, Israel
- Bovines Serum Albumin (BSA) Standard for Protein Assay: Artikelnummer UP36859A, Uptima, Montlucon Cedex, Frankreich
- Bromphenolblau: Artikelnummer A512.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Butanol: Artikelnummer 7724, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Blockierungsreagenz: Artikelnummer 1096176, Roche Diagnostics, Mannheim
- Coo Protein Assay Reagenz: Artikelnummer UPF 86421, Uptima, Monlucon Cedex, Frankreich
- Dithiotreitol (DTT): Artikelnummer 6908.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Ethyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat): Artikelnummer H5031, Promega GmbH, Mannheim
- Essigsäure: Artikelnummer T179.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Ethanol: Artikelnummer 9065.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Formalin: Artikelnummer 104002, Merck KGaA, Darmstadt
- Glutardialdehyd (25 %-ige Lösung in Wasser) Artikelnummer 820603, Merck KGaA, Darmstadt
- Glycin: Artikelnummer 3908.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Glycerin: Artikelnummer 3783.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Hefeextrakt: Artikelnummer LP0021, Oxoid Deutschland GmbH, Wessel
- Isopropanol (2-Propanol): Artikelnummer 109634, Merck KGaA, Darmstadt
- Kaliumchlorid (KCl): Artikelnummer 104933, Merck KGaA, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄): Artikelnummer 104873, Merck KGaA, Darmstadt
- Kaliumsulfat (K₂SO₄): Artikelnummer 105153, Merck KGaA, Darmstadt
- Maleinsäure: Artikelnummer 3538.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Mangansulfat-Monohydrat (MnSO₄): Artikelnummer 105941, Merck KGaA, Darmstadt
- Methanol: Artikelnummer 4627.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Natriumacetat (wasserfrei): Artikelnummer 106268, Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumcarbonat (Na₂CO₃): Artikelnummer A135.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

- Natriumchlorid (NaCl): Artikelnummer 3957.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Natriumdodecylsulfat (SDS): Artikelnummer 2326.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃): Artikelnummer 106329, Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄ x 2 H₂O): Artikelnummer 106580, Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH): Artikelnummer 106462, Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumthiosulfat-Pentahydrat: Artikelnummer 106516, Merck KGaA Darmstadt
- PhastGel™ Blue R-350: Artikelnummer 17-0518-01, GE Healthcare, Freiburg
- Phenol: Artikelnummer 77614, Fluka AG, CH-Buch
- PlusOne™ Acrylamid PAGE (40%-ig), Artikelnummer 17-1303-1, GE Healthcare, Freiburg
- Plus One™ N, N'- Methylenebisacrylamid (2%-ig): 17-1306-01, GE Healthcare, Freiburg
- Polyethylenglykol Hybri-Max™ 50 % (PEG), Artikelnummer P7181, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- PeqGOLD Proteinmarker IV, prestained: Artikelnummer 27-2110, Peqlab, Erlangen
- Salzsäure (HCl): Artikelnummer KMF 08-723, KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
- Silbernitrat (AgNO₃): Artikelnummer 6207.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- TEMED: Artikelnummer 2367.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Tris-Base: Artikelnummer 4855.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Trypanblau (0,5%): 47285, Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
- Tusche A: Nr. 17, schwarz, Pelikan, Hannover
- Tween® 20: Artikelnummer 822184, Merck KGaA, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂): Artikelnummer 108597, Merck KGaA, Darmstadt
- Zitronensäure-Monohydrat: Artikelnummer 100243, Merck KGaA, Darmstadt

6.2.2 Verbrauchsmaterial

- Amicon® Centricon® YM-10: Artikelnummer 4241, Millipore, Eschborn
- Dialyseschlauch Zellu Trans V Series, molekulare Ausschlussgröße 2 kDa): Artikelnummer E913.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

- Filterpapier (Gel blotting Papier, 580 x 600 mm): Artikelnummer 10426892, Whatmann®/Schleicher und Schuell, Bezug über Multimed Wicker GmbH, Kirchheim/T.
- Flaschenhalsfilter (0,45 µm, Nalgene): Artikelnummer 595-4520, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- HiTrap G HP Säule, 1ml: Artikelnummer 17-1153-01, GE Healthcare, Freiburg
- HiTrap IgM Purification HP Affinitätschromatographiesäule: Artikelnummer 17-5110-01, GE Healthcare, Freiburg
- Kryoröhrchen (Nunc Cryo Tube Vials): Artikelnummer 366656, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- Nunclon™ 6 Kavitäten Platte (steril): Artikelnummer 140675, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- Nunclon™ 96 Kavitäten Platte: F96 Maxisorp, Artikelnummer 442404, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- Nunclon™ 96- Kavitäten Platte (steril): Artikelnummer 167008, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- Nunclon™ Zellkulturflaschen (groß): Artikelnummer 178883, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- Nunclon™ Zellkulturflaschen (mittel): Artikelnummer 178905, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- Nunclon™ Zellkulturflaschen (klein): Artikelnummer 136196, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
- PVDF Membran: Millipore Immobilon P, Artikelnummer T831.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Spritzenfilter (Celtron, 0,45 µm): Artikelnummer 10462257, Whatmann/Schleicher und Schuell, Bezug über Multimed Wicker GmbH, Kirchheim/T.
- Spritzenfilter (Millex VV, PVDF 0,1µm): Artikelnummer SLVV033RS, Millipore, Bezug über Multimed Wicker GmbH, Kirchheim/T.
- Vue Life® Zellkulturbeutel: Artikelnummer 32FL20, Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting

6.2.3 Nährmedien und Zusätze

- Agar (Agar Grade A, BBL): Artikelnummer 212304, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Columbia-Agar: Artikelnummer 110455, Merck KGaA, Darmstadt
- Kaseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP: Artikelnummer CM129, Oxoid Deutschland GmbH, Wessel

- Pepton (aus Fleisch): Artikelnummer 107224, Merck KGaA Darmstadt
- Schafblut: Artikelnummer SR0051C, Oxoid Deutschland GmbH, Wessel
- Trypton-Soja-Agar: Artikelnummer CM0131, Oxoid Deutschland GmbH, Wessel

6.2.4 Adjuvanzien

- Lipopeptid Adjuvans: Artikelnummer L4000, EMC Microcollections GmbH, Tübingen
- RIBI Adjuvans System (MPL[®]+ TDM+ CWS Adjuvans): Artikelnummer M6661, Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim

6.2.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

- Dimethylsulfoxid (DMSO): Artikelnummer 4720.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Fötale Kälber Serum (FKS): Artikelnummer S0115, Biochrom AG, Berlin
- HAT-Supplement (50 x): Artikelnummer F0483, Biochrom AG, Berlin
- Hybridoma-Medium (ohne HAT, mit L-Glutamin und 10 % FKS): Artikelnummer F5515, Biochrom AG Berlin
- Hybridomed DIF 1000-Flüssigmedium (serumfrei, für 5 % CO₂): Artikelnummer F8055/1, Biochrom AG Berlin
- L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM): Artikelnummer K0302, Biochrom AG, Berlin
- Mercaptoethanol: Artikelnummer 4227.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Natriumpyruvat MEM (100 mM): Artikelnummer 11360-039, Gibco/Invitrogen Corporation, Karlsruhe
- Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x), K0293, Biochrom AG, Berlin
- Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/, 10.000 µg/ml): Artikelnummer A2213, Biochrom AG, Berlin
- Pferdeserum: Artikelnummer 16050-130, Gibco/Invitrogen Corporation, Karlsruhe
- RPMI 1640 (mit HEPES und Glutamin): Artikelnummer FG 1385, Biochrom AG Berlin
- Trypsin-EDTA (10 x, 0,5 %/0,2 %): Biochrom, L2153, Lösung

6.2.6 Antikörper und Immenserum

- Anti-Maus polyvalent Immunglobulin (IgG, IgA, IgM) Peroxidase Konjugat: Artikelnummer A 0412, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Maus IgM (MOPC-104E) gereinigtes Immunglobulin: Artikelnummer M5909, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Polyklonale Kaninchenserum: Universität Hohenheim

- Ziege Anti-Kaninchen IgG (H& L) Peroxidase Konjugat: Artikelnummer W99035P
Biodesign International, Bezug über Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
- Ratte Anti-Maus IgG₁ Peroxidase Konjugat, monoklonaler Antikörper:
Artikelnummer 559626, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Ratte Anti-Maus IgG_{2a} Peroxidase Konjugat, monoklonaler Antikörper:
Artikelnummer 553391, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
- Ratte Anti-Maus IgM Peroxidase Konjugat: Artikelnummer 550588, Becton
Dickinson GmbH, Heidelberg

6.3 Verwendete *Bacillus* ssp. Isolate

In Tab. 5 sind die verwendeten *Bacillus* ssp. Isolate aufgelistet, die zur Identifizierung von *B. anthracis* spezifischen thermostabilen Antigenen, im Screening der Hybridome, sowie zur Bestimmung der Spezifität als thermostabile Antigenpräparationen von vegetativen Zellen, bzw. Sporensuspensionen verwendet wurden aufgelistet. Alle Isolate stammen aus der Stammsammlung des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene.

Tab. 5: Verwendete *Bacillus* ssp. Isolate

Isolat Nr.	Isolat	<i>Bacillus</i> ssp.	Charakteristika
1	A93	<i>B. anthracis</i> Stamm Ames	voll virulenter Stamm (pX01 ⁺ und pX02 ₊)
2	A2	<i>B. anthracis</i> Vakzinestamm	nicht virulenter toxigener Stamm (pX01 ⁺ und pX02 ⁻) ATCC 14185
3	A30	<i>B. anthracis</i>	voll virulenter Stamm (pX01 ⁺ und pX02 ⁺)
4	„Letonice“	<i>B. anthracis</i>	voll virulenter Stamm (pX01 ⁺ und pX02 ⁺)
5	34F2	<i>B. anthracis</i> Stamm Sterne	nicht virulenter toxigener Stamm (pX01 ⁺ und pX02 ⁻)
6	B10	<i>B. cereus</i>	
7	B197	<i>B. cereus</i>	Falsch positiv im γ -Phagentest
8	B334	<i>Bacillus</i> ssp.	51,8% <i>B. anthracis</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. cereus</i>
9	B7	<i>B. subtilis</i>	nicht 100% nach API
10	B13	<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633

Fortsetzung Tab. 5

Isolat Nr.	Isolat	<i>Bacillus ssp.</i>	Charakteristika
11	B21	<i>Bacillus ssp.</i>	nicht genau charakterisiert
12	B33	<i>B. cereus</i>	
13	B66	<i>B. lentus</i>	ATCC 10840, Typstamm
14	B108	<i>B. cereus</i>	nicht 100% nach API
15	B125	<i>B. pantothenicus</i>	
16	B146	<i>B. cereus</i>	ATCC 12826
17	B157	<i>B. subtilis</i>	DSM 618
18	B177	<i>B. licheniformis</i>	ATCC 10716
19	B188	<i>B. thuringiensis</i>	DSM 2046 Typstamm
20	B200	<i>B. cereus</i>	
21	B207	<i>B. sphaericus</i>	Falsch positiv im γ -Phagentest
22	B224	<i>B. sphaericus</i>	
23	B296	<i>B. cereus</i>	
24	B300	<i>B. cereus</i>	
25	B336	<i>B. brevis</i>	Falsch positiv im γ -Phagentest
26	B16	<i>B. cereus</i>	Phagen positiv
27	B234	<i>B. cereus</i>	Falsch positiv im γ -Phagentest
28	B333	<i>B. megaterium</i>	Falsch positiv im γ -Phagentest
29	B338	<i>B. cereus</i>	ATCC 4342, Phagen-Wirtsstamm
30	B342	<i>Bacillus ssp.</i>	nicht genau charakterisiert
31	B344	<i>Bacillus ssp.</i>	nicht genau charakterisiert

ATCC= American Type Culture Collection, Rockville, U.S.A

DSM= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

6.4 Stammbäume der monoklonalen Antikörper

Tab. 6: Übersicht über die ersten 14 Screenings der Hybridome aus der Fusion von Milzzellen von Maus Nr. 3 und SP2/0-Ag14 Myelomzellen

1. Screening	2. Screening	3. Screening	4. Screening	5. Screening	6. Screening	7. Screening	8. Screening	9. Screening	10. Screening	11. Screening	12. Screening	13. Screening	14. Screening	Einteilung in S- oder V-Linie
1D2	negativ													
1 G 5	negativ													
8 B9	negativ													
8 C9	negativ													
9F2	negativ													
2 G8			negativ											
7 G5			negativ											
7 G6			negativ											
9 B4			negativ											
9B10			negativ											
10 D4	20 D3	27 C3		79 B4			112 D11	120 B3	123 F2	130 E10	143 E11	155 E10	164 B3	V2
													164 B5	V1
													164 D11	V3
													164 B2	S1
												155 E11	165 D7	S2
												155 F11	negativ	
												155 E9	negativ	
												155 E5	negativ	
											143 B3			V26
											143 C11			V27
											143 F11			S9
								123 B7	128 E9		138 B11			S10
											138 E8	negativ		
											138 B2	negativ		
											138 F9	negativ		
											138 E9	negativ		
											138 C10	152 E2	negativ	
												152 D8	negativ	
											138 E10	153 D7	negativ	
											138 D8			S13
											138 F11			S14
											138 B6			negativ
											138 D10			negativ
											138 F10			negativ

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6

1. Screening	2. Screening	3. Screening	4. Screening	5. Screening	6. Screening	7. Screening	8. Screening	9. Screening	10. Screening	11. Screening	12. Screening	13. Screening	14. Screening	Einteilung in S- oder V-Linie
10 D4	20 D3	27 C3		79 B4			112 D11	120 B3	123 B7	128 E9	138 B5			negativ
											138 C11			negativ
											128 D8	negativ		
											128 F11	negativ		
											128 C11	140 C4		negativ
									123 D3	129 C9	142 C4			negativ
								120 B4	124 F3	131 B10	144 B5	negativ		
										131 G10	negativ			
							112 C3	negativ						
							112 D9	negativ						
				79 B2							negativ			
				79 C7							negativ			
		27 F6		negativ										
		27 E11		negativ										
10 D4	20 D5	29F3	50 G9				negativ							
			50 E2											
		29F3	50 G10											
		29 G8	negativ											
		29 E9		82 C3							146 C9	157 E5	167 G11	S4
													167 G9	S3
												157 F5	negativ	
												157 G5		V24
														V25
				82 C5										
		82 E 10	87 E 11	105 C 10	109 E9				negativ					
				105 E10	110 G2				negativ					
		82 B 11	89 B 2	106 D3	108 E11				negativ					
					108 F11				negativ					
				82 C6										negativ
				82 F10										negativ
				82 C4		111 B4	negativ							
		82 E 11	83 F7	negativ										
		82 D11	84 C8	negativ										
			84 D6	negativ										
			84 E 8	negativ										
			84 F8	negativ										
			84 G 5	negativ										
		82 C11	85 E 5	negativ										
		82 C 9	90 C 11	negativ										
		82 D10	negativ											

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6

1. Screening	2. Screening	3. Screening	4. Screening	5. Screening	6. Screening	7. Screening	8. Screening	9. Screening	10. Screening	11. Screening	12. Screening	13. Screening	14. Screening	Einteilung in S- oder V- Linie
10D4	20 D5	29 E9		82 F11	negativ									
				82 D 9	negativ									
	20 D8	negativ												
	20 E5	negativ												
	20 F8	negativ												
	20 E7			negativ										
	20 F9			negativ										
	20 D10			73 D9	negativ									
11 B6			negativ											
11 E2			negativ											
12C5	negativ													
12 F10	24 C8	negativ												
	24 D4	28 C8	negativ											
	24D6	negativ												
	24 D9	negativ												
	24 E8	negativ												
	24 C4			76 F6	negativ									
				76 D5	negativ									
				76 E 7	negativ									
				76 D4	negativ									
				76 B5	negativ									
	24 E6			negativ										
	24 F7			negativ										
	24 D7										negativ			
	24 E3													V4
13 D10	negativ													
13 B5			negativ											
13 F3			negativ											
15 G4			negativ											
14 B2	negativ													

Die Abstammung der monoklonalen Zelllinien ist gelb unterlegt, die Zahlen-Buchstaben-Kombination entsprechen den jeweils positiv getesteten Kavitäten der Mikrotiterplatten

6 Anhang

Tab. 7: Übersicht über die Screenings der vegetativen Linie (V-Linie)

	1. V-Screening	2. V-Screening	3. V-Screening	4. V-Screening	5. V-Screening	6. V-Screening	
V2 / 164 B3	V2 G7	V6 F9	V12 C10	V15 D4	V19	monoklonal	BaV15
			V12 E2	V16 E4	V20	monoklonal	BaV16
	V2 D3	V5 E3	V10	monoklonal	BaV5		
V3 / 164 D11	V3 D2	negativ					
	V3 E4	V9 F3	negativ				
V4 / 24 E3	negativ						

Die Abstammung der monoklonalen Zelllinien sind gelb unterlegt, die Zahlen-Buchstaben-Kombination entsprechen den jeweils positiv getesteten Kavitäten der Mikrotiterplatten

Tab. 8: Übersicht über die Screenings der Sporen-Linien (S-Linie)

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening
S1 / 164 B2	S1B2	negativ										
	S1 C2	negativ										
	S1 D2	negativ										
	S1 E2	negativ										
	S1 B3		negativ									
	S1 C3		negativ									
S2 / 165 D7	negativ											
S3 / 167 G9	negativ											
S4 / 167 G11	negativ											
S9/ 143 F11			S9D11	negativ								
S10/ 138 B11			S10G10	S12 D7	S15 B3	S19 C3	S23 C2	S25 E9	S28 C10	S30 E10	S33 G4	S36 B4
												S36 B2
												S38
												S39
										S30 E8	S32 G11	negativ
									S28 B2	negativ		
									S28 B9	S31 G8	S34 C4	negativ

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 8

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening	S-Screening
S10/ 138 B11			S10G10	S12 D7	S15 B3	S19 C3	S23 C2	S25 F5	negativ			
								S25 F4	negativ			
							S23 B2	negativ				
						S 19 C2	negativ					
				S12E7	S16B6	negativ						
				S12 D8	S17 D10	negativ						
S13/ 138 D8			S13	S13 F11	negativ							
S14/ 138 F11			S14	negativ								

Die Zahlen-Buchstaben-Kombination entsprechen den jeweils positiv getesteten Kavitäten der Mikrotiterplatten

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. vet habil W. Beyer für die Bereitstellung des Projektes, sowie die hilfreichen Diskussionen bei der Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Schmidt danke ich für die Mitbetreuung und Korrektur dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. L. Hoelzle, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit fertig zustellen.

Frau Dr. B. Niederwöhrmeier danke ich für die Finanzierung des Projektes, sowie für die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Gespräche.

Bei Frau Dr. M. Huber und dem Team von Prof. W. Bessler aus Freiburg bedanke ich mich für die Beratung und Hilfestellung bei der Herstellung der Antikörper.

Ein dickes Dankeschön geht an die Mitarbeiter des Institutes, hauptsächlich an Eli und Bine. Ihr ward nicht nur im Labor immer für mich da. Hannah, auch Dir ein dickes Danke für alles.

Katja und Miri, danke, dass wir gemeinsam durch Dick und Dünn gehen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, Geschwistern und Manu. Danke das ihr immer an mich geglaubt habt und mir immer zur Seite gestanden seid.

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und das wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet worden sind.

Neuhausen, den 14. Dezember 2012

Karen A. Hilss