

Entwicklung eines Tests zur Ablösung von Tierversuchen beim Nachweis von Pertussis-Toxin

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität

Christina Natalia Erika Bache
geb. am 25.12.1978 in Wiesbaden

Mainz, 2009

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 16.4.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Pertussis	5
1.2 Der Erreger des Keuchhustens: <i>Bordetella pertussis</i>	6
1.3 Lipopolysaccharid	9
1.4 Pertussis-Toxin	10
1.5 Pertussis-Impfstoffe	14
1.6 Der Tierversuch	16
1.7 Derzeitiger Stand und Ziel der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden	20
2.1 Der Monozyten-Aktivierungs-Test und seine begleitenden Versuche	20
2.1.1 Verwendete Pertussis-Toxine, Positiv- und Negativkontrollen	20
2.1.2 Sonstige Reagenzien des Monozyten-Aktivierungs-Tests.....	21
2.1.3 Durchführung des Pertussis-MAT	22
2.1.4 Examinationsschritt via ELISA	23
2.1.5 Endotoxin-Abreicherung der PTx- und PTg-Präparationen	24
2.1.6 Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (GelClot-Technik)	24
2.1.7 Proteinbestimmung der PTx- und PTg-Proben vor und nach der LPS- Abreicherung.....	25
2.1.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Silberfärbung	25
2.1.9 Maus-Histamin-Sensibilisierungstest	26
2.1.10 Statistische Methoden.....	26
2.2 Gekoppelter photometrischer Nachweis von PTx.....	27
2.3 Fluorometrischer Nachweis von aktivem PTx mittels etheno-NAD.....	28
2.3.1 Aufbereitung von etheno-NAD	29
2.3.2 Vorbereitung der PTx-, PTg- und Pertussis-Impfstoffproben.....	29
2.3.3 Mögliche Störfaktoren für den Fluoreszenz-Test	30
2.4 Luminometrischer Nachweis von aktivem PTx im Zelltest.....	31
2.4.1 Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen	32
2.4.2 Kultivierung der permanenten T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat.....	34
2.4.3 Charakterisierung der Zellen.....	35
2.4.4 Der Pertussis-ATP-Test (PAT).....	37
3 Ergebnisse	45
3.1 Überprüfung des Monozyten-Aktivierungs-Tests als Instrument zum Nachweis von aktivem PTx.....	45
3.1.1 Bestimmung des Endotoxingehaltes in Pertussis-Toxin-Präparationen	46
3.1.2 Strategie 1: Eliminierung des kontaminierenden Endotoxins.....	47

3.1.3	Strategie 2: Inhibierung der LPS-Wirkung auf den Pertussis-MAT	48
3.2	Widerlegung der Aussage: PTx aktiviert humane Monozyten	51
3.2.1	Monozytenreaktion auf Pertussis-Toxin	52
3.2.2	Endotoxingehalt vor und nach LPS-Abreicherung und parallele Proteinbestimmung der PTx- und PTg-Proben	53
3.2.3	Reinheitskontrolle von PTx und PTg mittels Silberfärbung nach PAGE	54
3.2.4	Monozytenreaktion auf originales versus LPS-abgereichertes PTx und PTg	55
3.2.5	Aktivitätskontrolle des LPS-abgereicherten PTx im Maus-Histamin- Sensibilisierungstest (HIST).....	57
3.3	Neue methodische Ansätze zum Nachweis von aktivem PTx	59
3.4	Photometrischer Nachweis von aktivem PTx.....	59
3.5	Fluorometrischer Nachweis von aktivem PTx.....	61
3.5.1	Detektion von aktivem PTx im Fluoreszenz-Test.....	63
3.5.2	Überprüfung und Charakterisierung potentieller Störgrößen	64
3.6	Luminometrischer Nachweis von aktivem PTx	70
3.6.1	Charakterisierung der Indikatorzellen	71
3.6.2	Übersicht zu den Entwicklungsphasen des Pertussis-ATP-Tests	74
3.6.3	Entwicklung des PAT (Phase A: Grundsteinlegung).....	75
3.6.4	Entwicklung des PAT (Phase B: Jurkat-Zellen und Kryo-PBMCs)	82
3.6.5	Entwicklung des PAT (Phase C: Einführung des „One-Plate-Assay“)	89
3.6.6	Orientierende Versuche zum PTx-Nachweis in komplexen Impfstoffen	91
4	Diskussion	92
4.1	PTx ist nicht in der Lage, humane Monozyten zu aktivieren.....	93
4.2	Weswegen trifft die publizierte Aussage „PTx aktiviert humane Monozyten“ nicht zu?.....	97
4.3	Entscheidung für den „funktionellen“ Test	99
4.3.1	Der photometrische Nachweis von aktivem Pertussis-Toxin	100
4.3.2	Der Fluoreszenz-Test als Nachweissystem.....	101
4.3.3	Die Entwicklung des Pertussis-ATP-Tests.....	104
4.3.4	Ausblick.....	110
5	Zusammenfassung	111
6	Summary	112
7	Literaturverzeichnis	113
	Abbildungsverzeichnis	123
	Tabellenverzeichnis	124
	Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	125
	Danksagung	127
	Veröffentlichungen	129

1 Einleitung

1.1 Pertussis

Pertussis (Keuchhusten) ist eine durch das Gram-negative Bakterium *Bordetella pertussis* ausgelöste, hochansteckende Infektionskrankheit des oberen respiratorischen Traktes, die über Tröpfchen von Mensch zu Mensch übertragen wird [55]. Die ersten Pertussis-Ausbrüche wurden im 16. Jahrhundert beschrieben, die Isolation durch die Mikrobiologen Jules Bordet und Octave Gengou erfolgte jedoch erst 1906. Die lange Zeitspanne zwischen den ersten Krankheitsbeschreibungen und der Isolation ist auf die Entwicklung der Mikrobiologie und die anspruchsvollen Wachstumsbedingungen von *B. pertussis* zurückzuführen [109, 133]. *B. pertussis* ist obligat humanpathogen, tierische Wirte oder Umweltreservoirs sind nicht bekannt [102]. Charakteristisch sind neben allgemeinen Krankheitssymptomen krampf- und stakkatoartige Hustenanfälle (40–50 pro Tag) mit anschließendem langem und mühsamem Einatmen (siehe Abbildung 1) begleitet von typischen Keuchgeräuschen [21, 53]. Vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern kann die Krankheit einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen [91, 101]. Komplikationen treten oft als Sekundärinfektionen in Form von Pneumonie, Otitis, zentralnervösen Symptomen wie cerebralen Anfällen, Enzephalopathie bis hin zu Todesfällen auf [80, 99]. Kürzliche Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) lassen vermuten, dass im Jahr 2003 über 17,6 Millionen Menschen weltweit an Pertussis erkrankten (90 % in Entwicklungsländern) und circa 279.000 Patienten verstarben [148]. Pertussis, eher angesehen als eine Kinderkrankheit, betrifft auch Jugendliche und Erwachsene, die zwar häufig mildere Symptome entwickeln, jedoch ein Infektionsreservoir für nicht oder nur teilweise immunisierte Säuglinge und Kleinkinder darstellen [53, 96]. Somit ist eine umfassende Immunisierung der Bevölkerung von großer Bedeutung.



Abb. 1: An Pertussis erkrankte Säuglinge während eines Hustenanfalls (links) und nach einem Anfall (rechts).

Quelle: (links) <http://www.gesundes-kind.de/images/schutzimpf/keuchh01.jpg>; (rechts) <http://www.vaccineinformation.org/photos/pertcdc002.jpg>.

1.2 Der Erreger des Keuchhustens: *Bordetella pertussis*

Insgesamt sind neun Arten der Gattung *Bordetella* bekannt, wovon neben *B. pertussis* drei weitere Spezies (*B. bronchiseptica*, *B. holmesii* und *B. parapertussis*) mit respiratorischen Infektionen beim Menschen oder anderen Mammalia in Verbindung gebracht werden [80, 81]. Der Erreger von Pertussis ist das unbewegliche, Gram-negative, bekapselte, aerobe, kokkoide Stäbchenbakterium *B. pertussis* (~0,8 x 0,4 µm).

Der erste Schritt der Pertussis-Infektion ist charakterisiert durch das Anheften von *B. pertussis* an die zilientragenden Epithelzellen des menschlichen Respirationstraktes [149], gefolgt von lokalen Schädigungen und schließlich systemischer Manifestation [24, 80, 90]. Entsprechend kann die Infektion in eine frühe Phase und eine späte Phase unterteilt werden, die durch die unterschiedlich ausgeprägten Expressionen von Adhäsinen (frühe Phase) und Toxinen (späte Phase) gekennzeichnet sind [54]. Unter den zahlreichen von *B. pertussis* produzierten Virulenzfaktoren (siehe Tabelle 1), sollen bis zu acht verschiedene daran beteiligt sein, die Anheftung des Bakteriums zu begünstigen [69, 80, 90]. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Pertussis-Toxin (PTx), Filamentöses Hämagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) und Fimbrien (FIM) [80]. In Abbildung 2 ist die Adhäsion von *B. pertussis* an das Flimmerepithel des Respirationstraktes zu sehen. Auf der rechten Seite ist schematisch die Anheftung mit Hilfe des wichtigsten Adhesins FHA sowie PTx als wichtigstes Toxin dargestellt. Eine normale Zilienbewegung ist durch die Kolonisation des Bakteriums nicht mehr möglich, was schließlich zur Stase führt [24, 117].

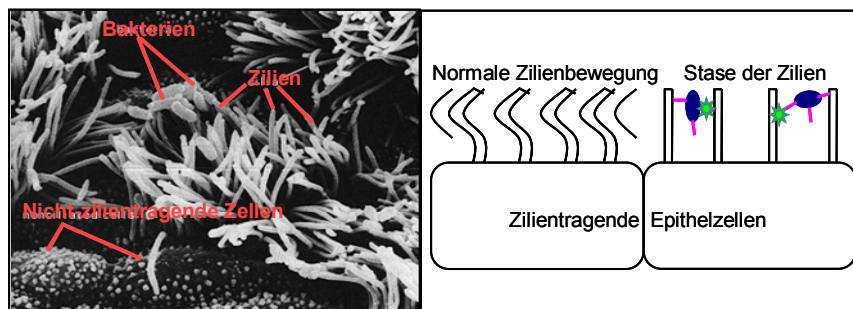


Abb. 2: Adhäsion von *B. pertussis* an die Zilien des Respirationstraktes. Rechts: Adhäsion von *B. pertussis* mit Hilfe des wichtigsten Adhesins Filamentöses Hämagglutinin (FHA) und Pertussis-Toxin (PTx), was schließlich zur Stase der Zilienbewegung führt. Quelle (links): <http://textbookofbacteriology.net/pertussis.html>.

Tab. 1: Virulenzfaktoren von *B. pertussis*

Virulenzfaktor	Bemerkung	Komponente im azellulären* Impfstoff
Filamentöses Hämagglutinin (FHA)	Haupt-Adhäsion bei Trachealkolonisation; hoch immunogen	Ja
Fimbrien (FIM)	Adhäsion; filamentöse Zelloberflächenstruktur; immunogen	Ja: Typ 2 u. 3
Pertactin (PRN)	Adhäsion; Oberflächenprotein; immunogen	Ja
Trachealkolonisierungsfaktor	Adhäsion im Mausmodell; sezerniertes Protein	Nein
Pertussis-Toxin (PTx)	Exotoxin/Adhäsion; hoch immunogen	Ja: inaktiviertes Toxin
Adenylatcyclase	Bifunktionales Toxin: Adenylatcyclase/Hämolyse	Nein
Dermonekrotisches Toxin	Verursacht nekrotische Läsionen im Tiermodell	Nein
Tracheal-Zytotoxin	Veranlasst Anschwellen der Mitochondrien, Öffnen der Tight Junctions, schädigt Zilien	Nein
Lipopolysaccharid (LPS)	pyrogen, mitogen, toxisch	Nicht gezielt gefordert

* Azellulärer Impfstoff: Besteht aus aufgereinigten und inaktivierten Komponenten von *B. pertussis* (siehe auch 1.5)

B. pertussis produziert zahlreiche Virulenzfaktoren, die in Adhäsine und Toxine eingeteilt werden können. Tabelle 1 beinhaltet einen Auszug aus 18 Faktoren, die bis zum heutigen Zeitpunkt beschrieben und erforscht wurden [80]. Im Folgenden soll nun ausschließlich auf die im azellulären Impfstoff enthaltenen Komponenten FHA, FIM und PRN eingegangen werden [35].

Die genannten Virulenzfaktoren werden durch das Virulenzkontrollsystem BvgA/BvgS, ein Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem, reguliert [46, 142]. Es ist nicht bekannt, welche äußeren Signale *in vivo* die Sensorkinase (BvgS) zur Autophosphorylierung und anschließender Phosphorylierung des Zielgene aktivierenden oder reprimierenden Regulatorproteins (BvgA) veranlassen [105, 143]. *In vitro* hat sich gezeigt, dass das BvgAS-System durch veränderte Kultivierungsbedingungen wie niedrige Inkubationstemperaturen von 25–37 °C und die Anwesenheit von Nicotinsäure (≥ 10 mM) oder $MgSO_4$ (≥ 40 mM), inaktiviert werden kann [84].

Ein durch BvgAS besonders stark aktiviertes Gen kodiert für das Filamentöse Hämagglutinin (FHA). FHA ist das Haupt-Adhäsion bei der Kolonisation von *B. pertussis* im Tiermodell. Es ist hoch immunogen und Bestandteil in den meisten azellulären Pertussis-Impfstoffen [24, 117, 120]. Das 220 kDa große oberflächenassoziierte und ebenfalls sezernierte Protein besteht aus vier separaten Bindedomänen. Die verschiedenen Domänen sind beispielsweise sowohl an der Anhaftung an bronchiale Endothelzellen über sulfatierte Glycopeptide als auch an der Adhäsion an Monozyten/Makrophagen oder andere Leukozyten, z. B. über den Integrin Komplementrezeptor CR3 beteiligt [15, 62, 123]. In Abhängigkeit von FHA inhibiert *B. pertussis* die Proliferation von T-Zellen [13]. Zudem wurde gezeigt, dass die Interaktion von FHA mit Rezeptoren auf Makrophagen über einen IL-10 abhängigen Mechanismus zu einer Suppression des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-12 (IL-12) führt und somit die Th1-Immunantwort drosselt [82, 83]. Im Gegensatz hierzu ruft FHA eine pro-inflammatorische Aktivierung in bronchialen Epithelzellen hervor, ausgelöst durch das Anheften an die Zellen. Dies führt zur Aktivierung von NF- κ B und somit zur Expression des epithelialen interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) [61].

Wie viele Gram-negative pathogene Bakterien besitzt *B. pertussis* polymere filamentöse Zelloberflächen-Proteinstrukturen, die so genannten Fimbrien (FIM). Von *B. pertussis* werden hiervon die Serotypen 2 und 3 produziert, deren Hauptuntereinheit zum einen das 22,5 kDa große Fim2, zum anderen das 22 kDa große Fim3 darstellt. Die Nebenuntereinheit besteht jeweils aus dem 40 kDa FimD [80]. Ebenso wie FHA bindet FIM an sulfatierte Glycopeptide an der Oberfläche von Epithelzellen [41]. Die Bindung von FIM an Monozyten und Makrophagen führt zur Aktivierung von CR3. Dadurch wird die Fähigkeit, FHA zu binden, verstärkt, was zu einer Hemmung der Monozyten führt [48, 49]. FIM ist aufgrund seiner Immunogenität Bestandteil einiger azellulärer Pertussis-Impfstoffe [22, 100].

Ebenfalls eine fakultative Komponente in azellulären Impfstoffen ist Pertactin (PRN) [35]. Das bei *B. pertussis* 69 kDa große Oberflächenmolekül (*B. bronchiseptica*: 68 kDa; *B. parapertussis*: 70 kDa) gehört zur Familie der Autotransporter [20, 73, 87]. Die funktionell vielfältigen Proteine (u. a. Proteasen, Toxine, Adhäsine, Lipasen, Invasine) der Autotransporterfamilie bewerkstelligen ihren eigenen Transport durch die äußere Membran über einen beta-Barrel-Kanal, der vom konservierten C-Terminus geformt wird [51]. PRN ist an der Bindung an eukaryotische Zellen beteiligt und, aufgrund der immunogenen Wirkung, in einigen Pertussis-Impfstoffen vertreten [36, 45].

Ein weiterer für diese Arbeit sehr wichtiger Bestandteil von *B. pertussis* ist Lipopolysaccharid (LPS). Das LPS ist zwar keine obligatorische Komponente von Pertussis-Adsorbat-Impfstoffen, jedoch ist kein Impfstoff zu finden, der LPS-frei ist, da es sich bei *B. pertussis* um ein Gram-negatives Bakterium handelt, und somit LPS-Kontaminationen bei jeder Protein-Präparation kaum zu umgehen sind.

Im folgenden Abschnitt werden der Aufbau von LPS im Allgemeinen und die Besonderheiten des *B. pertussis*-LPS im Speziellen beschrieben.

1.3 Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein integraler, hoch konservierter, essentieller Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, der nicht ausschließlich bei der Lyse der Bakterien freigesetzt wird, sondern ebenfalls kontinuierlich von den lebenden Bakterien abgegeben wird [98]. LPS (auch als Endotoxin bezeichnet) ist eine der stärksten bioaktiven Substanzen. Bereits in äußerst niedriger Konzentration (pikomolarer Bereich) löst es Stimulationen bei Gewebs- und Blutzellen, vor allem bei Monozyten, aus [86]. Eine Folge ist z. B. die Ausbildung von Fieber. Fieberauslösende Substanzen, zu denen z. B. Bakterien, Viren, Pilze oder ihre Bestandteile, aber auch andere Monozytenaktivatoren zählen, werden als Pyrogene bezeichnet. LPS ist das bekannteste und bestuntersuchte Pyrogen. Generell induzieren diese exogenen Pyrogene, die vor allem von Monozyten erkannt werden, im Organismus die Freisetzung von endogenen Pyrogenen (z. B. Zytokinen). Die sezernierten Zytokine, zu denen IL-1 β , IL-6 und TNF- α gehören, lösen durch Verschiebung der Solltemperatur im thermoregulatorischen Zentrum des Hypothalamus Fieber aus [140]. In Abbildung 3 ist eine durch LPS von *B. pertussis* hervorgerufene Fieberreaktion schematisch dargestellt. Essentiell für die Aktivierung der Monozyten ist die Interaktion von LPS mit dem CD14 Rezeptor, unter Beteiligung des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) [9, 28, 79]. Die Monozytenaktivierung wird durch das Serumprotein LPS-Binding-Protein (LBP) stark intensiviert [63,128]. Die Monozytenreaktion auf Pyrogene wurde als Grundlage verwendet, einen alternativen Pyrogentest zur Testung von Arzneimitteln auf pyrogene Verunreinigungen zu entwickeln [107].

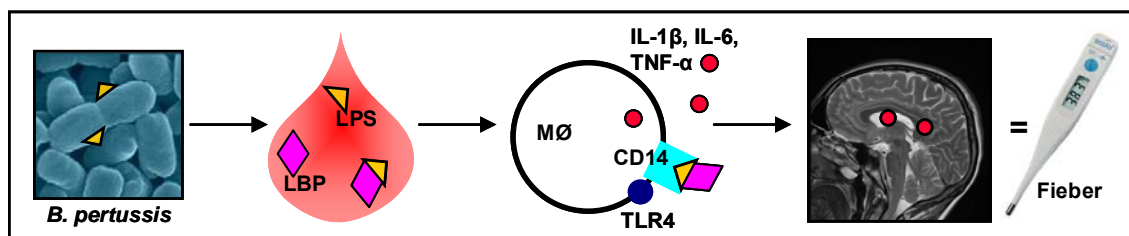


Abb. 3: Entstehung von Fieber durch ein exogenes Pyrogen (hier in Form von LPS von *B. pertussis*). MØ: Monozyt; LBP: LPS-Binding-Protein; LPS: Lipopolysaccharid.

Quelle: *B. pertussis*: <http://webpages.fc.ul.pt/~mcgomes/vacinacao/pnv/Bordetella.jpg>.

Das LPS von *B. pertussis* ist grundsätzlich pyrogen, mitogen und toxisch, so wie das von anderen Gram-negativen Bakterien [5, 147]. In seiner chemischen Struktur unterscheidet es sich jedoch von „smooth-type“ LPS, das bei vielen Mitgliedern der *Enterobacteriaceae*-Familie zu finden ist [80]. Im Gegensatz zu anderen Arten der Gattung *Bordetella* fehlt dem *B. pertussis*-LPS die repetitive O-Antigenstruktur, was zu einer kurzen O-spezifischen Seitenkette führt (siehe Abbildung 4) und deswegen dem so genannten „rough-type“ LPS ähnlicher ist [32, 80, 104]. Es wurde kürzlich gezeigt, dass *B. pertussis* die Gene zur Synthese üblicher O-Ketten fehlen [115]. Ein weiterer Unterschied besteht in den geladenen Zuckern N-Acetyl-Galactosaminuronsäure (GalNAcA), Glucuronsäure und Glucosamin, die üblicherweise nicht in der Kernzone anderer LPS-

Moleküle vertreten sind [80]. In Abbildung 4 ist schematisch der übliche Aufbau eines LPS-Moleküls im Vergleich zu dem *B. pertussis*-LPS zu sehen.

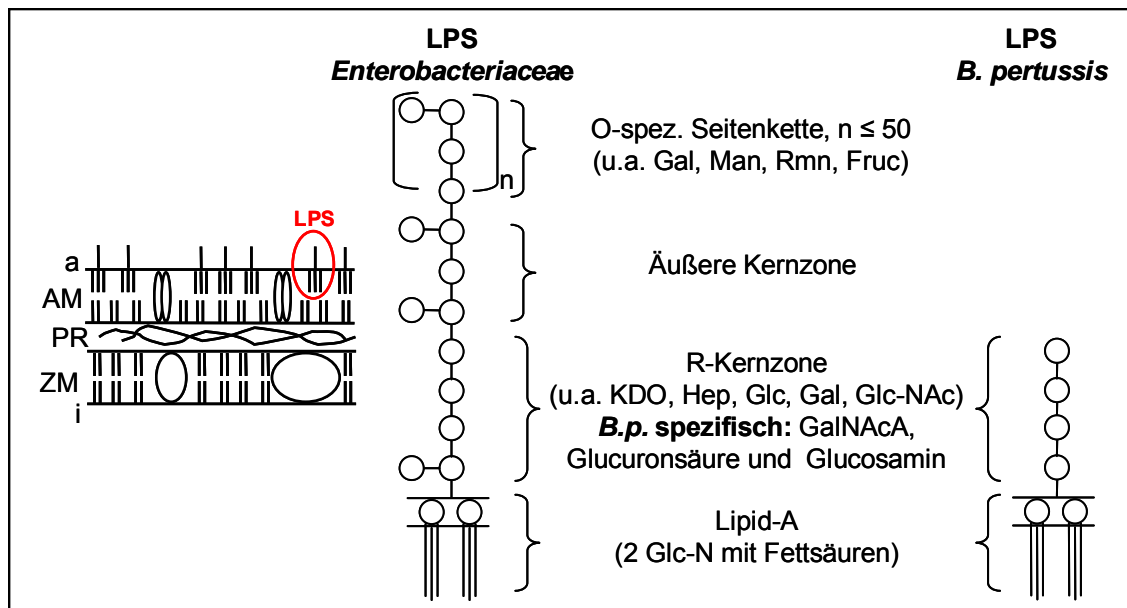


Abb. 4: Übersicht über die Zellwände Gram-negativer Bakterien (links) sowie der schematische Aufbau eines LPS-Moleküls der *Enterobacteriaceae* (Mitte) im Vergleich mit *B. pertussis*-LPS (rechts). a: außen; AM: Außenmembran; ZM: Zytoplasmamembran; Frc: Fructose; Gal: Galactose; Glc: Glucose; Glc-N: Glucosamin; Glc-NAc: N-Acetylglucosamin; GalNAcA: N-Acetyl-Galactosaminuronsäure; Hep: Heptose; i: innen; KDO: 2-Keto-3-desoxyoctonsäure; PR: Periplasmatischer Raum mit Mureinschicht; Modifiziert aus Allgemeine Mikrobiologie, Schlegel HG, Thieme 1992 [125].

1.4 Pertussis-Toxin

Das Pertussis-Toxin (PTx) wird innerhalb der Gattung *Bordetella* ausschließlich von *B. pertussis* synthetisiert und sezerniert. Es bewirkt eine große Vielfalt an biologischen Effekten wie z. B. Histaminsensibilisierung, Aktivierung der Insulinsekretion, Lymphozytose, Stimulation der IgE-Produktion sowie eine gesteigerte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke [6, 16, 92, 112]. Diese Reaktionen wurden vor allem in Tierversuchen mit Mäusen beobachtet, im Menschen hingegen konnten sie bis auf die Lymphozytose nicht gesichert bewiesen werden [69]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Effekte hat das PTx in der Vergangenheit viele Namen erhalten wie z. B. Lymphozytosis-Promoting-Faktor (LPF), Histamin-Sensibilisierungs-Faktor und Islet-Aktivierungs-Faktor [94, 121, 153]. Als die Aufreinigung des Toxins zeigte, dass ein Protein für diese Effekte verantwortlich ist, wurde es Pertussigen [93] und Pertussis-Toxin (PTx) [110] genannt, obwohl *B. pertussis*, wie in Tabelle 1 aufgelistet, noch zahlreiche andere virulente Toxine produziert [149]. In der Regel wird PTx als Hauptvirulenzfaktor beschrieben, allerdings scheint es keinen Zusammenhang mit den typischen Keuchhustensymptomen (paroxysmaler Husten, Keuchen, Übergeben) und PTx zu geben. Auch die

exakte Rolle von PTx bei der Etablierung der Infektion und deren Übertragung muss noch erkundet werden [80]. Lange bekannt ist hingegen, dass Pertussis-Toxin, in detoxifizierter Form, das wichtigste Antigen in azellulären Pertussis-Impfstoffen darstellt und deshalb in jedem azellulären Impfstoff enthalten sein muss [109, 120].

PTx ist ein 105 kDa großes heterohexameres Protein, das aus den fünf verschiedenen nicht-kovalent verbundenen Untereinheiten (UE) S1 (26 kDa), S2 (22 kDa), S3 (22 kDa), zweifach vertreten S4 (12 kDa) und S5 (11 kDa) besteht [77, 97]. Es gehört zu der Familie der A-B-Toxine [139], zu der u. a. auch das Enterotoxin von *E. coli*, das Cholera toxin (*Vibrio cholerae*) oder das Toxin von *Corynebacterium diphtheriae* gezählt werden [37]. Das A-Protomer stellt die toxische Komponente dar und besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die die enzymatisch aktive S1-UE bildet [139]. Das nicht-toxische, pentamerische B-Oligomer ist für die Bindung an die Zielzellen verantwortlich und besteht aus den UE S2, S3, S4 und S5, die sich im Verhältnis 1:1:2:1 zusammensetzen [139, 138, 152]. In Abbildung 5 ist schematisch die UE-Struktur des PTx dargestellt.

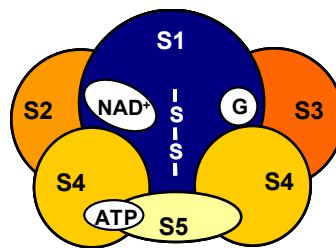


Abb. 5: Die Grundseite des PTx wird vom B-Oligomer gebildet und die Spitze vom A-Protomer (S1). Die S1-UE enthält als NAD-Glycohydrolase/ADP-Ribosyltransferase eine Bindestelle für NAD⁺ und ein G-Protein. Das B-Oligomer, verantwortlich für die Bindung an die Zielzelle, besteht aus den beiden Dimeren S4-S3 und S4-S2 sowie der verbindenden S5-UE. Die Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücke der S1-UE und die Bindung von ATP durch das B-Oligomer führen zum Entlassen des A-Protomers und zur Aktivierung von S1 (siehe auch Text und Abbildung 6).

Jede UE wird mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert. Der Transport über die Zytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum erfolgt einzeln über einen generellen Exportweg – analog zum Sec-System (Sekretions-System) von *E. coli* [46]. Die Sekretion des zusammengesetzten Holotoxins über die äußere Bakterienmembran erfordert einen speziellen Transport-Apparat, der sich aus neun Ptl-Proteinen („Pertussis toxin liberation“) zusammensetzt [17, 39]. Der pti-Locus weist interessanterweise eine hohe Übereinstimmung mit dem Operon des Sekretions-System des taxonomisch entfernten *Agrobacterium tumefaciens* auf [25, 145]. Der genaue Mechanismus, wie und wann das PTx-Protein zusammengesetzt wird und mit dem Ptl-Transporter *in vivo* interagiert, ist gegenwärtig noch nicht bekannt [17]. Nachdem das PTx die äußere Membran durchquert hat, kann die B-UE an die Zielzelle binden. Ein spezieller Rezeptor ist nicht identifiziert worden, aber das Toxin besitzt mehrere Bindeepitope für sialierte und asialierte Kohlenhydratreste von Glycoproteinen und Glycolipiden eukaryoti-

scher Zellmembranen und damit Lektincharakter [122, 144, 152]. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Bindung von PTx an die Zuckerreste der Glycoproteine und Glycolipide durch die S2- und S3-UE des B-Oligomers vermittelt wird [126, 127]. Das PTx wird nach der Bindung von der Zelle aufgenommen, woran sowohl Endosome als auch der Golgi-Apparat beteiligt sind, und wandert in das ER ein [37, 50]. Nachdem das B-Oligomer ATP gebunden hat, wird die S1-UE daraufhin entlassen und die Disulfidbrücke (siehe Abbildung 5) der S1-UE höchstwahrscheinlich durch weitere Faktoren, wie zelluläres Glutathion und Membranlipide reduziert und somit aktiviert [64, 65]. *In vitro* kann die Ablösung der S1-UE vom B-Oligomer durch Reduktionsmittel (z. B. mit Dithiothreitol) bewerkstelligt und die Aktivierung durch Detergenzien wie z. B. SDS bewirkt werden [65, 89]. In ihrer reduzierten Form fungiert die S1-UE als (A) NAD-Glycohydrolase und (B) ADP-Ribosyltransferase. Sie spaltet hierbei ihr Substrat NAD⁺ hydrolytisch in Nicotinamid und ADP-Ribose [89, 139]. In Abbildung 6 ist die 3D-Struktur von PTx zu sehen [134]. Die S1-UE ist grün dargestellt, deren C-Terminus penetriert die zentrale Pore des B-Oligomers. Das B-Oligomer beinhaltet mit der roten und türkisfarbenen UE das S4-S2 Dimer, mit der roten und lilafarbenen UE das zweite Dimer S4-S3 und gelb dargestellt die verbindende S5-UE. Im S1-Protomer ist das Glycin-129 der hauptkatalytische Rest, der in allen ADP-Ribosyltransferasen strikt konserviert ist [2]. Dieser Rest interagiert mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose des NAD⁺ [124]. Somit kann durch einen nukleophilen Angriff die Spaltung von Ribose und Nicotinamid herbeigeführt werden. Dieser nukleophile Angriff erfolgt durch ein Cystein des G-Proteins (Guanin-Nukleotid-Bindungs-Protein), das wiederum durch einen zweiten katalytischen Rest des PTx, dessen Histidin-35 aktiviert wird [3]. Die beiden katalytischen Reste Glycin-129 und Histidin-35 liegen dicht beieinander in der Nähe des NAD-bindenden Aktiven Zentrums [135].

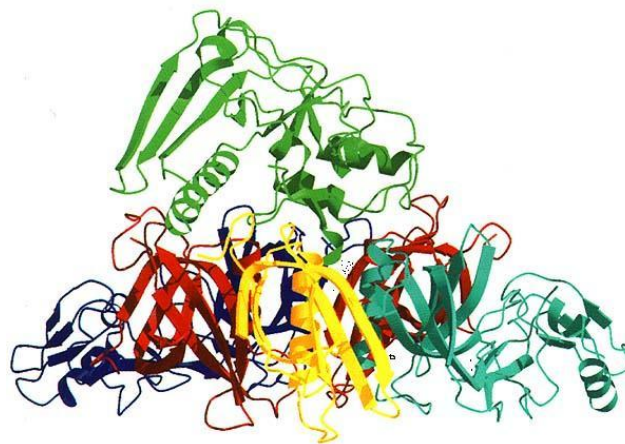


Abb. 6: 3D-Darstellung des PTx nach Stein *et al.* [134]. Das Toxin ähnelt einer Pyramide, die Grundseite wird vom B-Oligomer gebildet und die Spitze vom A-Protomer, deren C-Terminus in die von den B-UE geformte Pore reinragt. Die S1-UE ist grün dargestellt, S2 türkis, S3 lila, S4 (2x) rot und S5 gelb. Die β -Faltblatt-Stränge sind als Pfeile abgebildet, die α -Helices als Spiralen.

Nach der Spaltung von NAD^+ kann die ADP-Ribose in der eukaryotischen Zelle auf verschiedene G-Proteine, die der inhibitorischen G-Protein-Familie angehören, wie G_i -Proteine, Transducin (G_t -Protein) und G_o -Proteine übertragen werden [10, 95, 150]. Ohne Akzeptorprotein ist das A-Protomer *in vitro* alleinig als NAD-Glycohydrolase tätig und spaltet hydrolytisch NAD^+ , obwohl es anschließend die ADP-Ribose nicht auf ein G-Protein übertragen kann [89]. Transferiert PTx die ADP-Ribose auf ein G-Protein, ist dieses nicht mehr in der Lage, mit dem aktivierten 7TM (transmembran) Rezeptor zu interagieren, um selbst aktiviert zu werden [42]. Das G-Protein ist folglich in seinem inaktiven Status konserviert und kann nicht in den Signalweg der Zelle eingreifen, z. B. wenn G_i -Proteine betroffen sind, nicht hemmend auf die Adenylatcyclase (AC) einwirken (siehe Abbildung 7). Dies hat in diesem Fall zur Folge, dass die AC ohne Antagonist ungehemmt durch stimulierende G-Proteine (G_s -Proteine) aktiviert werden und somit aus ATP den Second Messenger cAMP synthetisieren kann (siehe Abbildung 7). Der cAMP-Spiegel steigt in der Zelle an, und damit einhergehend sinkt der ATP-Spiegel [47, 67, 69]. Der erhöhte cAMP-Spiegel kann nicht über die normale Homöostase kontrolliert werden. Der Signaltransduktionsweg der Zelle wird somit nachhaltig beeinträchtigt.

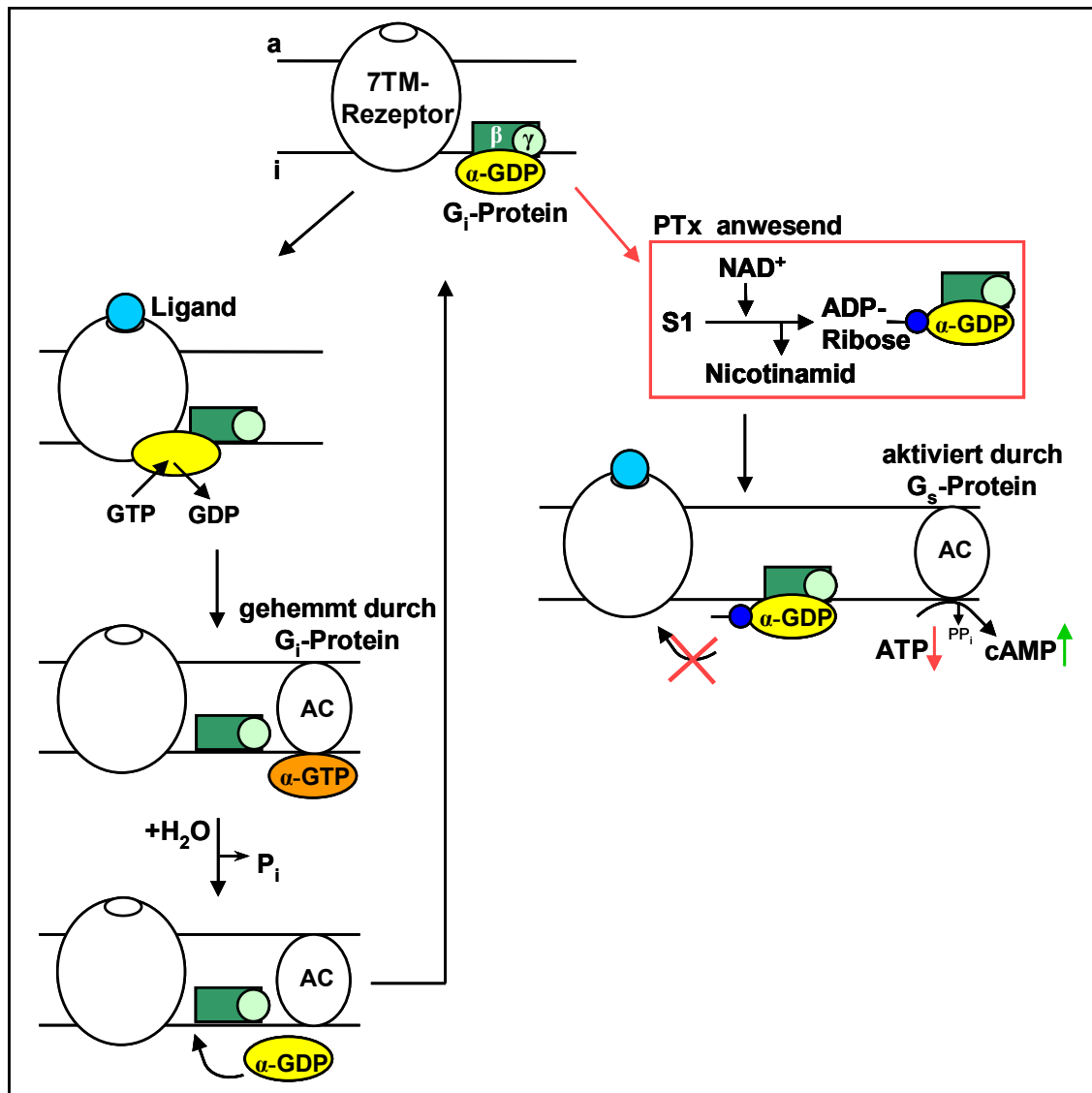


Abb. 7: Schematische Darstellung der Reaktion eines G_i-Proteins. Der durch einen Liganden (z. B. Hormon) aktivierte 7TM-Rezeptor interagiert und aktiviert wiederum das G-Protein, dessen α-UE sich daraufhin ablöst und mit dem nachgeschalteten Enzym (z. B. Adenylatcyclase (AC)) der Signaltransduktionskette interagiert. Bei Anwesenheit von PTx wird nach der hydrolytischen Spaltung des NAD⁺ die ADP-Ribose auf die α-UE des G-Proteins übertragen, so dass eine Wechselwirkung mit dem aktivierten Rezeptor nicht mehr möglich ist. Es wird somit signifikant in den Energiestoffwechsel eingegriffen. a: außen; GDP/GTP: Guanin-di-/triphosphat; i: innen; P_i: inorganisches Phosphat. PP_i: Diphosphat.

1.5 Pertussis-Impfstoffe

Seitdem im Jahre 1906 Bordet und Gengou ihre Entdeckung des Keuchhusten-Erregers publizierten, wurde versucht einen Impfstoff herzustellen. Die erste Lizenz eines Ganzkeimimpfstoffes wurde 1914 in den Vereinigten Staaten erteilt. Diese frühe

Vakzine wurde allerdings 1931 wegen Inkonsistenz aus dem Verzeichnis wieder gestrichen [99]. Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Keuchhusten hatte trotzdem seinen Anfang genommen. Generell existieren heute zwei Arten von Impfstoffen, der Ganzkeimimpfstoff, bestehend aus abgetöteten, entgifteten *B. pertussis* Organismen und der azelluläre Impfstoff, der aufgereinigte und inaktivierte Komponenten von *B. pertussis* enthält. Für die Inaktivierung des Ganzkeimimpfstoffes wurden zunächst verschiedene Methoden (Abkühlen, Erhitzen, Azeton, Phenol, Behandlung mit Formalin und Merthiolat) entwickelt [99], von denen sich das Abtöten mittels Erhitzen (56 °C, 30 Minuten) und Formalinbehandlung als geeignet herausstellten [99, 111]. Der Ganzkeimimpfstoff ist heute noch als Suspension in steriler physiologischer Kochsalzlösung (Saline) oder adsorbiert an Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) oder Aluminiumphosphat (Al-PO_4) erhältlich. Vor allem in Entwicklungsländern wird der wesentlich billigere Ganzkeimimpfstoff eingesetzt. Der azelluläre Pertussis-Impfstoff wird in Japan seit 1981 verwendet [120], in vielen Ländern Europas und den USA wurde er Anfang 1990 eingeführt. Der azelluläre Pertussis-Impfstoff enthält aufgereinigte und detoxifizierte Virulenzfaktoren von *B. pertussis*. Hierzu gehören detoxifiziertes Pertussis-Toxin, sogenanntes Pertussis-Toxoid (PTd), FHA, PRN und FIM (siehe Tabelle 1). In allen azellulären Impfstoffen ist PTd enthalten. FHA ist die am zweithäufigsten vertretene Komponente, gefolgt von PRN und annähernd gleichauf FIM [35]. Auf dem europäischen Markt ist der azelluläre Pertussis-Impfstoff nicht mehr monovalent erhältlich, sondern nur in Kombination mit anderen Impfstoffkomponenten (u. a. Diphtherie, Tetanus, Hepatitis-B, Poliomyelitis, *Haemophilus influenzae* Typ b). Um das im Impfstoff enthaltene PTx zu entgiften, existieren zwei methodisch unterschiedliche Herangehensweisen: Die chemische Detoxifizierung zu PTd oder die genetische Detoxifikation zu PTg. Die chemische Entgiftung wird mit Formaldehyd, Glutaraldehyd, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Tetranitromethan (TNM) vorgenommen. Die Behandlung mit Formaldehyd und Glutaraldehyd, manchmal auch eine Kombination aus beiden, ist hierbei am gängigsten. Aus Zulassungsunterlagen des Paul-Ehrlich-Institutes geht hervor, dass die kombinierte Detoxifizierung mit Glutaraldehyd und Formaldehyd z. B. bei 40 °C durchgeführt wird und sich über acht Tage erstreckt. Diese Behandlung führt zu einer gezielten Vernetzung der Aminogruppen des Proteins über Schiffsche-Basen-Bildung, so dass die Sekundär- und Tertiärstruktur des Toxins gestört ist, es jedoch nach wie vor als Antigen fungieren kann. In dieser vernetzten Form ist freies Formaldehyd im Impfstoff lediglich in Spuren vorhanden, so dass für den Impfling keine Gesundheitsgefahr vom Formaldehyd ausgeht. Für die genetische Detoxifizierung wird zuerst das mutierte Pertussis-Toxin-Operon durch ortsgerichtete Mutagenese geschaffen und dann das modifizierte Pertussis-Toxin-Gen über bakterielle Konjugation mit Hilfe eines *E. coli*-Stammes in das *B. pertussis*-Genom transferiert [113]. Das PTd und PTg im azellulären Impfstoff ist an ein Adjuvans adsorbiert; i. d. R. wird als Adsorbat $\text{Al}(\text{OH})_3$ verwendet, außerdem AlOH_4 oder vereinzelt Aluminiumkaliumsulfat [35]. Das Adjuvans wirkt zudem als Aktivator und steigert – sowohl bei den Ganzkeimimpfstoffen als auch bei den azellulären – die antigene Wirkung erheblich. Beide Impfstoffarten besitzen eine sehr gute Immunogenität, wobei der Ganzkeimimpfstoff mit 85–95 % besser abschnei-

det als der azelluläre mit 75–90 %, dessen Nebenwirkungen jedoch auch wesentlich schwächer sind und seltener auftreten [35].

Nebenwirkungen, die im Zusammenhang mit Pertussis-Impfungen auftreten, lassen sich in Lokalreaktion und systemische Reaktion unterteilen. Die Lokalreaktion ist durchweg gutartig, ihr Höhepunkt liegt 24 Stunden post vaccinationem [33]. Am häufigsten kommt es zu kleinen Infiltraten an der Injektionsstelle mit oder ohne Hautrötung und Schwellung sowie Schmerzen. Die lokale Rötung und Schwellung haben nur vorübergehenden Charakter, während die Infiltration in Form eines reaktionslosen Impfknotens monatelang persistieren kann [99]. Zu den schweren systemischen Reaktionen, die im trivalenten Impfstoff (Diphtherie-Tetanus-Pertussis) auf die Pertussis-Komponente zurückzuführen sind, zählt am häufigsten eine akute postvaksinale Enzephalopathie; andere zentralnervöse Komplikationen, bei deren Entstehung der Impfung die Rolle eines pathogenen mitwirkenden Faktors zukommt, sind die bakteriell bzw. viral bedingte Meningitis und Meningoenzephalitis. Nicht-neurale Komplikationen, bei deren Entstehung der Impfung die Rolle eines alleinigen, übertragenden pathogenetischen Faktors zukommt, sind Kreislaufschock, Hyperpyrexiesyndrom, vakzinale thrombopenische Purpura sowie bakterielle Erkrankungen wie Otitis und Pneumonie [33]. Der Zusammenhang zwischen der Pertussis-Impfung und den zuvor genannten Komplikationen muss jedoch kritisch betrachtet werden, da für die am häufigsten auftretende Komplikation, die postvaksinale Enzephalopathie, z. B. in einer neun Jahre umfassenden Überwachungsstudie (1993 bis 2002) in Kanada kein Beweis für eine Enzephalopathie nach > 6,5 Millionen Dosen verabreichten Pertussis-Impfstoffen gefunden wurde [88]. Eine ungewöhnliche Reaktion, die eindeutig mit dem Impfstoff im Zusammenhang gebracht werden kann, ist die Ausbildung von Fieberkrämpfen, deren Auslöser jedoch unklar ist [33, 35, 44, 137]. Interessanterweise tritt im Gegensatz hierzu bei einer Pertussis-Erkrankung nur leichtes Fieber auf.

Generell sind die genannten Nebenwirkungen vor allem beim Ganzkeimimpfstoff zu registrieren. Der azelluläre Pertussis-Impfstoff zeichnet sich durch eine bessere Verträglichkeit aus, die sich in deutlich schwächeren und seltener auftretenden Impfreaktionen äußert [35, 80].

1.6 Der Tierversuch

Das Europäische Arzneibuch schreibt für das im Pertussis-Adsorbat-Impfstoff enthaltene Pertussis-Toxoid (PTd) den Test auf „Abwesenheit von restlichem Pertussis-Toxin und Irreversibilität von Pertussis-Toxoid“ vor. Diese Testung ist nicht für Produkte erforderlich, die durch genetische Modifikation gewonnen wurden [108]. Beim PTd jedoch muss die Vollständigkeit der Detoxifizierung sowie eine mögliche Reversion zum Toxin überprüft werden; die immunogenen Eigenschaften müssen aber trotz Detoxifizierung erhalten bleiben. Diese Prüfung, der sogenannte Maus-Histamin-Sensibilisierungstest (HIST), ist ein letaler Belastungstest, der an 3 Gruppen von mindestens je 5 histaminsensitiven Mäusen durchgeführt wird. Den Mäusen der ersten Gruppe wird das Zweifa-

che einer Einzeldosis für den Menschen des bei 2 bis 8 °C gelagerten Impfstoffs intraperitoneal injiziert. Den Mäusen der zweiten Gruppe wird ebenfalls die zweifache humane Einzeldosis intraperitoneal verabreicht, jedoch wurde der Impfstoff 4 Wochen bei 37 °C inkubiert. Die dritte Gruppe ist die Kontrollgruppe und erhält Verdünnungsmittel. Nach fünf Tagen erfolgt die Histaminbelastung für alle Mäuse mit anschließender 24-stündiger Beobachtung. Die Prüfung ist ungültig, wenn eine oder mehrere Kontrollmäuse infolge der Histaminbelastung sterben. Der Impfstoff entspricht der Prüfung, wenn kein Tier aus der ersten oder zweiten Gruppe stirbt. Wenn eine Maus aus einer dieser beiden Gruppen stirbt, wird die Prüfung mit der gleichen oder einer größeren Anzahl an Tieren wiederholt und die Ergebnisse der gültigen Prüfungen werden zusammengefasst. Der Impfstoff entspricht der Prüfung, wenn nicht mehr als 5 % der Gesamtanzahl aus den beiden Prüfungsgruppen infolge der Histaminbelastung sterben. Zusätzlich dazu muss die Histaminsensitivität der verwendeten Mäusestämme regelmäßig untersucht werden. Das Europäische Arzneibuch schreibt hierzu vor, Dreifachverdünnungen einer Pertussis-Toxin-Referenzzubereitung intravenös den Mäusen zu injizieren [108]. Den Kontrolltieren wird das entsprechende Verdünnungsmittel verabreicht. Die Histaminbelastung und Auswertung erfolgt wie oben beschrieben.

1.7 Derzeitiger Stand und Ziel der Arbeit

Weltweit existiert keine Alternativmethode, um Pertussis-Adsorbat-Impfstoffe auf „Abwesenheit von restlichem Pertussis-Toxin und Irreversibilität von Pertussis-Toxoid“ ohne den Einsatz von Tieren zu testen. Der unter 1.6 beschriebene, vom Europäischen Arzneibuch vorgeschriebene Tierversuch stellt einen letalen Belastungstest dar, der allen beteiligten Mäusen, selbst den Tieren der Kontrollgruppe, die i. d. R. die Histaminbelastung überleben sollten, enorme Leiden bereitet. Zudem besitzt der HIST nach Erfahrungen des Paul-Ehrlich-Institutes (PEI, Langen, Deutschland) und anderer nationaler Kontrollbehörden wie z. B. dem National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Großbritannien), Netherlands Vaccine Institute (NVI, Niederlande) oder Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS, Frankreich) eine derart schlechte Aussagekraft, dass Wiederholungen unumgänglich sind und somit ein übermäßig hoher Einsatz von Versuchstieren notwendig ist. Allein vom PEI sind im Jahre 2006 insgesamt 346 Chargen Impfstoff freigegeben worden, die eine azelluläre Pertussis-Komponente enthalten. Das entspricht jährlich mehr als 22.897.508 Dosen.

Ein *In vitro*-Nachweis von aktivem PTx mit Hilfe von CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells), welcher erstmals 1983 publiziert wurde [56], beruht auf der Beobachtung, dass die Zugabe von PTx zu Kulturen von CHO-Zellen zu einer Clusterbildung beim Wachstum führt. Diese morphologischen Veränderungen können bereits mit einer PTx-Konzentration von weniger als 100 pg/ml erreicht werden [40], wodurch der Test über eine ausreichende Sensitivität verfügt. Er wird mit gutem Erfolg für die Testung von Zwischenprodukten der Impfstoffproduktion eingesetzt, versagt jedoch bei der Prüfung von Endprodukten, d. h. adsorbierten Impfstoffen. Nicht adsorbierte Impfstoffe sind

wegen wesentlich schlechterer Impferfolge nicht akzeptabel. Nach wie vor müssen daher die konfektionierten Impfstoffe gegen Keuchhusten (heute typischerweise kombiniert mit Impfstoffen gegen andere Infektionserreger, siehe 1.5) im Tierversuch auf restliches aktives PTx getestet werden, da bei seiner Anwesenheit mit schweren und schwersten Nebenwirkungen bei den Impfungen (u. a. Kleinkinder) gerechnet werden muss (siehe 1.5).

Demzufolge ist die Entwicklung einer alternativen Testmethode zur Ablösung von Tierversuchen beim Nachweis von aktivem Pertussis-Toxin in adsorbierten Impfstoffen dringend erforderlich.

In der Literatur wird die Aktivierung von Monozyten durch PTx beschrieben [141]. Dieses Potential sollte für die Etablierung einer Testmethode ausgenutzt werden. Hierbei stand jedoch zunächst eine andere Fragestellung im Vordergrund, da die Auswirkungen von PTx auf Zellen des Immunsystems kontrovers beschrieben werden. Auf der einen Seite zeigt PTx die immunstimulierenden Eigenschaften eines Adjuvans, auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass es Chemotaxis und die Freilassung von lysosomalen Enzymen in Neutrophilen und Makrophagen hemmt [11, 85, 132].

Tanon *et al.* [141] beschreiben die Aktivierung von humanen Monozyten durch PTx und PTg, indem beide die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α induzieren. Ergänzend hierzu existieren zahlreiche Veröffentlichungen, die PTx als starkes Adjuvans für verschiedene Immunsysteme von Tieren und dem Mensch beschreiben [4, 129, 71]. PTx agiert hier als Adjuvans und verstärkt die Zytokinproduktion, indem es die Differenzierung und klonale Expansion von Th1- und Th2-Zellen über die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen, inklusive Monozyten, veranlasst [119, 130]. In den Rahmen dieser Fragestellung fällt zudem die ungeklärte Tatsache, dass im Zusammenhang mit Pertussis-Impfungen immer wieder von ungeklärten Fieberausbrüchen und Fieberkrämpfen die Rede ist [33, 35, 44, 137]. Nach wie vor ist unerforscht, von welcher Impfstoffkomponente das Fieber ausgelöst wird. Häufig wird hierbei PTx in den Mittelpunkt gestellt [109].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beinhalten einige Publikationen gegensätzliche Aussagen, die die Inhibierung wichtiger Immunzellreaktionen, Monozyten eingeschlossen, durch *B. pertussis* und PTx beschreiben. Saukokken *et al.* [123] berichten über die Fähigkeit von *B. pertussis*, *in vitro* in humane Makrophagen und *in vivo* in die von Kaninchen über die Internalisierung des leukozyten-spezifischen Integrins CR3 einzudringen. Dieser Mechanismus führt insgesamt zu einer erhöhten Anzahl an in der Lunge verharrenden *B. pertussis*-Bakterien. Einen weiteren Beweis, dass *B. pertussis* die Antwort des Wirtes beeinflusst und moduliert, sehen Andreasen *et al.* [1] in einer von PTx induzierten Hemmung der frühen Zytokinproduktion, was zu einer Verzögerung bei der Rekrutierung von Neutrophilen führt. Shumilla *et al.* [131] erforschten, dass humane Monozyten, die mit *B. pertussis* infiziert sind, eine reduzierte HLA-DR-Expression zeigen. PTx ist an dem Rückgang von humanen Leukozytenantigenen(HLA)-DR auf der Zelloberfläche beteiligt. Darüber hinaus führt eine Infektion mit *B. pertussis* zu der Abnahme der Interferon- γ stimulierten HLA-DR-Expression, indem es die Induktion von

HLA-DR-Proteinen verhindert [131]. Ebenfalls wird die Fähigkeit von *B. pertussis* beschrieben, die Gene der Zellen, die in der Antigenprozessierung und -präsentation beteiligt sind, die humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) zu unterdrücken [12]. Dies unterstützend wurde gezeigt, dass PTx eine immunsuppressive Aktivität besitzt. Mäuse, die mit einem PTx-Mutanten infiziert wurden, entwickelten einen höheren anti-*Bordetella* Serumantikörpertiter als die mit dem *B. pertussis*-Wildtyp infizierten Tiere [19].

Um die Frage nach der Stimulierbarkeit humaner Monozyten durch PTx zu untersuchen, musste zunächst eine geeignete Nachweismethode etabliert werden, über die PTx in einem Bluttest mit Monozyten getestet werden konnte. Da in der Pyrogenarbeitsgruppe des Paul-Ehrlich-Institutes über 10 Jahre Erfahrungen mit einem Bluttest bestehen, der sich die Aktivierung humaner Monozyten als Indikator für Pyrogene in Arzneimitteln zunutze macht, bot es sich an, über diesen den Pertussis-Monozyten-Aktivierungs-Test zu entwickeln. Hierüber konnte die Frage geklärt werden, ob PTx in der Lage ist, humane Monozyten zu aktivieren.

In Hinblick auf die Entwicklung einer alternativen Testmethode wurden zudem verschiedene Testansätze ausgearbeitet, die die enzymatische Reaktion des Pertussis-Toxins in den Mittelpunkt stellen. Ansatzmöglichkeiten bieten hierbei das Substrat NAD^+ , ob in seiner natürlichen Form oder als fluoreszierendes Analogon, sowie die Messung von Substraten der nachgeschalteten Enzymkaskade, wie z. B. des cAMP- oder ATP-Spiegels, die durch die Anwesenheit von PTx verändert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Der Monozyten-Aktivierungs-Test und seine begleitenden Versuche

Bei der Erforschung der Frage, ob PTx in der Lage ist, humane Monozyten zu aktivieren, stand vor allem der hierfür entwickelte Pertussis-Monozyten-Aktivierungs-Test (Pertussis-MAT) im Mittelpunkt. Der Pertussis-MAT besteht aus einem Inkubationsschritt (Inkubation von humanem Vollblut mit der Probe) und einem Messschritt (Messung pro-inflammatorischer Zytokine).

2.1.1 Verwendete Pertussis-Toxine, Positiv- und Negativkontrollen

Sämtliche im MAT oder den begleitenden Versuchen (Endotoxin-Abreicherung, LAL-Test, Proteinbestimmung, SDS-PAGE, HIST) eingesetzten Pertussis-Toxine und Negativ- und Positivkontrollen wurden zu Beginn des Experimentenblocks einmal auf die gewünschte Konzentration im benötigten Volumen eingestellt, so dass für alle Versuche ein und dieselbe Ausgangsprobe verwendet werden konnte. Insgesamt wurden sechs Pertussis-Toxine getestet, von denen fünf käuflich erworben waren und das sechste, ein genetisch verändertes Pertussis-Toxin (PTg), freundlicherweise von der Firma Chiron Vaccines (Italien) kostenfrei zur Verfügung gestellt worden war (siehe Tabelle 2). Soweit nicht anders beschrieben, wurde sterile und pyrogenfreie Saline als Negativkontrolle verwendet sowie zwei unterschiedliche LPS-Präparate als Positivkontrollen: WHO-Standard-Endotoxin (WHO-LPS) und *B. pertussis*-LPS (*B.p.*-LPS; siehe jeweils Tabelle 2). Die beiden handelsüblichen LPS-Lyophilisate wurden jeweils in pyrogenfreiem LAL-Reagenzien-Wasser (Acila-H₂O, Pyroquant, Deutschland) gelöst und mit der entsprechenden Stammkonzentration zu 30 µl in Verdünnungsröhrchen (Borosilikatglas, VWR, Deutschland) aliquotiert und bei -25 °C verwahrt. WHO-LPS wurde auf eine Stammkonzentration von 200 ng/ml, das *B.p.*-LPS auf eine Stammkonzentration von 5 µg/ml eingestellt. Die Verdünnungsröhrchen waren zuvor für 2 Stunden bei 250 °C erhitzt worden, um anhaftendes LPS zu inaktivieren. Für den Versuchstag wurde die entsprechend benötigte Menge an Aliquots aufgetaut und für 5 Minuten auf dem Vortexer (z. B. Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Deutschland) bei maximaler Stufe geschüttelt. Im Anschluss wurden die gewünschten Konzentrationen mit Acila-H₂O eingestellt.

Tab. 2: In Vorversuchen, im Pertussis-MAT sowie begleitenden Versuchen verwendete Pertussis-Toxine sowie Negativ- und Positivkontrollen

Toxine	Herkunft	Verwendet in
PTx	Biologische Referenzpräparation (BRP), European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Frankreich	MAT, LAL-Test, LPS-Abr., Proteinbest., PAGE, HIST
PTx (B)	JNIH-5, WHO Internationales Standard- <i>Bordetella-pertussis</i> -Toxin, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Großbritannien	LAL-Test, LPS-Abreicherung, Proteinbestimmung, PAGE
PTx (C)	Biomol, Deutschland	
PTx (D)	List Biological Laboratories; Quadragech Diagnostics, Großbritannien	
PTx (E)	Sigma, Deutschland	
PTg	genetisch detoxifiziert, Chiron Vaccines, Italien	MAT, LAL-Test, LPS-Abr., Proteinbest., PAGE
Negativkontr. „Saline“	150 mM NaCl, Fresenius Kabi, Deutschland	MAT
Positivkontr.1 „WHO-LPS“	94/580, WHO Internat. Standard-Endotoxin <i>E. coli</i> O113:H10:K; NIBSC, Großbritannien	MAT, LAL-Test, LPS-Abreicherung
Positivkontr.2 „B.p.-LPS“	89/670; <i>B. pertussis</i> (W28) LPS; NIBSC, Großbritannien	

2.1.2 Sonstige Reagenzien des Monozyten-Aktivierungs-Tests

Frisches humanes Vollblut wurde von gesunden freiwilligen Spendern mit Hilfe heparinierter Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette, Sarstedt, Deutschland) entnommen. Für die Inkubation wurde RPMI 1640 Zellkulturmedium (low-endotoxin: $\leq 2,5$ pg/ml, Cambrex, Belgien) verwendet.

Der anti-CD14 AK (monoklonaler anti-CD14 Antikörper, biG14, Biometec, Deutschland) wurde aufgrund seiner Fähigkeit, den CD14 Rezeptor zu blockieren, ohne selbst den Monozyten hierdurch zu aktivieren, ausgewählt [38, 136].

Die verwendete phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer) war der im Institut hergestellte Hausstandard (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2–7,4; sterilfiltriert).

2.1.3 Durchführung des Pertussis-MAT

Inkubationsschritt: 200 µl Verdünnungsmittel (low-endotoxin RPMI 1640), 20 µl humanes Frischblut, 20 µl anti-CD14 AK (10 µg/ml) oder 20 µl Saline wurden für 1 h im Zellkulturschrank (Labotect, Deutschland) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit sowie 5 % CO₂ vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden 20 µl originales oder LPS-abgereichertes PTx oder PTg, jeweils 12,5 µg/ml oder 25 µg/ml, hinzugefügt (siehe Abbildung 8). In jedem Test war eine Negativkontrolle (Saline) und zwei Positivkontrollen mit einbezogen, um die Eignung des Blutes und des AK zu kontrollieren. Die beiden Positivkontrollen (WHO-LPS und *B.p.*-LPS) wurden von 50.000 pg/ml bis 3,1 pg/ml eingesetzt. Der Test wurde in einer 96-Well-Zellkulturplatte (pyrogenfrei, Falcon, Deutschland) durchgeführt. Alle im MAT-Inkubationsschritt verwendeten Materialien und Flüssigkeiten mussten pyrogenfrei sein.

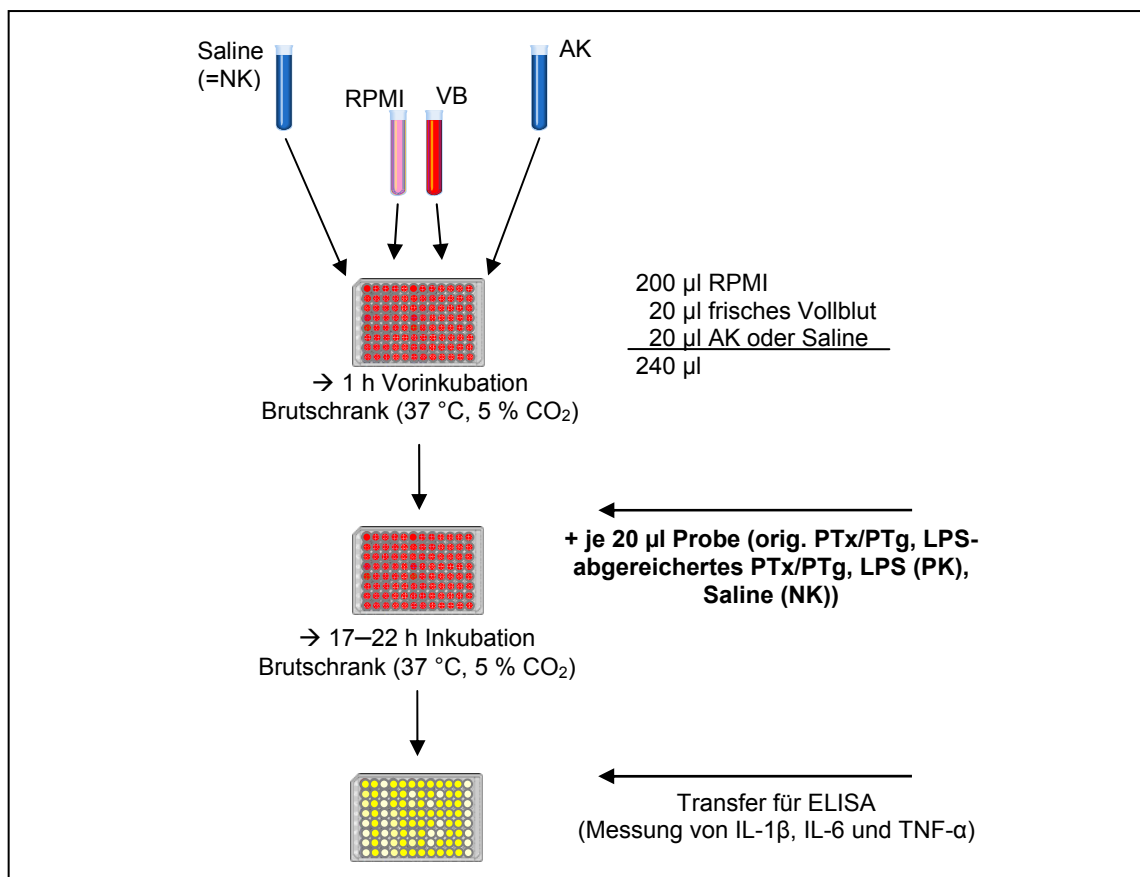


Abb. 8: Schema zur Versuchsdurchführung des Pertussis-MAT, AK: Antikörper; NK: Negativkontrolle; PK: Positivkontrolle.

Nach anschließender 17–22 stündiger Inkubation im Zellkulturschrank wurde die Zellsuspension für den Examinationsschritt auf eine ELISA-Platte (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) überführt.

2.1.4 Examinationsschritt via ELISA

Die Zellsuspension wurde nach der Übernachtinkubation auf humanes Interleukin 1 beta (IL-1 β), humanes Interleukin 6 (IL-6) und humanen Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) mittels ELISA (DuoSet R&D Systems, Deutschland) untersucht. Die verwendeten Reagenzien, mit Ausnahme des in PBS gelösten Festphasen-Antikörpers, wurden in Reagenzien-Puffer (siehe unten) aufgenommen. Für die Vorbereitung des Sandwich-ELISA wurden die Platten mit dem entsprechenden Festphasen-Antikörper beschichtet und nach dreimaligem Waschen für mindestens zwei Stunden mit Blocking-Puffer inkubiert (siehe unten). Nach erneutem Waschen konnten die Platten unmittelbar für die Inkubation der Proben verwendet werden oder bei -21 °C bis zu sechs Monate verwahrt werden. Die weitere Durchführung des ELISA erfolgte mit dem entsprechenden Detektions-Antikörper und anschließend in Kombination mit Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase. Die Farbentwicklung wurde mit zwei Reagenzien durchgeführt, die Tetramethylbenzidin (TMB) als Chromogen und Wasserstoffperoxid als Substrat enthalten (R&D Systems, Deutschland oder Bio-Rad Laboratories, Deutschland). Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 N H₂SO₄ Merck, Deutschland). Die photometrische Auswertung wurde bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm im Plattenphotometer durchgeführt (Spectra, Tecan, Deutschland). Der ELISA wurde hinsichtlich des Probenvolumens und der Inkubationszeiten nicht vollständig nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die modifizierte Version ist in Tabelle 3 zu sehen. Für jedes Zytokin wurde der entsprechende Standard (R&D Systems, Deutschland) als interne ELISA- und Plattenkontrolle mitgeführt.

Reagenzien-Puffer:

10 % BSA (Sigma, Deutschland) in PBS (Hausstandard), sterilfiltriert mittels Membranfilter (Porengröße 0,2 μ m, Nalgene, Deutschland).

Blocking-Puffer:

10 % FCS (Sigma, Deutschland) und 0,01 % Natriumazid (Merck, Deutschland) in PBS (Hausstandard) sterilfiltriert mit 0,2 μ m Porengröße (Nalgene, Deutschland).

Waschpuffer:

0,05 % Tween 20 (Sigma, Deutschland) in PBS (Hausstandard).

Tab. 3: Durchführung des ELISA

Schritt	Probenvol.	Dauer/Wiederholungen
1. Inkubation der Proben	50 µl/well	1 h (unter Schütteln)
2. Waschen	300 µl/well	3 x
3. Inkubation mit Detektions-AK	100 µl/well	1 h (unter Schütteln)
4. Waschen	300 µl/well	3x
5. Inkubation mit Streptavidin (dunkel)	100 µl/well	20 min
6. Waschen	300 µl/well	3x
7. Inkubation mit TMB/H ₂ O ₂ (dunkel)	100 µl/well	IL-1β: 17 min IL-6: 11 min TNF-α: 20 min
8. Abstoppen mit H ₂ SO ₄	50 µl/well	~30 sek (unter Schütteln bis zum vollst. Farbumschlag)
Messung		

2.1.5 Endotoxin-Abreicherung der PTx- und PTg-Präparationen

Die PTx- und PTg-Proben wurden auf Endotoxin Affinity Resin (END-X Beads, Pyroquant, Deutschland) in einem 1 zu 1-Verhältnis überführt und über Nacht bei 21 °C unter ständiger sanfter Agitation im Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach der Zentrifugation (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland) für 2 Minuten bei 1200 x g der Überstand vorsichtig in ein weiteres pyrogenfreies Gefäß überführt. Die Beads verblieben als Pellet im Gefäß. Als Positivkontrollen wurden WHO-LPS und *B.p.*-LPS mit einer Finalkonzentration von 30.000 pg/ml eingesetzt. Vor und nach der Behandlung mit END-X Beads wurde der Endotoxin-Gehalt der Proben im Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL)-Test mittels GelClot-Technik bestimmt, um die Eignung des Abreicherungssystems zu bestätigen (siehe 2.1.6).

2.1.6 Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (GelClot-Technik)

Der Endotoxin-Gehalt der Proben wurde mittels LAL-Test (GelClot-Technik) bestimmt, gemäß der in der Europäischen Pharmakopöe (EP) beschriebenen Methode [106]. Original-PTx/-PTg (100 µg/ml) und LPS-abgereichertes PTx/PTg (50 µg/ml) wurden in pyrogenfreiem LAL-Reagenzien-Wasser (Acila-H₂O, Pyroquant, Deutschland) verdünnt und getestet. Jeweils 60.000 pg/ml unbehandeltes und 30.000 pg/ml END-X Beads behandeltes LPS von *E. coli* (WHO-LPS) und *B.p.*-LPS wurden als Positivkontrollen

verwendet. Alle pH-Werte der Proben befanden sich in einem für den LAL-Test validen Bereich von pH 6 bis pH 8. Die Proben wurden mit LAL-Reagenz (Pyroquant, Deutschland) versetzt (1:1), für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und nach einer sichtbaren Gelbildung hin ausgewertet. Zur Evaluierung der LAL-GelClot-Methode wurde eine Standardkurve mit Endotoxin (*E. coli* O13:H10, Pyroquant, Deutschland) im Bereich der Sensitivitätsgrenze (3 µg/ml bzw. 0,03 Endotoxineinheiten/ml) des Lysates durchgeführt.

2.1.7 Proteinbestimmung der PTx- und PTg-Proben vor und nach der LPS-Abreicherung

Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Methode von Bradford [14] mit Roti-Quant-Reagenz (Carl Roth, Deutschland), das Coomassie Blau enthält, bestimmt. Originale PTx und PTg sowie LPS-abgereichertes PTx und PTg (Proteinstammlösung war vor der Behandlung mit END-X Beads eingestellt worden) wurden laut Angaben der Hersteller auf eine Proteinkonzentration von 50 µg/ml eingestellt. Rinderserumalbumin (Sigma, Deutschland) wurde als Referenzprotein verwendet und in einer linearen Verdünnungsreihe von 100 µg/ml bis 5 µg/ml eingesetzt. Aqua dest. wurde als Negativkontrolle verwendet. Abschließend wurden die Proben und der Standard im vorverdünnten Roti-Quant-Reagenz verdünnt (1:4). Die photometrische Messung (Photometer, Safire², Tecan, Deutschland) wurde bei 465 nm durchgeführt. Die Referenzwellenlänge betrug 595 nm.

2.1.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Silberfärbung

Die Elektrophorese und Silberfärbung wurden im PhastSystem (Pharmacia, Deutschland) durchgeführt. Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit Polyacrylamid-Gradientengelen (8–25 %, 43 x 50 x 0,35 mm; GE Healthcare, Deutschland) vorgenommen. Zudem wurden SDS-Pufferstreifen (GE Healthcare, Deutschland) und Niedermolekulargewichts-Markerproteine (GE Healthcare, Deutschland) mit einer Molekülmasse von 14 kDa bis 97 kDa verwendet. Der Proteingehalt der originalen PTx- und PTg- sowie LPS-abgereicherten PTx- und PTg-Proben wurde gemäß Herstellerangaben vor dem LPS-Abreicherungs-Prozedere eingestellt. Die Proben wurden für die Gel-Elektrophorese mit reduzierendem Probenpuffer (siehe unten) versetzt, so dass eine finale Proteinkonzentration von 25 µg/ml vorlag. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C 5 Minuten denaturiert. 4 µl jeder Probe und der Markerproteinlösung wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 250 V, 10 mA, 3,0 W, 15 °C, 65 Vh in der PhastSystem Separations-Einheit durchgeführt. Die automatisierte Silberfärbung in der PhastSystem Entwicklungs-Einheit erfolgte anschließend [52]. Die Fixierung wurde hierbei mit 20 % Trichloressigsäure (Carl Roth, Deutschland), die Waschschriffe mit 50 % Ethanol (Merck, Deutschland) und 10 % Essigsäure (Merck, Deutschland), 10 % Ethanol und 5 % Essigsäure sowie mit Aqua dest. durchgeführt. Als Detektor wurde 8,3 % Glutaraldehyd (Merck, Deutschland) und

zum Färben 0,5 % Silbernitrat (Merck, Deutschland) verwendet. Der stets frisch anzusetzende Entwickler bestand aus 0,015 % Formaldehyd (Sigma, Deutschland) in 2,5 % Natrium-Carbonat (Merck, Deutschland), die Stopplösung aus 5 % Essigsäure und die Konservierungslösung aus 10 % Essigsäure mit 10 % Glycerol (Merck, Deutschland).

Reduzierender Probenpuffer:

0,125 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan·HCl (Serva, Deutschland)

5 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Fluka, Deutschland)

0,2 M DTT (Dithiothreitol, Serva, Deutschland)

pH 6,8

2.1.9 Maus-Histamin-Sensibilisierungstest

Der Maus-Histamin-Sensibilisierungstest (HIST) ist ein letaler Belastungstest in Mäusen, der nach den Vorgaben der EP durchgeführt wurde [108]. Pertussis-Toxin muss demnach histaminsensitiven Mäusen intravenös verabreicht werden. Nach fünf Tagen erfolgt die Histamin-Belastung, wobei Histamin-Base intraperitoneal injiziert und in den folgenden 24 h das Überleben der Mäuse dokumentiert wird.

Der Tierversuch wurde unter der Aufsicht der Diplombiologin Dr. Ute Rosskopf, Paul-Ehrlich-Insitut, durchgeführt.

Die Aktivität von originalem und LPS-abgereichertem PTx (biologische Referenzpräparation) wurde überprüft. Jeweils zwei Verdünnungen (50 ng und 100 ng pro Maus) der beiden PTx-Proben wurden in die Schwanzvene histaminsensitiver CD1 Mäuse (Charles River, Deutschland) injiziert. Die Proteinkonzentration der LPS-abgereicherten Probe legte sich dem Proteingehalt zugrunde, der vor der Abreicherung eingestellt worden war. 10 zufällig für einen Käfig ausgesuchte und gruppierte, weibliche 5–6 Wochen alte Mäuse wurden für die Testung von 50 ng originalem und LPS-abgereichertem PTx verwendet. 6 zufällig für einen Käfig ausgesuchte und gruppierte, weibliche 5–6 Wochen alte Mäuse wurden für die Testung von 100 ng originalem und LPS-abgereichertem PTx verwendet. Das intravenös verabreichte Volumen betrug jeweils 0,1 ml pro Dosis. Die Kontrollgruppe bestand aus 5 Mäusen, denen ein adäquates Volumen an Verdünnungsmittel, steriler PBS-Puffer (hauseigener Standard) mit 2 g/l Gelatine (Serva, Deutschland), verabreicht wurde. Nach fünf Tagen erhielt jede Maus intraperitoneal die Belastung mit 2 mg Histamin-Base (Sigma, Deutschland) in PBS-Puffer pro Maus, als 0,5 ml Dosis. Das Überleben der Mäuse wurde nach 24 h dokumentiert.

2.1.10 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde mit der Unterstützung des Biostatistikers Kay-Martin Hanschmann, Paul-Ehrlich-Insitut, vorgenommen. Die Analyse der Daten wurde mit einem gemischten linearen Modell der wiederholten Messungen (Spender) mit fester Faktorbehandlung durchgeführt. Für den paarweisen Vergleich zwischen den Gruppen

wurden die P-Werte mit der Methode von Bonferroni angepasst. Hierbei wurde die Software SAS®/STAT, Version 9.2, SAS System für Windows verwendet.

2.2 Gekoppelter photometrischer Nachweis von PTx

PTx bzw. die A-UE (List Biological Laboratories, England) wurde mit NAD^+ (Sigma, Deutschland) im entsprechenden PTx-NAD-Puffer (siehe unten) bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) inkubiert (siehe Tabelle 4). Nach 1,5 h, 3 h und 24 h wurden Proben entnommen, um den NAD-Gehalt über den gekoppelten Lactatdehydrogenase(LDH)-Test zu messen (siehe Tabelle 5).

Tab. 4: Inkubation von PTx mit NAD^+ (1. Schritt)

PTx (A-UE): $\text{NAD}^+ \longrightarrow$ ADP-Ribose + Nicotinamid		
Testzusammensetzung	Testkonzentration	Volumina
PTx (A-UE) in PTx-NAD-Puffer	5 µg/ml	1 Teil
NAD^+ in PTx-NAD-Puffer	2 mM	1 Teil

Inkubation bis zu 24 h bei 37 °C, pH 8

PTx-NAD-Puffer (Testkonzentration):

50 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck, Deutschland)

0,1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Serva, Deutschland)

0,03 % CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat, Sigma, Deutschland)

pH 8

Im nächsten Schritt wurde die gekoppelte LDH-Reaktion mit der PTx-NAD⁺-Probe (siehe Tabelle 5) gestartet, um die Aktivität der toxischen Untereinheit S1 (A-UE) des PTx über den Verbrauch von NAD^+ zu ermitteln. Die LDH (L-LDH aus Kaninchenmuskel, Roche, Deutschland) lag zur Stabilisierung in Ammoniumsulfat gefällt vor und wurde vor jedem Versuch vom Stabilisator befreit. Hierfür wurde das zuvor für die gewünschten Einheiten an Enzym berechnete Volumen entnommen und für 10 Minuten bei 4 °C und 9.660 x g (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet im entsprechenden Volumen Glycin-Hydrazin-Puffer aufgenommen, so dass man eine Testkonzentration von 3,6 U/ml LDH erhielt. Der Glycin-Hydrazin-Puffer (Glycin und Hydrazin jeweils Sigma, Deutschland) wurde zuvor mit 2,5 M NaOH (Merck, Deutschland) auf pH 9,5 eingestellt. Sämtliche Testkomponenten wurden zusammengebracht und im Photometer (Ultrospec 4000, Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Deutschland) bei 340 nm als Vorlauf gemes-

sen. Nach 5 Minuten Vorlauf wurde die PTx-Probe (siehe Tabelle 5) hinzugefügt und 10 Minuten im Hauptlauf gemessen. Als Negativkontrolle und Referenz wurde NAD^+ in Aktivierungspuffer ohne PTx mitgeführt.

Tab. 5: Gekoppelte LDH-Reaktion (2. Schritt)

LDH: Lactat + NAD^+ \longrightarrow Pyruvat + NADH + H^+		
Testzusammensetzung	Testkonzentration	Einsatzmenge
Glycin/Hydrazin, pH 9,5		200 μl
Glycin	400 mM	
Hydrazin	160 mM	
EDTA	5 mM	40 μl
Lactat	1 mM	20 μl
LDH	3,6 U/ml	20 μl
H_2O		ad 180 μl
Vorlauf 5 Minuten		
„Starter“ (PTx-Probe mit NAD^+ , siehe Tabelle 4)	$\text{NAD}^+ \leq 2 \text{ mM}$	300 μl
Hauptlauf 10 Minuten		

2.3 Fluorometrischer Nachweis von aktivem PTx mittels etheno-NAD

Die entsprechend aufbereiteten Proben (siehe 2.3.2) wurden, wenn nicht anders angegeben, mit jeweils 0,13 mM etheno-NAD (Nicotinamid-1, N^6 -Ethenoadenin-Dinukleotid, Sigma, Deutschland) im Brutschrank bei 37 °C mit 95 % Luftfeuchtigkeit in einer schwarzen 96-Well-Fluoreszenzplatte (Nunc, Deutschland) inkubiert. Das verwendete Arbeitsvolumen in einer Kavität der Platte betrug 100 μl und setzte sich wie folgt zusammen:

50 μl Probe

50 μl etheno-NAD (Testkonzentration: i. d. R. 0,13 mM)

Während der Inkubation wurden insgesamt drei Endpunktmessungen (0 h, 24 h und 48 h) im Fluorometer (Safire², Tecan, Deutschland) vorgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 310 nm und die Emissionswellenlänge 410 nm. Um das Grundfluoreszenzsignal von etheno-NAD als Referenzsignal zu erhalten, wurde der entsprechende

Aktivierungspuffer (siehe 2.3.2) mit Aqua dest. als Negativkontrolle verwendet und mit etheno-NAD wie beschrieben inkubiert.

2.3.1 Aufbereitung von etheno-NAD

Zur Lagerung wurde etheno-NAD in Aqua dest. zur Herstellung der entsprechend gewünschten Stammkonzentration (z. B. 2 mM) gelöst, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20° C bis zur Verwendung verwahrt. Die Stammlösung besaß einen pH-Wert von ~5,5.

Für den Testeinsatz wurden die entsprechend benötigten etheno-NAD-Aliquots bei Raumtemperatur aufgetaut und der pH-Wert mit 4 M KHCO₃ (Kaliumhydrogen-Carbonat, Merck, Deutschland) von pH ~5,5 auf pH 8 gebracht. Anschließend wurde mit Aqua dest. die zweifach-konzentrierte Testkonzentration eingestellt.

2.3.2 Vorbereitung der PTx-, PTg- und Pertussis-Impfstoffproben

Vor der Inkubation mit etheno-NAD wurden PTx (EDQM, Frankreich) und PTg (Chiron Vaccines, Italien) mittels Aktivierungspuffer 1 oder 2 (siehe unten) für 10 Minuten bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) inkubiert [65, 103]. Vor dem Zusammenbringen von Probe und Aktivierungspuffer im Verhältnis 1:1, wurde der Proteingehalt der Proben mit Aqua dest. so eingestellt, dass die finale Konzentration von PTx im Testansatz 25 µg/ml bis 3,13 µg/ml betrug und die von PTg als Negativkontrolle 27,5 µg/ml.

Im Fluoreszenz-Test wurden zudem vier polyvalente Impfstoffe (siehe Tabelle 6) getestet, die alle eine azelluläre Pertussis-Komponente enthalten. Die Impfstoffe wurden wie oben beschrieben vor ihrem Einsatz im Test aktiviert, indem sie im Verhältnis 1:1 mit Aktivierungspuffer 1 für 10 Minuten bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) inkubiert wurden. Die Impfstoffkonzentrationen wurden ebenfalls mit Aqua dest. eingestellt.

Aktivierungspuffer 1 (Aktivierungskonzentration):

100 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck, Deutschland)

100 mM NaCl (Natriumchlorid, Merck, Deutschland)

20 mM DTT (Dithiothreitol, Serva, Deutschland)

2 % CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat, Sigma, Deutschland)

1 mM ATP (Adenosin-5'-triphosphat, Sigma, Deutschland)

pH 8

Aktivierungspuffer 2 (Aktivierungskonzentration):

50 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure)

1 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin, Sigma, Deutschland)

20 mM DTT (Dithiothreitol, Serva, Deutschland)

0,05 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Fluka, Deutschland)

pH 8

Tab. 6: Im Fluoreszenz-Test eingesetzte Impfstoffe verschiedener Hersteller

Impfstoff	Komponenten	Testkonzentration PTd [$\mu\text{g/ml}$]
1	Pa	11,7; 5,58; 2,93
2	DTPa-IPV-Hib	12,5; 6,25; 3,13
3	DTPa-HBV-IPV-Hib	12,5; 6,25; 3,13
4	DTPa-HBV-IPV-Hib	12,5; 6,25; 3,13

D: Diphtherie; T: Tetanus; Pa: Pertussis (azelluläre Komponente); HBV: Hepatitis-B (rDNA); IPV: Poliomyelitis (inaktiviert); Hib: *Haemophilus influenzae* Typ b

2.3.3 Mögliche Störfaktoren für den Fluoreszenz-Test

2.3.3.1 Der pH-Wert der Pufferlösung

Die vierfachkonzentrierte Stammlösung (Bestandteile und spätere Testkonzentration siehe unten) wurde mit 2,5 M NaOH (Fluka, Deutschland) auf den jeweiligen pH-Wert pH 8, pH 9, pH 10 und pH 12 mit Hilfe des pH-Meters (Knick, Deutschland) eingestellt.

Ethno-NAD wurde wie unter 2.3.1 beschrieben aufbereitet und in einer linearen Verdünnungsreihe mit Aqua dest. die gewünschten Konzentrationen so eingestellt, dass sie später im Testansatz 0,125 mM, 0,063 mM, 0,031 mM, 0,016 mM und 0,008 mM betragen.

Im Testansatz wurden die unterschiedlichen Pufferlösungen mit den jeweiligen ethno-NAD-Konzentrationen 1:1 versetzt.

Pufferlösung (Testkonzentration):

50 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck, Deutschland)

50 mM NaCl (Natriumchlorid, Merck, Deutschland)

10 mM DTT (Dithiothreitol, Serva, Deutschland)

0,5 mM ATP (Adenosin-5'-triphosphat, Sigma, Deutschland)

pH-Wert variierend (siehe oben)

2.3.3.2 Aluminiumhydroxid

Aluminiumhydroxid $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Sigma, Deutschland) wurde in PBS (Hausstandard) vorverdünnt und anschließend 1:1 mit Aktivierungspuffer 1 (siehe 2.3.2) versetzt. Die finale Konzentration $\text{Al}(\text{OH})_3$ betrug 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,063 mg/ml, 0,031 mg/ml und 0,016 mg/ml.

2.3.3.3 $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Interferenzen und Einfluss der Ionenstärke

$\text{Al}(\text{OH})_3$ (Sigma, Deutschland) wurde in PBS vorverdünnt und anschließend 1:1 mit Aktivierungspuffer 1 (siehe 2.3.2) versetzt. Etheno-NAD wurde wie unter 2.3.1 beschrieben aufgetaut und vorverdünnt. Vor dem Zusammenfügen der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Probe und des etheno-NAD im Well für die Inkubation, wurde das etheno-NAD nochmals 1:1 vorverdünnt, indem es mit fünf verschiedenen NaCl-Konzentrationen versetzt wurde. Hiernach erfolgte die Zusammenführung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Probe und etheno-NAD mit der jeweiligen Salzkonzentration. Die Testkonzentration des $\text{Al}(\text{OH})_3$ betrug 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,063 mg/ml, 0,031 mg/ml und 0,016 mg/ml, die des NaCl 2 M, 1 M, 0,5 M und 0,25 M und des etheno-NAD 0,13 mM. Die Inkubation und Messung erfolgte wie unter 2.3 beschrieben.

2.3.3.4 $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbiert an Albumin

Die Adsorption von Albumin an $\text{Al}(\text{OH})_3$ erfolgte nach einem bei der industriellen Impfstoffherstellung üblichen Protokoll.

Der erste Schritt beinhaltete die Adsorption von Humanalbumin (Human-Albumin 200, 20 %, Pharma Dessau, Deutschland) an $\text{Al}(\text{OH})_3$. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen an $\text{Al}(\text{OH})_3$ in PBS vorverdünnt sowie verschiedene Konzentrationen an Humanalbumin in Aqua dest. vorbereitet. Sämtliche Kombinationen an unterschiedlichen Albumin- und $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Konzentrationen wurden nun 1:1 zusammengefügt und unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (RT) über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde jeder Ansatz mit NaCl versetzt, so dass eine physiologische Salzkonzentration von 160 mM NaCl vorlag, und für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Im zweiten Versuchsteil erfolgte die übliche Durchführung des Fluoreszenz-Tests. Jede Probe wurde 1:1 mit Aktivierungspuffer 1 (siehe 2.3.2) versetzt. Abschließend wurden die jeweiligen $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Albumin-Proben mit etheno-NAD im Well 1:1 zusammengeführt und nach Protokoll inkubiert und gemessen.

Insgesamt wurden neun verschiedene Albuminkonzentrationen (Testkonzentrationen: 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,332, 0,16, 0,08, 0,04, 0,02 und 0 mg/ml) an fünf verschiedene $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Konzentrationen (Testkonzentrationen: 0,5, 0,25, 0,13, 0,06, 0,03 und 0 mg/ml) adsorbiert und im Fluoreszenz-Test mit 0,13 mM etheno-NAD inkubiert.

2.4 Luminometrischer Nachweis von aktivem PTx im Zelltest

Die Entwicklung des Zelltests (Pertussis-ATP-Test, PAT) beinhaltete neben der methodischen Ausarbeitung des PAT auch begleitende und vorbereitende Kontrollen, um

die Eignung und Vitalität der Indikatorzellen zu kontrollieren. Die Zellen wurden, neben dem eigentlichen Einsatz im PAT und der luminometrischen Messung ihres ATP-Spiegels, auch mittels Durchflusszytometer und Hämatometer immunchemisch und hämatologisch analysiert. Zudem wurde im Durchflusszytometer die Anzahl lebender und toter Zellen in den Proben bestimmt.

Die Isolation und alle weiteren Schritte der Zellverarbeitung erfolgten unter der Sterilbank. Alle verwendeten Materialien und Gefäße waren steril und ATP-frei.

2.4.1 Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen

Frisches humanes Vollblut wurde von gesunden freiwilligen Spendern mit Hilfe spezieller, eigens für die Isolation von PBMCs vorgesehener, heparinierter Blutentnahmeröhrchen (Vacutainer CPT, Becton Dickinson, Deutschland) entnommen. Das frisch entnommene Vollblut wurde über Dichtegradienten-Zentrifugation bei 1700 x g, für 25 Minuten bei 21 °C (Megafuge, Heraeus, Deutschland), mit Hilfe eines sich im Röhrchen befindlichen Polysaccharid-Gelbettes, in seine verschiedenen Zellpopulationen aufgeteilt. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, befinden sich die verschiedenen Zelltypen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte, in definierten Schichten des Zentrifugenröhrchens. Nach dem Entfernen des Plasmas wurde die PBMC-Schicht vorsichtig Röhrchen für Röhrchen entnommen und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Deutschland) überführt. Bei diesem Schritt konnten die PBMCs verschiedenster Spender direkt vereinigt (gepoolt) werden. Es folgten bis zu drei Waschschriffe mit PBS (Hausstandard), bei denen die Zellen jeweils bei 300 x g für 15 Minuten (1. Waschschriff) und 10 Minuten (2. und 3. Waschschriff) bei 21 °C abzentrifugiert wurden. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Zellpellet, nach Entfernen des Überstandes, mit RPMI 1640 Zellkulturmedium (Cambrex, Deutschland) im gewünschten Volumen aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte im hämatologischen Zellzählgerät (Cell-Dyn 3500 SL, Abbott, Deutschland). Entweder wurde der frisch isolierte PBMC-Pool unmittelbar im PAT oder Vitalitätstest eingesetzt oder die Zellen wurden kryokonserviert (siehe 2.4.1.1). Für eine immunchemische Charakterisierung der Zellen im Durchflusszytometer, wurde das Zellpellet in PBS-Puffer aufgenommen.

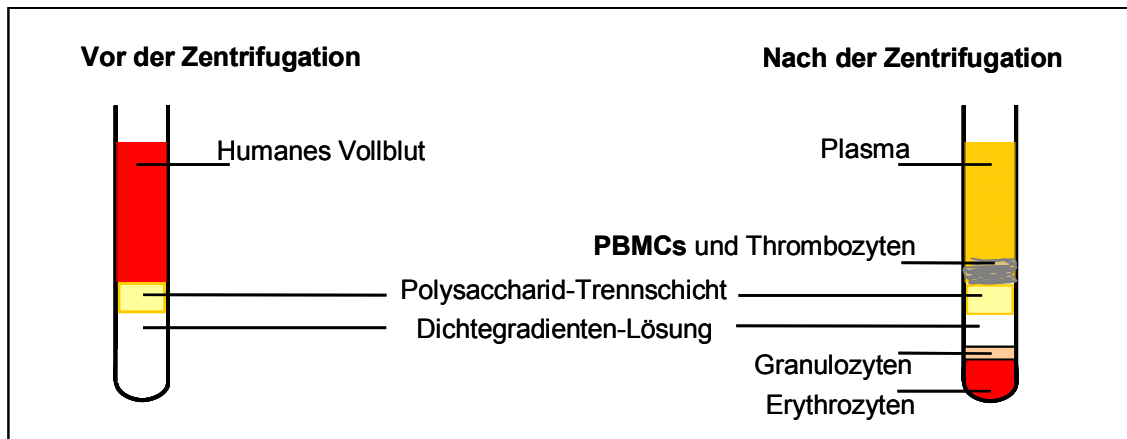


Abb. 9: Schematische Darstellung der Aufreinigung humaner PBMCs mittels Dichtegradienten-Zentrifugation zur Herstellung einer primären Zellkultur.

2.4.1.1 Kryokonservierung und Auftauprotokoll humaner PBMCs

Der unter 2.4.1 frisch isolierte PBMC-Pool wurde für die Kryokonservierung auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und mit Einfriermedium (siehe unten) versetzt. Der PBMC-Pool (Zellzahl i. d. R. 4×10^6 Zellen/ml) wurde anschließend ruhen gelassen. Für das Ausarbeiten des Standardprotokolls wurden zunächst drei verschiedene DMSO-Einwirkzeiten 5 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten getestet. Nach dem jeweiligen Einwirken wurden die Zellen in sterile Kryo-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland) zu jeweils 1,2 ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Zum Ausarbeiten des optimalen Einfrier- und Auftauprotokolls wurden in Vorversuchen die unterschiedlich behandelten Kryo-PBMCs (DMSO-Einwirkzeit: 5 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten) auf zwei verschiedene Arten aufgetaut. (A) Im Wärmeschrank bei 37°C für 10 Minuten 30 Sekunden; (B) Im Wasserbad bei 37°C für 2 Minuten. Bei beiden Varianten wurden die Aliquots direkt nach Ablauf der Auftauzeit mindestens drei Mal invertiert und hierbei kontrolliert, ob sich die Röhrchen nach wie vor kühl anfühlten und somit die Auftauzeit und Temperatur korrekt verlaufen war. Anschließend wurden die Kryo-PBMCs so schnell wie möglich (d. h. wenige Minuten nach dem Auftauen) verdünnt und das DMSO herausgewaschen. Zum Verdünnen wurden die Kryo-PBMCs in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (steril, Greiner, Deutschland), in die das entsprechende Volumen RPMI 1640 Medium (Cambrex, Deutschland) vorgelegt worden war, überführt. Maximal wurden vier Aliquots in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gebracht, so dass daraus ein Endvolumen von 50 ml Kryo-PBMCs in Zellkulturmedium resultierte. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei $300 \times g$ und 21°C zentrifugiert (Megafuge, Heraeus, Deutschland), der Überstand verworfen und das Zellpellet in der entsprechenden Menge RPMI 1640 Zellkulturmedium (Cambrex, Deutschland) aufgenommen. Die Zellzahl wurde im Zellmessgerät (Cell-Dyn 3500 SL, Abbott, Deutschland) bestimmt und die Zellzahl entsprechend den Versuchsbedingungen des PAT oder Vitalitätstest mit Zell-

kulturmedium eingestellt. Für die immunchemische Charakterisierung im Durchflusszytometer wurde das Zellpellet in PBS-Puffer aufgenommen.

Als Standardprotokoll wurde nach den Vorversuchen die Kombination 30 Minuten DMSO-Einwirkzeit vor dem Einfrieren und das Auftauen (10 Minuten 30 Sekunden) im Wärmeschrank ausgewählt (siehe 3.6.4.2, Abbildung 43).

Einfriermedium (Endkonzentration):

10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, zellkulturzertifiziert, Sigma, Deutschland) in autologem Plasma (der beteiligten Spender).

2.4.2 Kultivierung der permanenten T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat

Die permanente T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat (ATCC-TIB-152, LGC Standards, Deutschland) wurde im Zellkulturmedium RPMI (Biochrom, Deutschland), versetzt mit 1 mM Natrium-Pyruvat (Biochrom, Deutschland) und 10 % FCS (fötale Kälberserum, Sigma, Deutschland), im Brutschrank (Thermo Scientific, Deutschland) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Nach einer Passage betrug die Zellzahl circa 2 x 10⁵ Zellen/ml, die in einer 75 cm² großen Zellkulturflasche (Greiner, Deutschland) zu je 30 ml kultiviert wurden. Der Rhythmus des Passagierens der Zellen sowie der Medienwechsel sah wie folgt aus: 72 h nach der letzten Passage wurde ein Medienwechsel durchgeführt, der nächste erfolgte nach weiteren 48 h, d. h. 120 h nach der letzten Passage. Nach weiteren 48 h (bzw. 168 h nach der letzten Passage) erfolgte ein erneutes Passagieren der Zellen, so dass die auf circa 2,5 x 10⁶ Zellen/ml angewachsene Zellzahl wieder auf 2 x 10⁵ Zellen/ml reduziert wurde. Bei jedem Medienwechsel oder Passagieren wurde die Zellzahl im Zellzählgerät (Cell-Dyn 3500 SL, Abbott, Deutschland) oder mikroskopisch in einer Neubauer-Zellzählkammer (Brand, Deutschland) gezählt. Für den Medienwechsel wurden die Suspensionszellen in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Deutschland) überführt und bei 300 x g (Megafuge, Heraeus, Deutschland) für 10 Minuten bei 21 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet in 30 ml frischem, mit Na-Pyruvat und FCS versetzten Zellkulturmedium (Biochrom, Deutschland) resuspendiert, in eine neue Zellkulturflasche (75 cm²) überführt und aufrecht in den Brutschrank zurückgestellt. Für den Einsatz im PAT wurden die Zellen wie oben beschrieben abzentrifugiert und das Zellpellet anschließend in RPMI 1640 Medium (Cambrex, Deutschland) gelöst. Für die immunchemische Charakterisierung im Durchflusszytometer wurde das Zellpellet in PBS-Puffer aufgenommen.

2.4.2.1 Einfrieren der Jurkat-Zellen

Nach Bezug der Jurkat-Zellen von der ATTC wurden diese nach der ersten Kultivierung sowie vor der ersten Passage eingeforen. Hierzu wurden die Zellen nach dem Waschen, der Zellzählung und erneutem Abzentrifugieren in Einfriermedium (siehe unten) resuspendiert, so dass die Zellzahl zwischen 4 x 10⁶ bis 5 x 10⁶ Zellen/ml lag. Anschließend wurden sie zu je 1 ml in Kryo-Röhrchen (Nunc, Deutschland) aliquotiert,

für circa 2 h bei -80 °C eingefroren und danach bei -150 °C (Sanyo, Tiefkühltruhe, Deutschland) verwahrt.

Einfriermedium:

20 % FCS (fötale Kälberserum, Sigma, Deutschland), 5 % DMSO (Sigma, Deutschland) in RPMI 1640 (Biochrom, Deutschland).

2.4.2.2 Auftauen der Jurkat-Zellen

Ein Kryo-Röhrchen mit circa 4 bis 5 x 10⁶ Zellen/ml wurde nach dem Herausnehmen aus der -150 °C Umgebung direkt für 3 Minuten in Eiswasser gestellt. Danach folgte das Auftauen im Wasserbad bei 37 °C für 2 Minuten und das Überführen von 800 µl Zellsuspension in 9 ml Zellkulturmedium (Biochrom, Deutschland), versetzt mit Na-Pyruvat und FCS. Nach dem Waschschrift und anschließender Zentrifugation bei 125 x g und 21 °C für 6 Minuten, wurde das Zellpellet im entsprechenden Volumen aufgenommen, um eine Zellzahl von 2 x 10⁵ Zellen/ml zu erhalten. Die Zellen wurden nun wie unter 4.2.4 beschrieben kultiviert.

2.4.3 Charakterisierung der Zellen

2.4.3.1 Immunchemische Charakterisierung im Durchflusszytometer

Frisch isolierte PBMCs, Kryo-PBMCs und Jurkat-Zellen wurden wie beschrieben in PBS-Puffer aufgenommen und auf eine Zellzahl von 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Lyse-Lösung A (siehe unten) für die Erythrozytenlyse wurde stets frisch hergestellt, die Lyse-Lösung B (siehe unten) und PBS mit 1 % BSA (Sigma, Deutschland) wurden bei 4 °C bis zum Verfallsdatum verwahrt. Die Inkubation der Zellen mit Antikörper erfolgte nach dem Pipettierschema in Tabelle 7.

Der gegen den leukozyten-spezifischen Oberflächenmarker CD45 gerichtete AK war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) markiert. APC besitzt eine Absorption bei 650 nm und Emission bei 661 nm. Über die Fluoreszenzmarkierung aller Leukozyten konnte die Trennung von Zellen und Debris (u. a. Zelltrümmer) erfolgen. Mit Hilfe des monozyten-spezifischen anti-CD14 AK wurden die Leukozyten der PBMC-Proben in Lymphozyten und Monozyten aufgeteilt. Der anti-CD14 AK war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert, dessen Absorption bei 490 nm und Emission bei 525 nm liegt. Die Überprüfung und Identifizierung der vom Hersteller angegebenen Oberflächenmarker CD45 und CD3 der T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat erfolgte neben dem APC-markierten anti-CD45 AK mit einem Phycoerythrin (PE)-markierten anti-CD3 AK. Die Absorption dieses Fluoreszenzfarbstoffes liegt bei 490 und 565 nm, dessen Emission bei 578 nm.

Tab. 7: Durchführung und Pipettierschema zur Antikörperfärbung der Zellen mit anschließender Erythrozyten-Lyse

Schritt	Vol. für Ansätze mit AK gegen: CD14; CD3;	Vol. für Ansätze mit AK gegen: CD45	Vol. für Ansätze mit AK-Kombi.: CD3 + CD14 + CD45
1. PBS _{BSA} vorlegen	40 µl	47 µl	17 µl
2. AK hinzufügen	á 10 µl	3 µl	Σ 33 µl
3. Zellen hinzufügen	50 µl	50 µl	50 µl
Vorsichtig mischen und für 20 Minuten im Dunkeln inkubieren			
4. Lyse-Lsg. A zugeben	550 µl	550 µl	550 µl
10 Sekunden vortexen und ohne abzusetzen zu 5.			
5. Lyse-Lsg. B zugeben	250 µl	250 µl	250 µl
10 Sekunden vortexen			
5 Minuten bei 300 x g zentrifugieren			
Überstand verwerfen und Zellpellet aufnehmen in 6.			
6. FACS-Flow	300 µl	300 µl	300 µl
Messung im FACS-Gerät			

Sämtliche Schritte wurden in Durchflusszytometer-Röhrchen (Becton Dickinson, Deutschland) durchgeführt. Das Zellpellet wurde in FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Flow (Becton Dickinson, Deutschland) aufgenommen. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer (FACS-Gerät, Calibur, Becton Dickinson, Deutschland).

Lyse-Lösung A (0,1 % (v/v) Ameisensäure):

120 µl Ameisensäure (98 % (v/v), Merck, Deutschland) auf 100 ml Aqua dest.

Lyse-Lösung B (4 Wochen haltbar):

1,45 g NaCl (Merck, Deutschland)

0,6 g Na₂CO₃ (Natrium-Carbonat, Merck, Deutschland)

3,13 g Na₂SO₄ (Natrium-Sulfat, Merck, Deutschland)

in 100 ml Aqua dest.

2.4.3.2 Hämatologische Charakterisierung

Sämtliche Zellzählungen wurden im Zellzählgerät (Cell-Dyn 3500 SL, Abbott, Deutschland) durchgeführt. Neben der Ermittlung der Zellzahl ist dieses Gerät in der Lage, eine Vollblutprobe oder auch PBMC-Probe hämatologisch zu differenzieren. U. a. werden die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen, d. h. Granulozyten (Eosinophile, Basophile und Neutrophile), Lymphozyten und Monozyten, nach Komplexizität gegen relative Größe und Lobularität gegen Granularität charakterisiert.

2.4.3.3 Vitalitätstest der Zellen im Durchflusszytometer

Der Vitalitätstest wurde mit einem Viability-Kit (Becton Dickinson, Deutschland) für die Messung im Durchflusszytometer (FACS-Gerät; FACS-Calibur, Becton Dickinson, Deutschland) durchgeführt. Die im Zellkulturmedium RPMI 1640 (Cambrex, Deutschland) aufgenommenen PBMCs, Kryo-PBMCs und Jurkat-Zellen (siehe 2.4.1 und 2.4.2) wurden jeweils auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ oder 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen 1:10 in Färbepuffer (siehe unten) vorverdünnt. In die entsprechend benötigte Anzahl an Durchflusszytometer-Messröhrchen (Becton Dickinson, Deutschland) wurden je 4 μ l des Farbstoffes Thiazolorange und je 2 μ l Propidiumjodid (jeweils Bestandteile des Viability-Kits) vorgelegt. Thiazolorange färbt die lebenden Zellen, Propidiumjodid die toten Zellen. Danach wurden 2 ml der Zellverdünnung zugefügt und zum Schluss mit 50 μ l Counting-Beads (Kit-Bestandteil) versetzt. Die Proben wurden kurz gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgte direkt die Messung im Durchflusszytometer oder die Proben wurden bis zur Messung in Eiswasser gekühlt verwahrt.

Parallel zu jeder PBMC-Isolation wurde eine Vitalitätskontrolle der frisch isolierten und später der kryokonservierten Zellen mitgeführt.

Färbepuffer:

0,2 % Pluronic (Pluronic F-68 Solution 10 %, Sigma, Deutschland) in PBS (Hausstandard).

2.4.4 Der Pertussis-ATP-Test (PAT)

Der Pertussis-ATP-Test (PAT) besteht insgesamt aus drei Arbeitsschritten: der Vorbereitung der Indikatorzellen, der Inkubation und der Messung des somatischen ATP-Gehalts (siehe Abbildung 10).

Zuerst wurden die Zellen (frische PBMCs, Kryo-PBMCs oder Jurkat-Zellen) für den Test – wie unter 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben – vorbereitet. Danach folgte der Inkubationsschritt, bei dem die Zellen mit der Probe (Pertussis-Toxin, Impfstoff, potentieller Störfaktor, u. s. w.) im Zellkulturschrank (Thermo Scientific, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bis zu 24 h inkubiert wurden. In dieser Zeit wurde der ATP-Spiegel der Zellen nach 1 h, 5 h und 24 h Inkubation luminometrisch bestimmt (siehe Abbildung 10).

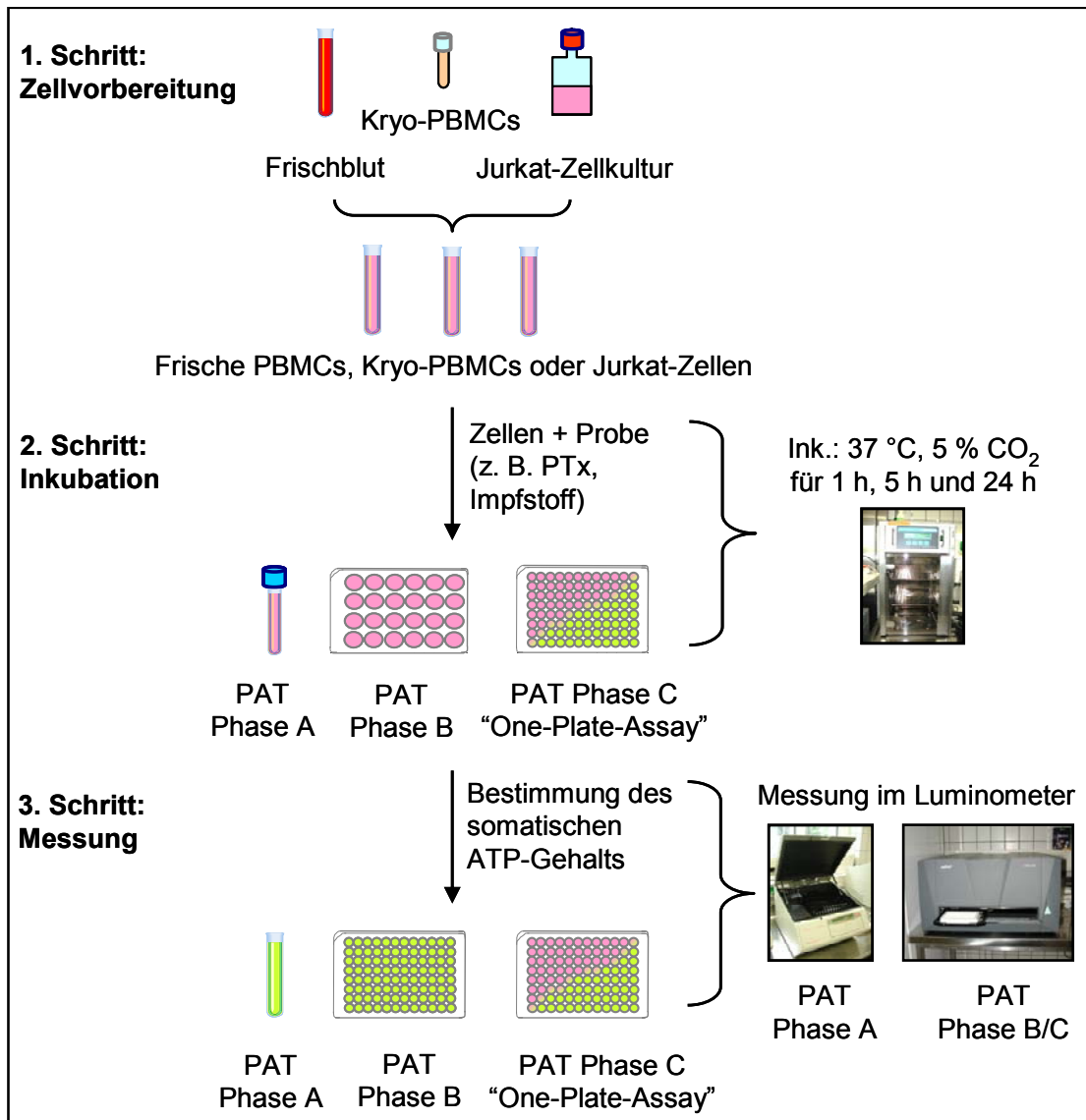


Abb. 10: Übersichtsschema zur Durchführung des PAT.

Während der Entwicklung des PAT durchlief dieser mehrere Phasen, die schließlich in eine Phase A, Phase B und Phase C unterteilt werden konnten und unter 2.4.4.6 beschrieben werden. Im Folgenden sind zunächst sämtliche verwendete Reagenzien aufgelistet.

2.4.4.1 Im PAT eingesetzte Pertussis-Toxine und Impfstoffe

Sämtliche im PAT verwendete Pertussis-Toxine (siehe Tabelle 8) wurden als Lyophilisate gekauft und in Acila-H₂O (Pyroquant, Deutschland) gelöst. Mit steriler Saline (150 mM NaCl, Fresenius Kabi, Deutschland) wurden die gewünschten Testkonzentrationen (21,6 µg/ml bis 0,005 µg/ml) eingestellt. Die Pertussis-Toxine mussten für den PAT nicht aktiviert werden. Das PTx wurde für einen Versuch mittels Hitze inaktiviert (PTx_{hitzeinakt.}). Hierfür wurde ein Teil der PTx-Probe bei 95 °C für 5 Minuten im Heizblock

(Thermomixer, Eppendorf, Deutschland) unter ständiger Bewegung inkubiert. Zudem wurde LPS-abgereichertes PTx (siehe 2.1.5) getestet.

Tab. 8: Im PAT getestete Pertussis-Toxine

Toxin	Herkunft	Verwendet in
PTx	Biologische Referenzpräparation (BRP), EDQM, Frankreich	Phase A/B/C
PTx _{hitzeinakt.}	BRP, EDQM, Frankreich	Phase A
PTx LPS-abgereichert	BRP, EDQM, Frankreich	Phase A
PTx 2	JNIH-5, WHO Internationales Standard- <i>Bordetella-pertussis</i> -Toxin, NIBSC, Großbritannien	
PTx 3	90/518, Pertussis Toxin, NIBSC, Großbritannien	
PTx 4	List Biological Laboratories; Quadrtech Diagnostics, Großbritannien	Phase C
PTx 5	Pertussis-Toxin salzfrei; List Biological Laboratories; Quadrtech Diagnostics, Großbritannien	
PTx 6	Biomol, Deutschland	
PTx 7	Sigma, Deutschland	

Der im PAT verwendete Impfstoff wurde unverdünnt und ohne weitere Vorbehandlung im Test eingesetzt (siehe Tabelle 9). Durch die anderen Testkomponenten wurde der Impfstoff im Testansatz schließlich 1:5 verdünnt (siehe 2.4.4.6). Zudem wurde jeder Impfstoff-Versuchsansatz mit PTx gespiket. Als Negativkontrolle wurde sterile, klinische Saline verwendet. Das PTx wurde für den Versuch wie beschrieben in Aqua dest. gelöst und mit klinischer Saline auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Es wurde hierfür eine Verdünnungsreihe in Fünfer-Schritten (78 ng/ml bis 5 ng/ml) angesetzt. Diese PTx-Spikes (78, 20 und 5 ng/ml) wurden, wie der Impfstoff, nochmals im Testsystem 1:5 verdünnt.

Tab. 9: Im PAT Phase B eingesetzter Impfstoff

Impfstoff	Komponenten	Konzentration PTd [$\mu\text{g/ml}$] unverdünnt
5	DTPa-IPV	5

D: Diphtherie; T: Tetanus; Pa: Pertussis (azelluläre Komponente); IPV: Poliomyelitis (inaktiviert)

2.4.4.2 Luminometrische Messung

Der ATP-Gehalt der Indikatorzellen wurde mit einem Lumineszenz-Kit (Promega, Deutschland) gemessen, das ursprünglich die Bestimmung der Vitalität eukaryotischer Zellen über deren ATP-Spiegel vorsieht. In dem Kit wird rekombinant hergestellte Luziferase verwendet. Die Halbwertszeit des generierten Lumineszenzsignals beträgt mehr als fünf Stunden, was automatisierte Injektoren überflüssig macht. In einem einzigen Schritt, durch die 1:1 Zugabe des CellTiter-Glo-Assay-Puffers zu der Probe, werden (A) die Zellen lysiert, (B) das somatische ATP von der Luziferase umgesetzt und (C) durch die Lyse freigesetzte ATPasen gehemmt.

Die Proben (Zellansätze mit PTx, Impfstoff und potentiellen Störfaktoren oder ATP-Standard ohne Zellen) wurden jeweils mit identischen Volumina (1:1) Luziferin-Testpuffer versetzt und für eine vollständige Lyse der Zellen für 2 Minuten geschüttelt (Phase A: Thermomixer, Eppendorf, Deutschland; Phase B/C: Plattenschüttler, Heidolph Instruments, Deutschland). Anschließend wurden die Proben zur Stabilisierung des Signals weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Messung der Lumineszenzsignale erfolgte während der Phase A im Luminometer, AutoLumat LB 953 (EG & G Berthold, Deutschland), später während der Phase B/C in der Lumineszenzeinheit des Multifunktionsgerätes Safire² (Tecan, Deutschland). Das Spektrum des emittierten Lichtes zeigt um die 560 nm einen Peak; die Integrationszeit betrug immer 1 Sekunden. Das AutoLumat LB 953-Gerät konnte nicht temperiert werden, die Lumineszenzeinheit des Safire² wurde standardmäßig auf eine Temperatur von 28 °C eingestellt. Während der Phase A wurde die Messung in Polystyrol-Reagenzröhrchen (Carl Roth, Deutschland) durchgeführt. Um die Röhrchen von eventuell anhaftendem ATP zu befreien, wurden diese mit 1 N HCl (37 % HCl, Merck, Deutschland) gefüllt. Nach Übernachtinkubation wurden die Gefäße 5x mit Aqua dest. gespült, anschließend mit Alufolie abgedeckt und bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Während der Phase B/C wurden weiße, sterile und ATP-freie 96-Well-Lumineszenz-Platten (z. B. Falcon, Deutschland oder Nunc, Deutschland) verwendet.

2.4.4.3 Negativkontrolle und ATP-Standard

Um den eigentlichen ATP-Gehalt der Zellen ohne den Einfluss von PTx zu erhalten, wurden diese mit steriler Saline (150 mM NaCl, Fresenius Kabi, Deutschland) als Negativkontrolle inkubiert.

Bei jedem Versuch wurde ein ATP-Standard zur Kontrolle der Luziferin/Luziferase-Reaktion mitgeführt. Die entsprechende Menge ATP (Sigma, Deutschland) wurde abgewogen und mit RPMI 1640 Medium (Cambrex, Deutschland) in einem sterilen Zentrifugenröhrchen (Greiner, Deutschland) aufgenommen. In der Regel wurden Konzentrationen von 500 mM, 250 mM und 125 mM ATP eingesetzt.

2.4.4.4 Entfernung von freiem ATP mittels ATPase

Für die Entfernung von freiem ATP wurde ATPase (Sigma, Deutschland) verwendet. Das Lyophilisat wurde in Aqua dest. gelöst und die ATPase wurde mit einer finalen Konzentration von 0,05 U/ml eingesetzt. Die Testbedingungen wurden nicht eigens auf die ATPase zugeschnitten, sprich Na^+ -, K^+ - und Mg^{2+} -Konzentrationen extra angepasst, nachdem sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass die Supplemente des Zellkulturmediums RPMI 1640 (Cambrex, Deutschland) ausreichen. Somit konnten die Testbedingungen unverändert für den PAT beibehalten werden.

2.4.4.5 Die potentiellen Störfaktoren LPS und $\text{Al}(\text{OH})_3$

Zur Überprüfung des potentiellen Störfaktors LPS wurde *B. pertussis*-LPS (89/670; *B. pertussis* (W28) LPS, NIBSC, Großbritannien) verwendet. Das Lyophilisat wurde in Acila- H_2O (Pyroquant, Deutschland) gelöst und mit einer Stammkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu je 30 μl in Verdünnungsröhrchen (Borosilikatglas, VWR, Deutschland) aliquotiert und bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ verwahrt. Die Verdünnungsröhrchen waren zuvor für 2 Stunden bei $250\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt worden, um anhaftendes LPS zu inaktivieren. Für den Versuchstag wurde die entsprechend benötigte Menge an Röhrchen aufgetaut und für 5 Minuten auf dem Vortexer (z. B. Junke & Kunkel, IKA Labortechnik, Deutschland) bei maximaler Stufe geschüttelt. Im Anschluss wurden die gewünschten Konzentrationen (10 ng/ml, 1 ng/ml und 0,1 ng/ml) Acila- H_2O (Pyroquant, Deutschland) eingestellt.

Aluminiumhydroxid (Sigma, Deutschland) wurde in sterilem PBS-Puffer (Hausstandard) gelöst und für den Versuch in Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.4.4.6 Pipettierschemata der Phasen A/B/C des PAT

Die Entwicklung des PAT durchlief mehrere Abschnitte, die in die Phasen A, B und C unterteilt werden. Im Folgenden sind die Pipettierschemata aufgelistet.

Die Inkubation erfolgte in der Entwicklungsphase A in sterilen Zentrifugenröhrchen (Greiner, Deutschland). Für die Messung wurden die Proben in ATP-freie Messröhrchen (siehe 2.4.4.2) überführt und im Luminometer (AutoLumat LB 953, EG & G Berthold, Deutschland) der ATP-Gehalt bestimmt. Die verwendeten Volumina sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Pipettierschema des PAT Phase A

Phase A	Inkubation (Zentrifugenröhrchen)
Frische PBMCs	1250 µl
Probe (PTx, PTx _{hitzeinakt.} , LPS-abgereichertes PTx, LPS, Al(OH) ₃ , Saline)	250 µl
ATPase oder Saline	10 µl
Gesamtvolumen	1510 µl
Messung (Messröhrchen)	
Ansatz Inkubation	200 µl
Luziferin-Testpuffer	200 µl
Gesamtvolumen	400 µl

In der Phase B wurde die Inkubation der Indikatorzellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Corning, Deutschland) durchgeführt. Die Messung erfolgte in weißen 96-Well-Lumineszenz-Zellkulturplatten (Becton Dickinson oder Nunc, Deutschland) in der Luminometereinheit des Safire² (Tecan, Deutschland). Die für die Etablierung der Inkubation in der 24-Well-Zellkulturplatte verwendeten Volumina sind in Tabelle 11 zu sehen.

Tab. 11: Etablierung der 24-Well-Platten-Inkubation mit frischen PBMCs sowie Überprüfung der Jurkat-Zellen auf Eignung als Indikatorzellen des PAT-Phase B

Phase B	Inkubation (24-Well-Platte)
Frische PBMCs, Jurkat-Zellen	650 µl
PTx oder Saline	130 µl
Gesamtvolumen	780 µl
Messung (96-Well-Platte)	
Ansatz Inkubation	100 µl
Luziferin-Testpuffer	100 µl
Gesamtvolumen	200 µl

Die Ausarbeitung der Kryokonservierungs- und Auftauprotokolle zur Kryo-PBMC-Herstellung wurde mit den in Tabelle 12 aufgelisteten Volumina durchgeführt.

Tab. 12: Pipettierschema PAT-Phase B mit Kryo-PBMCs

Phase B	Inkubation (24-Well-Platte)
Kryo-PBMCs	1000 μ l
PTx oder Saline	200 μ l
Gesamtvolumen	1200 μ l
Messung (96-Well-Platte)	
Ansatz Inkubation	100 μ l
Luziferin-Testpuffer	100 μ l
Gesamtvolumen	200 μ l

Sämtliche weitere Testungen von Pertussis-Toxinen und azellulärem Pertussis-Impfstoff wurden standardmäßig mit folgenden Volumina durchgeführt (siehe Tabelle 13).

Tab. 13: Volumina der Standardtestungen des PAT-Phase B

Phase B	Inkubation (24-Well-Platte)
Frische PBMCs, Kryo-PBMCs	600 μ l
RPMI 1640 (variabel)	120 μ l
PTx oder Saline	240 μ l
Pertussis-Impfstoff	240 μ l
Gesamtvolumen	1200 μ l
Messung (96-Well-Platte)	
Ansatz Inkubation	100 μ l
Luziferin-Testpuffer	100 μ l
Gesamtvolumen	200 μ l

Während der Phase C wurden Inkubation und Messung in ein und derselben Platte (weiße 96-Well-Zellkulturplatte, Nunc oder Becton Dickinson, Deutschland) vollzogen. Die Messung erfolgte in der Luminometereinheit des Safire² (Tecan, Deutschland). Das Pipettierschema zum PAT Phase C ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 14: Pipettierschema des PAT-Phase C

Phase C	Inkubation/Messung (96-Well-Platte)
Frische PBMCs	50 µl
RPMI 1640	35 µl
Pertussis-Toxin oder Saline	17
Gesamtvolumen	102 µl
Messung: + Luziferin-Testpuffer	102 µl
Gesamtvolumen	204 µl

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung des Monozyten-Aktivierungs-Tests als Instrument zum Nachweis von aktivem PTx

Neben der eigentlichen Zielstellung der Entwicklung eines alternativen Testsystems zum Nachweis von aktivem PTx in Pertussis-Adsorbat-Impfstoffen standen zunächst die in der Literatur kontrovers beschriebenen Auswirkungen von PTx auf Zellen des Immunsystems im Vordergrund. Wie in der Einleitung unter 1.7 beschrieben, befand sich vor allem die Frage im Mittelpunkt, ob PTx in der Lage ist, humane Monozyten zu aktivieren, da mit Hilfe dieser Aktivierung ein Pertussis-Monozyten-Aktivierungstest zum Nachweis von aktivem PTx aufgebaut werden sollte. Vor der Erforschung der PTx-Aktivierungs-Kernfrage mussten im Vorfeld Versuche durchgeführt werden, um grundlegende Bedingungen zum Aufbau einer geeigneten Testmatrix und die Messung des Störfaktors LPS zu ermöglichen. Gegebenenfalls mussten Strategien erarbeitet werden, um diesen Störfaktor zu eliminieren/inhibieren. In Abbildung 11 ist ein Fließschema zu den durchgeführten Vorarbeiten (LPS-Kontamination der PTx-Präparationen und dessen erfolgreiche Abreicherung sowie Inhibierung) dargestellt.

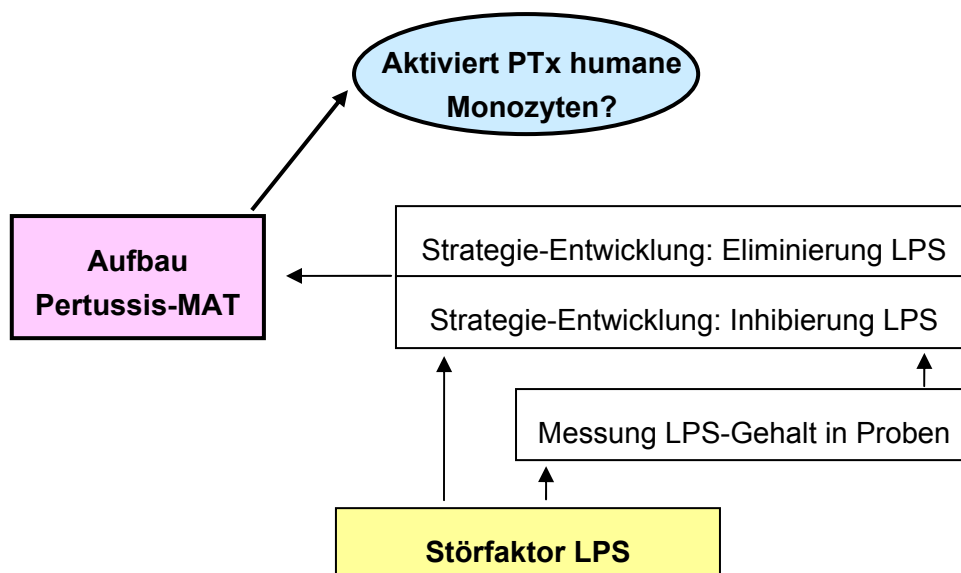


Abb. 11: Fließschema der Vorversuche, um auf die zentrale Fragestellung „Aktiviert PTx humane Monozyten“ hinzuarbeiten.

Um die potentielle Aktivierung der Monozyten durch PTx messen zu können, wurde ein modifizierter Zelltest mit humanem Vollblut entwickelt. In Material und Methoden ist unter 2.1.3 die Durchführung des Pertussis-MAT beschrieben, der als Monozyten-

Aktivierungsparameter die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α nutzt.

3.1.1 Bestimmung des Endotoxingehaltes in Pertussis-Toxin-Präparationen

Neben der Ausarbeitung des Pertussis-MAT musste gezielt die Spezifität des Testsystems hinterfragt und überprüft werden. Da *Bordetella pertussis* ein Gram-negatives Bakterium ist, musste naturgemäß mit Kontaminationen des stark Monozyten-aktivierenden Bestandteils Endotoxin/Lipopolysaccharid (LPS) gerechnet werden (siehe 1.3). Demnach wurden insgesamt sechs verschiedene Pertussis-Toxin-Präparate auf eine mögliche LPS-Belastung im Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) untersucht. Unter den Präparaten befanden sich unter anderem ein genetisch hergestelltes (PTg) sowie international verfügbare Referenzmaterialien, wie der erste Internationale WHO-Standard für Pertussis-Toxin des National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Großbritannien) und die Biologische Referenzpräparation (BRP) des European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM, Frankreich). Alle untersuchten Proben erwiesen sich als LPS-kontaminiert. In Tabelle 15 ist der ermittelte LPS-Gehalt der sechs verschiedenen Toxin-Präparationen zu sehen. Es wurden jeweils 100 $\mu\text{g/ml}$ Protein getestet. Die LPS-Kontamination der verschiedenen Präparate variierte von 2.400 pg/ml bis zu 400.000 pg/ml (siehe Tabelle 15).

Tab. 15: LPS-Gehalt von sechs unterschiedlichen, unbehandelten Pertussis-Toxin-Präparaten mit einer Proteinkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$.

	Anmerkung	LPS-Gehalt [pg/ml]
PTx	BRP*	6.000
PTx (B)	1 st IS**	400.000
PTx (C)	-	300.000
PTx (D)	-	169.676
PTx (E)	-	240.000
PTg	genetisch detoxifiziert	2.400

* Biologische Referenzpräparation; ** Internationaler WHO-Standard

Nachdem festgestellt worden war, dass sämtliche Pertussis-Toxin-Präparationen mit Endotoxin verunreinigt waren, inklusive der international verfügbaren Pertussis-Toxin-Referenzmaterialien, wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, um den Einfluss der LPS-Kontamination auf das Testsystem zu unterbinden. Hierfür wurden zwei methodisch voneinander unabhängige Strategien verfolgt, die im Folgenden beschrieben werden.

3.1.2 Strategie 1: Eliminierung des kontaminierenden Endotoxins

Die Strategie 1 beinhaltet die Zielstellung, die Pertussis-Toxin-Präparationen von kontaminierendem LPS mittels spezieller Endotoxin bindender Beads vor dem Einsatz im Pertussis-MAT zu befreien.

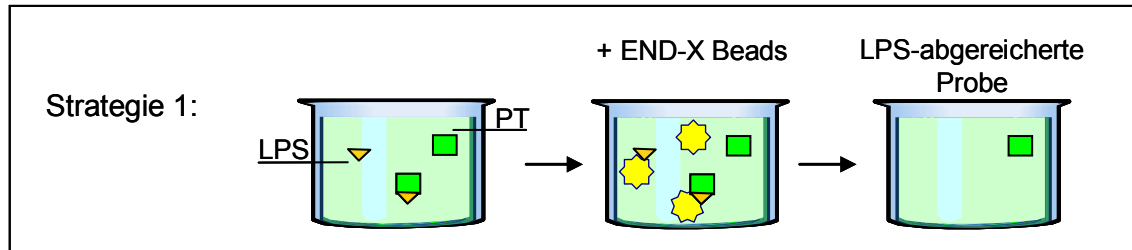


Abb. 12: Schematische Darstellung der Strategie 1, zur Überprüfung der Spezifität des Pertussis-MAT.

END-X Beads: Trägerkugeln mit speziellen von *Limulus polyphemus* abstammenden Liganden; **LPS:** Lipopolysaccharid; **PT:** ein Pertussis-Toxin.

In Vorversuchen wurde die Eignung dieser Methode überprüft, indem vor und nach der LPS-Abreicherung der Endotoxingehalt durch begleitende LAL-Tests in den PTx-Proben bestimmt wurde. Tabelle 16 zeigt den LPS-Gehalt in vier verschiedenen PTx- und einer PTg-Präparation (Proteinkonzentration jeweils 100 µg/ml) nach der Behandlung mit LPS-bindenden END-X Beads sowie die LPS-Abreicherung in Prozent (errechnet mit Hilfe der Werte vor der Abreicherung; siehe Tabelle 15).

Tab. 16: Vorversuch zur Strategie 1: LPS-Abreicherung mittels LPS-bindender Beads. Messung des LPS-Gehaltes vor und nach der Behandlung mit END-X Beads in fünf unterschiedlichen Pertussis-Toxin-Proben mit 100 µg/ml Protein.

100 µg/ml	Anmerkung	LPS-Gehalt [pg/ml]	LPS-Abreicherung [%]
PTx	BRP*	169,6	97,2
PTx (C)	-	2.400	99,2
PTx (D)	-	2.400	98,6
PTx (E)	-	2.400	99,0
PTg	genetisch detoxifiziert	600	75,0

* Biologische Referenzpräparation

3.1.3 Strategie 2: Inhibierung der LPS-Wirkung auf den Pertussis-MAT

Die Strategie 2 bestand darin, die Wirkung von LPS direkt im MAT mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern (gerichtet gegen die monozytären, LPS-bindenden und membranständigen Rezeptoren CD14 und TLR4) zu unterbinden. Mit derselben Zielstellung wurde zudem das Endotoxin-neutralisierende Protein (ENP) eingesetzt. Abbildung 13 verdeutlicht diese Zielstellung.

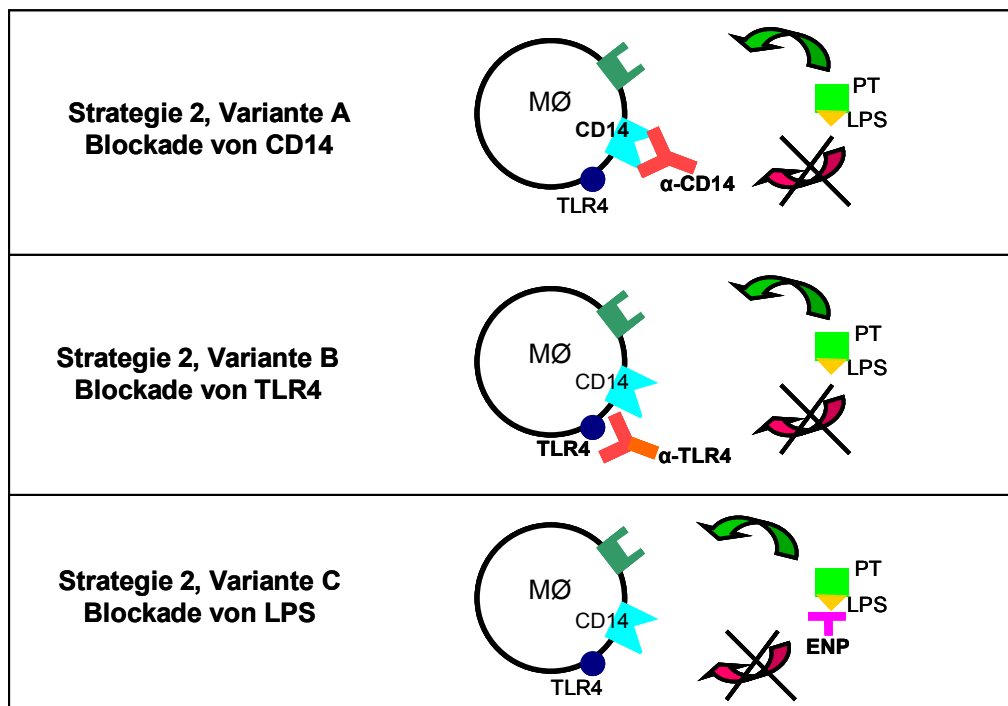


Abb. 13: Schematische Darstellung der Vorgehensweise, um die Spezifität des Pertussis-MAT zu überprüfen und zu gewährleisten.

MØ: Monozyt; PTx-Bindestelle: ; PT: Ein Pertussis-Toxin; LPS: Lipopolysaccharid; TLR4: Toll-like Rezeptor 4; CD14: LPS bindender Rezeptor; ENP: Endotoxin-neutralisierendes Protein.

Abbildung 14 zeigt den grundlegenden Versuch zur Überprüfung auf Eignung der LPS-Inhibitoren ENP und anti-TLR4 Antikörper im Pertussis-MAT mit vereinigt (gepooltem) humanen Frischblut von vier Spendern. Die Überprüfung wurde mit WHO-LPS durchgeführt. Die Bestimmung der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) erfolgte im ELISA. Diese beiden Inhibitoren sind für den speziellen Einsatz im MAT nicht geeignet, da trotz Variationen der Versuchsbedingungen sich nicht die gewünschte Hemmung einstellte.

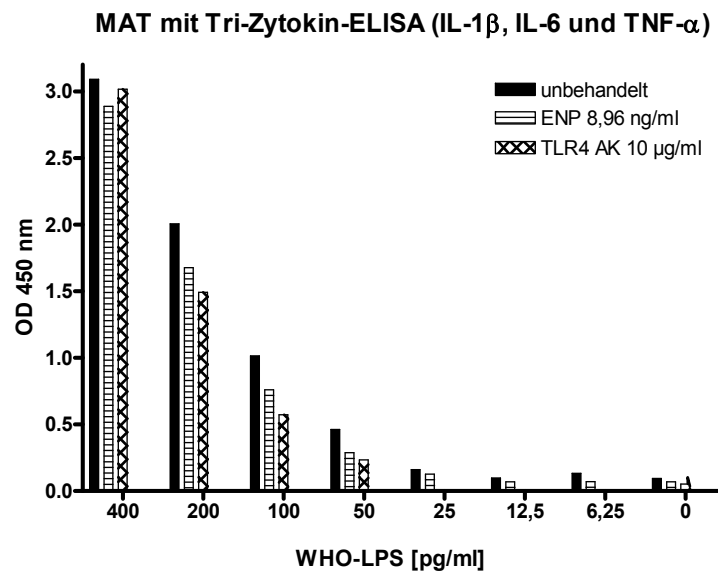


Abb. 14: Überprüfung der LPS-Inhibitoren ENP (Endotoxin-neutralisierendes Protein) und anti-TLR4 AK. Humanes Frischblut von vier Spendern wurde gepoolt. Nach Übernachtinkubation wurde im Überstand IL-1 β , IL-6 und TNF- α mittels ELISA gemessen.

Schwarze Säulen: Kontrolle (Inkubation ohne Inhibitor); Gestreifte Säulen: Inkubation mit 8,96 ng/ml ENP; Kreuzschraffierte Säulen: Inkubation mit 770 ng/ml anti-TLR4 AK.

Der monoklonale Antikörper gegen den CD14 Rezeptor hingegen unterbindet die Aktivierung der Monozyten durch LPS vollständig. Abbildung 15 zeigt die Überprüfung des anti-CD14 AK mittels WHO-LPS, welches intern als Standard für den MAT verwendet wird, und *B. pertussis*-LPS, das aller Wahrscheinlichkeit nach den Hauptanteil an kontaminierendem LPS in den PTx-Präparaten ausmacht. Abbildung 15 zeigt weiterhin die Mittelwerte von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit frisch entnommenem Vollblut von jeweils 4 gesunden, freiwilligen Spendern. Die Ergebnisse wurden statistisch gewichtet, weil es sich bei den insgesamt 12 Blutspenden um lediglich 10 verschiedene Spender handelte, da zwei Spender an zwei Versuchstagen Blut spendeten. Die Sezernierung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α diente als Monozyten-Aktivierungs-Parameter. Abbildung 15 weist auf die Fähigkeit des anti-CD14 AK hin, eine Aktivierung der Monozyten durch Endotoxin zu inhibieren. Es ist eindeutig, dass die LPS-induzierte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α vollständig durch die Zugabe des anti-CD14 AK mit einer finalen Konzentration von 770 ng/ml unterbunden werden konnte. Diese AK-Konzentration wurde für alle weiteren CD14-Inhibierungs-Versuche verwendet.

Zusätzlich wurde neben der Eignung des Antikörpers mit diesem Versuch die biologische Aktivität von *B. pertussis*-LPS gegenüber Monozyten bewiesen. *B. pertussis*-LPS vermag, genauso wie WHO-LPS, Monozyten dosis-abhängig zu aktivieren, jedoch ist ein deutlicher Unterschied im Aktivierungspotential der beiden LPS zu sehen (siehe Abbildung 15). WHO-LPS (isoliert von *E. coli*) ruft in niedrigeren Konzentrationen eine

wesentlich stärkere Monozytenaktivierung hervor als das höher konzentrierte *B. pertussis*-LPS. Trotz dieser unterschiedlichen Aktivierungspotentiale induzieren beide LPS am stärksten die Sezernierung von IL-6, gefolgt von IL-1 β und am schwächsten, insbesondere bei *B. pertussis*-LPS, TNF- α .

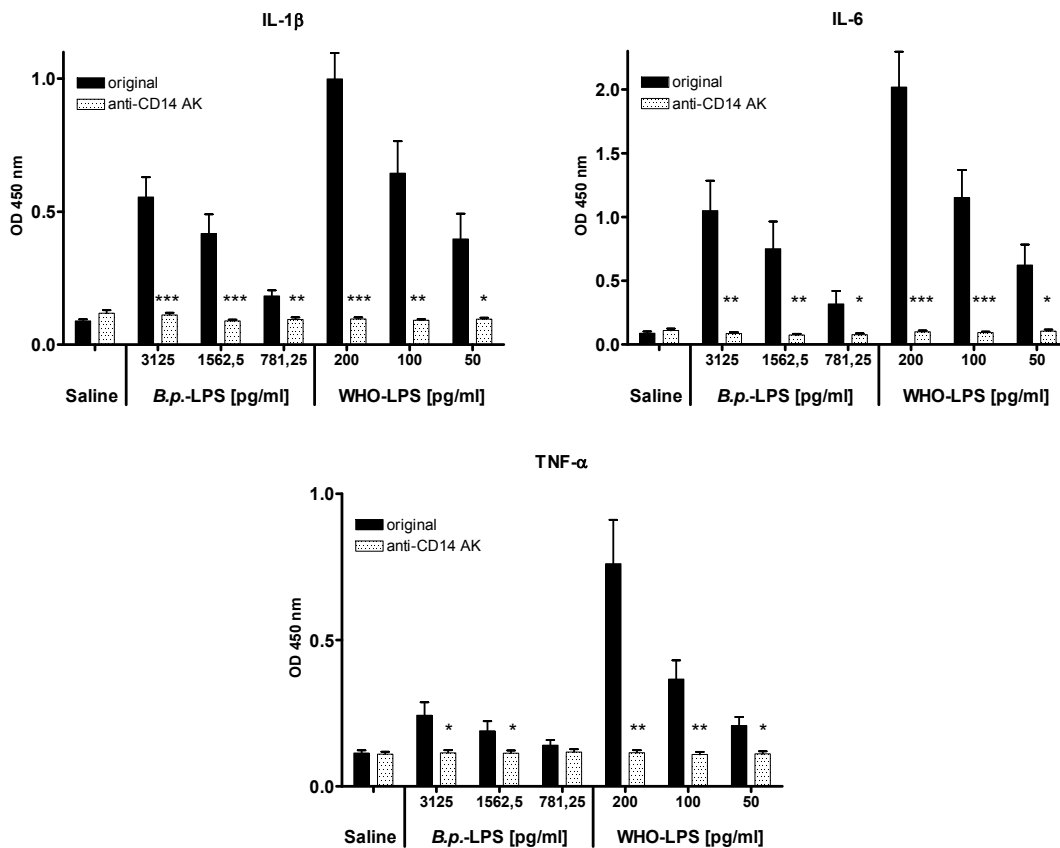


Abb. 15: Eignung des anti-CD14 AK sowie Vergleich der biologischen Aktivität von *B. pertussis*-LPS und WHO-LPS. ELISA: Messung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im Überstand humaner Blutzellen nach Übernachtinkubation.

Schwarze Säulen: Unbehandelte Proben, pyrogenfreie Saline und LPS; Gepunktete Säulen: Proben inkubiert mit 770 ng/ml anti-CD14 AK. Die Säulen präsentieren den berechneten Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit frischem Vollblut von jeweils 4 Einzelspendern (10 verschiedene Spender, von denen zwei doppelt spendeten). Die dünnen Linien zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Die Sterne stehen für den P-Wert verglichen mit den unbehandelten LPS-Ergebnissen (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Nachdem einerseits der Pertussis-MAT etabliert war, andererseits jedoch die Problematik kontaminierenden LPS` in sämtlichen Präparationen bestand, wurden zwei Strategien entwickelt, um die Spezifität des Pertussis-MAT für PTx hinterfragen und überprüfen zu können. Strategie 1, kontaminierendes LPS aus den Präparationen mittels spezieller Endotoxin-bindender Beads abzureichern, stellte sich als umsetzbar heraus. Bei der Strategie 2, die LPS-Wirkung direkt im Pertussis-MAT mittels Antikörper oder neutralisierendem Protein zu unterbinden, erwies sich die Blockierung des CD14 Rezeptors über den monoklonalen Anti-CD14 AK als sehr gut geeignet. Somit konnte mit

der Strategie 1 und Strategie 2 Variante A die Grundlage dafür gelegt werden, die Fragestellung nach dem Monozyten-Aktivierungsvermögen von Pertussis-Toxin eingehend zu bearbeiten, was schließlich zur Widerlegung der Aussage „PTx aktiviert humane Monozyten“ führte.

3.2 Widerlegung der Aussage: PTx aktiviert humane Monozyten

Um die Spezifität des Pertussis-MAT mit Hilfe der beiden entwickelten Strategien (siehe 3.1.2 und 3.1.3) zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Pertussis-Toxin-Präparate aus den insgesamt 6 zuvor getesteten ausgewählt: das PTx des EDQM als BRP und ein gentechnisch hergestelltes (PTg). Durch die Auswahl dieser beiden Präparate ist ein enzymatisch aktives, natürliches PTx vertreten und mit PTg eines, das nach der genetischen Veränderung keine toxischen Eigenschaften mehr aufweist. Hinzu kommt die – im Gegensatz zu den anderen Präparaten – relativ geringe Endotoxin-Kontamination (siehe Tabelle 15). In Abbildung 16 ist eine schematische Übersicht der Versuchsdurchführung zur systematischen Überprüfung der Spezifität des Pertussis-MAT mit sämtlichen ergänzenden Kontrollversuchen einschließlich der Vorbehandlung der Präparationen zur LPS-Abreicherung mittels END-X Beads dargestellt.

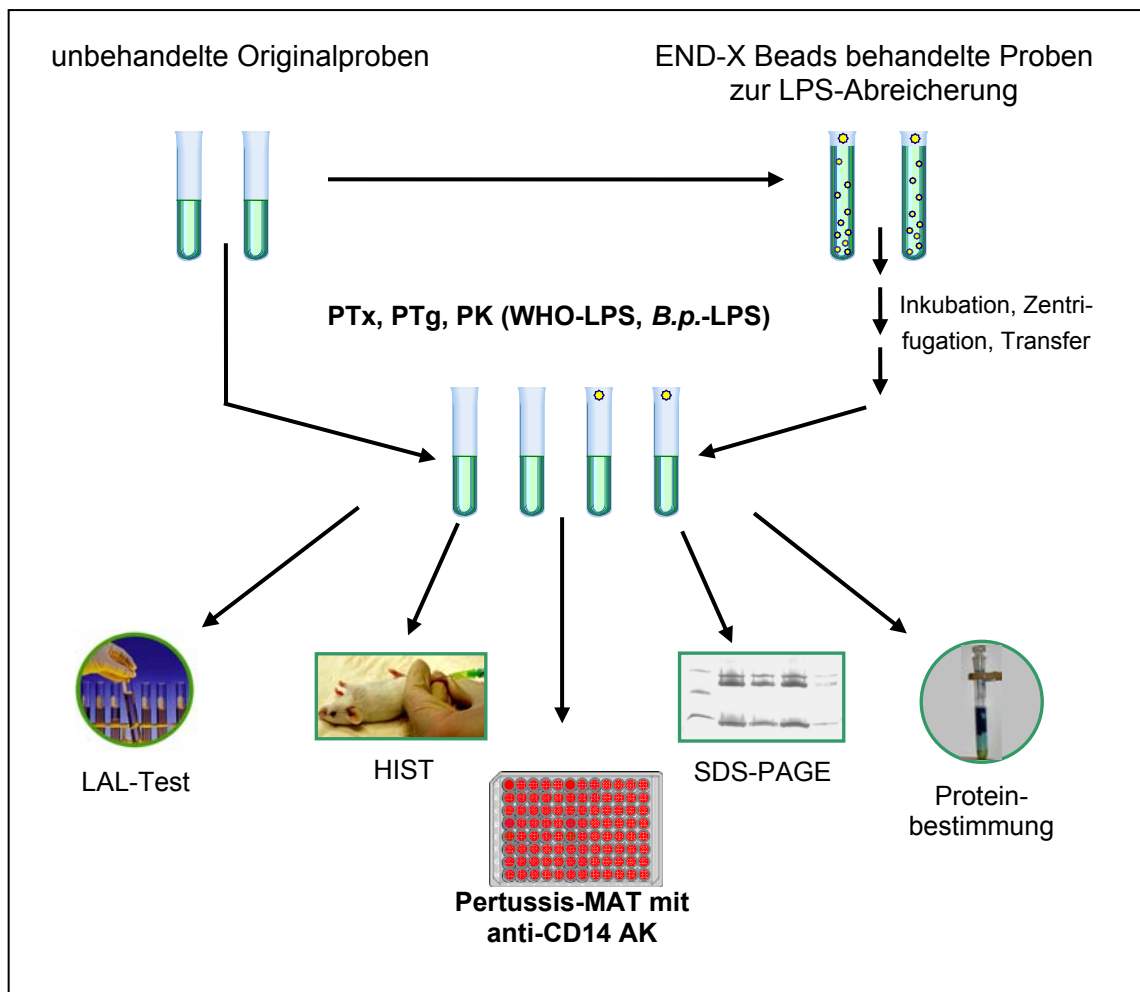


Abb. 16: Schematisch dargestellte Versuchsdurchführung zur systematischen Überprüfung der Spezifität des Pertussis-MAT. AK: Antikörper; *B.p.*: *Bordetella pertussis*; HIST: Maus-Histamin-Sensibilisierungstest; LAL: Limulus-Amöbozyten-Lysat Test; PK: Positivkontrolle.

3.2.1 Monozytenreaktion auf Pertussis-Toxin

Vor der eigentlichen Hauptstudie wurde das mögliche Aktivierungspotential der beiden unbehandelten, originalen PTx und PTg auf humane Monozyten im Pertussis-MAT mit humanem Frischblut charakterisiert. Die Induktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α diente als Monozyten-Aktivierungsparameter. Abbildung 17 zeigt eine deutliche dosis-abhängige Aktivierung der Monozyten durch PTx und PTg. Im Vergleich zum natürlichen PTx induziert das rekombinante PTg eine stärkere Reaktion. Betrachtet man generell das Muster, mit dem sich die drei Zytokine abbilden, ist, abgesehen von der unterschiedlich starken Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α , eine einheitliche Darstellung der Monozytenaktivierung zu sehen. Beide, PTx und PTg, induzieren eine höhere Freisetzung von IL-6 im Vergleich zu der Sekretion von IL-1 β und TNF- α .

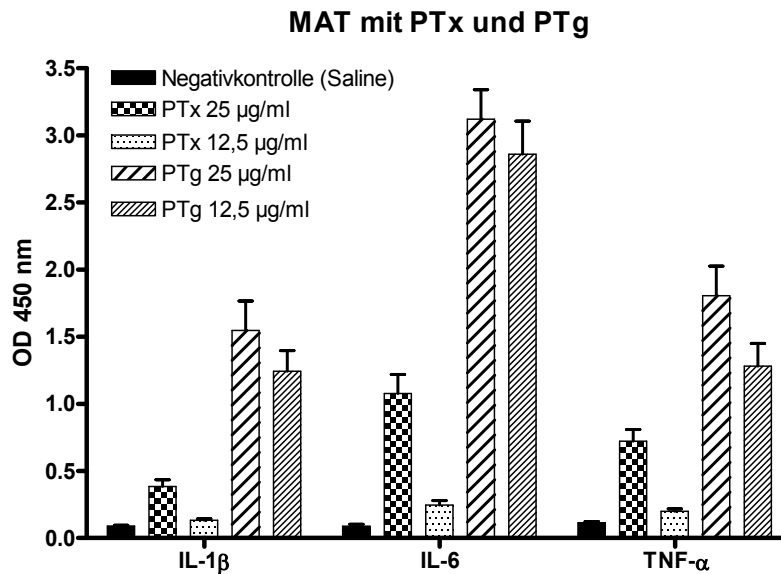


Abb. 17: Einfluss von PTx und PTg (25 µg/ml und 12,5 µg/ml) auf humane Monozyten. ELISA: Messung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im Überstand humaner Blutzellen nach Übernachtinkubation. Schwarze Säulen: Negativkontrolle mit pyrogenfreier Saline. Die Säulen präsentieren den berechneten Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit frischem Vollblut von jeweils 4 Einzelspendern (10 verschiedene Spender, von denen zwei doppelt spendeten). Die dünnen Linien zeigen den Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.2 Endotoxingehalt vor und nach LPS-Abreicherung und parallele Proteinbestimmung der PTx- und PTg-Proben

Von allen im Pertussis-MAT eingesetzten PTx- und PTg-Proben wurde parallel der Gehalt an LPS-Kontamination mittels LAL-GelClot-Test in mindestens vier unabhängigen Experimenten bestimmt. Alle Toxine waren – wie der Vortest bereits gezeigt hatte – LPS-kontaminiert (siehe Tabelle 15), wobei der Grad des LPS-Anteils variierte; d. h. PTx enthielt um die 6.000 pg/ml und PTg um die 1.200 pg/ml Endotoxin. Nach der erneut nachgewiesenen Kontamination der Pertussis-Toxin-Präparate mit LPS wurde der LPS-Gehalt mit Hilfe spezifischer LPS-bindender Beads reduziert, deren Eignung sich – wie bereits unter 3.1.2 beschrieben – in Vorversuchen bewiesen hatte (siehe Tabelle 16). Um den Erfolg der LPS-Abreicherung zu kontrollieren, wurden die behandelten PTx- und PTg-Proben erneut einer Endotoxinbestimmung unterzogen. Das Verhältnis des LPS-Gehaltes vor und nach der Abreicherung wurde kalkuliert (dargestellt in Tabelle 17). Um zudem die Eignung und Beladungskapazität der END-X Beads zu überprüfen, wurden bei jedem Versuch zwei Positivkontrollen (jeweils 30.000 pg/ml) mitgeführt. Verwendet wurde *B. pertussis*-LPS (*B.p.*-LPS) als natürlich kontaminierende Substanz in den Pertussis-Toxin-Präparationen, und zusätzlich WHO-LPS. Wie in

Tabelle 17 zu sehen ist, konnte der LPS-Gehalt bei PTg um 71,3 % und bei PTx um 92,8 % reduziert werden.

Tab. 17: Erfolg der LPS-Abreicherung sowie Kontrolle zur Erkennung möglicher Proteinverluste nach der Behandlung von PTx und PTg mit END-X Beads

	LPS-Reduktion		Proteinverlust		Anzahl unabhängiger Exp.
	%		%		
	MW	SD	MW	SD	
Positivkontrolle 1 (WHO-LPS)	93,2	7,8	n.a.	n.a.	5
Positivkontrolle 2 (<i>B.p.</i> -LPS)	99,4	0,8	n.a.	n.a.	5
PTx	92,8	8,0	9,5	6,4	5
PTg	71,3	14,4	63,8	23,4	4

n.a.: nicht anwendbar; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

Zusätzlich wurden die unbehandelten und die LPS-abgereicherten Pertussis-Toxin-Proben einer Proteinbestimmung unterzogen, um mögliche Protein-Verluste aufgrund des LPS-Abreicherungsprozederes, zu erkennen. Die Proteinkonzentration wurde einmal für originales PTx bzw. PTg eingestellt. Anschließend wurden die Proben jeweils aufgeteilt und ein Teil mit END-X Beads behandelt. Somit bestand die Möglichkeit, die originalen und behandelten Proben direkt miteinander vergleichen zu können. Der Proteingehalt der PTx-Probe wurde in mindestens vier unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Methode nach Bradford vor und nach der LPS-Abreicherung bestimmt [14]. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin, das in einer linearen Verdünnungsreihe (100 µg/ml bis 5 µg/ml) eingesetzt wurde. Die lineare Regression des Standards lag in allen Wiederholungs-Experimenten zwischen 1 und 0,99. Tabelle 17 zeigt einen Proteinverlust von 9,5 % für PTx auf, der Proteingehalt von PTg wurde hingegen um 63,8 % reduziert.

3.2.3 Reinheitskontrolle von PTx und PTg mittels Silberfärbung nach PAGE

Parallel zur Proteinbestimmung wurde als aussagekräftige Charakterisierungsmethode der unterschiedlichen Pertussis-Toxin-Präparationen eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) durchgeführt, die neben der Darstellung der Proteine ebenso Aussagen über den Proteingehalt der Proben zulässt. Als Entwicklungs-Methode wurde die Silberfärbung ausgewählt, da diese weitaus empfindlicher ist als eine Coomassie-Färbung. Abbildung 18 zeigt die Silberfärbung eines SDS-Gradienten-Gels. Die Präsentation der Proteine bestätigt die oben beschriebenen Ergebnisse der Proteinbe-

stimmung (siehe Tabelle 17). Die Spuren eins und drei in Abbildung 18 zeigen originale PTx- und PTg-, die Spuren zwei und vier LPS-abgereicherte PTx- und PTg-Präparationen. Die Proteinkonzentration wurde vor der LPS-Abreicherung eingestellt. Beim Vergleich der Spuren eins und zwei ist im Verhältnis zum Originaltoxin lediglich eine moderate Reduktion der LPS-abgereicherten PTx-Probe sichtbar. Im Gegensatz hierzu ist der Proteingehalt des behandelten PTg signifikant reduziert (siehe jeweils Spuren drei und vier).

In der SDS-PAGE stellen sich PTx und PTg (jeweils Spur eins und drei) gleich dar. Es sind keine Unreinheiten bis hin zur Nachweisgrenze (1 ng pro Spur) sichtbar. Alle Toxine zeigen eine Auftrennung in ihre Untereinheiten, bedingt durch den Reduktionsschritt vor der elektrophoretischen Analyse. In Abbildung 18 wird die S1 Untereinheit in der 26 kDa Bande repräsentiert. Die zweite Bande (von oben) besteht aufgrund der gleichen Größenverhältnisse aus den beiden Untereinheiten S2 (22 kDa) und S3 (22 kDa). Die dritte Bande beinhaltet die zweifach vertretene S4 Untereinheit mit 12 kDa und die vierte Bande die S5 Untereinheit (11 kDa).

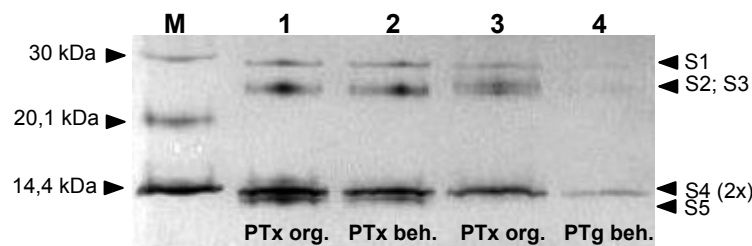


Abb. 18: Elektrophorese von PTx und PTg zur Prüfung auf Verunreinigungen sowie Proteinverluste. Alle Proben wurden reduziert und mit 100 ng pro Spur aufgetragen, wobei die Proteinkonzentrationen vor der Behandlung mit END-X Beads eingestellt wurden, um die Proben vor und nach der Aufbereitung miteinander vergleichen zu können. Die Elektrophorese wurde mit einem 8–25 % Polyacrylamid-Gradientengel durchgeführt und mittels Silberfärbung entwickelt. Der Niedermolekulargewichts-Marker (M) enthält als 30 kDa-Bande Carboanhydrase, als 20,1 kDa-Bande Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor und als 14,4 kDa-Bande α -Lactalbumin. Org.: Original; Beh.: Behandelt mit END-X Beads.

3.2.4 Monozytenreaktion auf originales versus LPS-abgereichertes PTx und PTg

Nachdem LPS in den Pertussis-Toxin-Präparationen detektiert worden war, musste die Aktivierung des Pertussis-MAT dahingehend hinterfragt werden, ob die Reaktion der Monozyten – wie in der Literatur beschrieben – durch Pertussis-Toxin hervorgerufen wurde oder durch kontaminierendes LPS. Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben, sollte mit Hilfe zweier unterschiedlicher, methodischer Strategien eine Aktivierung der Monozyten durch LPS ausgeschlossen werden. Zum einen wurde der Einfluss von LPS-abgereicherten PTx- und PTg-Proben im MAT untersucht, zum anderen wurde direkt im Bluttest eine Aktivierung der Monozyten durch LPS mittels monoklonalen anti-CD14 AK inhibiert (siehe Abbildungen 12 und 13). Zudem wurden beide Strategien

miteinander kombiniert, was bedeutet, dass LPS-abgereicherte Proben zusammen mit anti-CD14 AK im MAT inkubiert wurden. Die Induktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α diente als Parameter für eine Aktivierung der Monozyten. Abbildung 19 zeigt (I) die Monozytenreaktion auf originales PTx und PTg, (II) die Monozytenreaktion auf originales PTx und PTg in Anwesenheit von anti-CD14 AK, (III) die Monozytenreaktion auf LPS-abgereicherte Proben, (IV) die Monozytenreaktion auf LPS-abgereichertes PTx und PTg in Anwesenheit von anti-CD14 AK.

In Abbildung 19 zeigt sich, dass originales, natives PTx in der Lage ist, Monozyten zu aktivieren, aber keine Reaktion ersichtlich ist, wenn entweder der CD14 Rezeptor blockiert oder die Proben von LPS abgereichert wurden. Die Aktivierung, hervorgerufen durch PTg, ist nach der LPS-Abreicherung stark reduziert, genauso wie in Anwesenheit des anti-CD14 AK. Die Kombination von beiden Vorgehensweisen führt zu einer vollständigen Inhibition des Zytokinsignals, was bedeutet, dass sich die Werte der 25 $\mu\text{g/ml}$ Probe fast und der 12,5 $\mu\text{g/ml}$ PTg-Probe auf dem Niveau der Negativkontrolle befinden. Wieder präsentieren sich alle drei Zytokine grundsätzlich einheitlich, bei unterschiedlichen Sekretionsspiegeln von IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Interessanterweise induziert PTg eine wesentlich stärkere Monozytenaktivierung als PTx.

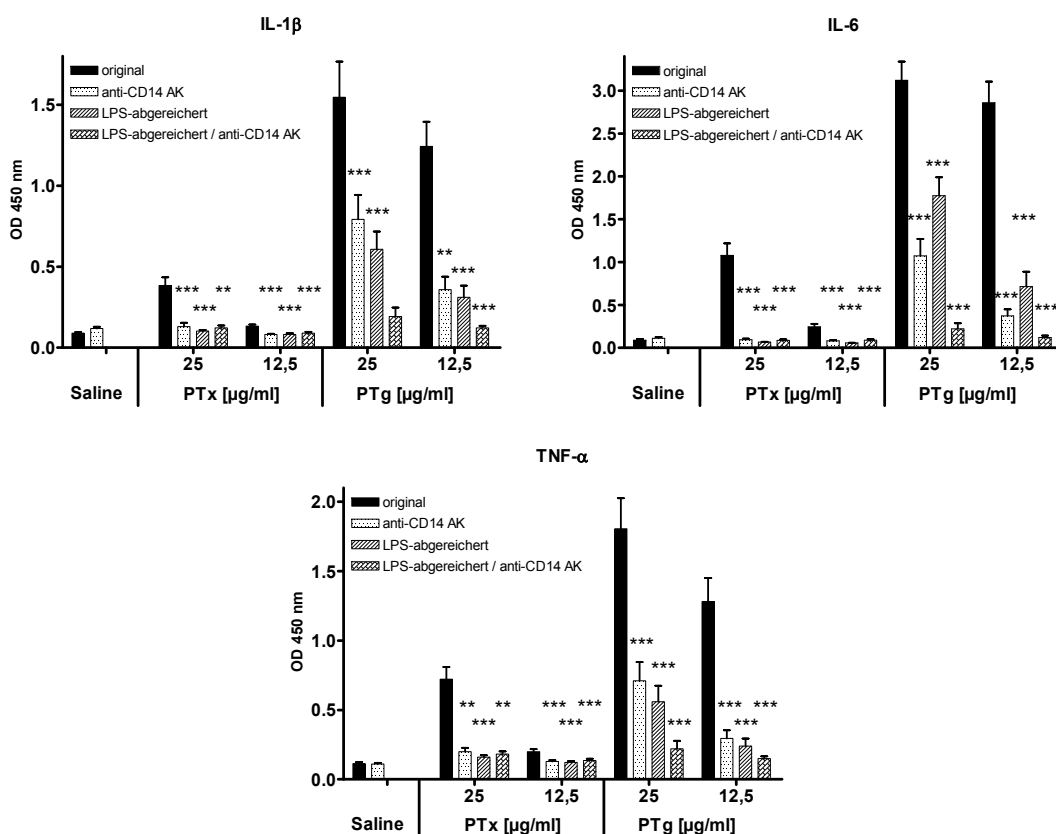


Abb. 19: Untersuchung des Aktivierungspotentials von unbehandelten und LPS-abgereicherten PTx und PTg auf humane Monozyten. Frisch entnommenes Blut wurde inkubiert mit (I) originale, unbehandeltem PTx und PTg, (II) beiden Originaltoxinen jeweils mit anti-CD14 AK, (III) mit LPS-abgereichertem PTx und PTg, (IV) mit LPS-abgereichertem PTx und PTg zusammen mit anti-CD14 AK. ELISA: Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im Überstand humaner Blutzellen nach Übernachtinkubation. Schwarze Säulen: Unbehandelte Proben (d. h. pyrogenfreie Saline, originales PTx und PTg); Gepunktete Säulen: Proben inkubiert mit 770 ng/ml anti-CD14 AK; Gestreifte Säulen: LPS-abgereichertes PTx und PTg; Gekachelte Säulen: Inkubation von LPS-abgereicherten PTx und PTg zusammen mit anti-CD14 AK. Die Säulen präsentieren den berechneten Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit frischem Vollblut von jeweils 4 Einzelspendern (10 verschiedene Spender, von denen zwei doppelt spendeten). Die dünnen Linien zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Die Sterne stehen für den P-Wert verglichen mit den unbehandelten LPS-Ergebnissen (***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$).

Abbildung 19 zeigt, dass eine Aktivierung der Monozyten AK nur bei unbehandelten Proben sowie bei Abwesenheit von anti-CD14 Antikörper zu detektieren war.

3.2.5 Aktivitätskontrolle des LPS-abgereicherten PTx im Maus-Histamin-Sensibilisierungstest (HIST)

Um die Funktionalität, vor allem die toxische Aktivität des PTx nach der LPS-Abreicherung zu testen, wurden originale und LPS-abgereicherte Proben im HIST ge-

testet. Aufgrund der genetischen Detoxifizierung von PTg wurde dieses Produkt nicht in die Studie mit einbezogen, um keine unnötigen Tierversuche durchzuführen. Das als Biologische Referenzpräparation (BRP) empfohlene PTx [108] wurde ausgewählt und in zwei Konzentrationen eingesetzt: 50 ng pro Tier als mittlere letale Dosis (LD₅₀) nach EP und zusätzlich 100 ng pro Tier (siehe Tabelle 18). Jeweils eine Hälfte der Proben wurde danach mit END-X Beads behandelt. Hiermit war die Möglichkeit einer direkten Korrelation zwischen originalen und behandelten Proben gegeben. Wie in Tabelle 18 zu sehen ist, wurde die Toxizität beider Präparate bestätigt. Das LPS-abgereicherte Toxin ist immer noch toxisch, was auf eine funktionale Proteinstruktur hinweist, auch wenn es sich etwas weniger toxisch verhält als die originalen, unbehandelten Proben. Die Gabe von LPS-abgereicherten Proben reduzierte die Anzahl der verstorbenen Tiere von 6 auf 4 (bei 10 Tieren) in der 50 ng Gruppe und von 5 auf 4 (bei 6 Tieren) in der 100 ng Gruppe.

Tab. 18: Maus-Histamin-Sensibilisierungstest (HIST) mit LPS-abgereicherten PTx, um dessen Toxizität nach der Behandlung mit END-X Beads zu kontrollieren.

	PTx	Sensitivitätssymptome (= Tod) %	Lebende Tiere	Tote Tiere	Gesamt-tierzahl
0 ng/Maus	Negativkontr.	0	5	0	5
50 ng/Maus	unbehandelt	60	4	6	10
	LPS-abger.	40	6	4	10
100 ng/Maus	unbehandelt	85	1	5	6
	LPS-abger.	65	2	4	6

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Aussage „PTx aktiviert humane Monozyten“ widerlegt wurde. Es zeigte sich, dass sämtliche Pertussis-Toxin-Präparate mit LPS kontaminiert waren. Um LPS als Störfaktor für den Pertussis-MAT auszuschließen, wurden zwei Strategien entwickelt: zum einen wurden die PTx- und PTg-Probe einer LPS-Abreicherung unterzogen, zum anderen wurde der Pertussis-MAT mit dem monoklonalen AK gegen den CD14 Rezeptor durchgeführt, so dass eine Aktivierung durch kontaminierendes LPS nicht möglich war. Der Pertussis-MAT zeigte hier nach, dass die zuvor gemessene Monozytenaktivierung nicht auf PTx oder PTg zurückgeführt werden konnte, sondern durch kontaminierendes LPS hervorgerufen wurde.

Hierdurch war eine wesentliche wissenschaftliche Voraussetzung, um das Ziel dieser Arbeit verwirklichen zu können, hinfällig geworden: Auf der Grundlage des Pertussis-MAT kann kein Nachweissystem für restlich aktives PTx aufgebaut werden.

3.3 Neue methodische Ansätze zum Nachweis von aktivem PTx

Aufgrund der Tatsache, dass mittels Pertussis-MAT kein Nachweis von aktivem PTx möglich ist, wurden daraufhin alternative Testmethoden entworfen, die auf der enzymatischen Aktivität von PTx basieren. In Tabelle 19 sind die enzymatischen Aktivitäten von PTx aufgezeigt sowie die entsprechenden Ansätze mit dem zu bestimmenden Substrat aufgeführt. Erfolgversprechend schien, die Wirkung von PTx biochemisch, photometrisch oder fluorometrisch nachzuweisen. Ein weiterer Ansatz beinhaltete die Entwicklung eines Zelltests, bei dem der ATP-Status der Zellen luminometrisch bestimmt wird.

Tab. 19: Übersichtstabelle der A- und B-Untereinheit des Pertussis-Toxins und den hieraus entwickelten Testgrundlagen

Bindung an Zielzelle	Enzymatische Aktivität	Substrat/Messung
B-Pentamer	<p>A-Monomer</p> <p>NAD-Glycohydrolase: $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{Nicotinamid} + \text{ADP-Ribose}$</p> <p>ADP-Ribosyltransferase: ADP-Ribose transferiert auf G_i-Protein \rightarrow Folge: Enzymkaskade beeinträchtigt</p> <p>$\text{ATP} \downarrow \xrightarrow{\text{Adenylatcyclase}} \text{cAMP} \uparrow$</p>	<p>NAD⁺ - Photometrisch (siehe 3.4) - Fluorometrisch (siehe 3.5)</p> <p>ATP - Luminometrisch (siehe 3.6)</p>

In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Ansätze zum Nachweis von aktivem PTx erläutert, die dessen biologische, sprich enzymatische Aktivität, als Testparameter ausnutzen.

3.4 Photometrischer Nachweis von aktivem PTx

Der erste methodische Ansatz bestand darin, PTx photometrisch über einen Lactatdehydrogenase(LDH)-gekoppelten Enzymtest nachzuweisen (siehe Abbildung 20). Die Überlegung hierzu war, in einem ersten Schritt aktives PTx in einen Ansatz mit bekannter NAD^+ -Konzentration zu geben. Das NAD^+ wird, abhängig von der Aktivität des PTx, gespalten. In dem zweiten daran gekoppelten Schritt wird die NAD^+ -Konzentration mit Hilfe der LDH gemessen und hierüber die Aktivität von PTx bestimmt. Die im Test verwendete LDH stammt aus dem Muskelgewebe von Kaninchen und besitzt – im Ge-

gensatz zu der aus Herzmuskeln isolierten LDH – eine hohe Affinität zu Pyruvat als Substrat. Demzufolge begünstigt sie die entgegengesetzte Reaktion, d. h. Pyruvat und NADH/H^+ umzusetzen. Das Gleichgewicht der Reaktion wurde demnach so verschoben, dass die gewünschte Reaktion von der LDH durchgeführt wurde. Hierzu wurden zum einen mit pH 9 alkalische Bedingungen geschaffen. Zum anderen wurde verhindert, dass sich ein Reaktionsgleichgewicht einstellen konnte, indem durch den Bestandteil Hydrazin im Reaktionspuffer entstehendes Pyruvat zu Pyruvat-Hydrazon umgesetzt wurde. Somit lag Pyruvat nicht im Überschuss vor und das Gleichgewicht wurde in die gewünschte Richtung verschoben.

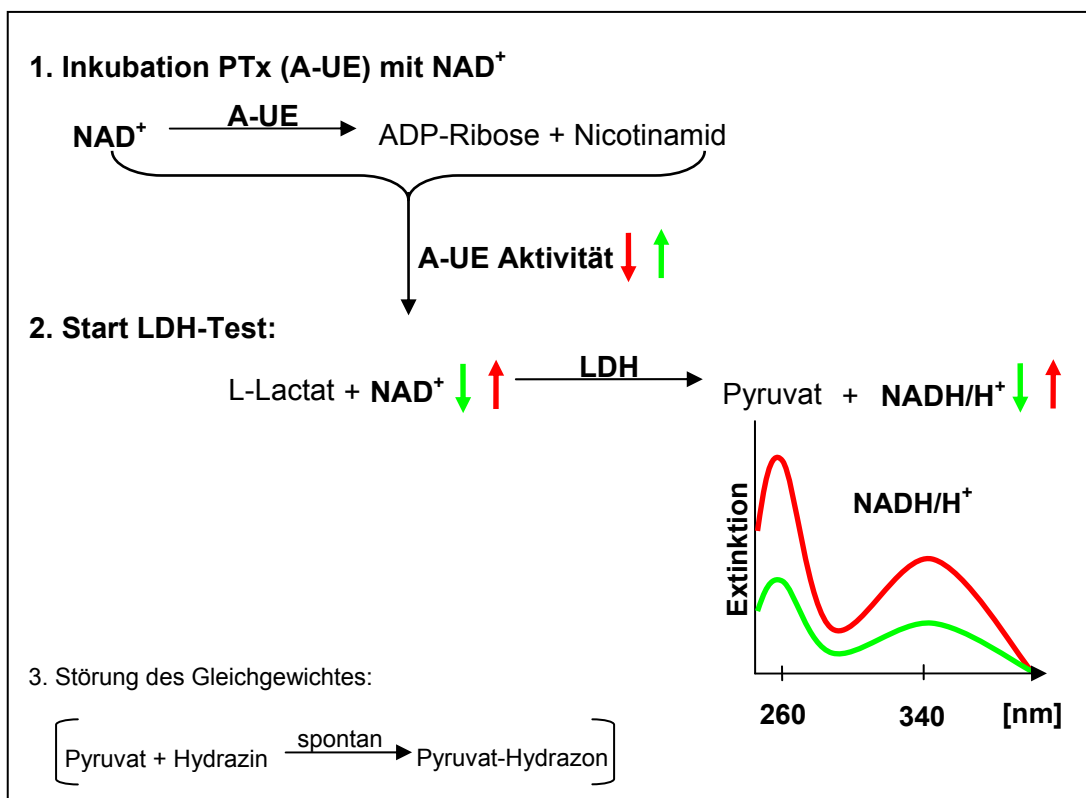


Abb. 20: Schematische Darstellung des Ansatzes, aktives PTx über eine Kopplungsreaktion mit der Lactatdehydrogenase (LDH) photometrisch nachzuweisen. A-UE: enzymatisch aktive Untereinheit des PTx-Holoproteins.

Die Abnahme von NAD^+ als Parameter für die Aktivität von PTx sollte photometrisch bestimmt werden. Dieser Ansatz erwies sich jedoch als nicht geeignet, da es mit dieser Nachweismethode nicht möglich war, aktives PTx zu detektieren. Abbildung 21 zeigt exemplarisch ein Ergebnis des gekoppelten Enzymtests. Nach 150 Minuten Inkubation der A-UE oder Negativkontrolle (PTx-NAD-Puffer) mit NAD^+ wurde mit Hilfe der LDH der NADH/H^+ -Gehalt in den Proben bestimmt. Der ermittelte NADH/H^+ -Gehalt der Probe mit aktiver A-UE unterschied sich nicht von den Werten der Negativkontrolle. Die enzymatische Aktivität der A-UE, NAD^+ hydrolytisch zu spalten, konnte demnach nicht ermittelt werden.

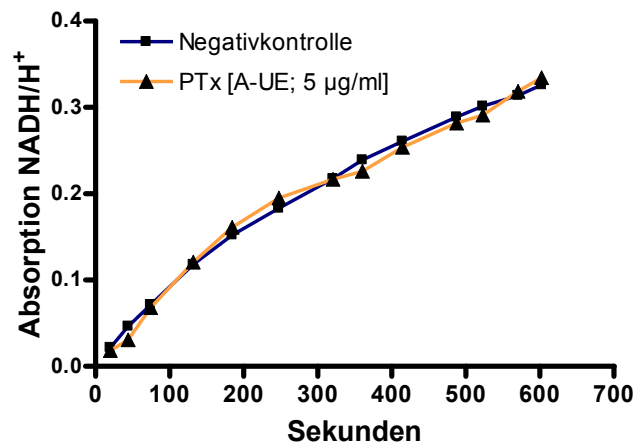


Abb. 21: Versuch des photometrischen Nachweises von aktivem PTx mit Hilfe eines an die LDH-Reaktion gekoppelten Messprinzips. 1. Schritt: Inkubation von PTx [A-UE; 5 µg/ml] mit NAD^+ [2 mM] in PTx-NAD-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 0,03 % CHAPS, pH 8) für 150 Minuten. 2. Schritt: Die PTx-NAD-Probe startet die gekoppelte LDH-Reaktion (LDH: 3,6 U/ml; 400 mM Glycin, 160 mM Hydrazin, 5 mM EDTA, 1 mM Lactat, pH 9,5). Absorption NADH/H^+ : 340 nm.

Trotzdem war diese Idee Grundlage und Ausgangspunkt für das weitere Vorgehen, aktives PTx über seine enzymatische Reaktion biochemisch nachzuweisen.

3.5 Fluorometrischer Nachweis von aktivem PTx

Nach dem photometrischen Ansatz wurde die Detektion im Fluorometer als weitaus empfindlichere Messmethode angestrebt. Hierzu wurde der Effekt ausgenutzt, dass Pertussis-Toxin das fluoreszierende NAD^+ -Analogon Nicotinamid-1, N^6 -Ethenoadenin-Dinukleotid ($1,\text{N}^6$ -etheno- $\text{NAD}^+ \equiv$ etheno- NAD) als Substrat nutzen kann [57]. Abbildung 22 zeigt die NAD-Glycohydrolase-Aktivität (siehe auch Tabelle 19) des PTx, d. h. dass etheno- NAD in Nicotinamid und etheno-ADP-Ribose gespalten wird. Die Fluoreszenz des intakten etheno- NAD -Moleküls wird teilweise durch den Bestandteil Nicotinamid unterdrückt (gequencht) [8]. Die Hydrolyse von etheno- NAD^+ durch aktives PTx führt zur Abspaltung des quenchend wirkenden Nicotinamids. Die dabei entstehende etheno-ADP-Ribose fluoresziert intensiver als etheno- NAD^+ . Diese Fluoreszenzzunahme wurde als Marker für die PTx-Aktivität genutzt.

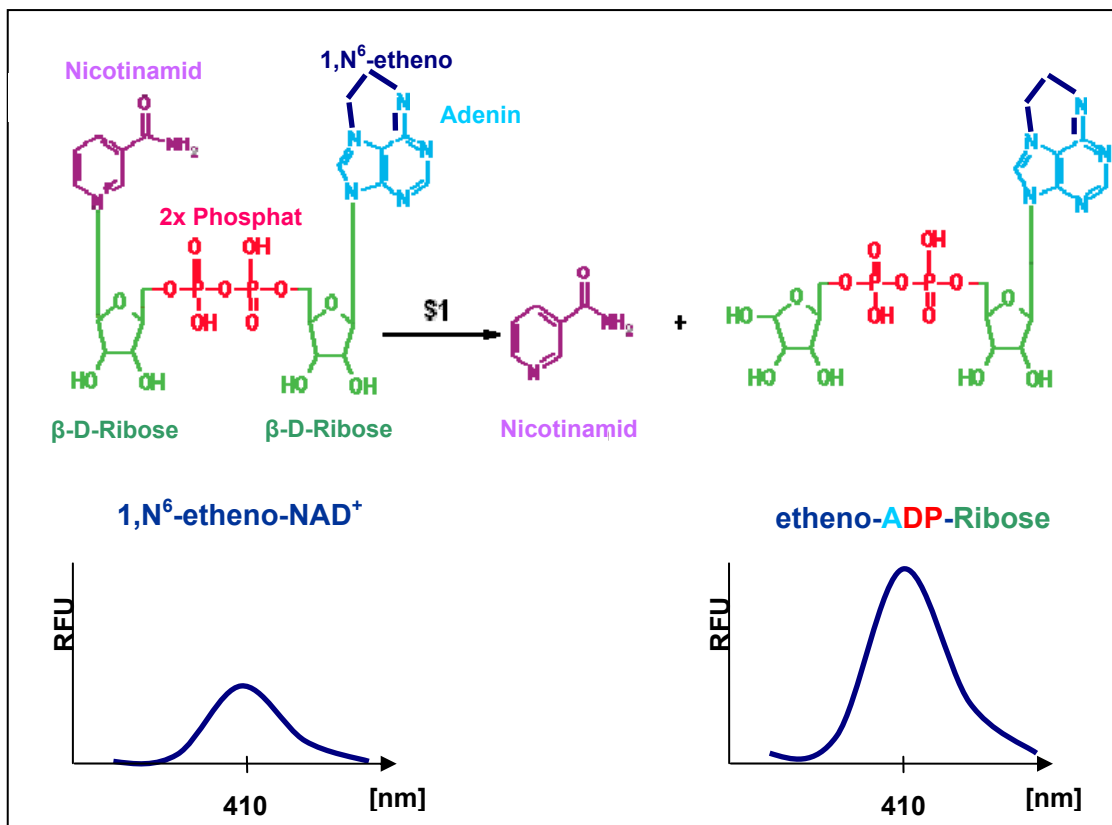


Abb. 22: Hintergrund der Messmethode, aktives PTx flourometrisch nachzuweisen. Das Reaktionsschema zeigt die Hydrolyse von etheno-NAD⁺ durch das A-Protomer (S1) des Pertussis-Toxins zu Nicotinamid und der stark fluoreszierenden etheno-ADP-Ribose. Zur Verdeutlichung ist parallel die ursprüngliche Fluoreszenzintensität des etheno-NAD⁺ und dessen späteren Spaltproduktes etheno-ADP-Ribose schematisch abgebildet. Beide Fluorogene absorbieren bei 310 nm und emittieren bei 410 nm. 1,N⁶-etheno-NAD⁺: Nicotinamid-1,N⁶-Ethenoadenin-Dinukleotid; RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten.

Bei diesem Testansatz musste das PTx in einem vorgeschalteten Schritt aktiviert werden, da die A-Untereinheit erst nach der Abspaltung von der B-Untereinheit enzymatisch aktiv ist. Auf einen vor- oder nachgeschalteten Kopplungsschritt konnte hingegen verzichtet werden. Diese Aktivierung ist generell nur notwendig, wenn im Testansatz keine intakten Zellen oder Zellfragmente enthalten sind, was bei diesem absolut auf den Kern der PTx-Wirkung reduzierten Fluoreszenz-Test der Fall ist. Die Aktivierung wurde leicht modifiziert nach dem Protokoll von Kaslow *et al.* [65] durchgeführt.

Besonders wichtig sind zudem interne Überprüfungen der Messmethode und deren Testsubstanzen sowie die Definierung potentieller Störfaktoren; als solche wurden die Ionenstärke, der pH-Wert und das Adjuvans Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) angesehen. Für die interne Überprüfung wurden umfassende Negativkontrollen eingesetzt. Hierfür wurden zum einen sämtliche Testsubstanzen ohne etheno-NAD⁺ auf Eigenfluoreszenz hin kontrolliert, zum anderen wurde als Negativkontrolle gentechnisch verändertes und dadurch nicht mehr enzymatisch aktives und folglich auch nicht mehr toxisches PTg verwendet. Alle im Fluoreszenz-Test eingesetzten Testsubstanzen (Pufferkomponen-

ten und PTx) zeigten keine Eigenfluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Einer ebenso großen Bedeutung kommt in jedem Ansatz das Mitführen einer Referenzprobe zu. Diese Probe beinhaltet etheno-NAD⁺ zusammen mit sämtlichen Testkomponenten außer PTx, wodurch sich die Grundfluoreszenz des etheno-NAD⁺ ermitteln lässt. Diese Referenz wurde, soweit angegeben, zur Datenverarbeitung vom jeweiligen Fluoreszenzsignal subtrahiert.

3.5.1 Detektion von aktivem PTx im Fluoreszenz-Test

Abbildung 23 zeigt den Nachweis von aktivem PTx im Fluoreszenz-Test. Verschiedene Konzentrationen von PTx wurden mit etheno-NAD⁺ insgesamt 48 h bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit im Wärmeschrank inkubiert. Während der Inkubation wurden insgesamt drei Endpunktmessungen mit einer Anregungswellenlänge von 310 nm und Emissionswellenlänge von 410 nm vorgenommen. Die Proben mit PTx in Abbildung 23 zeigen eine dosis- und zeitabhängige Fluoreszenzsteigerung. Die Negativkontrolle (PTg) weist hingegen keine Signalverstärkung auf.

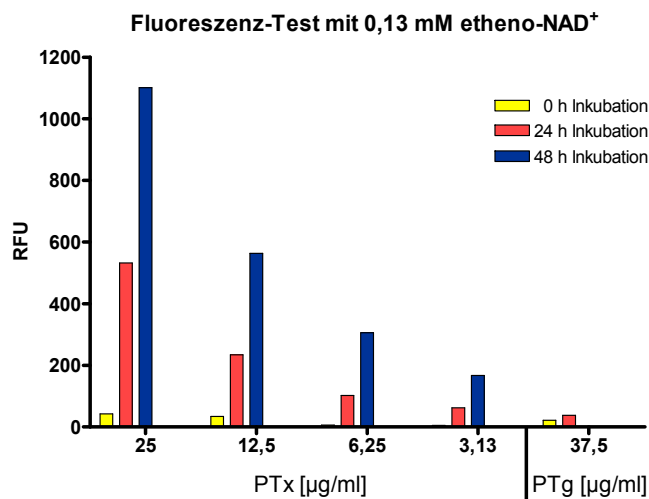


Abb. 23: Nachweis von aktivem PTx über die Fluoreszenzzunahme bei der hydrolytischen Spaltung von etheno-NAD⁺ zu etheno-ADP-Ribose (und Nicotinamid). Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C im Wärmeschrank mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h Inkubation wurde jeweils eine Endpunktmessung vorgenommen. Um das Grundfluoreszenzsignal von etheno-NAD⁺ zu erhalten, wurde als Referenz etheno-NAD⁺ mitgeführt. Zur Datenverarbeitung wurde die Referenz von jedem Wert subtrahiert. Aktivierungspuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 % CHAPS, 0,5 mM ATP, pH 8. PTg: Negativkontrolle; Absorption: 310 nm; Emission: 410 nm; RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten.

Die bisherigen Testbedingungen erwiesen sich grundsätzlich als geeignet. Um jedoch die Sensitivität des Testes weiter zu erhöhen, wurde die Aktivität des PTx mit Hilfe eines anderen Aktivierungspuffers gesteigert [103]. Der Hauptunterschied der beiden Puffer liegt, neben der Zusammensetzung an Ionen und Stabilisatoren, in den verwen-

deten Detergenzien. Der zuvor eingesetzte Puffer zur Spaltung von PTx in die A- und B-Untereinheit (-UE) und damit zur Aktivierung der A-UE enthielt neben dem Reduktionsmittel DTT (Dithiothreitol) das Detergenz CHAPS (3-[[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-Propansulfonat). Die neue Pufferlösung beinhaltet ebenfalls DTT, aber an Stelle des milden CHAPS wurde das potentere Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) verwendet. Abbildung 24 zeigt die Steigerung der PTx-Aktivität durch Änderung der Testbedingungen. Verschiedene PTx-Konzentrationen wurden nach der Aktivierung entweder durch Puffer 1 oder Puffer 2 mit etheno-NAD⁺ für 48 Stunden bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit im Wärmebrutschrank inkubiert. Während der Inkubation wurden insgesamt drei Endpunktmessungen mit einer Absorptionswellenlänge von 310 nm und Emissionswellenlänge von 410 nm vorgenommen.

Alle PTx-Proben zeigen eine dosis- und zeitabhängige Fluoreszenzsteigerung. Die PTx-Proben, die mit Puffer 2 aktiviert wurden, weisen im Vergleich zu den mit Puffer 1 aktivierten PTx-Proben bei 12,5 µg/ml und 6,25 µg/ml bis zu 3-fach stärkere Fluoreszenzsignale auf. Auch 3,13 µg/ml PTx entwickeln in Puffer 2 eine stärkere Aktivität. Demzufolge konnte die Aktivität von PTx durch die Variation der Pufferlösung gesteigert werden.

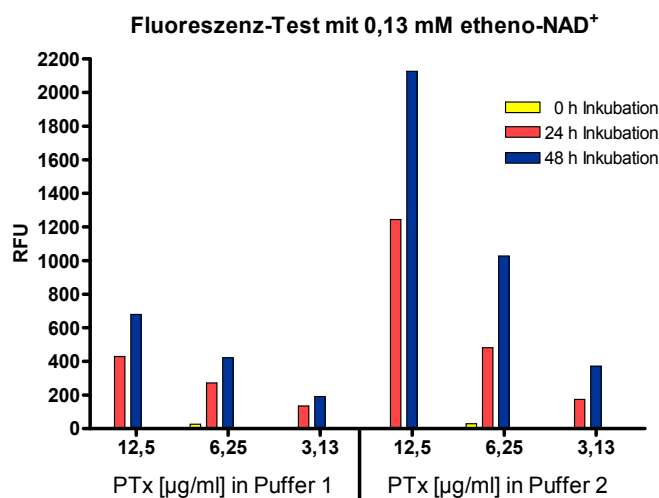


Abb. 24: Vergleich der PTx-Aktivität beim Einsatz von zwei verschiedenen Aktivierungspuffern. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Datenverarbeitung wurde die Referenz von jedem Wert subtrahiert. Aktivierungspuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 % CHAPS, 0,5 mM ATP, pH 8. Aktivierungspuffer 2: 25 mM HEPES, 0,5 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 0,025 % SDS, pH 8. Absorption: 310 nm; Emission: 410 nm; RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten.

3.5.2 Überprüfung und Charakterisierung potentieller Störgrößen

Weiterhin wurden theoretisch potentielle Störgrößen untersucht, die durch den zu testenden Impfstoff auftreten könnten. Hierzu zählten: Ionenstärke, Zuckerkonzentration und pH-Wert. Unterschiedliche Ionenstärke (Natriumchloridkonzentrationen) beein-

trächtigten die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorogens genauso wenig wie unterschiedlich hohe Konzentrationen an Zuckermolekülen, die z. B. über Lactatzugabe erzielt wurden (Daten nicht gezeigt).

Der pH-Wert des Testpuffers hingegen kann die Fluoreszenzeigenschaften des etheno-NADs beeinflussen. Abbildung 25 zeigt den Einfluss variierender pH-Werte der Pufferlösungen auf das Fluorogen etheno-NAD⁺. Ein pH-Wert von 8, auf den sämtliche Aktivierungs- und Probenpuffer eingestellt wurden, stört das Fluoreszenzverhalten des Fluorogens nicht. Das Signal ist über 24 h stabil. Höhere pH-Werte hingegen können einen starken Einfluss ausüben. Über 24 h Inkubation wird das Signal bei pH 9 und 12 um den Faktor 3 verstärkt, bei pH 10 sogar um den Faktor 4.

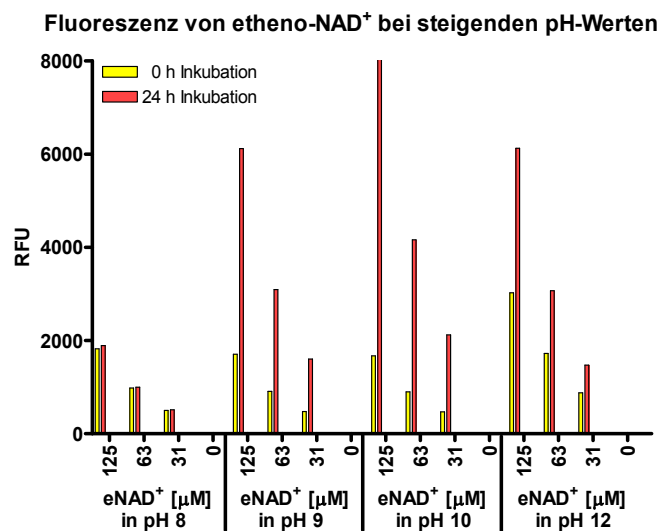


Abb. 25: Einfluss des pH-Wertes auf die Fluoreszenzeigenschaften von etheno-NAD⁺ (eNAD⁺). Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Aktivierungspuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 % CHAPS, 0,5 mM ATP, pH 8. Absorption: 310 nm; Emission: 410 nm; RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten.

Des Weiteren wurde ein spezifischer möglicher Störfaktor untersucht, der im zu testenden Endprodukt enthalten ist, wie zum Beispiel das Adjuvans des Impfstoffes, das i. d. R. Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) ist. Al(OH)₃ bewirkt eine dosisabhängige Fluoreszenzzunahme. In Abbildung 26 ist der interferierende Einfluss von Al(OH)₃ zu sehen. Unterschiedliche Konzentrationen Al(OH)₃ wurden zusammen mit 0,31 mM etheno-NAD⁺ 48 h inkubiert. Abbildung 26 zeigt deutlich, dass vor allem höhere Konzentrationen Aluminiumhydroxid das Potential haben, den Test zu beeinflussen. Die Überprüfung des Al(OH)₃ ohne etheno-NAD zeigte, dass es keinerlei Eigenfluoreszenz besitzt (siehe Abbildung 26).

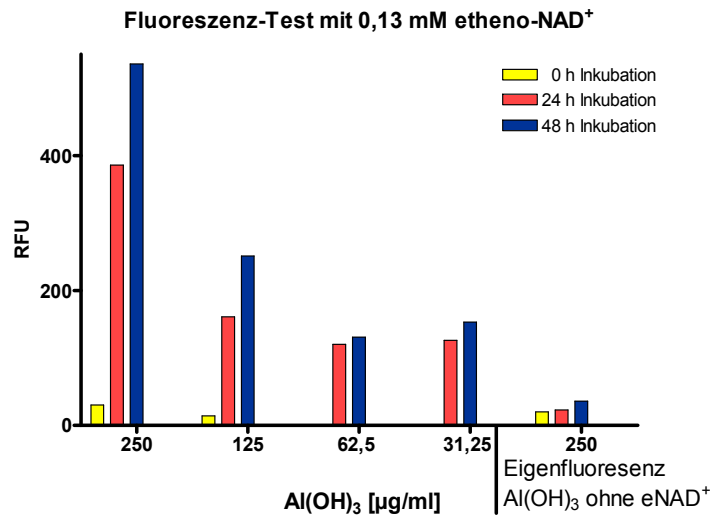


Abb. 26: Überprüfung des möglichen Störfaktors Al(OH)₃ auf einen testinterferierenden Einfluss. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Datenverarbeitung wurde die Referenz von jedem Wert subtrahiert, mit Ausnahme der Eigenfluoreszenz-Werte von Al(OH)₃. Aktivierungspuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 % CHAPS, 0,5 mM ATP, pH 8. Absorption: 310 nm; Emission: 410 nm; RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten.

Nachdem die störende Wirkung des Adjuvans` Aluminiumhydroxid festgestellt worden war, wurden verschiedene Versuche zur Eliminierung des fluoreszenzbeeinträchtigenden Bestandteils unternommen.

In dem einem Ansatz wurde eine Konkurrenzsituation für das positiv geladene Al(OH)₃ geschaffen. Zugefügtes Natriumchlorid (NaCl) bzw. dessen positiv geladenes Natrium (Na⁺) sollte mit Al(OH)₃ um die negativ geladenen Phosphatgruppen des etheno-NAD⁺ konkurrieren. Die fluoreszenzbeeinflussende Wirkung des Al(OH)₃ konnte jedoch über diesen Weg nicht abgeschwächt werden. Die Inkubation von 0,13 mM etheno-NAD⁺ über 24 h mit unterschiedlich hohen Salzkonzentrationen und jeweils 250 µg/ml Al(OH)₃ ist in Abbildung 27 dargestellt. Auch die höchste Konzentration mit 2 M NaCl-Lösung vermag den Einfluss von Al(OH)₃ nicht aufzuheben.

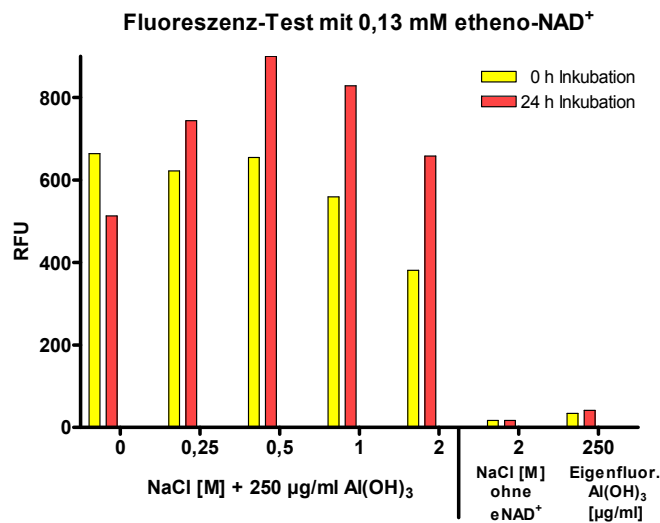


Abb. 27: Versuch, den testinterferierenden Einfluss von $\text{Al}(\text{OH})_3$ mit Hilfe erhöhter Konzentrationen an positiv geladenen Na^+ -Ionen aufzuheben. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Datenverarbeitung wurde die Referenz von jedem Wert subtrahiert, mit Ausnahme der NaCl-Werte ohne etheno-NAD und Eigenfluoreszenz-Werte von $\text{Al}(\text{OH})_3$. Aktivierungspuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 % CHAPS, 0,5 mM ATP, pH 8. Absorption: 310 nm Emission: 410 nm RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten.

In dem anderen Ansatz wurde eine Überlegung verfolgt, wonach vor allem freies, unlösliches $\text{Al}(\text{OH})_3$, das kein Protein gebunden hat, für die Interferenzen verantwortlich sein könnte. Demnach sollte über ein testunbeteiligtes Protein, z. B. humanes Albumin, die freien $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Valenzen neutralisiert werden. Für die Überprüfung, ob an Protein gebundenes $\text{Al}(\text{OH})_3$ seine interferierenden Eigenschaften verliert, wurden im ersten Schritt insgesamt 9 verschiedene Humanalbumin-Konzentrationen einer Verdünnungsreihe (5 mg/ml bis 0,02 mg/ml und 0 mg/ml) an 5 unterschiedliche $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Konzentrationen einer Verdünnungsreihe (0,5 mg/ml bis 0,03 mg/ml und 0 mg/ml) adsorbiert. Der Fluoreszenz-Test erfolgte dann mit diesen Proben im zweiten Schritt, die mit jeweils 0,13 mM etheno-NAD inkubiert wurden. Die Fluoreszenzzunahme wurde nach 0 h, 24 h und 48 h in einer Endpunktmessung bestimmt. Abbildung 28 (A) zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Inkubation aller Humanalbumin-Konzentrationen adsorbiert an $\text{Al}(\text{OH})_3$ mit einer Konzentration von 250 µg/ml. Das Verhältnis von Protein und Adjuvans liegt hier (I) fast ausgeglichen vor (1 Teil Humanalbumin : 1,16 Teile $\text{Al}(\text{OH})_3$), (II) mit bis zu 20-fach höher konzentriertem Albuminanteil und (III) mit bis zu 12,5-fach höher konzentriertem $\text{Al}(\text{OH})_3$. Damit wurden viele mögliche Konzentrations-Konstellationen abgedeckt. Abbildung 28 (B) zeigt die 5 verschiedenen $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Konzentrationen exemplarisch mit 0,63 und 0,08 mg/ml Albumin. Zum Vergleich wurde aktiviertes PTx aufgetragen. In der Praxis haben sich die theoretischen Überlegungen leider nicht bewährt, die Wirkung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ auf etheno-NAD⁺ konnte mit Hilfe von humanem Albumin nicht ausgeschaltet werden.

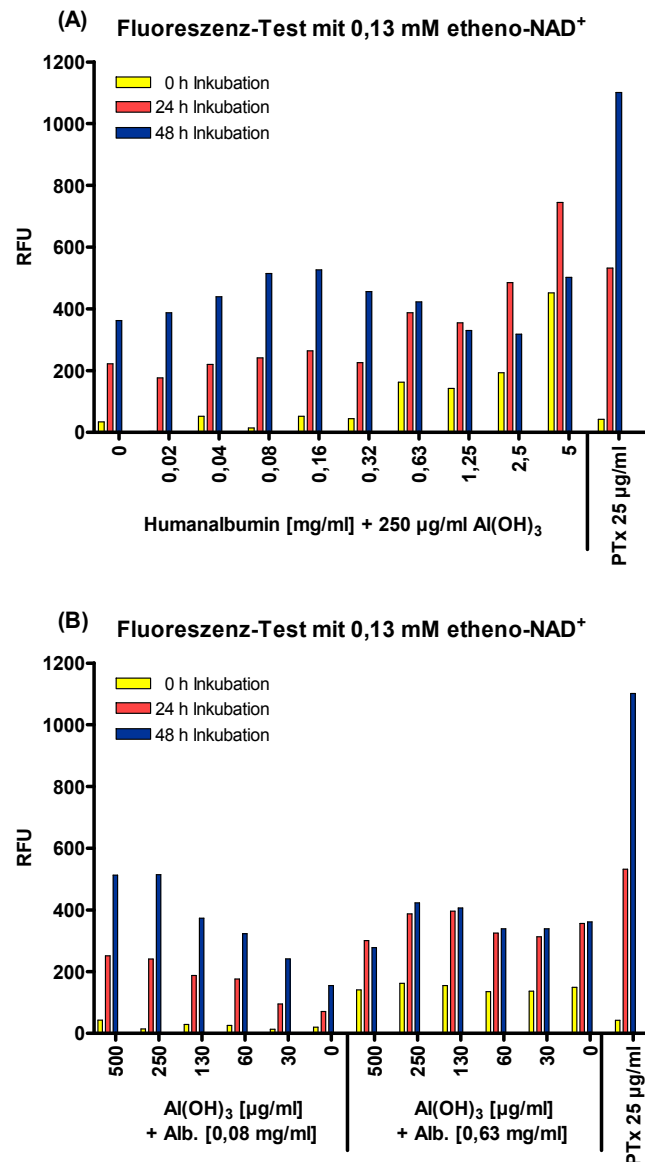


Abb. 28: Versuch, den testinterferierenden Einfluss von freiem Al(OH)₃ mit Hilfe des testunbeteiligten Proteins Humanalbumin zu neutralisieren. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Datenverarbeitung wurde die Referenz von jedem Wert subtrahiert. Aktivierungspuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 % CHAPS, 0,5 mM ATP, pH 8. Insgesamt wurden 9 verschiedene Albuminkonzentrationen an 5 unterschiedliche Al(OH)₃ adsorbiert. (A) Exemplarischer Auszug aus den erhobenen Daten. Die verschiedenen Proteinkonzentrationen und eine Adjuvans-Konzentration (250 µg/ml). (B) Exemplarischer Auszug aus den erhobenen Daten von verschiedenen Al(OH)₃-Konzentrationen adsorbiert an 0,08 und 0,63 mg/ml Protein. Absorption: 310 nm; Emission: 410 nm; RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten.

Das als potentieller Störfaktor definierte Adjuvans Al(OH)₃ stellte sich in den Versuchen als eine tatsächliche Störgröße heraus. Methodische Ansätze zur Eliminierung des testbeeinflussenden Effektes durch Al(OH)₃ zeigten keine Wirkung. Um den Störfaktor Adjuvans im Endprodukt zu charakterisieren, erfolgte abschließend die Testung von

vier verschiedenen polyvalenten adsorbierten Impfstoffen (siehe Tabelle 6), die alle eine azelluläre Pertussis-Komponente enthalten (siehe Abbildung 29). Die vier verschiedenen Impfstoffe und das PTx als Referenz wurden 48 h mit 0,13 mM etheno-NAD⁺ inkubiert. In dieser Zeit wurden drei Endpunktmessungen vorgenommen (nach 0, 24 und 48 h). Alle Proben weisen eine dosis-abhängige Aktivität auf. Nicht nur aktiviertes PTx vermag eine Fluoreszenzsteigerung zu bewirken, ebenso die getesteten Impfstoffe, von denen Impfstoff 3 sogar die stärkste Fluoreszenzsteigerung hervorruft. Wie die Aktivität der in den Impfstoffen enthaltenen detoxifizierten Pertussis-Toxine (PTd) einzuschätzen ist, wird unter 4.3.2 diskutiert. Die Impfstoffe enthalten jeweils über ihr Adjuvans folgenden Gehalt an Aluminium (Al): Impfstoff 1 besitzt einen pH-Wert von 7,19, der Al-Anteil ist nicht bekannt, Impfstoff 2 einen pH-Wert von 7,45 und 0,6 mg/ml Al, Impfstoff 3 pH 6,75 und 1 mg/ml Al, Impfstoff 4 pH 7,48 und 0,6 mg/ml Al.

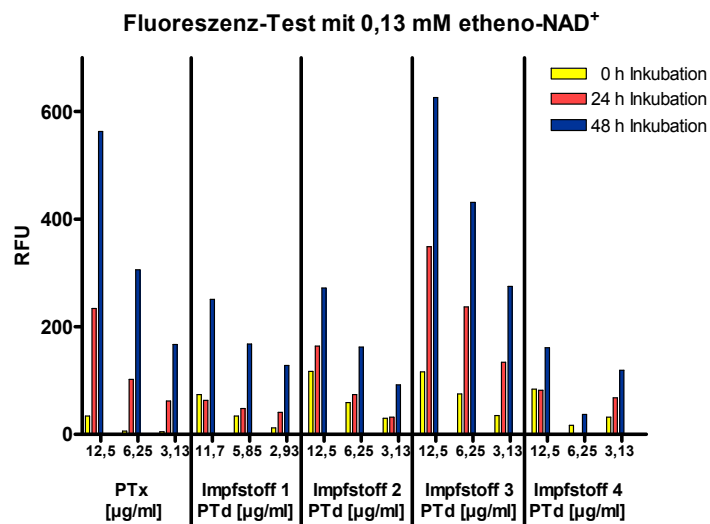


Abb. 29: Messung der restlichen PTx-Aktivität in vier verschiedenen adsorbierten polyvalenten Impfstoffen, die jeweils eine azelluläre Pertussis-Komponente enthalten. Zum Vergleich dient aktiviertes PTx. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Datenverarbeitung wurde die Referenz von jedem Wert subtrahiert. Aktivierungspuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 % CHAPS, 0,5 mM ATP, pH 8. Absorption: 310 nm; Emission: 410 nm; RFU: Relative Fluoreszenzeinheiten

Tabelle 20 beinhaltet eine zusammenfassende Bewertung der Störgrößen.

Tab. 20: Zusammenfassende Bewertung der definierten Störgrößen des Fluoreszenz-Tests

Definierte Störgröße	Realisiert mittels	Störenden Einfluss	Bemerkung
Ionenstärke	NaCl	nein	-
pH-Wert	Variierende pH-Werte des Probenpuffers	ja	Alkalischer pH-Wert (> 8) interferiert; alle Testsubstanzen auf ≤ pH 8 einstellen
Adjuvans	Al(OH) ₃	ja	Stört massiv; interferierender Einfluss nicht aufhebbar durch positive Ladung oder Adsorption an testunbeteiligtes Protein; relevant, da Bestandteil von Pertussis-Adsorbat-Impfstoff

Vor allem Al(OH)₃ übt einen sehr starken, störenden Einfluss auf den Fluoreszenz-Test aus. Somit wäre dieses Testprinzip zwar für den Nachweis von aktivem PTx in Impfstoffpräparationen vor der Adsorption geeignet, jedoch nicht für das konfektionierte Endprodukt. Deswegen wurde zusätzlich ein weiteres Testprinzip aufgebaut.

3.6 Luminometrischer Nachweis von aktivem PTx

Dieser Test nutzt den Energie-Status der Zelle als Indikator aus, um aktives PTx nachzuweisen. Wie bereits in Tabelle 19 aufgeführt, haben die enzymatischen Aktivitäten von PTx zur Folge, dass der Signaltransduktionsweg der Zelle nachhaltig beeinflusst wird. Abbildung 30 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen dem Eingriff in die Enzymkaskade durch enzymatisch aktives PTx und der sich hieraus ergebenden potentiellen Nachweismöglichkeit. Das G_i-Protein ist durch die ADP-Ribosylierung in seinem Ruhezustand konserviert (siehe auch Abbildung 7), wodurch die nachgeschaltete Adenylatcyclase (AC) nicht inhibiert wird. Der cAMP-Spiegel in der Zelle steigt und damit einhergehend sinkt der ATP-Spiegel. In dem Zelltest wird genau dieser Effekt ausgenutzt, indem der ATP-Status der Zelle nach Inkubation mit PTx (oder mit dem zu testenden Impfstoff) luminometrisch mit Hilfe eines Luziferin/Luziferase-Tests bestimmt wird (siehe Abbildung 30).

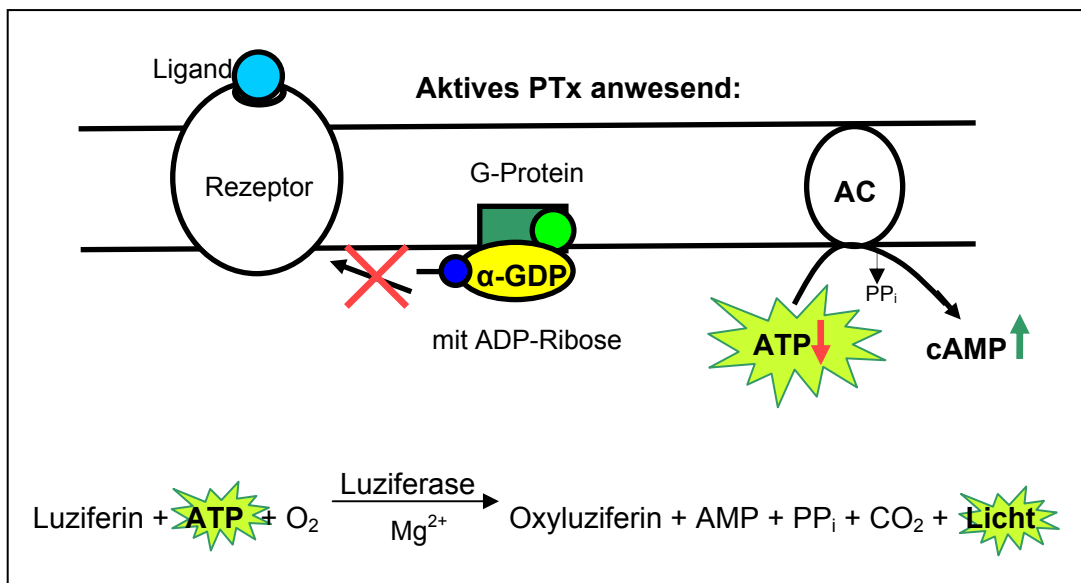


Abb. 30: Hintergrund der Messmethode, aktives PTx luminometrisch nachzuweisen. Die α -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins ist durch die ADP-Transferierung durch PTx nicht mehr in der Lage, mit dem aktivierten Rezeptor in Wechselwirkung zu treten. Einhergehend steigt der cAMP-Spiegel durch die Aktivität der Adenylatcyclase (AC) an und der ATP-Spiegel sinkt. Der somatische ATP-Spiegel wird über die Reaktion der Luziferase z. B. von *Photinus pyralis* oder dem rekombinant hergestellten Enzym nachgewiesen. Die entstehende Menge Licht steht im proportionalen Verhältnis zur Menge des ATP. AMP: Adenosinmonophosphat; PP_i: Diphosphat.

3.6.1 Charakterisierung der Indikatorzellen

Als Grundlage für einen erfolgreichen Testaufbau mussten die richtigen Indikatorzellen ausgesucht werden. Es wurden humane Lymphozyten für den Pertussis-ATP-Test (PAT) ausgewählt. Zum einen wurde die Isolation einer Primärzellkultur aus humanen peripheren mononukleären Zellen, sogenannten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), vorgenommen, zum anderen die permanente T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat in Kultur genommen.

Die PBMCs bestehen hauptsächlich aus zwei Zellpopulationen, Lymphozyten und Monozyten. Die phänotypische und immunchemische Differenzierung wurde im Durchflusszytometer durchgeführt. Zudem wurden dieselben PBMC-Präparationen auch hämatologisch mit Hilfe eines Zellzählgerätes differenziert.

Die Werte der Differenzierung mittels Durchflusszytometer einer PBMC-Präparation eines humanen Spenders ist exemplarisch in Abbildung 31 und der dazugehörigen Tabelle 21 zu sehen. Die Zellprobe wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Abbildung 31 (A) zeigt die phänotypische Auftrennung der Zellen im Streulicht nach relativer Größe und Granularität. Die Lymphozyten (orange dargestellt) siedeln sich aufgrund ihrer geringen Größe (circa 7-10 μm B- und T-Lymphozyten, 11-16 μm natürliche Killerzellen) und schwachen Granulierung unterhalb der 12-20 μm großen und stärker granu-

lierten Monozyten (grün dargestellt) an. Abbildung 31 (B) zeigt die CD45-positiven PBMCs. Mit Hilfe des leukozyten-spezifischen anti-CD45 AK konnten somit die Zellen vom Debris (u. a. Zelltrümmer) getrennt werden. In Abbildung 31 (C) ist die Auftrennung der Leukozyten in Monozyten und Lymphozyten zu sehen. Die Monozyten wurden über ihren CD14 Rezeptor identifiziert. Granulozyten sind in der PBMC-Präparation so gut wie nicht mehr vertreten (siehe auch Tabelle 21).

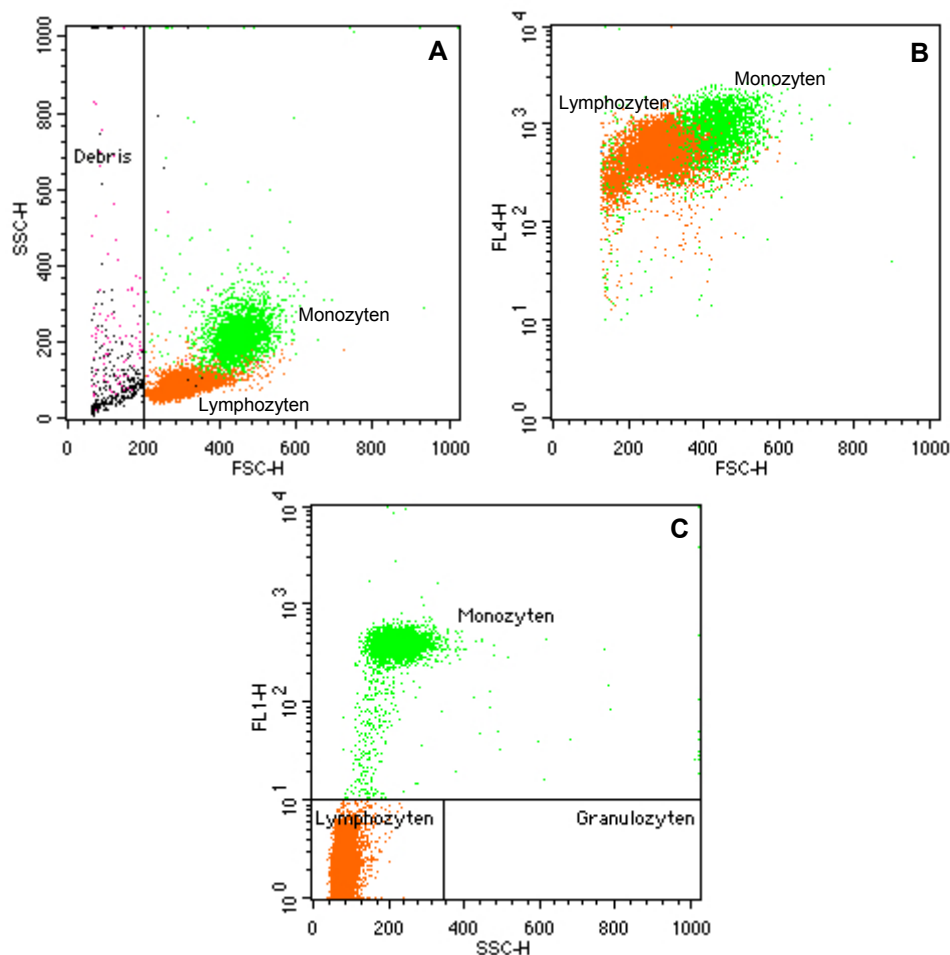


Abb. 31: Differenzierung frisch isolierter PBMCs (Einzelspender) mittels Durchflusszytometrie. (A) Phänotypische Auftrennung der Zellen im Streulicht, nach Größe (X-Achse: FSC; forward scatter) und Granularität (Y-Achse: SSC; sideward scatter); (B) CD45-positive Zellen, die mit dem AK-Fluoreszenzfarbstoff APC (FL 4, Y-Achse) markiert sind, wurden gegen die relative Größe (X-Achse, FSC) aufgetragen; (C) Identifizierung der Monozyten über den spezifischen CD14 Rezeptor. Der FITC-markierte anti-CD14 AK (Y-Achse, FL1) wurde gegen die Granularität (X-Achse, SSC) aufgetragen.

Anhand dieser Differenzierung im Durchflusszytometer (siehe Abbildung 31) konnte die prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Zellpopulationen frisch isolierter PBMCs erstellt werden. In Tabelle 21 sind diese ermittelten und errechneten Zellzahlen sowie die im Zellzählgerät gemessenen Zellzahlen aufgeführt. Die im Zellzählgerät gemessenen Zahlen decken sich mit den im Durchflusszytometer ermittelten Werten (siehe Tabelle 21). Die immunchemisch berechnete Anzahl von 69,08 % Lymphozyten

weicht hämatologisch gemessen etwa um 1,3 % ab, die mit 30,75 % im Durchflusszytometer ermittelten Monozyten um weniger als 1 %. Die Auswertung der Durchflusszytometer-Daten zeigt, dass im definierten Granulozyten-Gate keine Granulozyten-Population vertreten ist. Die in einer Vollblutprobe mit 54–80 % am stärksten auftretende Zellpopulation an Granulozyten ist in der PBMC-Präparation laut Hämatometer mit nur noch rund 1 % vorhanden.

Tab. 21: Differenzierung frisch isolierter PBMCs (Einzelspender), immunchemisch im Durchflusszytometer ermittelt und parallel im hämatologischen Zellgerät gemessen.

[% Leukozyten]	Zellpopulationen (frisch isolierter PBMCs)	
	Durchflusszytometer	Hämatometer
Monozyten	30,75	31,40
Granulozyten	0,17	1,03
Lymphozyten	69,08	67,77

Die immunchemische Typisierung der aus einer homogenen Zellpopulation bestehenden T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat erfolgte mit zwei spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Der eine war gegen den allgemeinen leukozyten-spezifischen Oberflächenmarker CD45 gerichtet, der andere gegen den T-Lymphozyten-spezifischen Oberflächenmarker CD3. Abbildung 32 zeigt die CD45- und CD3-positiven Jurkat-Zellen. Die Abbildung ist in vier Quadranten aufgeteilt, um die Zellen entsprechend ihrer Antikörpermarkierung aufzutrennen. Die Grenze, ob eine Zelle für das Merkmal positiv zu definieren ist oder als negativ gezählt werden soll, wurde für beide Fluoreszenzen bei 10^1 festgelegt. Quadrant I beinhaltet demnach CD45 positive und CD3 negative Jurkat-Zellen; Quadrant II doppelt Positive; Quadrant III hingegen doppelt Negative und Quadrant IV CD45 negative und CD3 positive Zellen. Mit Hilfe dieser Einteilung lassen sich 5,69 % CD45⁺/CD3⁻-Zellen und 94,30 % CD45⁺/CD3⁺-Zellen sowie 0,01 % doppelt negative und 0,00 % CD45⁻/CD3⁺-Zellen ermitteln.

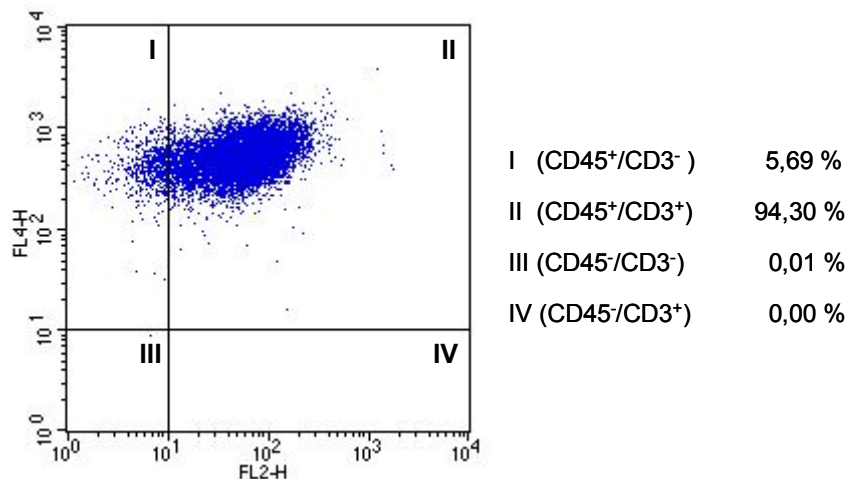

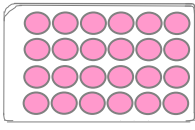

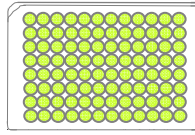
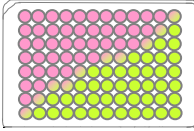


Abb. 32: Kontrolle der Jurkat-Zellen auf das Vorhandensein des Oberflächenmarkers CD3 (X-Achse, FL2 PE-markiert) versus CD45 (Y-Achse, FL4 APC-markiert).

3.6.2 Übersicht zu den Entwicklungsphasen des Pertussis-ATP-Tests

Nachdem die Isolation, Kultivierung und Charakterisierung der Indikatorzellen etabliert worden war, wurde der Zelltest aufgebaut. Wie bereits unter Material und Methoden (2.4.4) beschrieben, besteht der Zelltest generell aus drei Abschnitten. Zuerst werden die Zellen für den Test vorbereitet, gefolgt von dem Inkubationsschritt und schließlich der Messung. Der Pertussis-ATP-Test (PAT) hat verschiedene Entwicklungsphasen durchlaufen. Zu Beginn wurden generell der Inkubations- und der Messschritt in getrennten Gefäßen durchgeführt. Die Inkubation wurde zunächst ausschließlich mit frisch isolierten PBMCs als Indikatorzellen in sterilen Zentrifugenreaktionsröhrchen durchgeführt. Die Detektion erfolgte anschließend in ATP-freien Messröhrchen in einem Luminometer, das lediglich den Einsatz von Röhrchen erlaubt. Später wurde die Inkubation in einer 24-Well-Zellkulturplatte durchgeführt. Die anschließende Auswertung wurde nach Probenüberführung in einer ATP-freien 96-Well-Zellkulturplatte vorgenommen. Zusätzlich wurde die Zelllinie Jurkat auf Eignung als Indikatorzelle im PAT getestet und neben frisch isolierten PBMCs der Einsatz von Kryo-PBMCs im Test eingeführt. Die nächste Entwicklungsphase beinhaltete, den PAT in einem einzigen Gefäß durchzuführen, sprich Inkubation und Messung erfolgen hierbei in ein und derselben Platte, als sogenannter „One-Plate-Assay“. Tabelle 22 zeigt schematisch eine Übersicht, um die Unterschiede der drei Entwicklungsphasen zu verdeutlichen.

Tab. 22: Schematische Übersicht der drei verschiedenen Versuchsdurchführungen in den Entwicklungsphasen A, B und C des PAT.

	Phase A	Phase B	Phase C
Inkubation			
Messung			
Bemerkung	Frische PBMCs	Frische PBMCs, Jurkat-Zellen, Kryo-PBMCs	“One-Plate-Assay”

In den nachfolgenden Abschnitten werden die verschiedenen Phasen des PAT beschrieben.

3.6.3 Entwicklung des PAT (Phase A: Grundsteinlegung)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Testentwicklungsphase A (siehe Tabelle 22) aufgestellt. Die Inkubation erfolgte ausschließlich mit frisch isolierten PBMCs, für die luminometrische Messung wurden die Proben in ATP-freie Messröhrchen überführt.

3.6.3.1 Nachweis von aktivem PTx im PAT; Überprüfung der Spezifität

Abbildung 33 zeigt den Nachweis von aktivem PTx im PAT. Die frisch isolierten PBMCs wurden in zwei unterschiedlichen Zellzahlen ($2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml) eingesetzt. Sie stammten von zwei Spendern, deren Zellen nach der Isolation vereinigt (gepoolt) wurden (Einzelspenderkontrolle siehe Abbildung 34). Nach 1 h, 5 h und maximal 24 h Inkubation im Zellkulturschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit mit PTx (21,5 µg/ml), wurde jeweils der ATP-Status der Zelle luminometrisch gemessen. Bereits nach 1 h Inkubation verursacht PTx eine deutliche Abnahme des ATP-Spiegels im Vergleich zu den Referenzzellen, die anstelle des Toxins mit klinischer Kochsalzlösung (Saline, 150 mM NaCl) inkubiert wurden. Die ATP-Spiegel-Senkung ist nach 5 h und 24 h Inkubation noch stärker ausgeprägt. Als Positivkontrolle für die Luziferin/Luziferase-Reaktion wurde jeweils eine ATP-Standardreihe mitgeführt (Ergebnis nicht gezeigt).

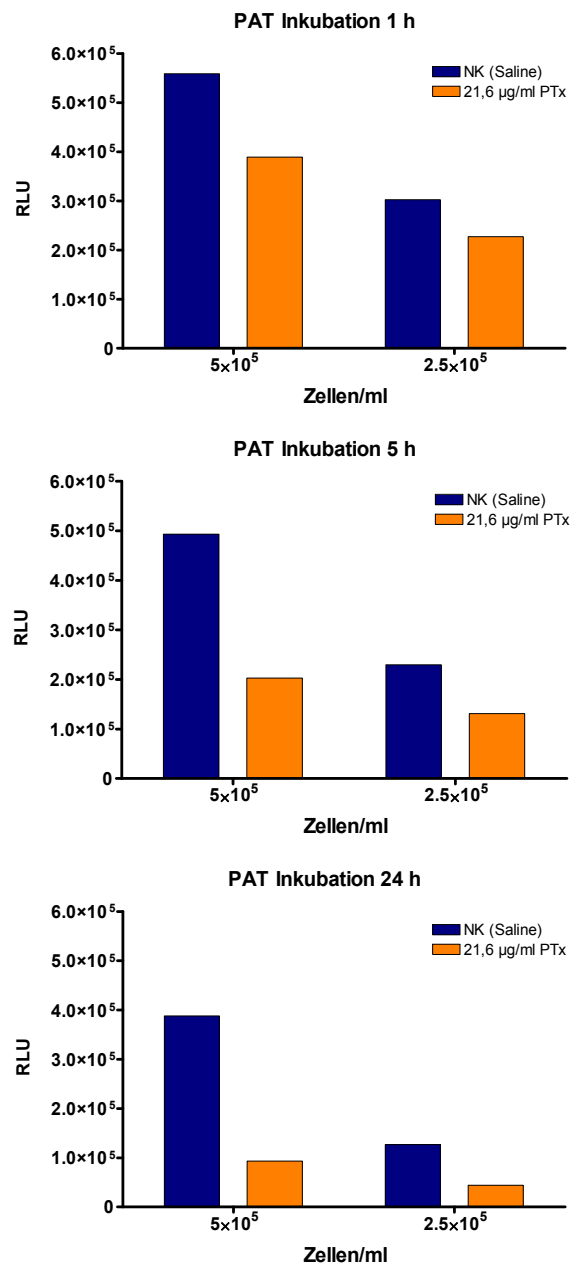


Abb. 33: Nachweis von aktivem PTx mit dem PAT. Frisch isolierte PBMCs (Pool von 2 Spendern) mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml wurden mit 21,6 µg/ml PTx oder klinischer Saline inkubiert und nach 1 h, 5 h und 24 h der ATP-Spiegel lumino-metrisch bestimmt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

Zusätzlich wurde parallel zum PBMC-Pool eine PBMC-Einzelspenderkontrolle durchgeführt, um auszuschließen, dass das Vereinen der Blutzellen unterschiedlicher Individuen selber das Testergebnis beeinflusst. Abbildung 34 zeigt die Einzelspenderkontrolle des PBMC-Pools, der in Abbildung 33 verwendet wurde. Exemplarisch wurde das Ergebnis nach 5 h Inkubation ausgewählt. Der ATP-Spiegel wurde bei allen drei PBMC-Proben (beiden Einzelspendern und Pool), die mit PTx (21,6 µg/ml) inkubiert wurden, im Vergleich zu den Werten der Negativkontrolle deutlich abgesenkt. Der ATP-

Spiegel der beiden Spender variiert, aber es zeigt sich deutlich und einheitlich dieselbe Aussage, dass PTx den ATP-Spiegel in derselben Art und Weise bei den Einzelspendern und deren Pool absenkt. Es darf geschlussfolgert werden, dass das Poolen der PBMC-Isolate verschiedener Spender keinen Einfluss auf das Testprinzip ausübt.

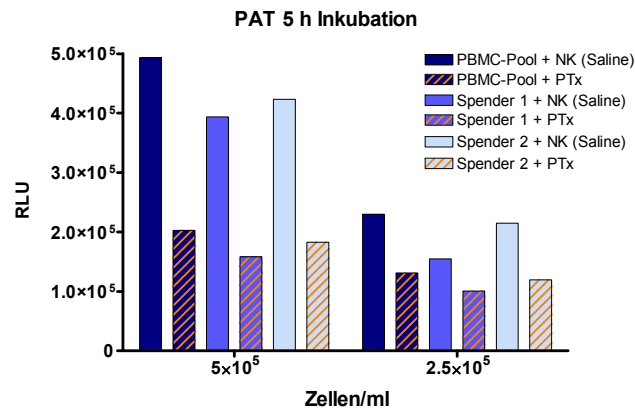


Abb. 34: Einzelspenderkontrolle des PBMC-Pools, um mögliche Interferenzen – aufgrund der Vereinigung von Blutzellen unterschiedlicher Spender – auf das Testsystem auszuschließen. $2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml von Spender 1 und Spender 2 sowie vom PBMC-Pool wurden mit $21,6 \mu\text{g/ml}$ PTx oder klinischer Saline inkubiert. Exemplarisch wurde der jeweilige ATP-Spiegel nach 5 h Inkubation ausgewählt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheit.

Um die Spezifität des Testsystems zu überprüfen, wurde die Aktivität eines nativen, originalen und eines inaktivierten PTx untersucht. Die beiden Toxin-Präparationen unterschieden sich lediglich darin, dass eine Hälfte der PTx-Probe mittels Hitze ($95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 Minuten) denaturiert wurde. In Abbildung 35 ist zu sehen, dass das unbehandelte PTx ($21,6 \mu\text{g/ml}$) die erwartete Senkung des ATP-Spiegels herbeiführte. Das inaktivierete PTx ($21,6 \mu\text{g/ml}$) hingegen ist nicht in der Lage, den ATP-Spiegel der Zellen zu beeinflussen. Die gemessenen ATP-Konzentrationen liegen auf derselben Höhe wie die der Kontrollzellen. Eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml scheint für den Test besser geeignet zu sein, da sich der ATP-Spiegel hier deutlicher abgesenkt, als die niedrigere Zellzahl mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml.

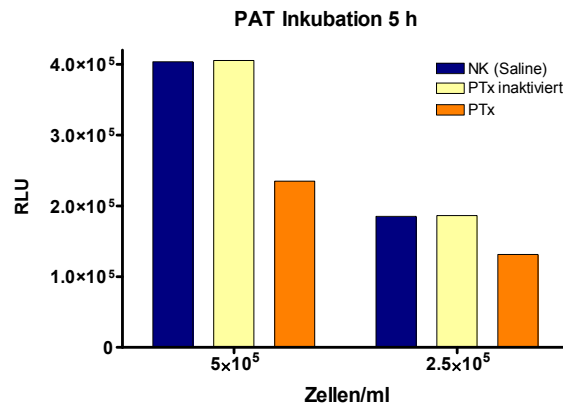


Abb. 35: Überprüfung der Spezifität des PAT mit Hilfe von hitzeinaktiviertem PTx. $2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml (frisch isolierter PBMC-Pool von 3 Spendern) wurden mit klinischer Saline, PTx (21,6 µg/ml) oder mittels hitze-inaktiviertem PTx (15 min, 95 °C; 21,6 µg/ml) inkubiert. Der ATP-Gehalt wurde nach 5 h Inkubation luminometrisch bestimmt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

3.6.3.2 Überprüfung und Charakterisierung möglicher Störgrößen

Nachdem nun die Grundlage für einen erfolgreichen Testaufbau erbracht worden war, musste in weiteren Schritten der Test auf mögliche Störfaktoren (wie z. B. freies ATP, LPS, andere mögliche Bestandteile des Impfstoffs) hin überprüft werden. Für die Überprüfung, ob freies, den Test möglicherweise beeinflussendes ATP in den Ansätzen vorhanden ist, wurde dieses aus den Proben mittels ATPase entfernt und mit den Werten von Proben, die ohne ATPase inkubiert wurden, verglichen. In Vorversuchen wurde zunächst die geeignete Konzentration an ATPase ermittelt, im eigentlichen Test (mit PBMCs und PTx) wurde stets parallel als Positivkontrolle eine ATP-Standardreihe ohne ATPase und eine mit ATPase mitgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Abbildung 36 zeigt den ATP-Spiegel frisch isolierter PBMCs (Pool von zwei Spendern) nach 24 h Inkubation im Zellkulturschrank (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) mit entweder Saline (ohne und mit ATPase) oder 21,6 µg/ml PTx (ohne und mit ATPase). Zwischen den Proben ohne ATPase und denen mit 0,05 U/ml ATPase besteht kaum ein Unterschied. Offensichtlich ist der Anteil an freiem ATP in den Proben nach 24 h Inkubation niedrig.

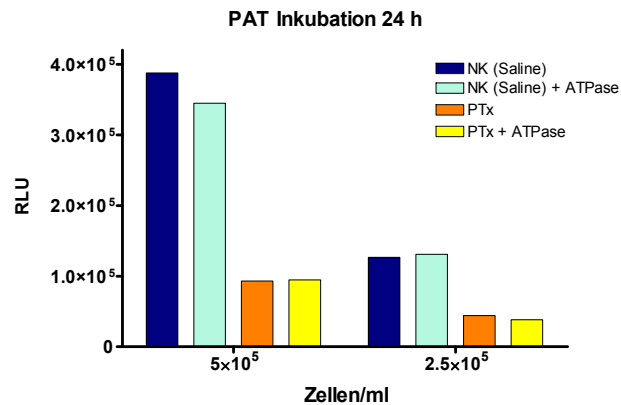


Abb. 36: Ausschluss von möglichen, durch freies ATP hervorgerufenen Interferenzen. $2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml (frisch isolierter PBMC-Pool von 2 Spendern) wurden mit klinischer Saline (ohne ATPase und mit 0,05 Units/ml ATPase) oder mit 21,6 $\mu\text{g/ml}$ PTx (ohne ATPase und mit 0,05 Units/ml ATPase) inkubiert. Der ATP-Gehalt wurde nach 24 h Inkubation bestimmt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

Ein weiterer möglicher interferierender Faktor, den es zu überprüfen galt, war Lipopolysaccharid (LPS). Bereits in Abschnitt 3.1.1 wurde gezeigt, dass in jeder PTx-Präparation eine Kontamination mit LPS vorlag (siehe Tabelle 15). LPS muss generell in der Zellkultur bzw. im Umgang mit Zellen als störender Effektor ausgeschlossen werden. Demnach wurden frisch isolierte PBMCs (Pool mit 3 Spendern) mit 10, 1 und 0,1 ng/ml *B. pertussis*-LPS inkubiert. In Abbildung 37 ist zu sehen, dass der ATP-Spiegel der Zellen nach 5 h Inkubation mit LPS, im Rahmen der Methodenstreuung auf gleicher Höhe des ATP-Spiegels der Kontrollzellen, die mit Saline inkubiert wurden, liegt. LPS ist somit kein Störfaktor für den PAT.

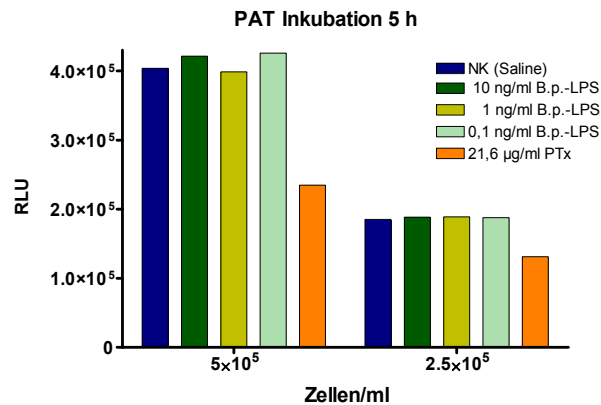


Abb. 37: Ausschluss von möglichen Interferenzen, die durch kontaminierendes LPS in den PTx-Präparationen hervorgerufen werden könnten. $2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml (frisch isolierter PBMC-Pool von 3 Spendern) wurden mit klinischer Saline, *B. pertussis*-LPS (10, 1 und 0,1 ng/ml) oder PTx (21,6 µg/ml) inkubiert. Der ATP-Gehalt wurde nach 5 h Inkubation bestimmt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

Neben LPS musste ebenso der potentielle Störfaktor Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) im PAT charakterisiert werden. In Abbildung 38 ist der ATP-Spiegel von frischen PBMCs (Pool von 3 Spendern) nach 1 h, 5 h und 24 h Inkubation mit 3 mg/ml $\text{Al}(\text{OH})_3$ dargestellt. Zum Vergleich wurden die Zellen ebenfalls mit 21,6 µg/ml PTx inkubiert. Nach 1 h Inkubation mit 3 mg/ml $\text{Al}(\text{OH})_3$, ist keine Beeinflussung des ATP-Spiegels zu erkennen. Die ATP-Konzentrationen liegen exakt auf der Höhe der mit Saline inkubierten Kontrollzellen. Die Zellen nach 1 h Inkubation mit PTx (21,6 µg/ml) hingegen weisen einen deutlich abgesenkten ATP-Spiegel auf. Nach 5 h Inkubation senkte sich der ATP-Spiegel der Zellen, die mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ inkubiert wurden, ebenfalls ab. Diese Absenkung fällt jedoch weit schwächer aus, als die durch PTx hervorgerufene Senkung. Nach 24 h Inkubation hingegen liegt der ATP-Spiegel der Zellen, die mit dem Adjuvans inkubiert wurden, unterhalb des ATP-Gehalts der mit PTx inkubierten PBMCs. Offenbar bewirkt das Adsorbens eine zeitabhängige Beeinflussung des Energiestoffwechsels.

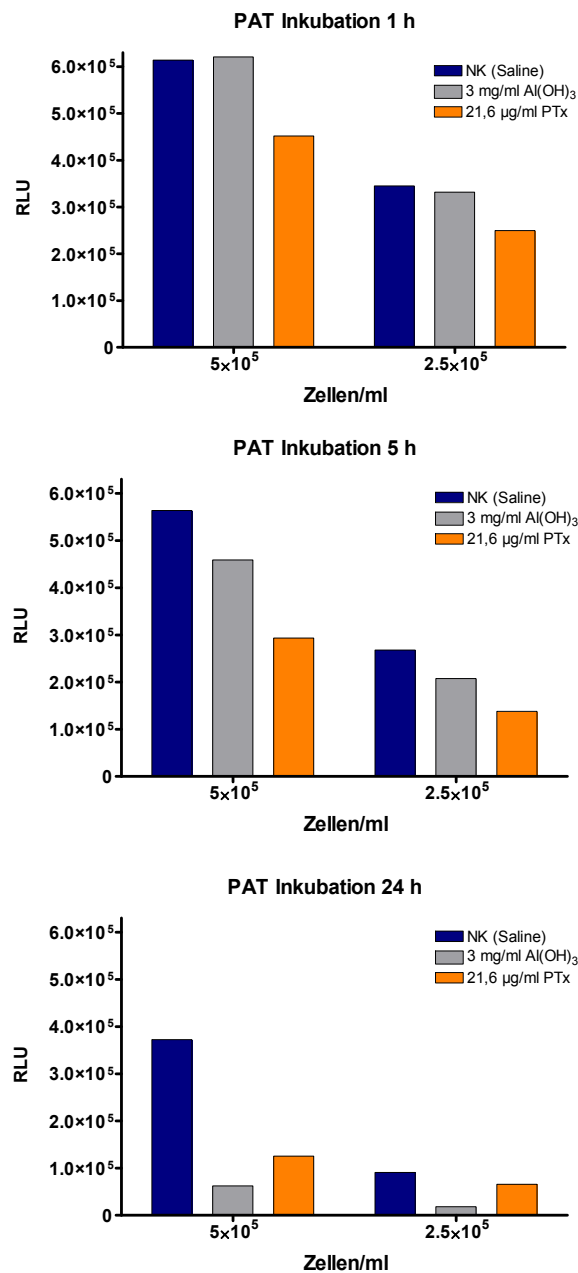


Abb. 38: Charakterisierung von möglichen Interferenzen durch das Adjuvans Al(OH)₃ als Bestandteil adsorbierter Pertussis-Impfstoffe. $2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml (frisch isolierter PBMC-Pool von 3 Spendern) wurden mit klinischer Saline oder 3 mg/ml Al(OH)₃ oder mit PTx (21,6 µg/ml) inkubiert. Der ATP-Gehalt wurde nach 1, 5 und 24 h Inkubation luminometrisch bestimmt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

3.6.3.3 Der PAT im Vergleich mit dem Tierversuch

Im Rahmen der Versuche zum Pertussis-Monozyten-Aktivierungstest (siehe Abschnitt 3.2.5) wurde ein Maus-Histamin-Sensibilisierungstest (HIST) mit unbehandeltem und LPS-abgereichertem PTx durchgeführt, um die intakte Proteinstruktur und somit die toxischen Eigenschaften der Toxine zu kontrollieren (siehe 3.2.5, Tabelle 18). Um so

wenige Tierversuche wie möglich durchführen zu müssen, wurden diese beiden im HIST getesteten Proben parallel ebenfalls im PAT eingesetzt. Abbildung 39 (A) zeigt den Einfluss von unbehandeltem PTx und LPS-abgereichertem PTx auf frisch isolierte PBMCs (Pool von 4 Spendern) nach 5 h Inkubation im PAT. Beide senken den ATP-Spiegel der Zellen im gleichen Maße ab. Eine Beeinträchtigung der Toxizität durch die LPS-Abreicherung ist nicht zu vermerken. In Abbildung 39 (B) sind zum Vergleich die Werte des HIST von Tabelle 18 (siehe 3.2.5) grafisch dargestellt. Vergleichbar zu den Negativkontrollen im PAT, die die höchsten ATP-Werte zeigen, weist hier die Kontrollgruppe, der kein Pertussis-Toxin verabreicht wurde, 100 % lebende Tiere auf. Die PTx-Gruppe und LPS-abgereicherte PTx-Gruppe hingegen zeigen, genauso wie der PAT, die Toxizität beider Pertussis-Toxine auf. Im Vergleich zum PAT scheint das originale PTx jedoch etwas toxischer für die Mäuse zu sein als die LPS-abgereicherte Probe. Dieses korreliert wiederum mit dem Proteinverlust, der bereits bei der Proteinbestimmung und SDS-PAGE im Rahmen der Versuche von Abschnitt 3.2 beobachtet wurde (siehe Tabelle 17 und Abbildung 18). Dieser Verlust scheint sich bei den niedrigen Konzentration von 50 und 100 ng Toxin pro Maus im Tierversuch bemerkbar zu machen.

Es wurde gezeigt, dass der PAT ebenso wie der HIST geeignet ist, die Toxizität von PTx nachzuweisen (siehe auch 3.2.5 Tabelle 18).

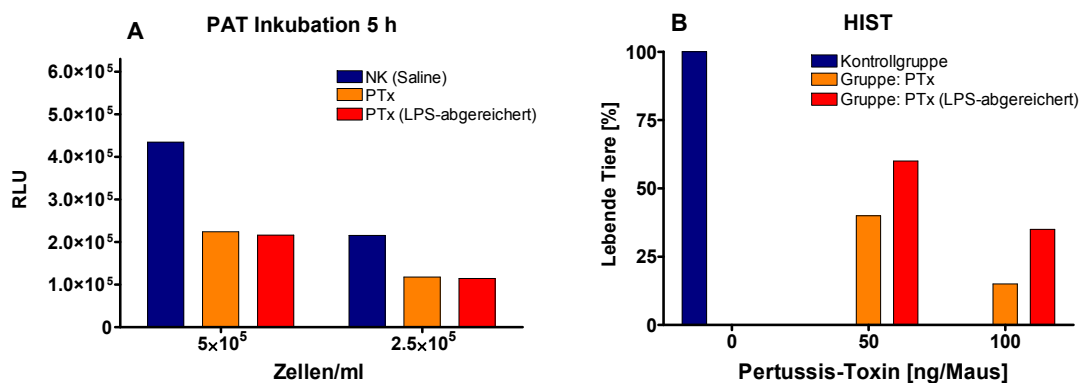


Abb. 39: (A) PAT-Test mit parallel im Tierversuch getesteten PTx und LPS-abgereicherten PTx (jeweils 21,6 µg/ml). Verwendet wurden frisch isolierten PBMCs (Pool von 4 Spendern) mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml. Die Kontrollzellen wurden mit klinischer Saline inkubiert. Der ATP-Gehalt wurde nach 5 h Inkubation luminometrisch bestimmt. NK: Negativkontrolle. (B) Grafische Darstellung des HIST (siehe auch Tabelle 18). Den Mäusen der Kontrollgruppe war Verdünnungsmittel (PBS mit 2 g/l Gelatine), der PTx-Gruppe unbehandeltes PTx und der LPS-abgereicherten-PTx-Gruppe mittels END-X Beads LPS-abgereichertes PTx injiziert worden. RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

3.6.4 Entwicklung des PAT (Phase B: Jurkat-Zellen und Kryo-PBMCs)

Nachdem der PAT in der Phase A sich als geeignet erwies, aktives PTx nachzuweisen und zudem gezeigt wurde, dass er unempfindlich gegenüber möglicher Störfaktoren

wie z. B. kontaminierendes LPS ist, wurde der Test im Interesse besserer Praktikabilität weiterentwickelt. In dieser Entwicklungsphase (Phase B) wurde die Inkubation in einer 24-Well-Zellkulturplatte durchgeführt. Für die Messung wurden die Proben in eine weiße, für die luminometrische Detektion geeignete 96-Well-Zellkulturplatte überführt (siehe auch Abbildung 10 und Tabelle 22). Als Indikatorzelle wurden neben den frisch isolierten PBMCs auch Zellen der permanenten Zelllinie Jurkat im PAT eingesetzt und auf Eignung überprüft. Zudem wurden Protokolle zum Kryokonservieren frisch isolierter PBMCs sowie entsprechende Auftauprotokolle der Kryo-PBMCs entwickelt. Die Vitalität und Differenzierbarkeit der Kryo-PBMCs wurde im Durchflusszytometer überprüft und mit den Daten frisch isolierter PBMCs verglichen. Im Folgenden sind diese Ergebnisse der PAT-Entwicklungsphase B dargestellt.

3.6.4.1 Nachweis von aktivem PTx; Installation der T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat als Indikatorzelle

In Abbildung 40 ist der ATP-Spiegel frisch isolierter PBMCs (Pool von 3 Spendern) nach 5 h Inkubation mit verschiedenen PTx-Konzentrationen im Balkendiagramm dargestellt. Wie sich in Phase A bereits zeigte, scheint eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml besser geeignet zu sein, da sich hier die beste Abstufung des ATP-Spiegels der Zellen zeigt.

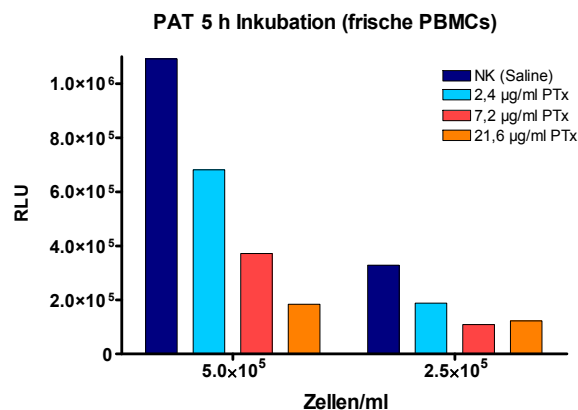


Abb. 40: ATP-Spiegel frisch isolierter PBMCs (Pool von 3 Spendern) nach 5 h Inkubation mit verschiedenen PTx-Konzentrationen, durchgeführt nach PAT Phase B, luminometrisch bestimmt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

Neben den frisch isolierten Primärzellen wurden zudem die bereits unter 3.6.1 (Abbildung 32) vorgestellten und charakterisierten Zellen der permanenten Zelllinie Jurkat im PAT eingesetzt und deren Eignung überprüft. Abbildung 41 zeigt die ATP-Messung von Jurkat-Zellen in unterschiedlicher Zellzahl ($2,5 \times 10^5$ und 5×10^5 Zellen/ml) nach 5 h Inkubation mit drei verschiedenen PTx-Konzentrationen (2,4, 7,2 und 21,6 µg/ml). Auch die Jurkat-Zellen sind als Indikatorzelle für aktives PTx geeignet. Ebenso wie bei den frisch isolierten PBMCs zeigt der Ansatz mit einer höheren Zellzahl von

5×10^5 Zellen/ml eine klarere und bessere dosis-abhängige Abstufung. Somit stellt diese Zelllinie eine zusätzliche Indikatorzelle zu den PBMCs dar.

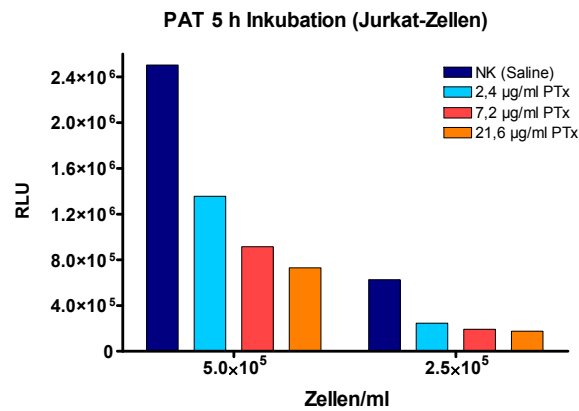


Abb. 41: Einsatz von Jurkat-Zellen im PAT, um deren Eignung als weitere mögliche Indikatorzelle zu überprüfen. Nach 5 h Inkubation der unterschiedlich konzentrierten Jurkat-Zellen (Passage 2) mit 2,4, 7,2 oder 21,6 µg/ml PTx, wurde der ATP-Spiegel lumino-metrisch bestimmt. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

Parallel wurden die im PAT eingesetzten Jurkat-Zellen zudem einem Vitalitätstest im Durchflusszytometer unterzogen. Hierbei werden die Zellen den Fluoreszenzfarbstoffen Thiazolorange (FL1) und Propidiumjodid (FL3) zusammengebracht. Thiazolorange färbt die lebenden Zellen, Propidiumjodid die toten Zellen. Abbildung 42 zeigt das Ergebnis des Vitalitätstests mit Jurkat-Zellen der Passage 2. In der Grafik wurden die berechneten Zahlen an lebenden und toten Zellen in Prozent eingefügt. Die Gesamtzellzahl betrug $1,54 \times 10^6$ Zellen/ml, wovon 85,39 % lebende Zellen, 10,19 % beeinträchtigte Zellen und 4,20 % tote Zellen vertreten sind.

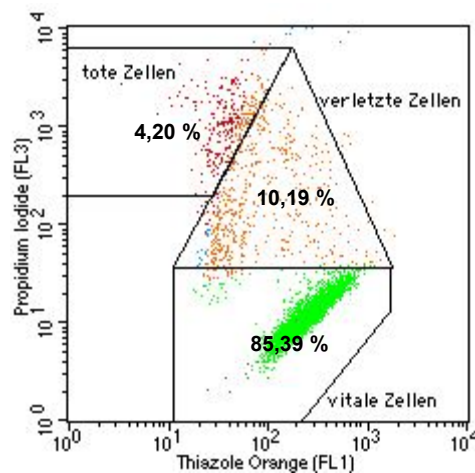


Abb. 42: Vitalitätskontrolle der im PAT verwendeten Jurkat-Zellen (Passage 2) mit einer Gesamtzellzahl von $1,54 \times 10^6$ Zellen/ml. Mit Hilfe der Farbstoffe Thiazolorange und Propidiumjodid konnten 85,39 % vitale und 4,20 % tote Zellen in der Probe ermittelt werden, weitere 10,19 % der Zellen werden als beeinträchtigt bewertet.

3.6.4.2 Einführung und Charakterisierung von Kryo-PBMCs als Indikatorzelle

Im Hinblick auf eine spätere einfache Anwendbarkeit für einen reibungslosen Methodentransfer und die Möglichkeit einer zumindest chargenweisen Standardisierung, wurden Protokolle entwickelt, um kryokonservierte PBMCs im PAT einzusetzen. Hierzu wurden sowohl unterschiedliche Einfriermethoden als auch entsprechende Auftaumethoden mit dem Anspruch erarbeitet, einfach und dennoch zellschonend vorzugehen. Nachdem ein Grundrezept entwickelt war, wurden für die Kryokonservierung der Zellen unterschiedliche Einwirkzeiten des Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) ausgearbeitet. Ebenso wurde entsprechend die optimale Technik für den Auftauvorgang ermittelt. Für den Versuch, dessen Ergebnisse in Abbildung 43 dargestellt sind, wurden die PBMCs (Pool von 6 Spendern) nach der Isolation nach 5, 30 und 60 Minuten Einwirkzeit mit 10 % DMSO (verdünnt im vereinigten Plasma der Spender) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach fünf Tagen wurde jeweils ein Röhrchen jeder Konservierungsart mit Kryo-PBMCs im Wärmeschrank (11 Minuten 30 Sekunden) und im Wasserbad (2 Minuten) aufgetaut. Die Zellzahl wurde nach dem Waschvorgang jeweils auf $4,3 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt und die Zellen mit PTx (2,4, 7,2 und 21,6 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Abbildung 43 zeigt den ATP-Gehalt nach 1 h, 5 h und 24 h Inkubation. Interessanterweise weisen die Zellen nach 1 h und 5 h Inkubation einen deutlich niedrigeren ATP-Spiegel als nach 24 h Inkubation auf. Generell scheint kein Einfrier- und Auftauprotokoll sowie deren Kombinationen, die Zellen in ihrer Funktion vollständig zu beeinträchtigen. Dennoch sind Unterschiede zu sehen, wie z. B. in Abstufung und Sensitivität. Demnach wurde folgendes Protokoll ausgewählt: 30 Minuten DMSO-Einwirkzeit vor dem Einfrieren und späteres Auftauen im Wärmeschrank (siehe Abbildung 43, schwarz umrandete Grafik).

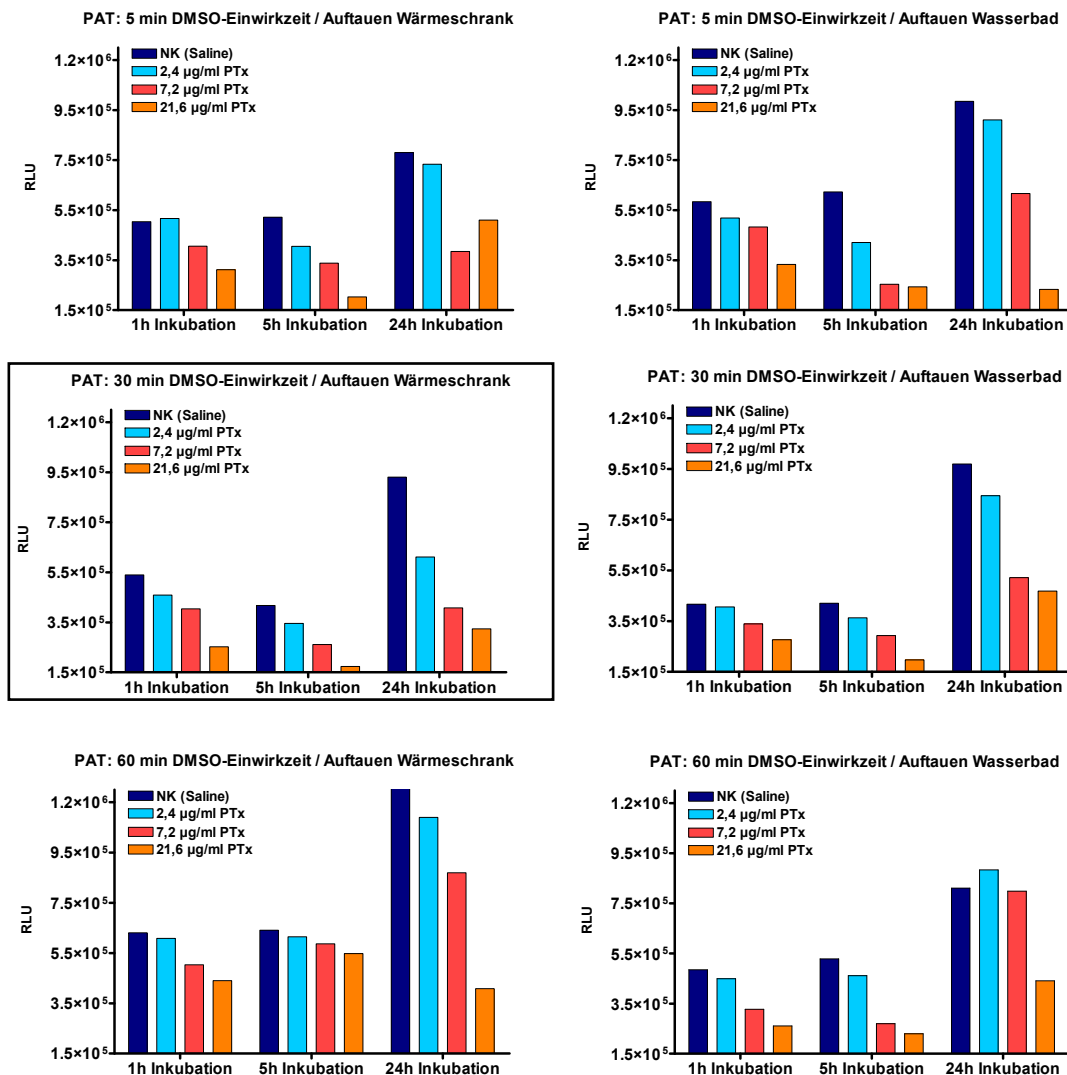


Abb. 43: Unterschiedliche Einfrier- und Auftaumethoden zur Etablierung eines geeigneten Protokolls, um Kryop-BMCs für den Einsatz als Indikatorzellen im PAT herzustellen. Die Einwirkzeiten des Gefrierschutzmittels DMSO vor dem Einfrieren betragen 5, 30 und 60 Minuten. Das Auftauen für den Einsatz im PAT erfolgte entweder für 11 Minuten und 30 Sekunden im Wärmeschrank bei 37 °C oder für 2 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad. Der ATP-Gehalt der unterschiedlich konservierten Kryop-BMCs (Pool von 6 Spendern; $4,3 \times 10^5$ Zellen/ml) wurde nach 1h, 5 h und 24 h Inkubation luminometrisch gemessen. Die aufgrund ihrer besten dosis-abhängigen Abstufung ausgewählte Einfrier- und Auftau-Kombination (30 Minuten DMSO-Einwirkzeit mit Auftauphase im Wärmeschrank) ist mit einem schwarzen Rahmen gekennzeichnet. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzeinheiten.

Ebenso wie die frisch isolierten PBMCs und Jurkat-Zellen (siehe 3.6.1, Abbildung 31 und 32) wurden die nach dem oben ausgewählten Protokoll hergestellten Kryop-BMCs immunchemisch und hämatologisch analysiert. Zusätzlich wurde noch eine Vitalitätskontrolle im Durchflusszytometer vorgenommen und deren Werte mit den Daten frisch isolierter PBMCs verglichen.

Die Ergebnisse der Differenzierung einer Kryo-PBMC-Probe eines humanen Einzelspenders im Durchflusszytometer ist exemplarisch in Abbildung 44 und der dazugehörigen Tabelle 23 zu sehen. Die Zellprobe wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Abbildung 44 (A) zeigt die phänotypische Auftrennung der Zellen im Streulicht nach relativer Größe und Granularität. Die Lymphozyten (orange dargestellt) siedeln sich aufgrund ihrer geringen Größe und schwachen Granulierung unterhalb der größeren und stärker granulierten Monozyten (grün dargestellt) an. Abbildung 44 (B) zeigt die CD45-positiven PBMCs, die somit von unmarkierten Debris abgetrennt waren. In Abbildung 44 (C) ist die Auftrennung der Leukozyten in Monozyten und Lymphozyten zu sehen, die über die Fluoreszenzmarkierung des CD14 Rezeptors der Monozyten erfolgte. Granulozyten sind in der Kryo-PBMC-Präparation so gut wie nicht vertreten (siehe auch Tabelle 23).

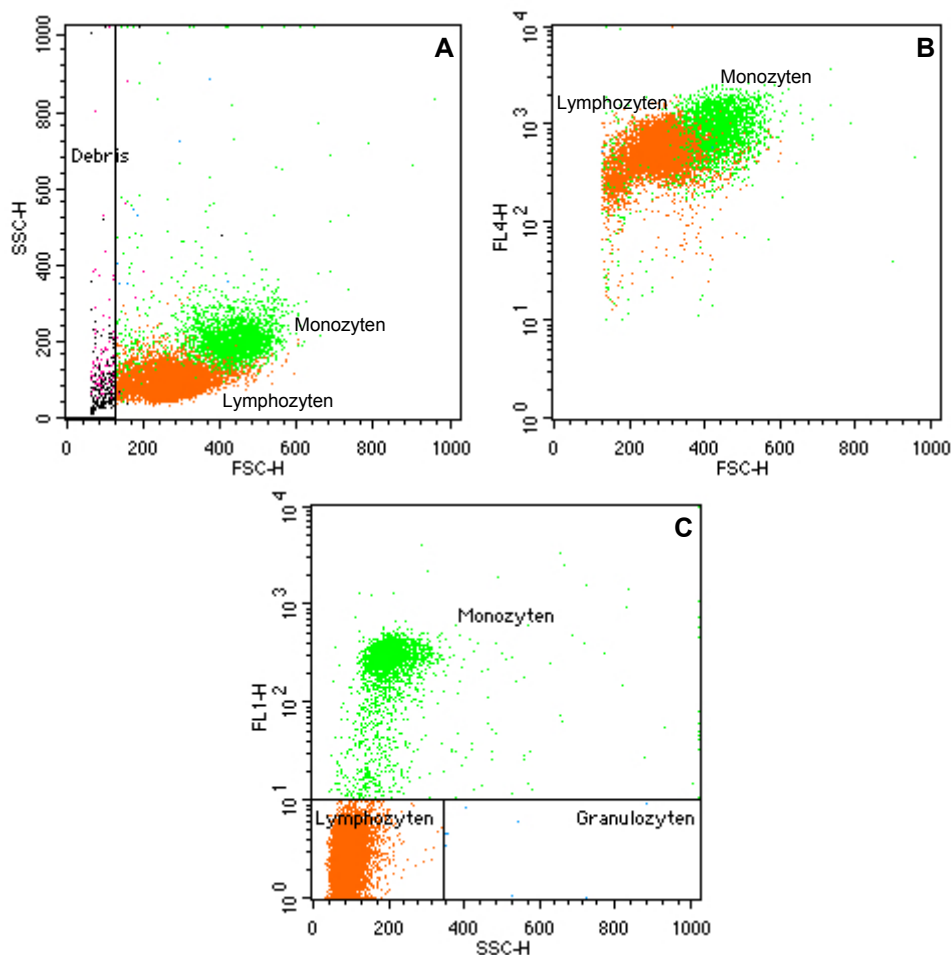


Abb. 44: Differenzierung von Kryo-PBMCs (Einzelspender) mittels Durchflusszytometrie. (A) Phänotypische Auftrennung der Zellen im Streulicht, nach Größe (X-Achse: FSC; forward scatter) und Granularität (Y-Achse: SSC; sideward scatter); (B) CD45-positive Zellen, die mit dem AK-Fluoreszenzfarbstoff APC (FL 4, Y-Achse) markiert sind, wurden gegen die relative Größe (X-Achse, FSC) aufgetragen; (C) Identifizierung der Monozyten über den spezifischen CD14 Rezeptor. Der FITC-markierte anti-CD14 AK (Y-Achse, FL1) wurde gegen die Granularität (X-Achse, SSC) aufgetragen.

Anhand der Differenzierung mittels Durchflusszytometer (siehe Abbildung 44) wurden die Zellpopulationen der Kryo-PBMC-Präparation prozentual ermittelt (siehe Tabelle 23). Die Zahlen der hämatologischen Differenzierung sind ebenfalls in Tabelle 23 aufgeführt. Die im Zellzählgerät gemessenen Zahlen decken sich mit den im Durchflusszytometer ermittelten Werten. Die immunchemisch berechnete Anzahl von 78,12 % Lymphozyten weicht hämatologisch gemessen um circa 3 % ab. Die mit 21,76 % im Durchflusszytometer ermittelte Monozyten-Anzahl liegt 4 % höher als der hämatologisch gemessene Wert. Entsprechend den frisch isolierten PBMCs sind auch hier die Granulozyten mit nur noch rund 1 % (Hämatometer) vertreten.

Tab. 23: Differenzierung von Kryo-PBMCs (Einzelspender), immunchemisch im Durchflusszytometer ermittelt und parallel im hämatologischen Zellgerät gemessen.

[% Leukozyten]	Zellpopulationen (Kryo-PBMCs)	
	Durchflusszytometer	Hämatometer
Monozyten	21,76	17,75
Granulozyten	0,12	1,03
Lymphozyten	78,12	81,25

Neben der hämatologischen und immunchemischen Differenzierung wurde zudem ein Vitalitätstest mit den Kryo-PBMCs und zum Vergleich mit frisch isolierten PBMCs durchgeführt. Hierbei werden die Zellen – wie bereits für die Vitalitätskontrolle der Jurkat-Zellen – mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Thiazolorange und Propidiumjodid) zusammengebracht. Abbildung 45 (A) zeigt exemplarisch das Ergebnis des Vitalitätstests mit frisch isolierten PBMCs eines Einzelspenders. Abbildung 45 (B) beinhaltet die Auswertung des Vitalitätstests für Kryo-PBMCs. Eine Rate von 93,02 % lebender Zellen in der Kryo-PBMC-Probe bestätigt die Eignung dieser Konservierungsmethode. Der Vergleich mit den Werten frisch isolierter PBMCs ergibt nur sehr geringe Unterschiede. Die Anzahl an toten Zellen hat um etwas mehr als 1 % zugenommen. Insgesamt hat sich die Anzahl an lebenden Zellen der Kryo-PBMC-Präparation, trotz Einfrier- und Auftauprozedere, im Vergleich mit den frisch isolierten PBMCs um weniger als 5 % verringert.

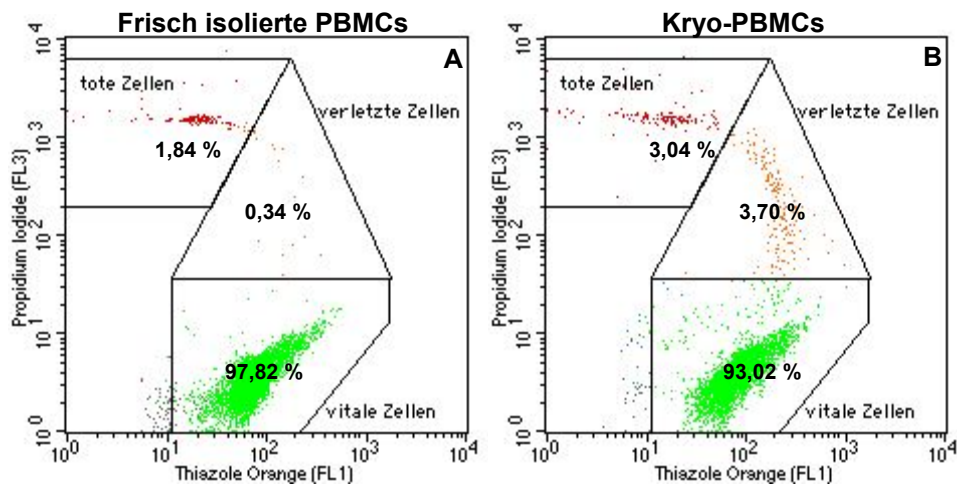


Abb. 45: Vitalitätskontrolle im Durchflusszytometer von Kryo-PBMCs im Vergleich mit frisch isolierten PBMCs. (A) Frisch isolierte PBMCs (Einzelspender) mit einer Gesamtzellzahl von $1,12 \times 10^6$ Zellen/ml; (B) Kryo-PBMCs (Einzelspender) mit einer Gesamtzellzahl von $1,12 \times 10^6$ Zellen/ml. Trotz Einfrier- und Auftauprozedur wurde die Anzahl an lebenden Zellen der Kryo-PBMC-Präparation im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen um weniger als 5 % verringert.

In der nächsten Entwicklungsphase (Phase C) des PAT wurde der Test noch weiter vereinfacht. Hiermit sollte die Grundlage gelegt werden, den Test später für einen breiten Anwenderkreis, in den unterschiedlichsten Laboratorien mit dort verschiedensten anzutreffenden Voraussetzungen, zugänglich zu machen..

3.6.5 Entwicklung des PAT (Phase C: Einführung des „One-Plate-Assay“)

Nachdem der PAT in der Entwicklungsphase B mit der erfolgreichen Einführung von Kryo-PBMCs als Indikatorzellen bereits schon wesentlich vereinfacht wurde, sollte in der Entwicklungsphase C die Grundlage gelegt werden, den PAT noch einfacher und schneller durchführbar zu machen. Wie bereits in Tabelle 22 (Phase C) zu sehen, soll der PAT als sogenannter „One-Plate-Assay“ durchführbar sein. Dies bedeutet, dass die Inkubation und die Messung in ein und derselben Platte stattfinden. Hinzu kommt, dass aufgrund des Versuchsdesigns von Phase B durch den Transfer der Probe von der Inkubationsplatte zur Messplatte automatisch eine Fehlerquelle gegeben ist, die zu nennenswerten Schwankungen der Ergebnisse führen kann, die im „One-Plate-Assay“ nicht mehr auftreten würden.

Abbildung 46 zeigt die Inkubation von sieben verschiedenen PTx-Präparaten im PAT mit Kryo-PBMCs (Pool von 5 Spendern), nach Versuchsdurchführung Phase C organisiert. Um mögliche Schwankungen zu minimieren, wurden die Kryo-PBMCs in der 96-Well-Zellkulturplatte mittels elektronischem Mehrfachdispenser verteilt. Die Zellzahl nach dem Auftau- und Waschvorgang betrug 5×10^5 Zellen/ml. Zur Überprüfung von Intertestschwankungen wurden die Zellen insgesamt in 21 Kavitäten mit steriler isotonischer Kochsalzlösung inkubiert. Die Proben mit den jeweiligen PTx-Präparationen

wurden im Dreifachansatz getestet. In Abbildung 46 ist zu sehen, dass nach 1 h Inkubation in der 96-Well-Zellkulturplatte lediglich die höchste Konzentration (21,6 µg/ml) von PTx und PTx 2 den ATP-Spiegel zu senken vermag. Nach 24 h Inkubation induzieren sämtliche PTx-Proben eine dosis-abhängige ATP-Spiegelsenkung. Die 21 gemittelten Ansätze der Kontrollzellen, inkubiert mit klinischer Saline, weisen eine sehr niedrige Standardabweichung auf. Die Versuchsdurchführung als „One-Plate-Assay“ zeigt somit die gute Voraussetzungen, als standardisierbares Testprinzip weiterentwickelt zu werden.

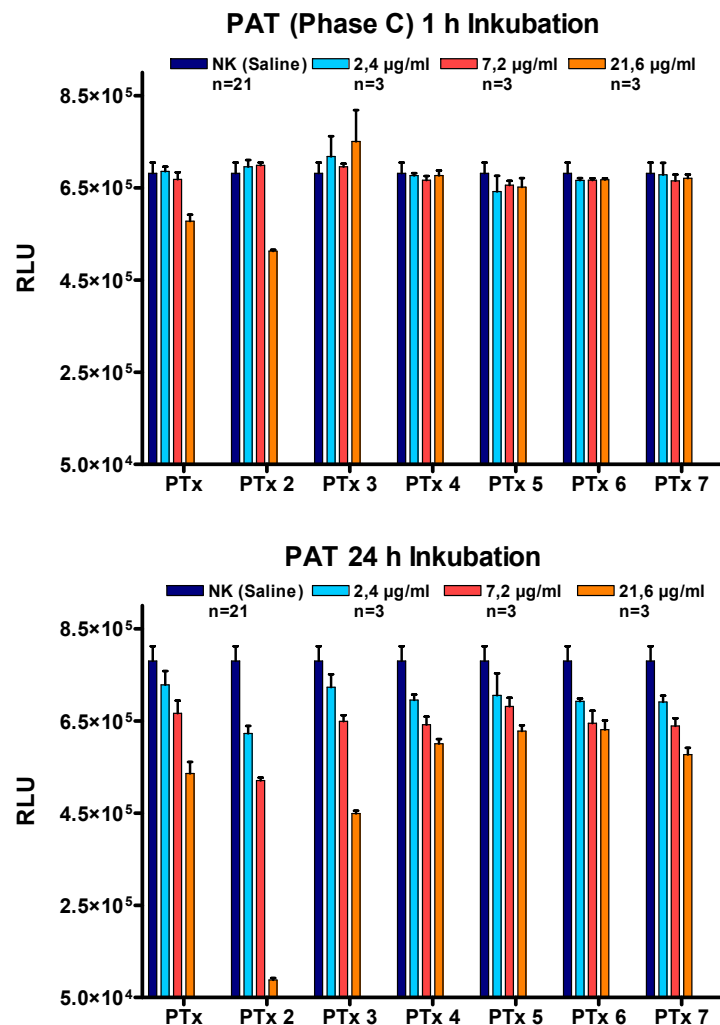


Abb. 46: PAT als „One-Plate-Assay“ nach Versuchsvorschrift der Phase C durchgeführt. Sieben verschiedene PTx unterschiedlichster Anbieter wurden 24 h mit Kryo-PBMCs (Pool von 5 Spendern) inkubiert. Nach 1 h und 24 h wurde der ATP-Gehalt lumino-metrisch bestimmt. Die Zellzahl betrug 5×10^5 Zellen/ml. Die dünnen schwarzen Linien stellen die Standardabweichung dar. NK: Negativkontrolle; RLU: Relative Lumineszenzenheiten.

3.6.6 Orientierende Versuche zum PTx-Nachweis in komplexen Impfstoffen

Die Testung und Validierung von komplexen, polyvalenten Impfstoffen mit Pertussis-Adsorbat-Komponente im PAT würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Dennoch wurde im PAT orientierend gelöstes PTx in einem später zu überprüfenden Endprodukt getestet. Hierfür wurde ein gängiger auf dem Markt frei erhältlicher tetravalenter Impfstoff (DTPa-IPV-Impfstoff, siehe Tabelle 9) ausgewählt und im Test mit aktivem PTx versetzt (sogenanntes Spiken) eingesetzt. Dabei war uns bewusst, dass sich an Adsorbat gebundenes aktives Toxin anders verhalten kann als freies. Der PAT (Phase B) wurde mit Kryo-PBMCs (Pool von 4 Spendern) durchgeführt. Zum einen wurden die Zellen mit PTx alleine inkubiert, zum anderen mit dem adsorbierten Impfstoff und PTx-Spike. Hierfür wurde eine PTx-Verdünnungsreihe von 78 ng/ml bis zur Sensitivitätsgrenze von 5 ng/ml angesetzt. Abbildung 47 zeigt den detektierten ATP-Gehalt der Kryo-PBMCs, inkubiert mit Impfstoff und Spike oder alleinig mit PTx (jeweils $n=3$), nach 5 h Inkubation. Der Impfstoff enthielt 0,66 mg/ml Aluminium (Al) als unlösliches Aluminiumsalz des Adsorbens. Abbildung 47 lässt weiter erkennen, dass die PTx-Proben (ohne Impfstoff) eine klare dosis-abhängige Abstufung hervorrufen. Auch die Proben mit Impfstoff und PTx-Spike lassen eine leichte dosis-abhängige Abnahme des ATP-Spiegels erkennen, die jedoch noch ausbaufähig ist. Alle Werte, selbst die der Sensitivitätsgrenze mit 5 ng/ml, setzen sich dennoch deutlich von der Negativkontrolle (klinische Saline) ab. Dieses vielversprechende Ergebnis muss in weiteren Versuchen mit komplexen Impfstoffen ausgearbeitet und verifiziert werden.

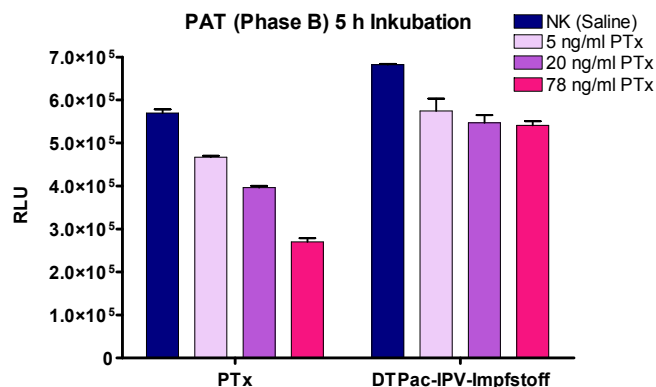


Abb. 47: PAT mit PTx und einem tetravalenten Adsorbat-Impfstoff. Der DTPac-IPV-Impfstoff (siehe unten) wurde entweder mit klinischer Saline oder mit PTx (78 ng/ml bis 5 ng/ml) versetzt, um zu überprüfen, ob eine Wiederfindung möglich ist. Nach 5 h Inkubation wurde der ATP-Spiegel der auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellten Kryo-PBMCs (Pool von 4 Spendern) gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte ($n=3$) mit Standardabweichung. NK: Negativkontrolle; DTPac-IPV: Diphtherie, Tetanus, Pertussis (azelluläre Komponente) Poliomyelitis (inaktiviert); RLU: Relative Lumineszenzeinheit.

4 Diskussion

Weltweit existiert keine anerkannte Alternative zum Tierversuch, um adsorbierte Pertussis-Impfstoffe auf restlich aktives Pertussis-Toxin hin zu untersuchen. Der im Europäischen Arzneibuch vorgeschriebene Tierversuch (Histamin-Sensibilisierungstest) an Mäusen besitzt nach Erfahrungen des Paul-Ehrlich-Institutes (PEI) und anderer nationaler Kontrollbehörden wie z. B. dem National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Großbritannien), dem Netherlands Vaccine Institute (NVI, Niederlande) oder der Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS, Frankreich) eine derart schlechte Aussagekraft, dass Wiederholungen unumgänglich sind. Ein existierendes *In vitro*-Verfahren, das auf der Clusterbildung von CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary cells) beruht, kann nicht am fertig konfektionierten, adsorbierten Endprodukt durchgeführt werden. Der Vorschlag der Expertengruppe 15 des European Department for the Quality in Medicine (EDQM, Council of Europe, Straßburg), auf den Tierversuch am fertigen Impfstoff als Bulk oder an der Fertigzubereitung zu verzichten, wurde von einigen Ländern in der Sitzung der Europäischen Arzneibuch-Kommission abgelehnt. Um die diesbezüglichen Tierversuche zu ersetzen, wird folglich ein *In vitro*-Test benötigt, der die Untersuchung auf Toxinfreiheit am Endprodukt erlaubt.

Diese Notwendigkeit ist auch anderen Arbeitsgruppen bewusst. Demnach beschäftigen sich weltweit mehrere Forschungsgruppen mit dem Vorhaben, einen *In vitro*-Test für Pertussis-Adsorbat-Impfstoffe zu entwickeln. Auf internationalen Kongressen konnte ein wissenschaftlicher Austausch über die Entwicklungen der verschiedenen Projekte stattfinden. Die Messmethoden werden bewusst erst an dieser Stelle beschrieben, da deren Entwicklungen parallel zu dieser Arbeit stattgefunden haben und somit zeitliche Überschneidungen unvermeidbar waren.

Im Rahmen des Kongresses „Pharmacology of Vaccines“ im Mai 2009 auf Kuba und des 7. Weltkongresses „Alternatives and Animal Use in the Life Sciences“ im September 2009 in Rom wurde der im Rahmen dieser Promotion entwickelte Pertussis-ATP-Test vorgestellt. Ebenfalls präsentierten Coenraad Hendriksen und seine Arbeitsgruppe vom NVI ihr alternatives Testprinzip, wonach aktives PTx in adsorbierten Impfstoffen über den cAMP-Spiegel vaskulärer glatter Muskelzellen der Zelllinie A-10, isoliert aus der Thoraxaorta von Rattenembryonen, nachgewiesen wird [59]. Dieser cAMP-Test greift ebenfalls wie der Pertussis-ATP-Test am Energiestoffwechsel von Indikatorzellen an. Die verwendeten Zellen und das zu testende Substrat unterscheiden sich jedoch grundlegend. Ein wechselseitiger Transfer dieser beiden Methoden mit dem Ziel des Methodenvereinfachens hinsichtlich Aussagekraft, Sensitivität und Praktikabilität, ist für das nächste Jahr geplant.

Neben diesem 2009 vorgestellten Ansatz der holländischen Kontrollbehörde wurde 2007 auf dem 6. Weltkongress „Alternatives and Animal Use in the Life Sciences“ in

Tokio von der englischen Kontrollbehörde NIBSC ein Prinzip zum Nachweis von aktivem PTx in adsorbierten Impfstoffen vorgestellt, welches jedoch recht aufwendig ist. Die Bindung und die enzymatische Aktivität des Toxins werden hier in zwei getrennten Reaktionen nachgewiesen [43, 154]. Die vom NIBSC verfolgte Testidee zum Nachweis der Toxizität der A-UE wurde erstmals 2001 von einer Arbeitsgruppe der kanadischen Kontrollbehörde Biologics and Genetic Therapies Directorate (BGTD), publiziert [26]. Hierbei wird aktives PTx, bzw. die enzymatische Aktivität der A-UE, über die ADP-Ribosylierung eines Fluorescein-markierten, synthetischen $G\alpha_{i3}C20$ Peptids mittels „Reverse-Phase Enzymatic-High Performance Liquid Chromatography“ (RP-HPLC) nachgewiesen [26, 154]. Auch die unabhängig durchzuführende zweite Testmethode zur Überprüfung der B-UE wird sowohl vom NIBSC als auch vom BGTD verfolgt. Beide versuchen über die Bindung der B-UE des PTx an artifizielle Affinitätsstrukturen (Glycoproteine, wie z. B. Fetuin oder bestimmte Oligosaccharide) einen ELISA aufzubauen [43, 60]. Diese an sich elegante Lösung birgt jedoch berechtigte Zweifel und Nachteile, so dass die Entwicklung dieses Testsystems noch nicht abgeschlossen ist. Das Messprinzip, um die A-UE mittels HPLC zu überprüfen, stellt eine methodisch anspruchsvolle Versuchsdurchführung dar. Sowohl die Labore als auch das Personal, das den Versuch durchführt, müssen entsprechend ausgestattet und ausgebildet sein. Vor allem die Auswertung der Ergebnisse erfordert viel Erfahrung. Die Basislinie und die jeweiligen Peaks des fluoreszierenden Substrates und des von PTx hervorgebrachten fluoreszierenden Produktes sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit sehr schwer zu interpretieren. Der entwickelte ELISA zur Affinitätsstudie der B-UE kann nicht direkt mit adsorbierten Pertussis-Impfstoffen durchgeführt werden, da das Adjuvans Aluminiumhydroxid ($Al(OH)_3$) den Test stört. Eine quantitative Aussage ist nicht möglich, solange Aluminiumsalze anwesend sind, weil das an $Al(OH)_3$ als feste Phase gebundene PTx schlechter an die Wandstrukturen (z. B. Fetuin) der ELISA-Platte binden kann. Eine gebundene B-UE blockiert wiederum durch das anhängende $Al(OH)_3$ sterisch die Bindung von weiteren B-UE in unmittelbarer Nachbarschaft und wird teilweise bei den Waschschrritten aufgrund der großen unlöslichen Partikel aus $Al(OH)_3$ wieder abgelöst. Das NIBSC versucht deswegen, über Vorbehandlungen der Proben das $Al(OH)_3$ vom PTx bzw. im adsorbierten Impfstoff vom Ptd (detoxifiziertes) abzutrennen und mittels Dialyse aufzubereiten [43].

Im folgenden Abschnitt wird die Frage nach dem Potential von PTx humane Monozyten zu aktivieren diskutiert, das als Grundlage für den Aufbau eines Testprinzips dienen sollte.

4.1 PTx ist nicht in der Lage, humane Monozyten zu aktivieren

Neben der Zielstellung einer Testentwicklung stand zunächst eine andere wichtige Fragestellung im Mittelpunkt, deren Klärung Hand in Hand mit der Verwirklichung eines Testansatzes mit humanem Vollblut ging: Die Fragestellung nach dem Potential von PTx, humane Monozyten zu aktivieren (siehe auch 1.7). In der Literatur wird die Wirkung von PTx auf Zellen des Immunsystems kontrovers beschrieben. Zum einen ist

von einem inhibierenden Effekt die Rede [11, 85, 132], zum anderen werden dem Toxin Eigenschaften eines Adjuvans [4, 71, 129] sowie die Aktivierung humaner Monozyten zugeschrieben [141]. Um dieser Fragestellung nachzugehen, musste zunächst eine geeignete Nachweismethode etabliert werden, über die PTx mit Monozyten getestet werden konnte. Da in der Pyrogenarbeitsgruppe des Paul-Ehrlich-Institutes über 10 Jahre Erfahrung mit einem Bluttest bestehen, der sich die Aktivierung humaner Monozyten als Indikator für Pyrogene in Arzneimitteln zu nutze macht, bot es sich an, auf deren Grundlage den Pertussis-Monozyten-Aktivierungs-Test (Pertussis-MAT) zu entwickeln. Dieses Nachweissystem wäre zudem später geeignet gewesen, entsprechend modifiziert für die Testung von adsorbierten Keuchhusten-Impfstoffen genutzt zu werden. Die Verwirklichung dieses Nachweissystems beruhte auf zwei wichtigen Grundlagen: (A) Dem Wissen, dass humane Monozyten im Vollblut potentiell hervorragend geeignet sind, adsorbierte Impfstoffe problemlos zu testen. Umfangreiche Testungen von adsorbierten Impfstoffen im Rahmen des „Alternativen Pyrogentests“ haben bewiesen, dass das Adjuvans Aluminiumhydroxid humane Monozyten im Vollbluttest nicht stört. Die zweite essentielle Grundlage (B) beinhaltete die in der Literatur beschriebene Aktivierung von Monozyten durch PTx [141]. Diese galt es jedoch zu hinterfragen, womit zunächst die Fragestellung, ob PTx in der Lage ist humane Monozyten zu aktivieren, im Vordergrund stand.

Der entwickelte Pertussis-Monozyten-Aktivierungs-Test (Pertussis-MAT; siehe 2.1.3) musste für diese Fragestellung folglich spezifisch für die Testung von PTx sein und somit auf mögliche interferierende Substanzen hin untersucht werden. Als Störfaktor kam vor allem LPS als starker Monozytenstimulator in Betracht. Wie bereits erwähnt, besitzt *B. pertussis* als Gram-negatives Bakterium naturgemäß LPS. Demzufolge wurden sechs käuflich erworbene Pertussis-Toxin-Präparate auf eine Kontamination mit LPS hin untersucht (siehe Tabelle 15). Es stellte sich heraus, dass diese kommerziell erwerblichen Pertussis-Toxin-Präparationen mit LPS verunreinigt waren, was auch für die international verfügbaren PTx-Referenzmaterialien (siehe Tabelle 15) gilt. Dies erforderte die Ausarbeitung unterschiedlicher Strategien, um den wahrscheinlichen Einfluss des kontaminierenden LPS zu unterbinden und somit die Spezifität des Pertussis-MAT für PTx sicherzustellen. LPS als Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ist einer der stärksten Stimulatoren von Monozyten. Essentiell für die Aktivierung der Monozyten ist die Interaktion von LPS mit dem CD14 Rezeptor, die durch das Serumprotein LPS-Binding-Protein (LBP) stark intensiviert wird [63, 128]. In der Literatur wird eine hochaffine Bindung zwischen der S2-UE des PTx und LPS beschrieben, wobei höchstwahrscheinlich die S2-UE mit dem Disaccharid-Rückgrad des Lipid A vom LPS interagiert [72]. Betrachtet man den Mechanismus der Ausschleusung des im periplasmatischen Spalt zusammengesetzten PTx [114, 116] durch die äußere – aus LPS bestehende – Membran des Gram-negativen Bakteriums, erscheint die Bindung von LPS an PTx als mögliche evolutive Konsequenz. Die Sekretion des PTx-Holotoxins über die äußere Membran erfordert einen speziellen Transport-Apparat, der sich aus neun Ptl-Proteinen („Pertussis toxin liberation“) zusammensetzt [17, 39]. Der genaue Mechanismus, wie und wann das PTx-Protein zusammengesetzt wird und mit

dem Ptl-Transporter *in vivo* interagiert, ist gegenwärtig noch nicht bekannt [17]. Eventuell könnte hierbei jedoch die Bindung zwischen PTx und LPS eine Rolle spielen, indem die endgültige Ausschleusung des PTx über die Wechselwirkungen und die Bindefähigkeiten zu LPS gewährleistet wird. Oder es handelt sich um ein evolutives Relikt, aus der Zeit eines *B. pertussis*-Vorfahren, der noch keinen speziellen Transporter für die Ausschleusung des PTx-Vorläuferproteins besaß, und dies über membranassoziierte Bestandteile – wie LPS – bewerkstelligen musste. Demnach scheint es auf der Hand zu liegen, dass es sehr schwer ist, PTx-Präparationen ohne LPS zu erhalten. Unter den sechs getesteten Pertussis-Toxin-Präparationen, die alle mit LPS kontaminiert waren, befand sich gesichert nur eines, in dem LPS nicht an PTx fest gebunden gewesen ist.

Um die Spezifität des MAT-Testsystems zu gewährleisten, wurden zwei methodisch unabhängige Ansätze entwickelt, die den wahrscheinlichen Einfluss der LPS-Kontamination auf das Testsystem unterbinden sollten. Zum einen wurden die Pertussis-Toxin-Proben einer LPS-Abreicherung unterzogen, und zum anderen wurde die Wirkung von LPS direkt im MAT mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers inhibiert. Für diese Versuche wurden zwei verschiedene Pertussis-Toxin-Präparate aus den insgesamt 6 zuvor getesteten ausgewählt: das PTx des EDQM als BRP und ein gentechnisch hergestelltes (PTg). Durch die Auswahl war ein enzymatisch aktives, natürliches PTx vertreten und mit PTg eines, das nach der genetischen Veränderung keine toxischen Eigenschaften mehr aufweist. Hinzu kam die – im Gegensatz zu den anderen Präparaten – relativ geringe Endotoxin-Kontamination (siehe Tabelle 15). Die LPS-Abreicherung der Proben wurde mit spezifischen Endotoxin-bindenden Trägerkugeln, sogenannten Beads, vorgenommen. Die Oberfläche der Beads ist mit Antilipopolysaccharid-Faktor (LALF) beschichtet, der – wie das Lysat des LAL-Tests – aus den Amöbozyten von *Limulus polyphemus* gewonnen wurde [146]. Somit wird LPS spezifisch und hochaffin gebunden, was einen sehr effektiven Weg der LPS-Entfernung erwarten lässt, sowie mit einem breiten Spektrum, das die verschiedensten Endotoxine umfasst. Ungeachtet hiervon wurde zudem die Effektivität des Liganden in Kontrollexperimenten über eine Beladung (jeweils 30.000 pg/ml) mit LPS von *E. coli* und *B. pertussis* überprüft. Diese beiden Endotoxine, die sich erheblich in ihrer Struktur unterscheiden [80], wurden zu einem hohen Anteil an die Beads gebunden (jeweils 93,2 % und 99,4 %, siehe Tabelle 17). Da PTx und PTg im Vergleich zu den oben erwähnten Beladungskontrollen weniger Endotoxin enthielten (entsprechend um die 6.000 und 1.200 pg/ml), konnte ein Überladen des Liganden ausgeschlossen werden. Der Erfolg der LPS-Abreicherung wurde im LAL-Test überwacht. Für PTx wurde eine akzeptable Reduktion von 92,8 % erreicht (siehe Tabelle 17). Wenn man die oben erwähnte hochaffine Bindung zwischen Endotoxin und Pertussis-Toxin berücksichtigt [72] könnte die Entfernung von LPS aus der Präparation zu einer unerwünschten Eliminierung von PTx führen. Das könnte bedeuten, dass LPS und PTx als Komplex an die Matrix gebunden werden könnten. Dieser potentielle Verlust konnte in unseren Experimenten über drei verschiedene Wege im Wesentlichen (siehe unten) ausgeschlossen werden: Erstens, 90,5 % der PTx Proteine blieben in der Probe nach der Abreicherung enthalten (siehe

Tabelle 17). Zweitens, die SDS-PAGE nach der LPS-Abreicherung, zeigte die komplette Proteinstruktur, d. h. die Summe an Peptidketten, wenn auch in leicht reduzierter Intensität (siehe Abbildung 18), die jedoch mit dem oben erwähnten leichten Proteinverlust von 9,5 % korreliert. Der verlässlichste Beweis für den Erhalt von PTx nach der LPS-Abreicherung wurde mit dem Toxizitäts-Tierversuch HIST erbracht (siehe Tabelle 18). Auch hier war eine leicht reduzierte Aktivität der LPS-abgereicherten Probe zu vermerken, die wiederum mit dem Verlust korreliert, der bereits bei der Proteinbestimmung und SDS-PAGE beobachtet wurde. Die LPS-Abreicherung von genetisch modifiziertem PTg führte zu einer mehr oder weniger akzeptablen Endotoxin-Reduktion (71,3 %, siehe Tabelle 17), aber auch zu einem sehr viel stärkeren Proteinverlust (63,8 %) im Vergleich zu PTx. Der Proteinverlust korreliert mit einer deutlich reduzierten Intensität bei der SDS-PAGE (siehe Abbildung 18). Die Ergebnisse des PTg werden im unteren Abschnitt diskutiert.

Für die Erforschung einer potentiellen Monozytenaktivierung im MAT wurde humanes Vollblut verwendet, wobei die Produktion von IL1- β , IL-6 und TNF- α im Überstand der Zellen nach Übernachtinkubation als Signal genutzt wurde. Die Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine findet als Parameter für eine Monozytenaktivierung eine breite Akzeptanz [58]. Zudem wurde unter anderem humanes Vollblut als Matrix für Monozytenaktivierungstests in einer internationalen Validierungsstudie zum Alternativen Pyrogentest untersucht [58]. Auch sollte erwähnt werden, dass Tonon *et al.* über eine Monozytenaktivierung, hervorgerufen durch Pertussis-Toxin, berichteten und ebenfalls humanes Vollblut für ihre Experimente verwendeten [141].

Originales, unbehandeltes PTx induzierte eine Aktivierung von humanen Monozyten (siehe Abbildung 19), die jedoch entweder durch die Entfernung von kontaminierendem LPS oder durch die Blockade des monozytären CD14 Rezeptors mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers vollständig verhindert werden konnte (siehe Abbildung 19). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Monozytenstimulation durch den Kontaminanten hervorgerufen wurde und nicht durch das PTx selber. Für PTg ist die Situation nicht ganz so eindeutig. Abgesehen von der Tatsache, dass identische Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden, war eine intensivere Aktivierung der Monozyten verglichen mit PTx zu beobachten. Diese Aktivierung konnte – wenn auch stark reduziert – weder durch die LPS-Abreicherung noch durch den Einsatz von anti-CD14 AK vollständig inhibiert werden. Die Aufhebung der Monozytenaktivierung konnte erst durch die Kombination von LPS-abgereicherter Probe mit anti-CD14 AK bei der niedrigeren Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ PTg erreicht werden (siehe Abbildung 19). Analysiert man diesen offensichtlichen Widerspruch, fällt interessanterweise der Unterschied in der Aktivität der Monozytenstimulierung bereits zwischen den beiden originalen Toxin-Präparationen PTx und PTg auf. Das unbehandelte PTx enthält fünfmal mehr LPS als PTg (6.000 pg/ml versus 1.200 pg/ml), aber induziert eine sehr viel schwächere Monozytenreaktion (siehe Abbildung 19). Dies bedeutet, dass die biologische Aktivität des kontaminierenden Endotoxins in den beiden Präparationen unterschiedlich zu sein scheint. Daher wurde die Monozytenaktivierung, die durch LPS von *E. coli* hervorgerufen wurde

mit der Monozytenaktivierung verursacht durch LPS von *B. pertussis* verglichen. Hierbei wies das Endotoxin von *E. coli* eine sehr viel stärkere biologische Aktivität auf (siehe Abbildung 15). Die Differenz liegt circa bei Faktor 30, wenn die Zytokinkonzentrationen, die durch 50 pg/ml *E. coli*-LPS und durch 1562,5 pg/ml *B. pertussis*-LPS induziert wurden, miteinander verglichen werden [27, 30]. Verschiedene LPS von unterschiedlichen Bakterien-Familien, haben folglich nicht dasselbe Potential Monozyten zu aktivieren. Mann *et al.* beschrieb sogar ein variierendes biologisches Potential des LPS innerhalb der Gattung *Bordetella* [78]. Das LPS von *B. bronchiseptica* besitzt demnach ein 10-fach größeres Potential, TLR4 zu stimulieren als *B. pertussis*-LPS und sogar ein 100-fach größeres im Vergleich zum *B. parapertussis*-LPS [78]. Geht man also davon aus, dass die LPS-Kontamination in den Präparaten natürlicherweise von dem jeweiligen genutzten *B. pertussis*-Stamm herrührt, waren unterschiedliche biologische Aktivierungspotentiale auch innerhalb derselben Art im MAT durchaus plausibel. Dies würde auch den variierenden Monozytenaktivierungen durch das in den PTx- und PTg-Proben enthaltene unterschiedliche LPS entsprechen (Abbildung 19). Zusammengefasst ist die wahrscheinlichste Erklärung eine Kombination aus einem Unterschied in der biologischen Aktivität von PTx und PTg und vor allem, dass die rekombinante Variante sekundär mit LPS kontaminiert wurde, dessen Ursprung nicht *B. pertussis* ist (zum Beispiel über Flüssigkeiten während des Herstellungsverfahrens).

Zieht man zur Analyse von Abbildung 19 das Wissen über den Proteinverlust der PTg-Probe hinzu, zeigt sich, dass die zwar stark reduzierte, aber immer noch deutlich vorhandene Monozytenaktivierung durch LPS-abgereichertes PTg und PTg mit anti-CD14 AK zudem kaum Toxin-induziert sein kann, da der Proteinanteil in der Probe um 63,8 % reduziert wurde. Obwohl der Proteingehalt der PTx-Probe hingegen nur marginal durch die LPS-Abreicherung verringert wurde, ist dieses nicht in der Lage, Monozyten zu aktivieren. Offenbar korreliert die Aktivierung nicht mit dem Proteingehalt der verschiedenen Präparationen, sondern mit deren kontaminierendem LPS.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in dieser Arbeit die Kontaminationen mit Endotoxin vor dem Einsatz in der Zellkultur aus den Proben entfernt wurden. Hierfür wurde ein spezieller von *Limulus polyphemus* stammender Ligand verwendet, der ein breites Spektrum an Endotoxinen zu binden vermag. Zusätzlich wurde in einem unabhängigen Ansatz der CD14 Rezeptor der Monozyten blockiert. Demnach erlaubt die in dieser Arbeit angewendete Methode die Schlussfolgerung, dass gereinigtes Pertussis-Toxin nicht in der Lage ist, humane Monozyten zu aktivieren.

Im folgenden Abschnitt werden die Gründe ausführlich diskutiert, weswegen Zweifel an den Ergebnissen von Tonon *et al.* erlaubt sind.

4.2 Weswegen trifft die publizierte Aussage „PTx aktiviert humane Monozyten“ nicht zu?

Wendet man sich der Veröffentlichung von Tonon *et al.* [141] zu, um hier Gründe zu finden, warum die Aussage nicht zutrifft, dass Pertussis-Toxin humane Monozyten ak-

tiviert, werden einige Unklarheiten deutlich. So wird in der Arbeit von Tonon *et al.* die LPS-Abreicherung mit Polymyxin B (PMB) vorgenommen. Obwohl PMB für seinen LPS-bindenden und -inhibierenden bekannt Effekt ist [34, 118], garantiert die Verwendung von PMB alleine noch keinesfalls die LPS-Freiheit der behandelten Lösung [70]. Weiterhin ist PMB generell aufgrund seiner Fähigkeit, die Produktion von IL-1 in humanen Monozyten zu induzieren, für den Einsatz im Monozytentest nicht geeignet [27]. Auch kann die LPS-Abreicherung durch PMB sehr stark variieren, da dieses nicht in der Lage ist, jedes LPS unterschiedlichen Ursprungs zu binden und somit quantitativ zu entfernen [70]. Es ist daher nachvollziehbar, dass Kluger *et al.* eine Reevaluierung solcher Studien fordern, die auf der Inaktivierung von Endotoxin mittels PMB basieren [70]. Demnach sind begleitende Kontrollen, in Form von Endotoxintestungen absolut notwendig. In dieser Arbeit wurde kontaminierendes Endotoxin aus den Proben über einen aus *Limulus polyphemus* stammenden Liganden, der ein breites Spektrum an Endotoxinen bindet, vor dem Einsatz in der Zellkultur entfernt. Parallel wurden *B. pertussis*-LPS als natürlich vorkommende Substanz sowie WHO-LPS als Positivkontrollen mitgeführt, um den Erfolg der LPS-Abreicherungen zu kontrollieren. Zudem wurde in allen Proben (Pertussis-Toxine sowie Positivkontrollen) der LPS-Gehalt vor und nach der LPS-Abreicherung bestimmt und die Abreicherungsrate berechnet (siehe Tabelle 17). Tonon *et al.* führen keine parallelen und unabhängigen Kontrollen zu ihren Versuchen mit. Die zum Beweis der Tauglichkeit von PMB aufgeführte Tabelle vergleicht lediglich die ELISA-Werte nach der Inkubation von humanem Vollblut mit PTx, PTg und als Kontrolle LPS mit und ohne PMB untereinander. Das LPS wurde mit 1 ng/ml und sogar 1 µg/ml eingesetzt. Die ungewöhnlich hohe Konzentration von 1 µg/ml LPS kann aufgrund ihrer toxischen Wirkung einen störenden Einfluss auf den Zelltest ausüben. Zum anderen stammt das als Positivkontrolle verwendete LPS von *E. coli*, die Tauglichkeit für das natürlicherweise in der PTx-Probe kontaminierende LPS von *B. pertussis* wurde nicht überprüft. Damit fehlt die Berücksichtigung, dass sich die *Bordetellen*-LPS-Moleküle in ihrer chemischen Struktur von dem gut untersuchten „smooth-type“ LPS unterscheiden, das bei der Familie der *Enterobacteriaceae*, also auch bei *E. coli*, zu finden ist [80]. *B. pertussis*-LPS fehlt die repetitive O-Antigenstruktur, was zu einer kurzen O-Kette führt und deswegen ähnlicher zu dem so genannten „rough-type“ LPS ist [80]. Ein weiterer Unterschied besteht in den geladenen Zuckern GalNAcA (N-Acetyl-Galactosaminuronsäure), Glucuronsäure und Glucosamin, die üblicherweise nicht in der Kernzone anderer LPS-Moleküle vertreten sind [80]. Neben der fehlenden Berücksichtigung von Besonderheiten des *B. pertussis*-LPS wurde zudem in keiner Probe (unbehandelte oder PMB inkubierte) der LPS-Gehalt bestimmt. Auch allgemeine Charakterisierungen des PTx und PTg fehlen, wie zum Beispiel die biochemische Reindarstellung mittels einer PAGE, Proteinbestimmung oder einer unabhängigen Überprüfung der Toxizität der unbehandelten und PMB-behandelten Toxine.

Berücksichtigt man alle diese Hinweise und die eigenen Ergebnisse, wird ein weiteres Indiz deutlich. In der Publikation von Tonon *et al.* werden mehrere Histogramme dargestellt, die die Expression ausgewählter Oberflächenmoleküle von monozyten-abstammenden dendritischen Zellen nach der Inkubation mit PTx oder LPS und jeweils

als Kontrolle ohne Stimulus beinhalten [141]. Die PTx- und LPS-Histogramme bilden sich fast völlig identisch ab. Die Expression der Oberflächenmoleküle unterscheidet sich lediglich in ihrer Höhe. Alles weist darauf hin, dass es sich hier nicht um zwei verschiedene Stimuli handelt, sondern kontaminierendes LPS in der PTx-Probe dasselbe Muster generiert, wie die eigentliche LPS-Probe. Die leicht variierenden Peak-Höhen könnten sowohl auf unterschiedliche Konzentrationen der bewusst eingesetzten LPS-Probe und des kontaminierenden LPS in der PTx-Probe als auch auf das unterschiedliche biologische Aktivierungspotential der verschiedenen LPS-Moleküle zurückzuführen sein (siehe Abbildung 15).

In Anbetracht der Tatsache der lücken- und mangelhaft durchgeführten Kontrollen, gewinnt das eigene, entgegengesetzte Forschungsergebnis noch mehr Plausibilität. Die Aussage, dass Pertussis-Toxin humane Monozyten aktiviert, wurde somit eindeutig widerlegt. Demnach musste eine neue Grundlage für ein alternatives Testsystem, aktives PTx ohne Tierversuch nachzuweisen, gefunden und entwickelt werden.

4.3 Entscheidung für den „funktionellen“ Test

Nachdem durch die eigenen Ergebnisse eine wesentliche wissenschaftliche Voraussetzung, um das Ziel dieser Arbeit verwirklichen zu können, hinfällig geworden war, wurde nach neuen Testideen gesucht. Auf der Suche nach möglichen Parametern wurden die durch das Pertussis-Toxin hervorgerufenen biologischen Effekte herangezogen, zu denen u. a. auch eine gesteigerte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zählen [16].

Eine theoretische Möglichkeit beinhaltete demnach den Aufbau eines Zelltestes, in dem Endothelzellen der Hirnkapillaren als Indikatorzelle genutzt werden sollten. Hierbei müsste mit Hilfe der Primär- oder Sekundärzellkultur aus Schweinehirnendothelzellen *in vitro* eine Blut-Hirn-Schranke modelliert werden. Der transendotheliale Widerstand von PTx-exponierter Zellen würde Auskunft über die Permeabilität des Blut-Hirn-Schranken-Modells liefern und damit Rückschlüsse auf die Toxizität des PTx zulassen.

Eine andere Möglichkeit bestand darin als Ausgangspunkt und Grundlage die enzymatische Reaktion des Pertussis-Toxins in den Mittelpunkt zu stellen. Wie in Tabelle 19 aufgelistet entsprang aus der NAD-Glycohydrolase-Aktivität des PTx der Gedanke, sein Substrat (NAD⁺) als Parameter für dessen Aktivität zu nutzen. Die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität und die Folgen der ADP-Ribosylierung von G_i-Proteinen hingegen war die Grundlage für die Idee, einen Zelltest zu entwickeln, bei dem über den Energie-Status der Indikatorzellen die Aktivität von PTx ermittelt wird. Der ATP-Gehalt wird mit Hilfe des Enzyms Luziferase bestimmt, das vor allem bei *Photinus pyralis* untersucht wurde [31]. Der Nachweis von ATP mittels Biolumineszenz kann heute mit rekombinant hergestellter Luziferase durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde letztendlich der Nachweis von PTx über dessen enzymatische Reaktion und deren Folgen angestrebt. Es wurde an einem photometrischen Testsystem gearbeitet, das NAD als Substrat von PTx in den Mittelpunkt stellte sowie die Vari-

ante verfolgt, das fluoreszierende NAD-Analogon etheno-NAD als Parameter zu nutzen. Von der Entwicklung eines Blut-Hirn-Schranken-Modells aus Schweinehirn isolierten Primärzellen wurde abgesehen, da die Versuchsbedingungen nicht ohne Weiteres später einmal in andere Labore transferiert worden wären. Auch wenn Schweineköpfe nicht für den Verzehr verkauft werden und demnach in Schlachtereien anfallen und kein Tier extra für die Isolation der Zellen sterben müsste, wären alleine die logistischen Voraussetzungen schwierig. Des Weiteren besteht das Problem der bakteriellen Kontamination bei der Schlachtung und Abtrennung des Kopfes und somit auch bei der Isolation der Zellen. Erschwerend kommt die Tatsache hinzu, dass Schweine häufig Bakteriämien entwickeln, wenn sie Stress ausgesetzt sind, der durch den Transport und die bevorstehende Schlachtung eindeutig gegeben ist. Somit ist es kaum möglich, steriles Ausgangsmaterial zu erhalten. Hätte man trotzdem die Zellen erfolgreich isoliert, müssten diese bis zum Testbeginn bis zu sechs Tage in Kultur genommen werden, was einen erheblichen Zeitaufwand bedeutet. Die Messung und Auswertung mit einem TEER-Messgerät (transendothelialer elektrischer Widerstand) erfordern wiederum Spezialwissen. Auch muss bei empfindlichen Hirnkapillar-Endothelzellen mit Schwierigkeiten bei der Testung des Endproduktes gerechnet werden. Vor allem das Adjuvans $\text{Al}(\text{OH})_3$ könnte die Zellen höchstwahrscheinlich stark beeinflussen. Die Entwicklung eines leicht durchführbaren Zelltests mit robusten Indikatorzellen hingegen scheint allen Ansprüchen gerecht zu werden. Demnach wurde letztendlich die Variante eines Tests mit intakten Zellen und ATP als Messparameter favorisiert. Die Entscheidung fiel somit auf den Pertussis-ATP-Test (PAT). Der Werdegang des PAT und dessen „Konkurrenten“ wie z. B. der Fluoreszenz-Test werden im Folgenden diskutiert.

4.3.1 Der photometrische Nachweis von aktivem Pertussis-Toxin

Die erste Variante, einen Testansatz mit Hilfe der enzymatischen Aktivität von PTx zu entwickeln bestand darin, dessen natürliches Substrat einzubeziehen. Wie bereits unter 1.4 beschrieben spaltet die enzymatisch aktive A-UE NAD^+ in Nicotinamid und ADP-Ribose. *In vivo* läuft diese Reaktion ab, nachdem die B-UE an die Zielzelle gebunden hat, das PTx nach der endozytotischen Aufnahme ins ER eingewandert ist und schließlich die A-UE abgespalten wird [37, 50]. Die aktivierte A-UE transferiert in der Zelle die abgespaltene ADP-Ribose auf ein G-Protein. Werden dem PTx keine intakten Zellen angeboten, muss dieses vor dem Versuch über einen Reduktionsschritt des Holotoxins aktiviert werden, indem hierdurch die A-UE abgespalten wird [65, 66, 74]. Wird der A-UE kein Akzeptorprotein dargeboten, läuft die Glycohydrolyse des NAD^+ um den Faktor 10 langsamer ab als bei der Anwesenheit eines G-Proteins in Form von intakten Zellen, Zellfragmenten oder in isoliertem Zustand [23, 75, 76]. Den Verbrauch von NAD^+ direkt als Messparameter in einem gängigen Enzymtest zu ermitteln, ist nicht möglich. Weit verbreitet und gut etabliert ist die photometrische Messung von entstehendem NADH/H^+ mit Hilfe der Lactatdehydrogenase (LDH). Hierbei wird Lactat und NAD^+ von der LDH zu Pyruvat und NADH/H^+ umgesetzt. Das NADH/H^+ besitzt bei 340 nm ein Absorptionsmaximum. Somit sollte die enzymatische Umsetzung von NAD^+ durch aktiviertes PTx indirekt über einen an die LDH gekoppelten Test nachweisbar

sein. Im ersten Schritt erfolgte die Inkubation von aktiviertem PTx mit NAD^+ , in einem zweiten Schritt wurde diese Probe als „Starter“ für den LDH-Enzymtest verwendet (siehe Abbildung 20). Der LDH-Test wurde zuvor so etabliert, dass alle zugehörigen Reagenzien, bis auf NAD^+ , zusammengefügt wurden. Bei der Inkubation von PTx mit NAD^+ sollte, je nach dessen Aktivität, viel oder wenig NAD^+ umgesetzt werden (siehe Abbildung 20).

Die kinetische Messung dieses gekoppelten Enzymtests im Photometer erwies sich jedoch als nicht geeignet, aktives PTx nachzuweisen. Über den gekoppelten LDH-Test war es nicht möglich, die Aktivität von PTx zu bestimmen. Die die Werte des entstehenden NADH/H^+ der PTx-Probe entsprachen auch bei hoher Toxinkonzentration exakt den Wert der Negativkontrolle (siehe Abbildung 21). Bei der PTx-Probe war demnach kein NAD^+ umgesetzt worden. Die photometrische Messung erreichte aller Wahrscheinlichkeit nicht die benötigte Sensitivität und hatte damit keine Zukunft als mögliche Nachweismethode. Trotzdem war diese Idee Grundlage und Ausgangspunkt, um weiter in eine ähnliche Richtung zu gehen, nämlich aktives PTx über seine enzymatische Reaktion und unter Einbezug seines Substrates biochemisch nachzuweisen. Dies wurde mit Hilfe des fluoreszierenden NAD-Analogons etheno-NAD bewerkstelligt.

4.3.2 Der Fluoreszenz-Test als Nachweissystem

Auch in diesem neuen Testansatz sollte die enzymatische Hydrolyse von NAD^+ durch PTx als spezifischer Indikator für dessen Aktivität genutzt werden. Anstelle seines natürlichen Substrates NAD^+ wurde dem PTx jedoch das fluoreszierende Analogon Nicotinamid-1, N^6 -Ethenoadenin-Dinukleotid (etheno-NAD) als Substrat angeboten. In der Literatur wird beschrieben, dass Pertussis-Toxin etheno-NAD als Substrat nutzen kann [57]. Die Fluoreszenz des intakten etheno-NAD-Moleküls wird teilweise durch den Bestandteil Nicotinamid gequenchet, was zur Verringerung seiner Fluoreszenz führt [8]. Die Hydrolyse von etheno- NAD^+ durch aktives PTx führt zur Abspaltung des quenchend wirkenden Nicotinamids, wobei etheno-ADP-Ribose entsteht, die um das 10-fache intensiver fluoresziert als etheno- NAD^+ [8]. Der Testansatz basiert folglich auf der Fluoreszenzsteigerung, die durch die Hydrolyse des fluoreszierenden etheno- NAD^+ zu etheno-ADP-Ribose hervorgerufen wird (siehe Abbildung 22). Diese Fluoreszenzzunahme wurde als Marker für aktives PTx genutzt.

Mit Hilfe des entwickelten Fluoreszenz-Tests konnte aktives PTx erfolgreich nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23). Für den Test spricht seine gute Handhabbarkeit. Nach der Abspaltung der A-UE über die Vorinkubation mit Aktivierungspuffer erfolgt die eigentliche Inkubation in einer schwarzen 96-Well-Fluoreszenz-Platte mit PTx und Substrat und schließlich die fluorometrische Messung in derselben Platte. Aufgrund des artifiziellen Testsystems müssen keine über das normale saubere Arbeiten hinausgehenden Maßnahmen, wie steriles Arbeiten unter der Werkbank, vorgenommen werden. Es ist lediglich ein Wärmeschrank für die Inkubation nötig, bei dem die Möglichkeit besteht die Luftfeuchtigkeit individuell einzustellen, um möglichen Verdunstungseffekten über der 96-Well-Platte bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C ent-

gegenzuwirken. Mit einer Inkubationszeit über 48 h verfügt der Test über eine relativ lange Testdauer, würde aber im Vergleich zum abzulösenden Tierversuch, der sich über sieben Tage erstreckt, dennoch eine wesentliche Verkürzung darstellen [108]. Die stärkste PTx-Aktivität wurde mit einem Aktivierungspuffer hervorgerufen, der unterstützend zur Spaltung des PTx-Proteins mit dem Reduktionsmittel DTT (Dithiothreitol) das Detergenz SDS enthielt. Mit diesen Pufferkomponenten war die Aktivität des PTx um das dreifache höher als bei Aktivierungs- und Testpuffern, die das mildere Detergenz CHAPS (3,3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-Propansulfonat) enthielten (siehe Abbildung 24). Höchstwahrscheinlich wurde die Spaltung schneller und vollständiger vollzogen und damit einhergehend eine stärkere Aktivierung hervorgerufen.

Einen störenden Einfluss auf den Fluoreszenz-Test zeigten die pH-Abhängigkeit des etheno-NAD und der fluoreszenzsteigernde Effekt des Adjuvans $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Bei steigenden pH-Werten erhöhte sich ebenfalls das Fluoreszenzsignal von etheno-NAD über die Inkubationszeit (siehe Abbildung 25). Bei einem pH-Wert von 8 blieb das Fluoreszenzsignal über die Zeit stabil, pH 9 hingegen zeigte eine deutliche Steigerung des Signals um den Faktor 3 über die 24 h Inkubation. Bei pH 10 erreichte die Signalzunahme ihren Höhepunkt, das Fluoreszenzsignal hatte sich über die Inkubationsdauer vervierfacht, pH 12 zeigt im Gegensatz zu pH 10 eine niedrigere Fluoreszenzsteigerung, die sich wie bei pH 9 um den Faktor 3 verstärkt hatte. Bei Fluoreszenzmessungen sind pH-Einflüsse generell bekannt und nicht zu unterschätzen. Änderungen des pH-Wertes können das Fluoreszenzverhalten des Fluorogens massiv beeinträchtigen. Das etheno-NAD liegt im neutralen Bereich (pH 6–8) unprotoniert vor und ist somit stabil [8]. Für den Fluoreszenz-Test wurden alle Pufferlösungen auf pH 8 eingestellt, um zum einen das pH-Optimum von PTx zu gewährleisten und zum anderen keinen interferierenden pH-Effekt in das Testsystem einzubringen. Die im Fluoreszenz-Test zu überprüfenden Endprodukte, sprich adsorbierte Impfstoffe, würden ebenfalls keinen pH-Wert beeinflussenden Effekt ausüben, da deren pH-Werte i. d. R. um pH 7 liegen. Eine standardmäßige pH-Messung der Proben zur zusätzlichen Kontrolle würde zudem Sicherheit geben. Um das Fluoreszenzverhalten von etheno-ADP-Ribose bei basischen pH-Werten über pH 8 zu untersuchen, fehlten die technischen Voraussetzungen [8, 128].

Häufig wird in adsorbierten Impfstoffen als Adsorbens und Adjuvans Aluminiumhydroxid verwendet. Dieses übt einen bisher nicht zu inhibierenden fluoreszenzverstärkenden Einfluss auf das Testsystem aus (siehe Abbildung 26). Deshalb wurde versucht, das schwerlösliche $\text{Al}(\text{OH})_3$ mit Hilfe von positiver Ladung in die Gleichgewichtsrichtung seines Salzes zu bringen und somit noch unlöslicher zu machen, um einen eventuell interferierenden Effekt der positiv geladenen Aluminium-Ionen mit z. B. den negativ geladenen Phosphatgruppen des NAD-Moleküls zu unterbinden. Durch die Anwesenheit von 0,25 M bis hin zu 2 M NaCl konnte der Effekt der elektrischen Ladung des Adsorbens nicht unterdrückt werden (siehe Abbildung 27). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Überschuss an positiver Ladung das Molekül daran hindert, seine Anregung u. a. über interne Konversion abzubauen und somit ein höherer Anteil fluo-

resziert. Es war demnach nicht möglich, das interferierende $\text{Al}(\text{OH})_3$ im Fluoreszenz-Test über diesen Weg auszuschalten. Ein weiterer Ansatz beruhte darauf, freie $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Moleküle, die kein Protein gebunden hatten, über ein testunbeteiligtes Protein, wie z. B. humanes Albumin, mittels Bindung abzusättigen. Das übliche Verhältnis von Protein und Adjuvans bei der Impfstoffherstellung von Pertussis-Impfstoffen ist 1 Teil PTd und 2 Teile $\text{Al}(\text{OH})_3$. In dem Versuchsdesign von Abbildung 28 wurde ein breites Spektrum an Protein-Adjuvans-Verhältnissen abgedeckt. Demnach wurde sowohl das Adjuvans bis um den Faktor 12,5 höher konzentriert eingesetzt und entgegengesetzt das Protein bis um das 20-fache höher konzentriert. Die fluoreszenzbeeinflussende Wirkung konnte über diesen Weg nicht abgeschwächt werden (siehe Abbildung 28). Ab einer Konzentration von 0,63 mg/ml $\text{Al}(\text{OH})_3$ beginnt sich die dosis-abhängige, interferierende Wirkung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ abzuschwächen (siehe Abbildung 28 B), die Höhe der Signalzunahme verändert sich hingegen nicht wesentlich.

Auch im „Praxistest“ bei der Überprüfung von vier verschiedenen polyvalenten Impfstoffen, die alle eine azelluläre Pertussis-Komponente enthalten, zeigte sich die beeinflussende Wirkung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ deutlich. Im Pertussis-Fluoreszenz-Test wiesen alle Proben eine dosis-abhängige Aktivität auf (siehe Abbildung 29). Nicht nur aktiviertes PTx vermag eine Fluoreszenzsteigerung zu bewirken, sondern auch die getesteten Impfstoffe. Wie ist die gemessene Aktivität der Impfstoffe jedoch einzuschätzen? Die hier verwendeten Impfstoffe stammen alle aus Chargen, deren routinemäßige Freigabeverfahren, inklusive des abzulösenden Tierversuches HIST, längst durchlaufen sind und die zum Verkauf den freien Markt erreicht haben. Alle Impfstoffe hatten den HIST ohne Beanstandung bestanden. Ist der Fluoreszenz-Test also so empfindlich, dass er, entgegen dem Tierversuch, in der Lage ist, restlich aktives PTx nachzuweisen? Wie ist also die gemessene Aktivität zu interpretieren? Liegt ein echter positiver Befund vor oder würde es sich um falsch Positive handeln, hervorgerufen durch Störfaktoren? Einen interferierenden Einfluss durch pH-Effekte kann mit sehr großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Alle für den Versuch verwendeten Puffer waren auf pH 8 eingestellt worden und die Proben, sprich die Impfstoffe selber, besaßen alle einen pH-Wert im neutralen Bereich, von 6,75 bis 7,45. Zieht man aber zur näheren Analyse der Ergebnisse den Gehalt des Adjuvans, in den Fachinformationen als dessen Aluminium-Gehalt angegeben, im jeweiligen Impfstoff hinzu, korreliert dieser mit der Stärke des Fluoreszenzsignals. Impfstoff 3 enthält mit 1 mg/ml den höchsten Gehalt an Al. Dies spiegelt sich auch in der Höhe der Signale wieder, die sogar die Fluoreszenzsteigerungen, hervorgerufen durch die PTx-Proben, übertreffen. Impfstoff 2 und 4 enthalten beide mit 0,6 mg/ml Al weniger Adjuvans und entsprechend schwächer fällt die Fluoreszenzsteigerung aus. Ein weiteres Argument, das gegen eine echte Detektion von PTx-Restaktivität in den Impfstoffen spricht, ist die jeweilige Stärke des Signals. Vergleicht man hier die Fluoreszenzsteigerungen, die durch die aktivierten PTx-Proben (12,5, 6,25 und 3,13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein) hervorgerufen werden mit den Werten der Impfstoffe, dürfte vor allem bei Impfstoff 3 in den 12,5, 6,25 und 3,13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PTd-Proben kein inaktiviertes PTd enthalten sein, sondern ausschließlich reversiertes PTx. Der störende Einfluss von $\text{Al}(\text{OH})_3$ kann nicht endgültig beurteilt werden. Vermutlich ist jedoch das

Al(OH)₃-induzierte Signal für die gemessene Aktivität der Impfstoffe verantwortlich. Somit wäre dieses Testprinzip zwar für den Nachweis von aktivem Pertussis-Toxin in Impfstoff-Präparationen vor der Adsorption an das Adjuvans geeignet, jedoch nicht für das konfektionierte Endprodukt. Deswegen wurde zusätzlich ein neues Testprinzip aufgebaut.

4.3.3 Die Entwicklung des Pertussis-ATP-Tests

Der Pertussis-ATP-Test (PAT) macht sich Änderungen des ATP-Spiegels in der PTx-exponierten Zelle zu nutze. Wie in Tabelle 19 dargestellt, besitzt das Pertussis-Toxin neben der NAD-Glycohydrolase-Aktivität auch Tranferaseaktivität. Hierbei wird das Spaltprodukt der NAD-Hydrolyse ADP-Ribose kovalent an die α -Untereinheit eines G-Proteins gebunden, so dass dieses nicht mehr in der Lage ist, mit dem aktivierten 7TM(transmembran)-Rezeptor zu interagieren, um selber aktiviert zu werden [42]. Das G-Protein ist folglich in seinem inaktiven Status konserviert und kann nicht in den Signalweg der Zelle eingreifen und somit nicht hemmend auf die Adenylatcyclase (AC) einwirken. Dies hat in diesem Fall zur Folge, dass die AC ungehemmt aus ATP den Second Messenger cAMP synthetisieren kann. Der cAMP-Spiegel steigt in der Zelle an und damit einhergehend verändert sich der ATP-Spiegel [47, 67, 69]. Im PAT wird der ATP-Spiegel der Zelle als Indikator für die Aktivität von PTx genutzt (siehe Abbildung 30). Der ATP-Status der Zelle wird nach Inkubation mit PTx (oder in Zukunft mit dem zu testenden Impfstoff) in einer einfach durchzuführenden luminometrischen Messung mit Hilfe der Luziferin/Luziferase-Reaktion bestimmt.

Als Grundlage für einen erfolgreichen Testaufbau mussten im Vorfeld die richtigen Indikatorzellen ausgewählt werden. Hierbei galt es mehrere wichtige Kriterien zu vereinbaren. Zum einen müssen die Zellen sensitiv für PTx sein, aber möglichst robust und unempfindlich gegen Impfstoffbestandteile wie z. B. Al(OH)₃. Zum anderen war ebenso wichtig, dass sie im Umgang und ihrer Handhabbarkeit einfach und anspruchslos sind, damit ein späterer Methodentransfer in die unterschiedlichsten Laboratorien so reibungslos und unkompliziert wie möglich gewährleistet werden kann. In der Literatur sind im Zusammenhang mit PTx unter anderem folgende Zellarten als sensitiv für PTx beschrieben: Endothelzellen der Hirnkapillaren isoliert aus Schweinehirn, als Primär- oder Sekundärkultur eingesetzt [16]; die Epithelzelllinie CHO (Chinese hamster ovary cells) und die humane T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat als permanente Zelllinien [151]. Im Sinne der oben genannten Kriterien kam die Isolation der Endothelzellen aus Schweinehirn nicht in Frage. Die unter 4.3 im Rahmen der Idee für einen Testaufbau eines Blut-Hirn-Schranken-Modells zum Nachweis von aktivem PTx aufgeführten kritischen Punkte treffen in Bezug auf die Gewinnung und Verarbeitung der Endothelzellen auch für den PAT zu. Die logistischen Hindernisse an frische Schweinehirne zu gelangen sowie die aufwendige und sehr anspruchsvolle Isolation mit einem hohen Kontaminationsrisiko, schließen die Nutzung von den porcinen Hirnendothelzellen aus. Die Installation der CHO-Zellen für den PAT konnte ebenfalls nicht in Betracht gezogen werden. Der oben erwähnte, bereits existierende *In vitro*-Test mit CHO-Zellen wird

zwar mit gutem Erfolg für die Testung von Zwischenprodukten der Impfstoffproduktion eingesetzt. Er versagt jedoch bei der Prüfung fertig konfektionierter, adsorbierter Endprodukte aufgrund der Anwesenheit von Aluminiumsalzen als Adjuvans [154] und war folglich somit auch für den PAT nicht geeignet.

Mit dem Vorwissen aus dem Monozyten-Aktivierungs-Test, dass humane Monozyten unempfindlich gegen adsorbierte Impfstoffe und deren Bestandteil $\text{Al}(\text{OH})_3$ sind, wurden ebenfalls weiße Blutzellen, in diesem Fall jedoch humane Lymphozyten, für den PAT ausgewählt. Lymphozyten sind aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben bei der menschlichen Immunabwehr und der sich hieraus ergebenden Robustheit für *In vitro*-Testungen besonders gut geeignet. Es wurden zwei Zellkulturen installiert, zum einen die Isolation einer Primärzellkultur aus humanen peripheren mononukleären Zellen, den sogenannten PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) und zum anderen die permanente T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat. Die Primärzellkultur wurde direkt aus frisch entnommenen humanem Vollblut gesunder Spender gewonnen und ist aufgrund ihrer natürlichen „Vollausstattung“ an Rezeptoren, Enzymen und Membranoberflächenstrukturen von biologischer hoher Relevanz. PBMCs setzen sich aus Lymphozyten und Monozyten zusammen. Die Diskriminierung der Zelltypen erfolgte durch Phänotypisierung im automatischen Hämatometer sowie immunchemisch über Antikörper-Markierung spezifischer Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer (siehe Abbildung 31 und 44). Es wurden durchschnittlich circa 70 % Lymphozyten und circa 30 % Monozyten in den frisch präparierten und etwa 80 % Lymphozyten und 20 % Monozyten in den kryokonservierten PBMC-Isolaten ermittelt (siehe Tabelle 21 und 23). Die Zelllinie Jurkat wurde zudem installiert, da sie als permanente Zellkultur den Vorteil besitzt, in großen Mengen gezielt zur Verfügung zu stehen und unter gleichförmiger Kultivierung – im Rahmen biologischer Abweichungen – ein einziger Zelltyp mit derselben Grundausstattung an Rezeptoren, Proteinen, Enzymen und anderen Molekülen in das Experiment eingebracht werden können. Bei der permanenten Zelllinie darf jedoch auf gar keinen Fall ihre Herkunft (Fusion mit entarteter Tumorzelle) und vor allem ihre oft schon über Jahrzehnte andauernde Kultivierung und somit immer weitere Entartung von ihrer ehemals natürlichen Ausstattung an Rezeptoren, Enzymen und anderen Membran- und Zellproteinen außer Acht gelassen werden. Deswegen wurde die Entwicklung des PAT besonders für die Durchführung mit PBMCs favorisiert und forciert. Der mögliche Einsatz von Jurkat-Zellen wurde jedoch als Methodenerweiterung und Absicherung ebenfalls untersucht. Aktives PTx lässt sich im PAT erfolgreich sowohl mit PBMCs (siehe Abbildung 33 und 40) als auch mit Jurkat-Zellen nachweisen (siehe Abbildung 41).

Zu Beginn der Entwicklung des PAT (Phase A) wurden zunächst grundsätzliche Fragestellungen untersucht. Hierzu zählte u. a. das Vereinigen der PBMC-Isolate verschiedener Spender auf eine mögliche Beeinflussung des Testergebnisses hin zu überprüfen. Der Vergleich der Einzelspender und deren Pool (siehe Abbildung 34) zeigt, dass das Vereinigen der Zell-Isolate das Testergebnis nicht beeinflusst. Durch die maximale Inkubationszeit von 24 h ist zudem eine sogenannte gemischte Leukozyten-

Reaktion nicht zu erwarten. Weitere mögliche Interferenzen, die aufgrund der Erfahrungen mit dem Pertussis-MAT und Fluoreszenz-Test ausgeschlossen werden mussten, waren vor allem mögliche Auswirkungen durch kontaminierendes LPS sowie des Adjuvans $\text{Al}(\text{OH})_3$ auf den Zelltest. Bereits beim MAT wurde festgestellt, dass jede PTx-Präparation mit LPS kontaminiert ist (siehe Tabelle 15). LPS ist einer der stärksten Monozyten-Stimulatoren [7, 18] und muss generell im Umgang mit Zellen als störender Effektor ausgeschlossen werden. Für den PAT kann LPS als Störfaktor eindeutig ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 37). Alle Proben, die mit LPS inkubiert wurden, befanden sich mit ihren Werten auf identischer Höhe wie die des ATP-Spiegels der Kontrollzellen, die mit klinischer Saline inkubiert worden waren. Selbst hohe LPS-Konzentrationen von 10 ng/ml übten keinen störenden Einfluss auf die frisch isolierten PBMCs aus.

Die Überprüfung des Adjuvans $\text{Al}(\text{OH})_3$, das i. d. R. in adsorbierten Impfstoffen verwendet wird, zeigte, dass der ATP-Spiegel frisch isolierter PBMCs nach 1 h Inkubation mit 3 mg/ml $\text{Al}(\text{OH})_3$ nicht beeinflusst wird. Nach 5 h Inkubation war jedoch der ATP-Gehalt der Zellen mit Adjuvans gegenüber dem ATP-Spiegel der Kontrollzellen (siehe Abbildung 38) abgesenkt. Diese Absenkung des ATP-Spiegels nach 5 h Inkubation war aber im Vergleich zu der vom PTx verursachten halb so stark ausgeprägt. Nach 24 h hingegen war der ATP-Spiegel der mit Adjuvans inkubierten Zellen niedriger als der ATP-Gehalt der PBMCs, die mit PTx inkubiert wurden. Die Tatsache, dass $\text{Al}(\text{OH})_3$ über die Inkubationszeit einen ATP-Spiegel senkenden Einfluss im PAT ausübt, muss für die spätere Anwendung mit adsorbierten Endprodukten berücksichtigt werden, stellt jedoch keinen generellen Hinderungsgrund dar, um vom PAT in seiner jetzigen Ausführung Abstand zu nehmen. Eine kurze Inkubationszeit wäre für eine zügige Testdurchführung ohnehin anzustreben. Der Impfstoff selber wird nicht unverdünnt in den PAT eingebracht, sondern wird nach aktuellem Stand im Testansatz des PAT (Phase C) 1:5 verdünnt eingesetzt (siehe 2.4.4.1). Mit Hilfe solcher Modifikationen sollte eine Vorbehandlung der Proben zur Entfernung von $\text{Al}(\text{OH})_3$, wie es das NIBSC mittels Dialyse anstrebt, nicht nötig sein.

Neben der Überprüfung und Charakterisierung möglicher Störfaktoren wurde ein weiterer wichtiger Meilenstein, die erfolgreiche Testung von zwei – parallel im Tierversuch eingesetzten – PTx-Proben für den PAT erfüllt. Im Rahmen der Versuche zum Monozyten-Aktivierungs-Test (siehe 3.2) wurde zur Kontrolle der Funktionalität, Aktivität und somit Toxizität von zwei PTx-Proben ein HIST mit unbehandeltem und LPS-abgereichertem PTx durchgeführt. Mit Hilfe des Tierversuchs wurde bewiesen, dass LPS-abgereichertes PTx trotz Abreicherungsprozedere immer noch eine intakte Proteinstruktur und somit toxische Eigenschaften besitzt (siehe Tabelle 18). Um so wenige Tierversuche wie möglich durchzuführen, wurden diese beiden Proben ebenfalls parallel im PAT getestet. Beide PTx-Proben (unbehandelt und LPS-abgereichert) senkten in genau derselben Stärke den ATP-Spiegel der Zellen ab (siehe Abbildung 39). Der neue alternative Test ist somit ebenso geeignet, die Toxizität von PTx-Proben nachzuweisen.

Nach diesen ersten wichtigen Ergebnissen folgte die nächste Entwicklungsphase (Phase B), in der unter anderem die Inkubation in Zellkulturplatten und die Messung in 96-Well-Luminometerplatten eingeführt, aber auch der Einsatz von Kryo-PBMCs installiert wurde. Interessanterweise zeigen die Kryo-PBMCs nach 1 h und 5 h Inkubation einen deutlich niedrigeren ATP-Spiegel auf, als nach 24 h Inkubation (siehe Abbildung 43). Möglicherweise benötigen die kryokonservierten Zellen nach dem Auftauen mehrere Stunden, um sich zu erholen. Nach 24 h ist der Energiestoffwechsel hingegen vollständig hochgefahren worden. Die Erarbeitung eines Protokolls zur Kryokonservierung frisch isolierter PBMCs und dem geeigneten Auftauprozess (siehe Abbildung 43) sowie der erfolgreiche Einsatz der Kryo-PBMCs im PAT (siehe Abbildung 47) brachten mehrere wesentliche Vorteile mit sich. Die Testdurchführung wird stark verkürzt, da die Kryo-PBMCs mit wenig Aufwand aufgetaut werden und unmittelbar nach dem anschließenden Waschschrift für den Einsatz im Test zur Verfügung stehen. Hieraus ergeben sich mehrere positive Aspekte. Erstens muss keine zeitaufwendige Isolation vor dem Versuchsbeginn durchgeführt werden. Zweitens können die Kryo-PBMCs in einem einfachen Gefrierschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden, so dass keine teure und gefährliche Lagerung im Stickstofftank bei $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ nötig ist. Besonders wertvoll ist der dritte Aspekt, die isolierten Zellen zumindest chargenweise standardisieren zu können. Damit könnten bei einem möglichen zukünftigen Methodentransfer alle Teilnehmer z. B. einer Ringstudie, mit denselben Zellen als Grundlage arbeiten, was für die Validierung äußerst vorteilhaft wäre. Zudem würde sich somit die Versuchsdurchführung der Ringstudie stark vereinfachen, da die Isolation der PBMCs, die mit einer autorisierten Blutentnahme und geeigneten Spendern anfängt, wegfallen könnte.

In der nächsten Entwicklungsphase (Phase C) des PAT wurde damit begonnen, den Versuchsablauf weiter zu optimieren, indem erfolgreich der „One-Plate-Assay“ eingeführt wurde. Hiermit wurde ein weiterer Schritt in Richtung eines zuverlässigen und einfach durchzuführenden Tests vollzogen. Die Möglichkeit, Inkubation und Messung in ein und derselben Platte durchzuführen, bringt nicht nur zeitliche Vorteile mit sich. Durch die weiter vereinfachte Testdurchführung werden Fehlerquellen, wie z. B. beim Transfer der Proben von der Inkubations- auf die Messplatte, minimiert. Durch das veränderte Versuchsdesign und damit einhergehend der Möglichkeit, Mehrkanalpipetten und Mehrfachdispenser einzusetzen, werden zudem Intertestschwankungen reduziert (siehe Abbildung 10). Neben diesem positiven Entwicklungsstatus des „One-Plate-Assay“ darf dennoch dessen weitere Optimierung, wie z. B. die Steigerung der Sensitivität, nicht außer Acht gelassen werden. Hierfür ist es jedoch notwendig, zunächst eine einheitliche Grenze festzulegen, deren Berechnung nicht einfach ist. Im folgenden Abschnitt wird die Problematik der Sensitivitätsgrenze für die Testung zum Nachweis von restlich aktivem PTx in adsorbierten Impfstoffen auf Basis des zurzeit bestehenden Tierversuches diskutiert.

4.3.3.1 Erforderliche Sensitivität des Testsystems für Pertussis-Adsorbat-Impfstoffe

Die alternative Testmethode und deren Sensitivität müssen sich an dem augenblicklich bestehenden System orientieren. Demnach gilt der Tierversuch als „Goldstandard“, auch wenn er in realitas von Ungenauigkeiten und Wiederholungen geprägt ist. Die Berechnung der Nachweisgrenze auf der Basis des HIST gestaltet sich als sehr schwierig. Auf der Tagung „Pharmacology of Vaccines“ auf Kuba im Mai 2009 wurde im Rahmen meines Vortrages diese Problematik angesprochen und in der anschließenden Diskussion von dem dort anwesenden fachkundigen Publikum bestätigt. Die Schwierigkeit besteht darin, dass in einem Test auf Basis des HIST die Aktivität von PTx durch dessen intravenöse Verabreichung bestimmt wird und hierdurch zudem noch die Sensitivität und Eignung des Mäusestammes überprüft wird (siehe 1.6). Ein anderer Versuch auf Basis des HIST besteht in der Testung des adsorbierten Impfstoffes durch intraperitoneale Injektion [108]. Um aus diesen beiden unterschiedlichen Testdurchführungen einen gemeinsamen Ansatzpunkt zu finden, wurden folgende Aussagen als Grundlage zur Festlegung der Nachweisgrenze gewählt:

- Die LD₅₀ für PTx im HIST ist 50 ng.
- Die Testung für Impfstoffe im HIST erlaubt eine LD₅ (bei 1 ml Applikation).

Kombiniert man diese beiden Aussagen, um eine Grundlage zur Festlegung der Nachweisgrenze zu erhalten, ergibt sich augenblicklich eine Sensitivität von 5 ng/ml. Hier wird vereinfachend Linearität von Dosis und Wirkung vorausgesetzt, was jedoch nur bedingt erlaubt ist.

Im Rahmen der geplanten internationalen Studie (siehe Abschnitt 4.3.3.3) zum Methodentransfer alternativer Nachweise zur Detektion von aktivem PTx, muss die Festlegung der Sensitivitätsgrenze diskutiert und von allen Teilnehmern zusammen mit Vertretern des EDQM bestätigt werden.

4.3.3.2 Orientierende Versuche zum PTx-Nachweis in komplexen Impfstoffen

Die Testung und Validierung von Pertussis-Adsorbat-Impfstoffen im Rahmen dieser Arbeit durchzuführen würde den Umfang einer Dissertation weit übersteigen. Dennoch wurden erste orientierende Versuche zum Nachweis von aktivem PTx in komplexen Impfstoffen vorgenommen. Hierfür wurden als Kontrollreihe Kryo-PBMCs mit PTx inkubiert, die 78 ng/ml bis 5 ng/ml umfasste und somit die zu erreichende Sensitivitätsgrenze von 5 ng/ml (siehe 4.3.3.1) einschloss. Zudem wurde ein tetravalenter Adsorbat-Impfstoff getestet (siehe Abbildung 47). Der verwendete Impfstoff enthält die Antigene zur aktiven Immunisierung gegen Diphtherie, Tetanus, Pertussis und Poliomyelitis. Er wird ab 3 Jahren als Auffrischimpfung nach erfolgter Grundimmunisierung europaweit angewendet. Die Impfstoffcharge wurde seinerzeit ohne Beanstandung vom Paul-Ehrlich-Institut freigegeben. Für die Testung im PAT wurde der Impfstoff ebenfalls mit PTx-Konzentrationen von 78 ng/ml bis 5 ng/ml versetzt. Somit sollte zum einen die Wiederfindung von enzymatisch aktivem PTx trotz Impfstoffmatrix (Adjuvans, Konser-

vierungsmittel, komplexe Antigenmischung) überprüft werden und zum anderen zum Ausloten der Sensitivitätsgrenze dienen. Die eingesetzten PTx-Konzentrationen bei den Proben ohne Impfstoff, rufen eine sehr klare dosis-abhängige Abstufung des ATP-Spiegels der Kryo-PBMCs hervor. Die PTx-Proben mit Impfstoff zeigen nur eine leichte dosis-abhängige Absenkung des ATP-Spiegels, dennoch ist auch hier eine deutliche Abgrenzung gegenüber der Negativkontrolle zu erkennen. Die Sensitivitätsgrenze von 5 ng/ml kann mit dem verwendeten PTx bei diesen Versuchsbedingungen deutlich erreicht werden. Die mit adsorbiertem Impfstoff und PTx-Spike inkubierten Zellen weisen ebenfalls auch für die geringste PTx-Spike-Konzentration einen niedrigeren ATP-Spiegel auf, verglichen mit den Zellen, die mit Impfstoff und Negativkontrolle (klinische Saline) inkubiert wurden (siehe Abbildung 47). Der ATP-Spiegel dieser Kryo-PBMCs, die mit Impfstoff inkubiert wurden, zeigt jedoch keine klare dosis-abhängige Abstufung, wie dies bei der reinen PTx-Inkubation der Fall gewesen ist. Nach 24 h Inkubation zeigten alle Zellen durch den Impfstoff, auch die Negativkontrollen, eine deutliche Beeinträchtigung in ihrer Vitalität (Daten nicht gezeigt). Diese Beeinflussung deckt sich mit den Ergebnissen der Vorversuche zum Störfaktor $\text{Al}(\text{OH})_3$ (siehe Abbildung 38), muss jedoch nicht zwangsläufig die Auswertung des Tests beeinflussen. Einerseits ist generell eine kurze Inkubationszeit erstrebenswert, was den 24 h Wert ohnehin überflüssig werden lassen würde. Andererseits spricht wiederum nichts gegen die Nutzung dieser Werte, solange eine eindeutig abgestufte Dosis-Abhängigkeit des ATP-Spiegels zu gewährleisten ist. Generell ist es wichtig, dass das Endprodukt frühzeitig in die Testentwicklung mit eingebunden wird. Der im PAT getestete tetravalente Adsorbat-Impfstoff stellt hierzu lediglich einen positiven Einstieg dar. Die Untersuchung dieser äußerst komplexen Matrix mit möglichen Störfaktoren aus anderen Antigenen bleibt zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

4.3.3.3 Der PAT als einfacher, robuster und ökonomischer Test

Der PAT bringt viele Vorteile mit sich. Er ist einfach, robust und ökonomisch. Der Test besteht aus zwei unkomplizierten Schritten, einem Inkubations- und einem Detektionsschritt. Vor allem die PBMCs als Indikatorzellen sind in ihrer Handhabung unkompliziert, aber auch die Kultivierung der Jurkat-Zellen ist sogar für Laborpersonal, das mit Zellkultur keine oder wenig Erfahrungen hat, schnell erlernbar. Auch die lumino-metrische ATP-Messung ist schnell und einfach durchführbar. Hinzu kommt, dass die Bestimmung des ATP-Gehaltes mittels Luziferin/Luziferase-Reaktion weit verbreitet und bekannt ist und somit später einmal eine breite Anerkennung finden sollte. Bereits in der Entwicklungsphase A war der PAT somit ein kostengünstiger Test. Von Nachteil war zu diesem Zeitpunkt jedoch die Inkubation der Zellen in sterilen Zentrifugenröhrchen mit der anschließenden Überführung der Proben für die Messung in ATP-freie Luminometer-Röhrchen. Die Anwenderfreundlichkeit wurde in Phase B bereits erhöht, indem die Inkubation in 24-well-Zellkulturplatten durchgeführt wurde und die Messung in 96-well-Platten erfolgte. Die Überführung der Proben von der Inkubationsplatte auf die Messplatte bestand in dieser Phase jedoch immer noch. Dafür wurde der Einsatz von Kryo-PBMCs als Indikatorzellen erfolgreich installiert, was die Testdurchführung

wesentlich verkürzte. In der Entwicklungsphase C konnte die Durchführung des PAT nochmals vereinfacht werden, indem sowohl Inkubation als auch Messung in ein und derselben Platte durchgeführt werden. Mit der Einführung des „One-Plate-Assays“ fielen somit das zeitaufwendige und eventuell fehlerbehaftete Überführen der Proben von der Inkubations- in die Messplatte weg.

Ein besonders relevanter, bisher noch unerwählter Vorteil des PAT ist zudem seine „Doppelfunktion“ bei der Testung von PTx. Er kommt der *In vivo*-Situation der Zelle sehr nahe. Somit wird mit dem PAT eine gleichzeitige Überprüfung sowohl der A- als auch der B-UE vorgenommen. Durch die Präsenz intakter, vitaler humaner Zellen im Test, muss keine artifizielle Aktivierung des PTx vorgenommen werden. Die Aktivierung erfolgt, genauso wie im Pertussis erkrankten Patienten, über die natürliche Zellfunktion. Die gleichzeitige Testung beider Untereinheiten gewährleistet somit eine hohe Sicherheit der Aussage. Das gesamte PTx wird erfolgreich auf Irreversibilität der Detoxifizierung hin untersucht und nicht nur alleine seine enzymatisch aktive und toxische Untereinheit. Diese Überprüfung wird in einem einzigen Test vollzogen und nicht wie bei dem oben beschriebenen Ansatz vom NIBSC in zwei getrennten Reaktionen.

4.3.4 Ausblick

Der PAT hat somit gute Chancen, den im europäischen Arzneibuch vorgeschriebenen Tierversuch einmal abzulösen. Die hierfür anzustrebende Optimierung des PAT, wie z. B. dessen Sensitivität zu steigern, könnte bewerkstelligt werden, indem die Zellen während der Inkubation durch die Verwendung von glukosefreiem Zellkulturmedium „hungern“, wodurch der ATP-Spiegel der Zellen zusätzlich abgesenkt wird. Weiterhin sollten Zwischenprodukte aus der azellulären Pertussis-Impfstoffherstellung, so genannten In-Prozess-Proben, im PAT getestet werden, um alle möglichen „Toxinstadien“ zwischen toxisch und vollständig detoxifiziert zu untersuchen. Wissenschaftlich hoch interessant ist zudem die Erforschung der Zielzellen von PTx im PAT. Welche Zellen der heterogenen PBMCs im PAT aktiviert werden, könnte im Durchflusszytometer über fluoreszenzmarkiertes PTx und dessen Bindung an seine Zielzellen bestimmt werden. Zusätzlich könnte die somit definierte Zielzelle nach spezifischen Aktivierungsmarkern hin untersucht werden.

Aufgrund der Dringlichkeit, den Tierversuch abzulösen, sowie eines starken internationalen Interesses am PAT wird 2010 im Paul-Ehrlich-Institut eine internationale Arbeitsgruppe gegründet werden, um die bestehenden alternativen Testprinzipien zu validieren und somit die Ablösung des Tierversuches voranzutreiben. Die Arbeitsgruppe wird aus Forschungsgruppen bestehen, die an der Entwicklung eines alternativen Tests arbeiten wie z. B. das NVI in Holland, das NIBSC in England und BGTD in Kanada sowie Vertretern der Industrie und des europäischen Arzneibuches. Der Aufbau einer Kooperation und ein mehrgleisiger Methodentransfer könnte somit zu einer schnellen Änderung der Monographie [108] führen. Damit wäre die Durchführung der alternativen Nachweismethode von restlich aktiven PTx in adsorbierten Impfstoffen für alle Impfstoffhersteller und Kontrollbehörden europaweit bindend.

5 Zusammenfassung

Weltweit existiert keine zum Tierversuch alternative Methode, um adsorbierte Pertussis-Impfstoffe auf restliche Toxin-Aktivität hin zu untersuchen. Der im Europäischen Arzneibuch vorgeschriebene Tierversuch besitzt nach Erfahrungen der Industrie, internationaler Prüfbehörden sowie des Paul-Ehrlich-Institutes eine schlechte Aussagekraft. Er ist wenig standardisierbar und weist häufig ein zweifelhaftes Ergebnis auf, so dass Wiederholungen und damit einhergehend ein hoher Verbrauch an Versuchstieren unumgänglich sind. Enthält der Impfstoff Reste von nicht-inaktiviertem Pertussis-Toxin (PTx), muss mit schweren und schwersten Nebenwirkungen bei den Impfungen gerechnet werden. In dieser Arbeit wurde ein *In vitro*-Nachweis für aktives PTx entwickelt.

Angeregt durch Publikationen, wonach Pertussis-Toxin humane Monozyten aktiviert, wurde zunächst versucht, diesen Effekt zum Toxin-Nachweis auszunutzen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch eindeutig, dass Pertussis-Toxin selbst nicht zur Stimulation humaner Monozyten führt. Vielmehr konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung dieser Immunzellen auf Kontaminationen durch Lipopolysaccharide zurückzuführen ist. Damit wurden die Aussagen in den oben erwähnten Veröffentlichungen widerlegt. Dieses Ergebnis wurde bereits zur Publikation eingereicht.

Nunmehr wurden verschiedene Ansätze zum Nachweis von Pertussis-Toxin entwickelt, welche seine enzymatischen Aktivitäten als NAD-Glycohydrolase und ADP-Ribosyltransferase ausnutzen. Zunächst wurde versucht, die Hydrolyse von NAD zu ADP-Ribose und Nicotinamid photometrisch nachzuweisen. Wegen unbefriedigender Sensitivität wurde dieses Verfahren zu einem fluorometrischen Nachweis weiterentwickelt. Verwendet wurde hier fluorogenes etheno-NAD, welches von Pertussis-Toxin als Substrat akzeptiert wird. Letzteres Prinzip ist zum *In vitro*-Nachweis von Pertussis-Toxin geeignet, wird jedoch durch das in Impfstoffen häufig verwendete Adsorbens Aluminiumhydroxid gestört. Deshalb wurde dieser Ansatz aufgegeben und ein neuer Weg verfolgt, welcher am Energiestoffwechsel von humanen Zellen ansetzt. Eine Konsequenz des Angriffs von Pertussis-Toxin auf seine Zielzellen im Respirationstrakt besteht –nach komplexen Reaktionen des Signaltransduktionsweges– im Absenken des ATP-Gehaltes. Als menschliche Surrogat-Zellen wurden frisch isolierte periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) sowie die permanente Lymphozyten-Zelllinie Jurkat eingesetzt und deren ATP-Gehalt mittels Luziferin-Luziferase-Lumineszenz gemessen. Der Test wird nicht durch Lipopolysaccharid gestört und auch Aluminiumhydroxid übt erst nach mehreren Stunden Inkubation einen interferierenden Einfluss aus. Ebenso konnte aktives Pertussis-Toxin mit Hilfe kryokonservierter PBMCs detektiert werden, auch in orientierenden Versuchen mit komplexen Impfstoffen. Der Pertussis-ATP-Test kommt der *In vivo*-Situation in der Zelle sehr nahe, weil beide Untereinheiten des Toxins in einem Test überprüft werden. Demnach soll er Bestandteil einer geplanten internationalen Studie zu alternativen Pertussis-Toxin-Testungen sein.

6 Summary

Worldwide no alternative method exists which is suitable to replace animal testing for residual Pertussis Toxin activity in adsorbed pertussis vaccines. According to the opinion of industry, international authorities, and the Paul-Ehrlich-Institute, the animal test required by the European Pharmacopoeia exhibits, weak significance. This test is hard to standardise and is affected by inconsistencies, which make repetitions and accompanying use of high resources of animals inevitable. Residues of active Pertussis Toxin in the final products cause severe side effects. In this work an *in vitro* test for the detection of active Pertussis Toxin was developed.

Motivated by publications describing how Pertussis Toxin activates human monocytes, it was attempted to exploit this effect. However, in this work it was clearly shown that Pertussis Toxin is not able to stimulate human monocytes. In fact, contaminating lipopolysaccharide caused the activation of these human immune cells. Therefore, the above mentioned publications were disproved. This result is submitted for publication.

For this reason, new principles of detection which utilise Pertussis Toxins enzymatic activity such as NAD-glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase were investigated. At first it was attempted to take advantage of the hydrolysis of NAD to ADP-ribose by photometric measurement. Due to the need of improved sensitivity the objective method was altered to a fluorometric approach with fluorescent etheno-NAD as an accepted substrate of Pertussis Toxin. This principle is suitable as an *in vitro* method for detecting active Pertussis Toxin, but is interfered by the common used adjuvant aluminium hydroxide. Therefore this approach was abandoned and a new principle focusing on the energy turnover of human cells was established. As a consequence of being infected by Pertussis Toxin, respiratory tract cells showed a decrease in their ATP level as a consequence of the affected signal transduction pathway. As human surrogate-cells freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as well as the permanent lymphocyte cell line Jurkat were used and their ATP levels were monitored by luciferin luciferase luminescence. This test is not influenced by lipopolysaccharide and aluminium hydroxide disturbance does not occur until after several hours of incubation. In addition this test is even able to detect active Pertussis Toxin with cryo-preserved PBMCs and orientative investigations of complex vaccines showed encouraging results. The Pertussis-ATP-Test is very similar to the *in vivo* situation of the cells, because both subunits of the Pertussis Toxin are examined in one test. Consequently this new method will be subject of a prospective international study for testing active Pertussis Toxin in alternative ways.

7 Literaturverzeichnis

1. Andreassen C, Carbonetti NH. Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to *Bordetella pertussis* respiratory tract infection in mice. *Infect.Immun.* 2008; 76 (11):5139-5148
2. Antoine R, Locht C. The NAD-glycohydrolase activity of the pertussis toxin S1 subunit. Involvement of the catalytic HIS-35 residue. *J.Biol.Chem.* 1994; 269 (9):6450-6457
3. Antoine R, Tallett A, van Heyningen S, Locht C. Evidence for a catalytic role of glutamic acid 129 in the NAD-glycohydrolase activity of the pertussis toxin S1 subunit. *J.Biol.Chem.* 1993; 268 (32):24149-24155
4. Athanassiades TJ. Adjuvant effect of *Bordetella pertussis* vaccine to sheep erythrocytes in mice: enhancement of cell-mediated immunity by subcutaneous administration of adjuvant and antigen. *Infect.Immun.* 1977; 18 (2):416-423
5. Ayme G, Caroff M, Chaby R, Haeffner-Cavaillon N, Le Dur A, Moreau M, Muset M, Myrard MC, Roumiantzeff M, Schulz D, Szabo L. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect.Immun.* 1980; 27 (3):739-745
6. Badr-El-Din MK, Aref GH, Mazloum H, El Towesy YA, Kassem AS, Abdel-Moneim MA, Abbassy AA. The beta-adrenergic receptors in pertussis. *J.Trop.Med.Hyg.* 1976; 79 (10):213-217
7. Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, Fouts TR, Lewis GK. Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. *J.Leukoc.Biol.* 2002; 72 (5):962-969
8. Barrio JR, Secrist JA, III, Leonard NJ. A fluorescent analog of nicotinamide adenine dinucleotide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1972; 69 (8):2039-2042
9. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3 (2):169-176
10. Birnbaumer L. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim.Biophys.Acta* 2007; 1768 (4):772-793
11. Bokoch GM, Gilman AG. Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell* 1984; 39 (2 Pt 1):301-308
12. Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE, Botstein D, Staudt LM, Brown PO, Relman DA. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; 99 (2):972-977
13. Boschwitz JS, Batanghari JW, Kedem H, Relman DA. *Bordetella pertussis* infection of human monocytes inhibits antigen-dependent CD4 T cell proliferation. *J.Infect.Dis.* 1997; 176 (3):678-686

14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72:248-254
15. Brennan MJ, Hannah JH, Leininger E. Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNAc beta 4Gal sequence found in glycosphingolipids. *J.Biol.Chem.* 1991; 266 (28):18827-18831
16. Bruckener KE, el Baya A, Galla HJ, Schmidt MA. Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP. *J.Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 9):1837-1846
17. Burns DL, Fiddner S, Cheung AM, Verma A. Analysis of subassemblies of pertussis toxin subunits in vivo and their interaction with the ptl transport apparatus. *Infect.Immun.* 2004; 72 (9):5365-5372
18. Burns DL, Kenimer JG, Manclark CR. Role of the A subunit of pertussis toxin in alteration of Chinese hamster ovary cell morphology. *Infect.Immun.* 1987; 55 (1):24-28
19. Carbonetti NH, Artamonova GV, Andreasen C, Dudley E, Mays RM, Worthington ZE. Suppression of serum antibody responses by pertussis toxin after respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis* and identification of an immunodominant lipoprotein. *Infect.Immun.* 2004; 72 (6):3350-3358
20. Charles IG, Dougan G, Pickard D, Chatfield S, Smith M, Novotny P, Morrissey P, Fairweather NF. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989; 86 (10):3554-3558
21. Cherry JD. The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics* 2005; 115 (5):1422-1427
22. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 1998; 16 (20):1901-1906
23. Cortina G, Barbieri JT. Localization of a region of the S1 subunit of pertussis toxin required for efficient ADP-ribosyltransferase activity. *J.Biol.Chem.* 1991; 266 (5):3022-3030
24. Cotter PA, Miller JF. *Bordetella*. In: Groisman EA, editor. *Principles of bacterial pathogenesis*. London: Academic Press 2001; 619-674
25. Covacci A, Rappuoli R. Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol.Microbiol.* 1993; 8 (3):429-434
26. Cyr T, Menzies AJ, Calver J, Whitehouse LW. A quantitative analysis for the ADP-ribosylation activity of pertussis toxin: an enzymatic-HPLC coupled assay applicable to formulated whole cell and acellular pertussis vaccine products. *Biologicals* 2001; 29 (2):81-95
27. Damais C, Jupin C, Parant M, Chedid L. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B. *J.Immunol.Methods* 1987; 101 (1):51-56
28. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991; 99 (1):169-175

29. Decker MD, Edwards KM, Steinhoff MC, Rennels MB, Pichichero ME, Englund JA, Anderson EL, Deloria MA, Reed GF. Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics* 1995; 96 (3 Pt 2):557-566
30. Dehus O, Hartung T, Hermann C. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with *Limulus* amoebocyte lysate assay. *J.Endotoxin.Res.* 2006; 12 (3):171-180
31. DeLuca MMWD. Purification and properties of firefly luciferase (Band: Bioluminescence and chemiluminescence). *Methods Enzymol.* 1978; 57:1-653
32. Di Fabio JL, Caroff M, Karibian D, Richards JC, Perry MB. Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1992; 76 (3):275-281
33. Dittmann S, Thilo W. *Vademekum für Impfärzte.* Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1980
34. Duff GW, Atkins E. The inhibitory effect of polymyxin B on endotoxin-induced endogenous pyrogen production. *J.Immunol.Methods* 1982; 52 (3):333-340
35. Edwards KM, Decker MD, Mortimer EA. Pertussis vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines.* Philadelphia: W.B. Saunders Company 1999; 293-344
36. Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, Chatfield S, Dougan G, Roberts M. Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology* 1996; 142 (Pt 11):3261-3268
37. Falnes PO, Sandvig K. Penetration of protein toxins into cells. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2000; 12 (4):407-413
38. Fan X, Stelter F, Menzel R, Jack R, Spreitzer I, Hartung T, Schutt C. Structures in *Bacillus subtilis* are recognized by CD14 in a lipopolysaccharide binding protein-dependent reaction. *Infect.Immun.* 1999; 67 (6):2964-2968
39. Farizo KM, Cafarella TG, Burns DL. Evidence for a ninth gene, *ptII*, in the locus encoding the pertussis toxin secretion system of *Bordetella pertussis* and formation of a P_{II}-P_{IF} complex. *J.Biol.Chem.* 1996; 271 (49):31643-31649
40. Fujiwara H, Iwasa S. The quantitative assay of the clustering activity of the lymphocytosis-promoting factor (pertussis toxin) of *Bordetella pertussis* on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J.Biol.Stand.* 1989; 17 (1):53-64
41. Geuijen CA, Willems RJ, Hoogerhout P, Puijk WC, Meloen RH, Mooi FR. Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. *Infect.Immun.* 1998; 66 (5):2256-2263
42. Gierschik P. ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1992; 175:69-96
43. Gomez SR, Xing DK, Corbel MJ, Coote J, Parton R, Yuen CT. Development of a carbohydrate binding assay for the B-oligomer of pertussis toxin and toxoid. *Anal.Biochem.* 2006; 356 (2):244-253
44. Griffin MR, Ray WA, Mortimer EA, Fenichel GM, Schaffner W. Risk of seizures and encephalopathy after immunization with the diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *JAMA* 1990; 263 (12):1641-1645

45. Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N.Engl.J.Med.* 1996; 334 (6):349-355
46. Hacker J, Heesemann J. *Molekulare Infektionsbiologie*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH 2000
47. Hazeki O, Ui M. Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells. *J.Biol.Chem.* 1981; 256 (6):2856-2862
48. Hazenbos WL, Geuijen CA, van den Berg BM, Mooi FR, van Furth R. Bordetella pertussis fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J.Infect.Dis.* 1995; 171 (4):924-929
49. Hazenbos WL, van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi FR, van Furth R. Binding of FimD on Bordetella pertussis to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J.Immunol.* 1995; 155 (8):3972-3978
50. Hazes B, Read RJ. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* 1997; 36 (37):11051-11054
51. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect.Immun.* 2001; 69 (3):1231-1243
52. Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988; 9 (1):28-32
53. Hewlett EL, Edwards KM. Clinical practice. Pertussis-not just for kids. *N.Engl.J.Med.* 2005; 352 (12):1215-1222
54. Hewlett EL. A commentary on the pathogenesis of pertussis. *Clin.Infect.Dis.* 1999; 28 Suppl 2:S94-S98
55. Hewlett EL. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 1997; 16 (4 Suppl):S78-S84
56. Hewlett EL, Sauer KT, Myers GA, Cowell JL, Guerrant RL. Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect.Immun.* 1983; 40 (3):1198-1203
57. Hingorani VN, Ho YK. Fluorescent labeling of signal-transducing G-proteins. Pertussis toxin-catalyzed etheno-ADP ribosylation of transducin. *J.Biol.Chem.* 1988; 263 (36):19804-19808
58. Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y, Montag-Lessing T, Spreitzer I, Loschner B, van Aalderen M, Bos R, Gommer M, Nibbeling R, Werner-Felmayer G, Loitzl P, Jungi T, Brcic M, Brugger P, Frey E, Bowe G, Casado J, Coecke S, de Lange J, Mogster B, Naess LM, Aaberge IS, Wendel A, Hartung T. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *J.Immunol.Methods* 2005; 298 (1-2):161-173
59. Hoonakker ME, Ruiterkamp N, Hendriksen CFM. The cAMP assay: a functional in vitro alternative to the in vivo histamine sensitization test. *ALTEX.* 2009; 26 (Spec. Issue):207-208

60. Isbrucker R, Prior F, Bliu A. Modified binding assay for the improved detection of residual pertussis toxin in vaccines preparations. *ALTEX*. 2009; 26 (Spec. Issue):207
61. Ishibashi Y, Nishikawa A. Bordetella pertussis infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. *Microb.Pathog.* 2002; 33 (3):115-125
62. Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J.Exp.Med.* 1994; 180 (4):1225-1233
63. Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Furl B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schutt C. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* 1997; 389 (6652):742-745
64. Kaslow HR, Burns DL. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J.* 1992; 6 (9):2684-2690
65. Kaslow HR, Lim LK, Moss J, Lesikar DD. Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin. *Biochemistry* 1987; 26 (1):123-127
66. Katada T, Tamura M, Ui M. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch.Biochem.Biophys.* 1983; 224 (1):290-298
67. Katada T, Ui M. Islet-activating protein. Enhanced insulin secretion and cyclic AMP accumulation in pancreatic islets due to activation of native calcium ionophores. *J.Biol.Chem.* 1979; 254 (2):469-479
68. Kataoka M, Toyoizumi H, Yamamoto A, Ochiai M, Horiuchi Y. Chinese hamster ovary (CHO) cell clustering does not correlate with in vivo histamine-sensitization when measuring residual activity of aldehyde-treated pertussis toxin (PT). *Biologicals* 2002; 30 (4):297-302
69. Kerr JR, Matthews RC. Bordetella pertussis infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 2000; 19 (2):77-88
70. Kluger MJ, Singer R, Eiger SM. Polymyxin B use does not ensure endotoxin-free solution. *J.Immunol.Methods* 1985; 83 (1):201-207
71. Lehrer SB, Vaughan JH, Tan EM. Adjuvant activity of the histamine-sensitizing factor of Bordetella pertussis in different strains of mice. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 1975; 49 (6):796-813
72. Lei MG, Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with S2 subunit of pertussis toxin. *J.Biol.Chem.* 1993; 268 (2):1488-1493
73. Li LJ, Dougan G, Novotny P, Charles IG. P.70 pertactin, an outer-membrane protein from Bordetella parapertussis: cloning, nucleotide sequence and surface expression in Escherichia coli. *Mol.Microbiol.* 1991; 5 (2):409-417
74. Lobban MD, van Heyningen S. Thiol reagents are substrates for the ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin. *FEBS Lett.* 1988; 233 (2):229-232
75. Loch C, Antoine R. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* 1995; 77 (5):333-340

76. Locht C, Lobet Y, Feron C, Cieplak W, Keith JM. The role of cysteine 41 in the enzymatic activities of the pertussis toxin S1 subunit as investigated by site-directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.* 1990; 265 (8):4552-4559
77. Locht C, Keith JM. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 1986; 232 (4755):1258-1264
78. Mann PB, Wolfe D, Latz E, Golenbock D, Preston A, Harvill ET. Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect.Immun.* 2005; 73 (12):8144-8152
79. Mathison J, Wolfson E, Steinemann S, Tobias P, Ulevitch R. Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages. *J.Clin.Invest* 1993; 92 (4):2053-2059
80. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin.Microbiol.Rev.* 2005; 18 (2):326-382
81. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci.* 2001; 6:E168-E186
82. McGuirk P, Johnson PA, Ryan EJ, Mills KH. Filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* modulate immune responses to unrelated antigens. *J.Infect.Dis.* 2000; 182 (4):1286-1289
83. McGuirk P, Mills KH. Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Eur.J.Immunol.* 2000; 30 (2):415-422
84. Melton AR, Weiss AA. Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J.Bacteriol.* 1989; 171 (11):6206-6212
85. Molski TF, Naccache PH, Marsh ML, Kermodie J, Becker EL, Sha'afi RI. Pertussis toxin inhibits the rise in the intracellular concentration of free calcium that is induced by chemotactic factors in rabbit neutrophils: possible role of the "G proteins" in calcium mobilization. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1984; 124 (2):644-650
86. Montag T, Spreitzer I, Loschner B, Unkelbach U, Flory E, Sanzenbacher R, Schwanig M, Schneider CK. Safety testing of cell-based medicinal products: opportunities for the monocyte activation test for pyrogens. *ALTEX.* 2007; 24 (2):81-89
87. Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect.Immun.* 1985; 47 (3):744-751
88. Moore DL, Le Saux N, Scheifele D, Halperin SA. Lack of evidence of encephalopathy related to pertussis vaccine: active surveillance by IMPACT, Canada, 1993-2002. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 2004; 23 (6):568-571
89. Moss J, Stanley SJ, Burns DL, Hsia JA, Yost DA, Myers GA, Hewlett EL. Activation by thiol of the latent NAD glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase activities of *Bordetella pertussis* toxin (islet-activating protein). *J.Biol.Chem.* 1983; 258 (19):11879-11882
90. Mountzouros KT, Kimura A, Cowell JL. A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis* reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with *B. pertussis*. *Infect.Immun.* 1992; 60 (12):5316-5318

91. Moxon ER, Rappuoli R. Haemophilus influenzae infections and whooping cough. *Lancet* 1990; 335 (8701):1324-1329
92. Munoz JJ. Biological activities of pertussigen. In: Sekura R, Moss J, Vaughan M, editors. *Pertussis toxin*. New York: Academic Press 1985; 1-18
93. Munoz JJ, Arai H, Bergman RK, Sadowski PL. Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect.Immun.* 1981; 33 (3):820-826
94. Munoz J, Hestekin BM. Method of preparing histamine sensitizing factor. *Nature* 1962; 196:1192-1193
95. Neer EJ, Lok JM, Wolf LG. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J.Biol.Chem.* 1984; 259 (22):14222-14229
96. Nelson JD. The changing epidemiology of pertussis in young infants. The role of adults as reservoirs of infection. *Am.J.Dis.Child* 1978; 132 (4):371-373
97. Nicosia A, Perugini M, Franzini C, Casagli MC, Borri MG, Antoni G, Almoni M, Neri P, Ratti G, Rappuoli R. Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1986; 83 (13):4631-4635
98. Nowotny A. Shedding bacteria. *Biomembranes*. 1983; 11:1-20
99. Ocklitz HW. *Der Keuchhusten*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1969
100. Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet* 1997; 350 (9091):1569-1577
101. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, Goldsmith CS, Greer PW, Montague JL, Eliason MT, Holman RC, Guarner J, Shieh WJ, Zaki SR. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin.Infect.Dis.* 2008; 47 (3):328-338
102. Parton R. Review of the biology of *Bordetella pertussis*. *Biologicals* 1999; 27 (2):71-76
103. Passador L, Iglewski W. ADP-ribosylating toxins. *Methods Enzymol.* 1994; 235:617-631
104. Peppler MS. Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella pertussis* and their phenotype variants. *Infect.Immun.* 1984; 43 (1):224-232
105. Perraud AL, Weiss V, Gross R. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* 1999; 7 (3):115-120
106. Ph. Eur. Monograph. *Bacterial endotoxins*, 20614, 6th Edition 2008; 182-189
107. Ph. Eur. Monograph. *Monocyte-activation test*, 20630, 6th Edition 2010; 5440-5445
108. Ph. Eur. Monograph. *Pertussis vaccine (acellular, component, adsorbed)*, 1356, 6th Edition 2008; 820-822
109. Pittman M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr.Infect.Dis.* 1984; 3 (5):467-486
110. Pittman M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev.Infect.Dis.* 1979; 1 (3):401-412

111. Pittman M. Comparison of the histamine sensitizing property with the protective activity of pertussis vaccines for mice. *J.Infect.Dis.* 1951; 89 (3):300-304
112. Pittman M. Sensitivity of mice to histamine during respiratory infection by *Hemophilus pertussis*. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1951; 77 (1):70-74
113. Pizza M, Fontana MR, Scarlato V, Rappuoli R. Genetic detoxification of bacterial toxins. *Methods Mol.Med.* 2003; 87:133-152
114. Pizza M, Bugnoli M, Manetti R, Covacci A, Rappuoli R. The subunit S1 is important for pertussis toxin secretion. *J.Biol.Chem.* 1990; 265 (29):17759-17763
115. Preston A, Allen AG, Cadisch J, Thomas R, Stevens K, Churcher CM, Badcock KL, Parkhill J, Barrell B, Maskell DJ. Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *bordetellae*. *Infect.Immun.* 1999; 67 (8):3763-3767
116. Randall LL, Hardy SJ. Export of protein in bacteria. *Microbiol.Rev.* 1984; 48 (4):290-298
117. Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989; 86 (8):2637-2641
118. Rogers MJ, Cohen J. Comparison of the binding of gram-negative bacterial endotoxin by polymyxin B sulphate, colistin sulphate and colistin sulphomethate sodium. *Infection* 1986; 14 (2):79-81
119. Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int.Immunol.* 1998; 10 (5):651-662
120. Sato Y, Kimura M, Fukumi H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1984; 1 (8369):122-126
121. Sato Y, Arai H, Suzuki K. Leukocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. 3. Its identity with protective antigen. *Infect.Immun.* 1974; 9 (5):801-810
122. Saukkonen K, Burnette WN, Mar VL, Masure HR, Tuomanen EI. Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89 (1):118-122
123. Saukkonen K, Cabellos C, Burroughs M, Prasad S, Tuomanen E. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J.Exp.Med.* 1991; 173 (5):1143-1149
124. Scheuring J, Schramm VL. Pertussis toxin: transition state analysis for ADP-ribosylation of G-protein peptide alpha13C20. *Biochemistry* 1997; 36 (27):8215-8223
125. Schlegel HG. *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1992
126. Schmidt MA, Raupach B, Szulczynski M, Marzillier J. Identification of linear B-cell determinants of pertussis toxin associated with the receptor recognition site of the S3 subunit. *Infect.Immun.* 1991; 59 (4):1402-1408
127. Schmidt MA, Schmidt W. Inhibition of pertussis toxin binding to model receptors by anti-peptide antibodies directed at an antigenic domain of the S2 subunit. *Infect.Immun.* 1989; 57 (12):3828-3833
128. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249 (4975):1429-1431

129. Sekiya K. Effects of *Bordetella pertussis* components on IgE and IgG1 responses. *Microbiol.Immunol.* 1983; 27 (11):905-915
130. Shive CL, Hofstetter H, Arredondo L, Shaw C, Forsthuber TG. The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells. *Eur.J.Immunol.* 2000; 30 (8):2422-2431
131. Shumilla JA, Lacaille V, Hornell TM, Huang J, Narasimhan S, Relman DA, Mellins ED. *Bordetella pertussis* infection of primary human monocytes alters HLA-DR expression. *Infect.Immun.* 2004; 72 (3):1450-1462
132. Spangrude GJ, Sacchi F, Hill HR, Van Epps DE, Daynes RA. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J.Immunol.* 1985; 135 (6):4135-4143
133. Stainer DW, Scholte MJ. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J.Gen.Microbiol.* 1970; 63 (2):211-220
134. Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure.* 1994; 2 (1):45-57
135. Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Heerze LD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding. *Nat.Struct.Biol.* 1994; 1 (9):591-596
136. Stelter F, Bernheiden M, Menzel R, Jack RS, Witt S, Fan X, Pfister M, Schutt C. Mutation of amino acids 39-44 of human CD14 abrogates binding of lipopolysaccharide and *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* 1997; 243 (1-2):100-109
137. Stetler HC, Orenstein WA, Bart KJ, Brink EW, Brennan JP, Hinman AR. History of convulsions and use of pertussis vaccine. *J.Pediatr.* 1985; 107 (2):175-179
138. Tamura M, Nogimori K, Yajima M, Ase K, Ui M. A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. *J.Biol.Chem.* 1983; 258 (11):6756-6761
139. Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 1982; 21 (22):5516-5522
140. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 1999
141. Tonon S, Goriely S, Aksoy E, Pradier O, Del Giudice G, Trannoy E, Willems F, Goldman M, De Wit D. *Bordetella pertussis* toxin induces the release of inflammatory cytokines and dendritic cell activation in whole blood: impaired responses in human newborns. *Eur.J.Immunol.* 2002; 32 (11):3118-3125
142. Uhl MA, Miller JF. *Bordetella pertussis* BvgAS virulence control system. In: Hoch JA, Silhavy TJ, editors. *Two-component signal transduction.* Washington: ASM Press 1995; 333-349
143. Uhl MA, Miller JF. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; 91 (3):1163-1167
144. van't Wout J, Burnette WN, Mar VL, Rozdzinski E, Wright SD, Tuomanen EI. Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect.Immun.* 1992; 60 (8):3303-3308

145. Ward JE, Jr., Dale EM, Nester EW, Binns AN. Identification of a virB10 protein aggregate in the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Bacteriol.* 1990; 172 (9):5200-5210
146. Warren HS, Glennon ML, Wainwright N, Amato SF, Black KM, Kirsch SJ, Riveau GR, Whyte RI, Zapol WM, Novitsky TJ. Binding and neutralization of endotoxin by *Limulus* antilipopolysaccharide factor. *Infect.Immun.* 1992; 60 (6):2506-2513
147. Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, Amano K. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J.Gen.Microbiol.* 1990; 136 (3):489-493
148. Weekly Epidemiological Record.
http://www.who.int/immunization/topics/wer8004pertussis_Jan_2005.pdf. World Health Organisation. 2005; 80:29-40
149. Weiss AA, Hewlett EL. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu.Rev.Microbiol.* 1986; 40:661-686
150. West RE, Jr., Moss J, Vaughan M, Liu T, Liu TY. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J.Biol.Chem.* 1985; 260 (27):14428-14430
151. Witvliet MH, Vogel ML, Wiertz EJ, Poolman JT. Interaction of pertussis toxin with human T lymphocytes. *Infect.Immun.* 1992; 60 (12):5085-5090
152. Witvliet MH, Burns DL, Brennan MJ, Poolman JT, Manclark CR. Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins. *Infect.Immun.* 1989; 57 (11):3324-3330
153. Yajima M, Hosoda K, Kanbayashi Y, Nakamura T, Nogimori K, Mizushima Y, Nakase Y, Ui M. Islets-activating protein (IAP) in *Bordetella pertussis* that potentiates insulin secretory responses of rats. Purification and characterization. *J.Biochem.* 1978; 83 (1):295-303
154. Yuen CT, Canthaboo C, Menzies JA, Cyr T, Whitehouse LW, Jones C, Corbel MJ, Xing D. Detection of residual pertussis toxin in vaccines using a modified ribosylation assay. *Vaccine* 2002; 21 (1-2):44-52

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: An Pertussis erkrankte Säuglinge während eines Hustenanfalls.	5
Abb. 2: Adhäsion von <i>B. pertussis</i> an die Zilien des Respirationstraktes	6
Abb. 3: Entstehung von Fieber durch ein exogenes Pyrogen	9
Abb. 4: Übersicht über die Membranen Gram-negativer Bakterien, Aufbau eines LPS-Moleküls der <i>Enterobacteriaceae</i> und im Vergleich von <i>B. pertussis</i>	10
Abb. 5: Untereinheitenstruktur des Pertussis-Toxins	11
Abb. 6: 3D-Darstellung des Pertussis-Toxins	12
Abb. 7: Schematische Darstellung der Reaktion eines G _i -Proteins bei Abwesenheit und Anwesenheit von PTx.....	14
Abb. 8: Schema zur Versuchsdurchführung des <i>Pertussis</i> -MAT	22
Abb. 9: Schematische Darstellung der Aufreinigung humaner PBMCs	33
Abb. 10: Übersichtsschema zur Durchführung des PAT.....	38
Abb. 11: Fließschema zu den Vorversuchen des <i>Pertussis</i> -MAT	45
Abb. 12: Schematische Darstellung der Strategie 1, zur Überprüfung der Spezifität des <i>Pertussis</i> -MAT.	47
Abb. 13: Schematische Darstellung der Vorgehensweise, um die Spezifität des <i>Pertussis</i> -MAT zu überprüfen und zu gewährleisten.....	48
Abb. 14: Überprüfung der LPS-Inhibitoren ENP und anti-TLR4 AK.....	49
Abb. 15: Eignung des anti-CD14 AK sowie Vergleich der biologischen Aktivität von <i>B. pertussis</i> -LPS und WHO-LPS	50
Abb. 16: Schematisch dargestellte Versuchsdurchführung zur systematischen Überprüfung der Spezifität des <i>Pertussis</i> -MAT	52
Abb. 17: Einfluss von PTx und PTg auf humane Monozyten.....	53
Abb. 18: Elektrophorese von PTx und PTg.....	55
Abb. 19: Untersuchung des Aktivierungspotentials von beiden unbehandelten und LPS-abgereicherten PTx und PTg auf humane Monozyten	57
Abb. 20: Schematische Darstellung aktives PTx photometrisch nachzuweisen	60
Abb. 21: Photometrischer Nachweis von aktivem PTx	61
Abb. 22: Hintergrund der Messmethode aktives PTx fluorometrisch nachzuweisen	62
Abb. 23: Nachweis von aktivem PTx mittels Hydrolyse von etheno-NAD ⁺	63
Abb. 24: PTx-Aktivität bei zwei verschiedenen Aktivierungspuffern	64
Abb. 25: pH-Wert-Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften von etheno-NAD ⁺	65
Abb. 26: Überprüfung des möglichen Störfaktors Aluminiumhydroxid.....	66
Abb. 27: Versuch den testinterferierenden Einfluss von Al(OH) ₃ mit Hilfe erhöhter Konzentration an positiv geladenen Na ⁺ -Ionen aufzuheben	67
Abb. 28: Versuch den testinterferierenden Einfluss von freiem Al(OH) ₃ mit Hilfe des testunbeteiligten Proteins Humanalbumin zu neutralisieren.....	68
Abb. 29: Messung der restlichen PTx-Aktivität in vier adsorbierten Impfstoffen	69
Abb. 30: Hintergrund der Messmethode aktives PTx luminometrisch nachzuweisen...	71
Abb. 31: Differenzierung frisch isolierter PBMCs im Durchflusszytometer	72
Abb. 32: Kontrolle der Jurkat-Zellen auf das Vorhandensein von CD3 und CD45	74
Abb. 33: Nachweis von aktivem PTx im <i>Pertussis</i> -ATP-Test.....	76
Abb. 34: Einzelpenderkontrolle des PBMC-Pools im PAT Phase A.....	77

Abb. 35: Überprüfung der Spezifität des PAT mit Hilfe von hitzeinaktiviertem PTx	78
Abb. 36: Ausschluss von möglichen Interferenzen (freies ATP)	79
Abb. 37: Ausschluss von möglichen Interferenzen (LPS)	80
Abb. 38: Charakterisierung von möglichen Interferenzen (Al(OH) ₃)	81
Abb. 39: PAT versus HIST	82
Abb. 40: PAT Phase B: ATP-Spiegel frisch isolierter PBMCs	83
Abb. 41: Einsatz von Jurkat-Zellen im PAT Phase B	84
Abb. 42: Vitalitätskontrolle der im PAT verwendeten Jurkat-Zellen	85
Abb. 43: Methodenentwicklung für die Herstellung von Kryo-PBMCs	86
Abb. 44: Differenzierung von Kryo-PBMCs im Durchflusszytometer.	87
Abb. 45: Vitalitätskontrolle im Durchflusszytometer: Kryo-PBMCs versus frische PBMCs	89
Abb. 46: PAT als „One-Plate-Assay“ nach Versuchsvorschrift der Phase C	90
Abb. 47: PAT mit PTx und einem tetravalenten Adsorbat-Impfstoff	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Virulenzfaktoren von <i>B. pertussis</i>	7
Tab. 2: Verwendete Pertussis-Toxine sowie Negativ- und Positivkontrollen	21
Tab. 3: Modifizierte Durchführung des ELISA	24
Tab. 4: Photometrischer Nachweis: Inkubation von PTx mit NAD ⁺ (1. Schritt)	27
Tab. 5: Photometrischer Nachweis: Gekoppelte LDH-Rektion (2. Schritt)	28
Tab. 6: Im Fluoreszenz-Test eingesetzte Impfstoffe	30
Tab. 7: Zelldifferenzierung im Durchflusszytometer: AK-Färbung und Erythrozyten- Lyse	36
Tab. 8: Im PAT getestete Pertussis-Toxine	39
Tab. 9: Im PAT Phase B eingesetzter Impfstoff	40
Tab. 10: Pipettierschema des PAT Phase A	42
Tab. 11: Pipettierschema des PAT Phase B (frische PBMCs und Jurkat-Zellen)	42
Tab. 12: Pipettierschema des PAT Phase B (Kryo-PBMCs)	43
Tab. 13: Volumina der Standardtestungen des PAT Phase B	43
Tab. 14: Pipettierschema des PAT Phase C	44
Tab. 15: LPS-Gehalt von sechs unterschiedlichen Original-Pertussis-Toxinen	46
Tab. 16: LPS-Abreicherung mittels LPS-bindender Beads	47
Tab. 17: Erfolg der LPS-Abreicherung sowie Kontrolle möglicher Proteinverluste	54
Tab. 18: HIST mit originalem und LPS-abgereichertem PTx	58
Tab. 19: Übersichtstabelle zum PTx und den hieraus entwickelten Testgrundlagen	59
Tab. 20: Bewertung der definierten Störgrößen des Fluoreszenz-Tests	70
Tab. 21: Differenzierung frisch isolierter PBMCs	73
Tab. 22: Schematische Übersicht des PAT (Entwicklungsphasen A, B und C)	75
Tab. 23: Differenzierung von Kryo-PBMCs	88

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

Ac	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AK	Antikörper
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
A-UE	A-Untereinheit des Pertussis-Toxins
BGTD	Biologics and Genetic Therapies Directorate
<i>B. p.</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BRP	biologische Referenzpräparation
B-UE	B-Untereinheit des Pertussis-Toxins
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CHO	Chinese Hamster Ovary
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNAD	siehe etheno-NAD
etheno-NAD	Nicotinamid-1,N ⁶ -Ethenoadenin-Dinukleotid
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FHA	Filamentöses Hämagglutinin
FIM	Fimbrien
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
G-Protein	GTP-bindendes Protein
h	Stunde (Hora)
HIST	(Maus)-Histamin-Sensibilisierungstest
IL	Interleukin

LAL	Limulus-Amoebocyten-Lysat
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LDH	Lactatdehydrogenase
kDa	Kilodalton
LBP	LPS-Binding-Protein
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (Mol/l)
MAT	Monozyten-Aktivierungs-Test
min	Minuten
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NK	Negativkontrolle
NVI	Netherlands Vaccine Institute
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen; peripheral Blood Mononuclear Cells
PAT	Pertussis-ATP-Test
PE	Phycoerythrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PK	Positivkontrolle
PMB	Polymyxin B
PRN	Pertactin
PT	Pertussis-Toxin (im Allgemeinen)
PTd	detoxifiziertes Pertussis-Toxin
PTg	genetisch detoxifiziertes Pertussis-Toxin
PTx	toxisches Pertussis-Toxin
RT	Raumtemperatur
TLR	toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UE	Untereinheit
WHO	Weltgesundheitsorganisation; World Health Organization

Danksagung

Bei meinem Betreuer an der Universität Mainz [REDACTED] möchte ich mich herzlich bedanken, dass er mir die externe Anfertigung dieses interessanten Themas ermöglicht hat und zu jeder Zeit kompetent und offen für mich die universitäre Brücke geschlagen hat.

[REDACTED] danke ich für die Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Meinem Betreuer am Paul-Ehrlich-Institut [REDACTED] danke ich sehr für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie sein motivierendes Vertrauen in mich und diese Arbeit. Danke für die vergangenen Jahre voller naturwissenschaftlicher und auch mal sozialwissenschaftlicher – aber nicht minder interessanter – Diskussionen, Anleitungen und Erfahrungsweitergaben.

Mein Dank geht ebenfalls an [REDACTED], auf dessen Unterstützung, Rückhalt und gerechten Einsatz ich mich immer verlassen konnte.

Ein großes Dankeschön geht an [REDACTED], der mir immer motivierend zur Seite stand und den ein oder anderen Versuch im Vorfeld durch die warnenden Worte „Christina nicht zu kompliziert“ gerettet hat.

Bei [REDACTED] möchte ich mich herzlich bedanken, auf deren kompetente und verlässliche Hilfestellung ich zu jeder Zeit bauen konnte und mit der so manche zähe Rechnerphasen durch erfrischende Gespräche aufgelockert wurden.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine fleißigen Korrekturleserinnen [REDACTED] für das sehr schnelle Lesen meiner Arbeit trotz weihnachtlicher Nebenveranstaltungen.

[REDACTED] danke ich für das stets sehr gute und schnelle „Treffen“ der zahlreichen Venen meiner vielen freiwilligen Spender.

[REDACTED] sende ich ein dreifach donnerndes Danke fürs Zuhören, einfach mal nur Quatschen und Lachen. Bei der gesamten Arbeitsgruppe, deren Namen ich leider nicht alle einzeln aufzählen werde, möchte ich mich herzlich für die aufmunternde und fröhliche Atmosphäre bedanken. Es ist so schön, dass man mit jedem von Euch über seine Probleme reden kann.

Bei meiner gesamten Familie, vor allem auch [REDACTED], möchte ich mich für den Rückhalt und deren tiefes Interesse an meinem Befinden und meiner Arbeit bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich immer meinen Weg haben gehen lassen; an [REDACTED] für Ihre liebevolle Fürsorge und [REDACTED] für sein Vertrauen in mich und das sehr gute und schnelle Lesen dieser für ihn fachfremden Arbeit. [REDACTED]

██████ sende ich ████████████████████ Dank mit kubanischem Rhythmus. Es ist so schön, Dich immer an meiner Seite zu wissen.

██████████████████, besonders ████████████████████ und meinen ████████████████████ ████████████████████, danke ich nicht nur für die zahlreichen fröhlichen Stunden sondern auch die vielen tiefen Gespräche und die Möglichkeit bei Euch richtig Abschalten zu können.

Mein letzter tiefster Dank geht an ████████████████████, der mir zu jeder Zeit in allen Bereichen liebevoll und stark zur Seite stand und steht. Vielen Dank für das was wir zusammen haben.

Veröffentlichungen

Publikationen

1. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Loeschner B, Rosskopf U, Hanschmann KM, Schwanig M, Schneider CK, Lieb B and Montag T. *Bordetella pertussis* toxin does not induce the release of pro-inflammatory cytokines in human whole blood. Eingereicht im Dezember 2009 bei Vaccine.
2. Montag T, Störmer M, Schurig U, Brachert J, Bubenzer M, Sicker U, Beshir R, Spreitzer I, Löschner B, **Bache C**, Becker B und Schneider CK. Probleme der mikrobiellen Sicherheit bei Neuartigen Therapien – die Quadratur des Kreises. Bundesgesundheitsblatt (Sonderheft). Zur Publikation angenommen für Januar 2010.
3. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Loeschner B, Schwanig M, Schneider CK and Montag T. Alternative *in vitro* method for detection of Pertussis Toxin in vaccines to replace the mandatory animal test. ALTEX 2007; 24(3):185; (Poster-Abstract)

Vorträge

1. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Schneider CK, Schwanig M and Montag T. Novel *in vitro* test for toxicity of Pertussis Toxin. 1st International Congress on Pharmacology of Vaccines 2009; Varadero, Cuba
2. Montag T, Spreitzer I, Löschner B, Becker B und **Bache C**. Vom Projekt zur Lösung: Praxisrelevanz der BMBF-Förderung zur Ablösung von Tierversuchen. Ehrenvortrag als herausragendes Projekt des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Verleihung des 27. Forschungspreises zur Förderung methodischer Arbeiten mit dem Ziel der Einschränkung und des Ersatzes von Tierversuchen durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMBELV) 2008; Berlin
3. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Löschner B, Schwanig M and Montag T. Detection of active Pertussis Toxin by its biochemical reaction. Plenum, Paul-Ehrlich-Institut 2007; Langen
4. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Schwanig M and Montag T. Functional characterisation of active Pertussis Toxin. Plenum, Paul-Ehrlich-Institut 2006; Langen

Poster

1. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Schneider CK, Schwanig M and Montag T. Novel alternative *in vitro* method for determination of Pertussis Toxin activity in vaccines. 7th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2009; Rome, Italy
2. *Spreitzer I, Loeschner B, **Bache C**, Hanschmann KM, Schneider CK and Montag T. Routine and experimental application of the monocyte activation test (MAT) in the Paul-Ehrlich-Institut (PEI). 7th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2009; Rome, Italy

3. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Loeschner B, Schwanig M, Schneider CK and Montag T. Alternative *in vitro* method for detection of Pertussis Toxin in vaccines to replace the mandatory animal test. 14th World Congress on Alternatives to Animal Testing 2007; Linz, Austria
4. Spreitzer I, Löschner B, **Bache C**, Schneider CK, Hanschmann KM and Montag T. Cryopreserved human whole blood (-80°C): Development and optimisation of a monocyte source stable for alternative pyrogen tests (Monocyte activation tests). 14th World Congress on Alternatives to Animal Testing 2007; Linz, Austria
5. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Loeschner B, Schwanig M, Schneider CK and Montag T. Replacement of the mandatory animal test by an alternative *in vitro* method to detect Pertussis Toxin in vaccines. 6th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2007; Tokyo, Japan
6. **Bache C**, Spreitzer I, Becker B, Löschner B, Schurig U, Schwanig M und Montag T. Nachweis von aktivem Keuchhusten-Toxin in Impfstoffen. Tag der offenen Tür; Paul-Ehrlich-Institut 2006; Langen

*Ausgezeichnet mit dem Posterpreis: „Doerenkamp-Zbinden Poster Prize 2009“ der Stiftung: „Doerenkamp-Zbinden Foundation for Alternatives in Biomedicine“