

Detektion von Pathogenen

DOI: 10.1002/ange.200602048

Antikörper gegen ein Kohlenhydrat-Antigen zum Nachweis von Anthrax-Sporen**


Marco Tamborrini, Daniel B. Werz, Joachim Frey,
Gerd Pluschke und Peter H. Seeberger*Die Sporen von *Bacillus anthracis*, dem Milzbranderreger, sind in den letzten Jahren wiederholt für bioterroristische

[*] Dr. D. B. Werz, Prof. Dr. P. H. Seeberger
Laboratorium für Organische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich
ETH-Hönggerberg, HCI F 315
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 44-633-1235
E-Mail: seeberger@org.chem.ethz.ch

M. Tamborrini, Prof. Dr. G. Pluschke
Schweizer Tropeninstitut
Socinstrasse 57, 4002 Basel (Schweiz)

Prof. Dr. J. Frey
Institut für Veterinärbakteriologie
Universität Bern
Länggassstrasse 122
3012 Bern (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt von der ETH Zürich, durch ein Feodor Lynen-Stipendium der Alexander von Humboldt-Stiftung (AvH) und durch ein Emmy Noether-Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (für D.B.W.).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

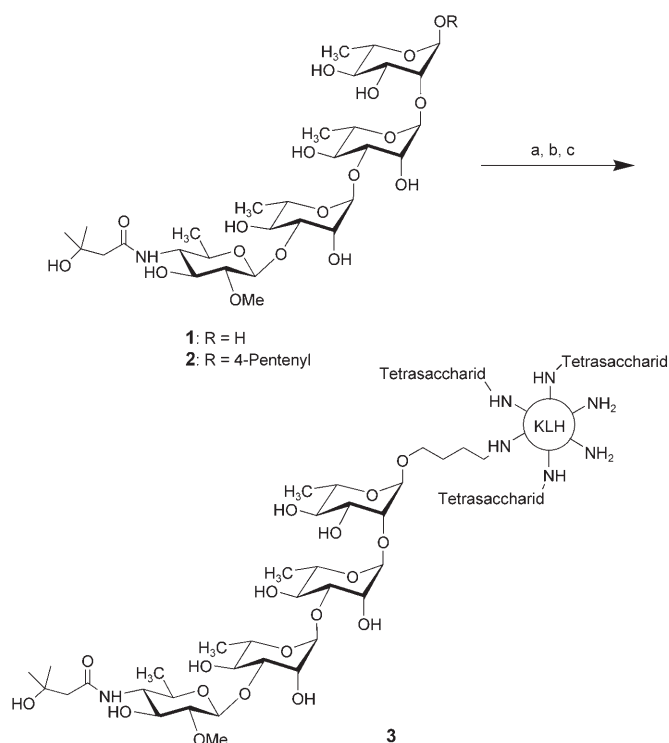
Anschläge gegen die Zivilbevölkerung verwendet worden. Wenn diese Dauerformen des Erregers eingeatmet werden, sterben die meisten Opfer in Kürze, sofern nicht innerhalb von 24–48 h mit einer Behandlung begonnen wird.^[1] Nach der Aufnahme in den Körper fangen die Sporen an zu keimen, die vegetativen Zellen vermehren sich und bilden Toxine, und Läsionen entstehen, von denen aus sich die Infektion verbreitet, was häufig zum Tode führt. Daher nimmt man an, dass ein effektiver Anthrax-Impfstoff verschiedene Antigene enthalten sollte. Möglicher Bestandteil eines solchen Impfstoffes könnte ein Oberflächen-Antigen der Sporen sein, das die Bildung von Antikörpern bewirkt, welche die Keimung der Sporen unterdrücken und die Phagocytose durch Makrophagen beschleunigen.

Verschiedene Detektionssysteme wurden entwickelt, um Sporen von *B. anthracis* nachzuweisen^[2–4] und die große Zahl an Proben, die jedes Jahr getestet werden müssen, zu bearbeiten. Verfahren zur Detektion der bakteriellen DNA durch Nucleinsäureamplifikation (PCR) oder der Nachweis der Bakterien in Kulturen anhand ihres Phänotyps liefern die eindeutigsten Resultate; diese Methoden sind jedoch aufwändig, teuer und langsam. Nachweismethoden, die auf der Bindung von Antikörpern an Peptid- oder Protein-Antigene der Sporenoberfläche beruhen, sind technisch weniger anspruchsvoll, jedoch mit höheren Fehlerraten verbunden. Die Ähnlichkeit der Protein-Antigene an der Sporenoberfläche des opportunistischen Pathogens *B. cereus* und anderer nahe verwandter Bakterienarten erschwert die Entwicklung eines zuverlässigen und selektiven Detektionssystems auf Antikörperbasis beträchtlich.

Auf der Oberfläche der Sporen von *B. anthracis* wurde das einzigartige Tetrasaccharid **1** (Schema 1) gefunden, dessen endständiger nichtreduzierender Zucker, die Anthrose, zuvor noch nicht beschrieben wurde.^[5] Der Zugang zu hinreichenden Mengen an reinen Oberflächen-Oligosacchariden durch Isolierung aus kultivierten Zellen ist oft schwierig. Daher ist die chemische Synthese solcher Kohlenhydrat-Antigene häufig der letzte Ausweg. Da das Kohlenhydrat-Antigen **1** bei nahe verwandten Arten nicht gefunden wurde, sollte ein spezifischer Nachweis der Sporen von *B. anthracis* mit Antikörpern gegen diese Struktur möglich sein.

Bei unserem Ansatz erhielten wir das Tetrasaccharid durch chemische Synthese^[6,7] in Form eines *n*-Pentenyglycosids **2**.^[6] Der Linker am reduzierenden Ende wurde genutzt, um nach Ozonolyse der Doppelbindung eine Aldehydfunktion als reaktive Gruppe zu erzeugen. Eine reduktive Aminierung^[8,9] verknüpfte die synthetische Verbindung **2** mit einem KLH-Trägerprotein zu dem Kohlenhydrat-Protein-Konjugat **3** (Schema 1), das in Mäusen immunogen war. Die Konjugation an Trägerproteine stellt einen effizienten Weg dar, die Immunogenität von Oligosaccharid-Antigenen zu erhöhen. Die Peptideinheiten der Proteine können durch trägerspezifische T-Zellen erkannt werden, wobei eine T-Zell-unabhängige Antwort gegen das nichtkonjugierte Oligosaccharid in eine wirkungsvollere T-Zell-abhängige Antwort überführt wird.

Das Tetrasaccharid-KLH-Konjugat, formuliert in Immun-Easy-Adjuvans (QIAGEN), bewirkte nach der dritten Immunisierung die Bildung von IgG-Antikörpern. Drei B-Zell-



Schema 1. Das Tetrasaccharid **1**, das auf der Sporen-Oberfläche von *B. anthracis* gefunden wird, sein synthetisches Analogon **2** und die Konjugation über den Pentenyl-Linker von **2** an ein KLH-Trägerprotein zum KLH-Tetrasaccharid-Konjugat **3**: a) O_3 , MeOH, -78°C , 10 min; b) Me_2S , MeOH, RT, 2 h; c) KLH-Trägerprotein, PBS-Puffer (pH 7.2), NaBH_3CN , 37°C , 48 h. PBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung.

Hybridome, die Tetrasaccharid-spezifische monoklonale IgG-Antikörper (mAk) sezernieren, wurden aus den Milzzellen einer immunisierten Maus erhalten. Indirekte Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass alle drei mAk die Endosporen von *B. anthracis* spezifisch erkennen. Dagegen wurde in Vergleichsstudien keine Bindung der mAk an die Sporen der nahe verwandten Bakterien *B. cereus*, *B. subtilis* und *B. thuringiensis* gefunden (Abbildung 1).

Diese Ergebnisse zeigen in beeindruckender Weise, dass Unterschiede der Kohlenhydrat-Antigene auf Zelloberflächen die Grundlage für die Herstellung immunologischer Reagentien bilden können, wie dies hier am Beispiel des synthetischen Tetrasaccharid-Kohlenhydrat-Antigens **2** von *B. anthracis* beschrieben ist. Die Tetrasaccharid-spezifischen mAk sollten für ein sowohl hoch empfindliches, als auch spezifisches Detektionssystem für Sporen von *B. anthracis* geeignet sein. Diese Resultate könnten darüber hinaus Wege zur Entwicklung von neuen Therapie- oder Prophylaxe-Ansätzen öffnen.

Eingegangen am 23. Mai 2006

Online veröffentlicht am 17. August 2006

Stichwörter: Anthrax · Detektion von Pathogenen · Kohlenhydrate · Monoklonale Antikörper · Oligosaccharide

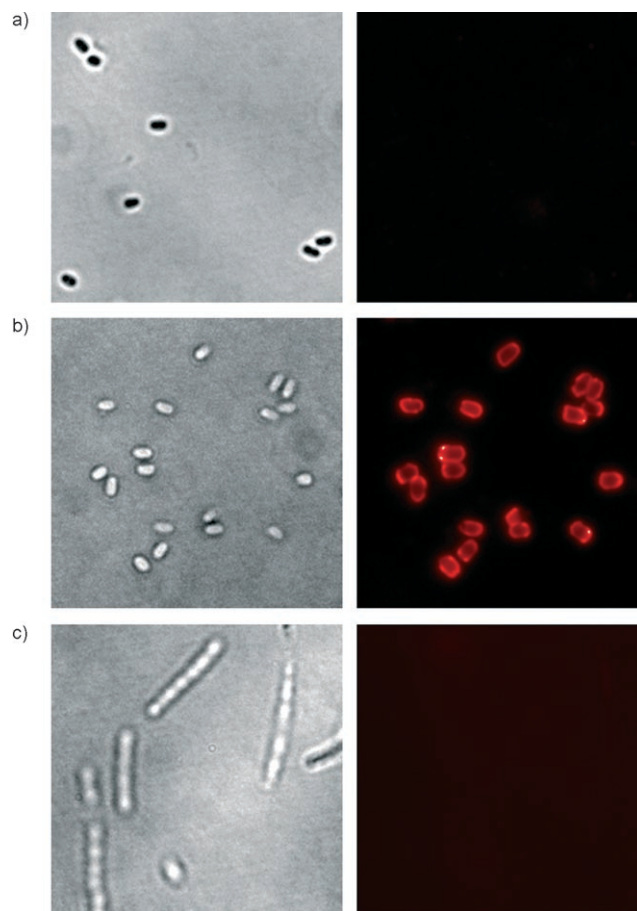


Abbildung 1. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der Endosporen von *B. anthracis* und *B. cereus* mit mAk, die gegen das synthetische Tetrasaccharid **2** erzeugt wurden. Linke Spalte: Lichtmikroskopie; rechte Spalte: Cy3-spezifische Immunfluoreszenz. a) Sporen von *B. anthracis* mit einem monoklonalen Kontrollantikörper gleichen Isotyps, aber anderer Spezifität. b) Sporen von *B. anthracis* mit einem für das Tetrasaccharid **2** spezifischen mAk. c) Sporen von *B. cereus* mit einem für das Tetrasaccharid **2** spezifischen mAk.

- [1] R. M. Atlas, *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, 56, 167–185.
- [2] D. King, V. Luna, A. Cannons, J. Cattani, P. Amuso, *J. Clin. Microbiol.* **2003**, 41, 3454–3455.
- [3] A. Fasanella, S. Losito, R. Adone, F. Ciuchini, T. Trotta, S. A. Altamura, D. Chiocco, G. Ippolito, *J. Clin. Microbiol.* **2003**, 41, 896–899.
- [4] X. Zhang, M. A. Young, O. Lyandres, R. P. van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4484–4489.
- [5] J. M. Daubenspeck, H. Zeng, P. Chen, S. Dong, C. T. Steichen, N. R. Krishna, D. G. Pritchard, C. L. Turnbough, Jr., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 30945–30953.
- [6] D. B. Werz, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6474–6476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4315–4318.
- [7] a) R. Adamo, R. Saksena, P. Kováč, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2579–2582; b) R. Adamo, R. Saksena, P. Kováč, *Helv. Chim. Acta* **2006**, 89, 1075–1089.
- [8] G. Ragupathi, R. R. Koganty, D. Qiu, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Glycoconjugate J.* **1998**, 15, 217–221.
- [9] Z.-G. Wang, L. J. Williams, X.-F. Zhang, A. Zatorski, V. Kudryashov, G. Ragupathi, M. Spassova, W. Bornmann, S. F. Slovin, H. I. Scher, P. O. Livingston, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 2719–2724.