

# Entwicklung und Prüfung eines Impfstoffes gegen die Ödemkrankheit der Schweine

CHRISTIANE HOFFMANN

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

**Entwicklung und Prüfung eines Impfstoffes  
gegen die Ödemkrankheit der Schweine**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Christiane Hoffmann**  
Tierärztin aus Luxemburg, Luxemburg

Gießen, 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 08.02.2010

Für Norman



**INHALTSVERZEICHNIS**

	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Ödemkrankheit der Schweine</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Edema Disease <i>E. coli</i> (EDEC)</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3</b>	<b>Der Virulenzfaktor „Shigatoxin 2e“</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4</b>	<b>Ödemkrankheitsmodelle</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5</b>	<b>Aktive Immunisierung gegen die Ödemkrankheit</b> .....	<b>19</b>
2.5.1	Impfstoffe auf Basis von chemisch-inaktiviertem Shigatoxin 2e .....	20
2.5.2	Impfstoffe auf Basis von gentechnisch-inaktivierten Shigatoxinen .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Bakterienstämme</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVOs)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3</b>	<b>Plasmide</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Serumproben</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Tiere</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7</b>	<b>Bakteriologische Methoden</b> .....	<b>39</b>
3.7.1	Anzucht von Bakterien.....	39
3.7.2	Keimzahlbestimmung .....	39
3.7.3	Sterilitätskontrolle .....	39
3.7.4	Dekontamination.....	40
<b>3.8</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b> .....	<b>40</b>
3.8.1	Präparation von DNS.....	40
3.8.2	Bestimmung von DNS-Konzentrationen.....	40
3.8.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	41
3.8.4	Agarosegelelektrophorese .....	44
3.8.5	DNS-Restriktion.....	44
3.8.6	DNS-Klonierung in pET-24b(+) .....	45
3.8.7	Ortspezifische Mutagenese .....	45
3.8.8	DNS-Sequenzierung .....	45

<b>3.9</b>	<b>Proteinpräparative und -analytische Methoden</b> .....	<b>46</b>
3.9.1	Übersicht über die hergestellten Stx2e- und rStx2e-Präparate.....	46
3.9.2	Präparation von Shigatoxin 2e aus Bakterienzelllysat .....	46
3.9.3	Präparation von Shigatoxin 2e aus dem Periplasma (Polymyxin-B-Methode) ...	47
3.9.4	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	48
3.9.5	Tricine-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricine-SDS-PAGE) .....	48
3.9.6	rStx2e-haltiges und rStx2e-freies-Challengematerial .....	48
3.9.7	Impfantigene.....	49
<b>3.10</b>	<b>Serologische Methoden</b> .....	<b>49</b>
3.10.1	Immunoblot.....	49
3.10.2	Enzyme-linked immunosorbent Assay für Antikörper gegen Stx2e (ELISA <sub>rStx2e</sub> ) .....	50
3.10.3	RIDASCREEN® Verotoxin ELISA.....	51
3.10.4	SIFIN-Stx2e-ELISA.....	53
<b>3.11</b>	<b>Zellkulturmethoden</b> .....	<b>54</b>
3.11.1	Kultivierung von Verozellen .....	54
3.11.2	Verozell-Zytotoxizitätstest .....	54
3.11.3	Stx2e-Neutralisationstest (Stx2e-NT-Test) .....	56
<b>3.12</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden</b> .....	<b>57</b>
3.12.1	Prinzip des etablierten Ödemkrankheitsmodells.....	57
3.12.2	Tierhaltung.....	58
3.12.3	Impfungen.....	58
3.12.4	Intravenöse Inokulation von rStx2e.....	58
3.12.5	Parameter bei der Versuchsauswertung .....	58
3.12.6	Übersicht über die durchgeführten Tierversuche .....	58
<b>3.13</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>61</b>
<b>3.14</b>	<b>Bilddokumentation</b> .....	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Rekombinante Herstellung von Shigatoxin 2e</b> .....	<b>62</b>
4.1.1	Klonierung des <i>stx2e</i> -Gens in den Expressionsvektor pET-24b(+) .....	62
4.1.2	Genetische Identitätsprüfung der Transformanten .....	62
<b>4.2</b>	<b>Herstellung von gentechnisch mutiertem rStx2e</b> .....	<b>62</b>
4.2.1	Einführung von ortsspezifischen Mutationen in das <i>stx2e</i> -Gen .....	62
4.2.2	Genetische Identitätsprüfung der Transformanten .....	64
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung von rStx2e und gentechnisch mutiertem rStx2e</b> .....	<b>71</b>
4.3.1	Qualitativer Nachweis der Bildung von rStx2e und rStx2e <sub>MUT</sub> durch transformierte <i>E. coli</i> -Stämme .....	71
4.3.2	Subzelluläre Lokalisation und zytotoxische Aktivität von rStx2e und mutiertem rStx2e .....	74
4.3.3	Einfluss der Kulturbedingungen auf die rStx2e-Expression .....	76



<b>4.4</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung von rStx2e- und rStx2e<sub>MUT</sub>-Impfantigen-Chargen</b> .....	<b>79</b>
4.4.1	Impfantigen aus chemisch inaktiviertem rStx2e .....	79
4.4.2	Impfantigen aus gentechnisch inaktiviertem rStx2e (rStx2e <sub>MUT</sub> ) .....	80
<b>4.5</b>	<b>Etablierung und Validierung des Ödemkrankheitsmodells</b> .....	<b>80</b>
4.5.1	Mortalität in Abhängigkeit von der rStx2e-Dosis.....	83
4.5.2	Humorale Immunantwort auf die intravenöse rStx2e-Applikation .....	83
<b>4.6</b>	<b>Immunisierungsversuche an Ferkeln</b> .....	<b>85</b>
4.6.1	Wirkung von rStx2e-Impfstoffen auf die Mortalität im Ödemkrankheitsmodell ....	86
4.6.2	Humorale Immunantwort auf die Impfung mit rStx2e-Impfstoffen.....	90
4.6.2.1	Induktion von Antikörpern gegen <i>E. coli</i> -Antigene.....	90
4.6.2.2	Induktion von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern.....	92
4.6.2.3	Zusammenhang zwischen dem Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern und der Mortalität.....	96
4.6.2.4	Korrelation zwischen den Messdaten aus dem ELISA <sub>rStx2e</sub> und dem Stx2e-Neutralisationstest .....	97
<b>5</b>	<b>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</b> .....	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>117</b>
	<b>SUMMARY</b> .....	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>121</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>132</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>165</b>

**ABKÜRZUNGEN**

<i>A. dest.</i>	Aqua destillata
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
AIDA	adhesin involved in diffuse adherence
Ak	Antikörper
Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Aluminiumhydroxid
Amp	Ampicillin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz-Gen ( <i>bla</i> )
AS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
CD <sub>50</sub>	Zytotoxische Dosis für 50 % der Verozellen
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdesoxycholat
dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ECF18R	<i>E. coli</i> F18-Rezeptoren
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	Ödemkrankheit („edema disease“)
EDEC	Ödemkrankheitserreger („edema disease <i>E. coli</i> “)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF1	eukaryotischer Elongationsfaktor 1
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunsorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
FA	Formaldehyd
<i>f. c.</i>	Endkonzentration
FCS	Fötales Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
Gb3	Globotriaosylceramid
Gb4	Globotetraosylceramid
Gnot.	Gnotobionten
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde

---

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
I	Infizierte Gruppe
IDT	IDT Biologika GmbH, Rodleben
iFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
Ig	Immunglobulin
<i>i.g.</i>	intrastral
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Giessen
<i>i.i.</i>	intraintestinal
<i>i.m.</i>	intramuskulär
<i>i.p.</i>	intraoperitoneal
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
<i>i.v.</i>	intravenös
J	Joule
k. A.	keine Angabe
K	Kontrollgruppe
kbp	Kilobasenpaare
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kFA	komplettes Freundsches Adjuvans
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KL-Überstand	Kulturlysat-Überstand
L	Liter
<i>lacI</i>	<i>lac</i> -Repressorgen
LB	Luria Bertani
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis für 50 % der Versuchspopulation
LPS	Lipopolysaccharid
LT	hitzeempfindliches Endotoxin
LW	Lebenswoche
M	molar
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
MDa	Megadalton
min	Minute
$\mu$ l	Mikroliter
MI	Mortalität in der infizierten Gruppe
mm	Millimeter
MM	Molekularmassenmarker
MP	Mortalität in der Placebo-Gruppe
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang

nm	Nanometer
n. s.	nicht signifikant
n. t.	nicht getestet
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Testwellenlänge von 600 nm
<i>ori</i>	„origin of replication“, Startpunkt der Replikation
p	pico
P	Placebo-Gruppe
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonale Antikörper
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
Rbs	Ribosomenbindungsstelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>p.i.</i>	nach Infektion („ <i>post infectionem</i> “)
PP-Fraktion	Periplasma-Fraktion
Q	SB221 <sub>E167Q</sub> #9
QD	SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1
QL	SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2
QLD	SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7
ÖK	Ödemkrankheit
r	Korrelationskoeffizient
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
rStxA2e	rekombinante A-Untereinheit von Shigatoxin Typ 2e
rStxB2e	rekombinante B-Untereinheit von Shigatoxin Typ 2e
rStx2e <sub>FA</sub>	Formaldehyd-inaktiviertes rekombinantes Shigatoxin Typ 2e
rStx2e <sub>GA</sub>	Glutaraldehyd-inaktiviertes rekombinantes Shigatoxin Typ 2e
rStx2e <sub>MUT</sub>	gentechnisch inaktiviertes rekombinantes Shigatoxin Typ 2e
RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
<i>s.k.</i>	subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPF	Spezifisch Pathogen Frei
ssDNS	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Std <sub>NT</sub> %	Standard Prozent, gemessen im Stx2e-NT
STEC	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i>
Stx	Shigatoxin von <i>Shigella dysenteriae</i>
<i>stx</i>	Strukturgen des Shigatoxin von <i>Shigella dysenteriae</i>
<i>stx1</i>	Strukturgen des Shigatoxin Typ 1
StxA1	A-Untereinheit von Shigatoxin1
StxA <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> -Fragment der A-Untereinheit von Shigatoxin
<i>stx2</i>	Strukturgen des Shigatoxin Typ 2
<i>stx2e</i>	Strukturgen des Shigatoxin Typ 2e
Stx2e-NT	Shigatoxin 2e-Neutralisationstest auf Verozellen

ST-Ip	hitze stabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin Ip
ST-II	hitze stabiles <i>E. coli</i> -Enterotoxin II
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
<i>tetR</i>	Strukturgen des Tet-Repressors
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
USL-Überstand	Ultraschalllysate-Überstand
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
var. haem.	<i>variatio haemolytica</i>
VT	Verotoxin (syn. zu Shigatoxin)
Vol	Volumeneinheit
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
WB	Westernblot-Analyse
Wo	Woche
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight pro volume</i> )
ZT	Verzells-Zytotoxizitätstest

**Tabelle 1: Aminosäurenkodierungen**

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code	Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V



## 1 EINLEITUNG

Die Ödemkrankheit ist eine meist akut bis perakut verlaufende Infektionskrankheit der Schweine, die in Schweinehaltungen weltweit vorkommt und häufig hohe wirtschaftliche Verluste verursacht. Erreger der Ödemkrankheit sind enterotoxämische *E. coli*-Stämme (EDEC), die eine eigenständige Gruppe der Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) darstellen (MOXLEY, 2000). Neben den F18-Fimbrien spielt das Shigatoxin 2e (Stx2e) im Krankheitsgeschehen als Virulenzfaktor der EDEC die entscheidende Rolle. Das Stx2e besteht wie alle Shigatoxine aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf rezeptorbindenden B-Untereinheiten (PATON und PATON, 1998). Nach oraler EDEC-Infektion gelangt das Stx2e über die Darmwand ins Blut und wird mit Hilfe der Erythrozyten zu den Endothelzellen transportiert (MATISE et al., 2003). In den Endothelzellen verursacht das katalytisch aktive Zentrum der A-Untereinheit eine Hemmung der Proteinbiosynthese, die letztendlich den Zelltod herbeiführt (PATON und PATON, 1998). Dies äußert sich pathologisch in Läsionen der kleinen Arterien und Arteriolen mit anschließender Ödembildung (KURTZ et al., 1969).

Die Therapie der Ödemkrankheit gestaltet sich als außerordentlich schwierig, da die Zeitspanne zwischen dem Auftreten der ersten Symptome bis hin zum Tod der Ferkel meist nur 24 bis 48 Stunden beträgt (KURTZ et al., 1969; MOXLEY, 2000). Eine Behandlung von klinisch erkrankten Tieren kann mittels parenteraler Gabe von Antibiotika, Glukokortikoiden, Neuroleptika und Antihistaminika versucht werden, jedoch ist der Therapieerfolg sehr unsicher (ORBAN et al., 1993). Der Gebrauch von Antibiotika wie z. Bsp. Ampicillin und Fosfomycin birgt sogar Risiken. Es kann zu einer Selektion von resistenten EDEC-Stämmen kommen oder auch zur Exazerbation der Erkrankung führen, in dem die Antibiotikagabe die EDEC-Stämme zur vermehrten Stx2e-Freisetzung provoziert (BERTSCHINGER und GYLES, 1994; KYRIAKIS et al., 1997; UEMURA et al., 2004).

Aus diesen Gründen ist es sinnvoller, prophylaktische Maßnahmen zur Bekämpfung der Ödemkrankheit einzusetzen, beispielsweise durch besondere Diäten oder durch Verfütterung von Probiotika (BOSWORTH et al., 1996; TSUKAHARA et al., 2007). Eine energie-/proteinreiche Fütterung nach dem Absetzen führt durch eine Erhöhung des pH-Werts im Dünndarm zu einer Begünstigung der EDEC-Vermehrung. Durch Steigerung des Rohfasergehalts ( $\geq 6\%$ ) und Reduktion des Proteingehalts ( $\leq 18\%$ ) kann man dieser pH-Wert-Erhöhung entgegenwirken (BOSWORTH et al., 1996). Zusätzlich ist eine restriktive Fütterung ratsam. Da diese Fütterungsweise häufig mit Gewichtseinbußen einhergeht, wird sie nicht gerne praktiziert. Als wirtschaftliche Alternative bietet sich die Prävention der Ödemkrankheit durch die passive und insbesondere durch die aktive Immunisierung an. Unter experimentellen Bedingungen konnte durch die aktive Immunisierung mit inaktiviertem Stx2e eine belastbare

Immunität im Ferkel induziert werden (MACLEOD und GYLES, 1991a; MAKINO et al., 2001). In Deutschland ist gegenwärtig aber noch kein Shigatoxoid-Impfstoff zugelassen. Bisher werden bei Ödemkrankheit als Bestandsproblem hierzulande ausschließlich stallspezifische Vakzine zur Prophylaxe eingesetzt.

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Therapieansätze und der unzureichenden prophylaktischen Maßnahmen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Impfantigen auf der Basis von rekombinant hergestelltem rStx2e zu entwickeln und zu evaluieren. Um die Immunogenität und Protektivität der entwickelten Impfantigene überprüfen zu können, war zunächst ein Ödemkrankheitsmodell, basierend auf der *i.v.*-Applikation von rStx2e an Ferkeln, zu etablieren.



## 2            **SCHRIFTTUM**

### 2.1         **Die Ödemkrankheit der Schweine**

Die Ödemkrankheit ist eine weltweit verbreitete Erkrankung der Schweine und tritt bei Ferkeln meist in den ersten zwei Wochen nach dem Absetzen von der Muttersau auf. Hervorgerufen wird die Ödemkrankheit durch die orale Infektion mit enterotoxämischen *E. coli*-Stämmen, die als „edema disease *E. coli*“, kurz EDEC, bezeichnet werden und eine eigenständige Untergruppe der Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) formen. Der Krankheitsverlauf ist meist perakut bis akut. Die Morbidität liegt bei 10 bis 30 %, die Letalität bei 20 bis 100 % (MOXLEY, 2000).

Nach der oralen Infektion der Ferkel kommt es zu einer massenhaften Vermehrung der EDEC im Dünndarm und der Freisetzung des Shigatoxins vom Typ 2e (Stx2e). Klinisch akut erkrankte Tiere zeigen Ödembildungen im Kopfbereich (häufig am Nasenrücken, sowie den Augenlidern). Durch Endothelschädigungen in den kleinen Blutgefäßen des ZNS kommt es zum Flüssigkeitsaustritt in das perivaskuläre Gewebe. Die Folge sind zentralnervöse Störungen, wie Ataxien, Paresen, Schreckhaftigkeit, tonisch-klonische Krämpfe und Ruderbewegungen in Seitenlage (TIMONEY, 1950). Auch kann Bluthochdruck beobachtet werden, der ab 200 mm Hg an der Auslösung von neurologischen Symptomen und an den Läsionen in Arterien und Arteriolen beteiligt sein kann (CLUGSTON et al., 1974b). Betroffene Tiere sterben meistens innerhalb von 24 bis 42 Stunden (BERTSCHINGER und GYLES, 1994). In wenigen Fällen überleben einige Ferkel die akute Phase, bleiben aber anschließend in der körperlichen Entwicklung hinter gesunden Altersgenossen zurück (BERTSCHINGER und POHLENZ, 1974; KAUSCHE et al., 1992). Wie auch die enterotoxischen *E. coli* (ETEC) sind EDEC häufig in der Lage neben dem Shigatoxin 2e zusätzlich hitzelabile (LT) und/oder hitzestabile (ST) *E. coli*-Enterotoxine zu bilden und Durchfälle auszulösen (GANNON et al., 1988).

Sowohl in Feldbeobachtungen als auch in tierexperimentellen Untersuchungen am Schwein zeichnete sich das pathologisch-anatomische Bild im akuten Krankheitsverlauf durch Ödeme im Herzbeutel und in der Lunge, in der Gallenblasenwand, in der submukösen Bindegewebsschicht des Magens und in den Mesenteriallymphknoten aus (KURTZ et al., 1969; MOXLEY, 2000; MULEI und NGATIA, 1999). In einem der oralen EDEC-Infektionsversuche war vor allem die Mitte des Ileums durch vergrößerte Lymphknoten sowie eosinophile und lymphozytäre Einwanderungen in der ödematösen Lamina propria gekennzeichnet. Im Dickdarm, speziell in den zentripetalen Gyri, waren dagegen nur wenige Ödeme und wenige lymphozytäre Infiltrationen zu sehen (TSUKAHARA et al., 2005). Dieses pathologische Bild entspricht der Lokalisation der EDEC-Kolonisation im Darm, denn nach oraler Inokulation

von Ferkeln beschränkte sich die Kolonisation der EDEC auf den Bürstensaum der Darmzotten von Jejunum und Ileum. Der Dickdarm war im Gegensatz zu Infektionen mit anderen STEC in die Besiedlung nicht miteinbezogen (METHIYAPUN et al., 1984). In subakuten und chronischen Fällen waren meist keine Ödeme nachweisbar, dagegen waren hier im Bereich des Hirnstamms Erweichungen sowie Flüssigkeitsansammlungen in Bauch- und Brusthöhle, sowie dem Perikard vorzufinden (KURTZ et al., 1969; MACLEOD et al., 1991c).

Histologisch waren sowohl in Feldbeobachtungen als auch in tierexperimentellen Untersuchungen Gefäßläsionen in Hirnstamm, Tonsillen, Magen-Darm-Trakt und in den Nieren erkennbar, aber auch Myokard, Leber, Lunge, Milz, Psoasmuskulatur, Harnblase, Speicheldrüse, Schilddrüse, Pankreas, Nebennieren, Hoden und Retina waren häufig betroffen (KURTZ et al., 1969; MATISE et al., 1999; MATISE et al., 2000). Fokale Nekrosen dominierten im Hirnparenchym (pyknotische Zellkerne in den Gliazellen, Vakuolenbildung und geschwollene Axone). Die degenerativen Angiopathien betrafen hauptsächlich die kleinen Arterien und Arteriolen (KURTZ et al., 1969). Bereits zwei Tage *p.i.* wiesen die geschädigten Endothelzellen Vakuolisierung, Schwellung, Proliferationen und pyknotische sowie hyperchromatische Zellkerne auf (KURTZ et al., 1969; METHIYAPUN et al., 1984). In den Gefäßen waren oft Mikrothromben nachweisbar (METHIYAPUN et al., 1984). Pyknose und Karyorrhesis waren ebenfalls in den Zellkernen in der Tunica media von kleinen Arterien und Arteriolen vorzufinden (KURTZ et al., 1969; WADDELL et al., 1998). In experimentell herbeigeführten Fällen von Ödemkrankheit zeigten sich bei subklinisch erkrankten Ferkeln eher Myozytennekrosen und weniger Endothelzellnekrosen, während es bei den klinisch erkrankten Ferkeln genau umgekehrt war. Es scheint, dass nach oraler EDEC-Infektion zuerst die Endothelzellen und dann erst die Muskelzellen der Arteriolen geschädigt werden, wobei die Endothelzellen sich schneller wieder erholen (MATISE et al., 2000).

Nach einer experimentellen, oralen EDEC-Infektion von Ferkeln kam es ab dem 14. Tag *p.i.* zur Ausbildung von Anti-Stx2e-Antikörpern (IgG und IgA) (KAUSCHE et al., 1992; MAKINO et al., 2001). Durch Infektion von rekonvaleszenten Ferkeln wurde zudem gezeigt, dass die bei einer natürlichen Infektion gebildeten Antikörper protektives Potential besitzen (SMITH und HALLS, 1968). Neben Stx2e-spezifischen Antikörpern sind im Rahmen einer EDEC-Infektion auch F18-spezifische Antikörper in der Lamina propria des Jejunums, in der Milz und im Serum detektierbar (IgM ab dem 4. Tag, IgA ab dem 11. Tag und IgG ab dem 15. Tag *p.i.*) (VERDONCK et al., 2002). Die höchste IgM-Konzentration war bei EDEC-infizierten Ferkeln in den Peyerschen Platten des Jejunums und in der Milz vorhanden, dagegen IgA in der jejunalen Lamina propria. Der IgG-Gehalt war in den einzelnen Geweben jeweils um den Faktor 10 niedriger als der für IgA. Die Höhe der Antikörper-Titer gegen Fimbrien scheint in hohem Maß von der Kolonisationsfähigkeit der Bakterien und der Stärke

der Rezeptorbindung der Fimbrien abzuhängen. Somit hatten Ferkel, die mit F4-positiven ETEC infiziert wurden, die im Infektionsmodell eine effizientere Kolonisation und *in vitro* eine stärkere Adhäsion aufwiesen als F18-positive EDEC, deutlich höhere Titer an F4-Antikörpern, als F18-Antikörper-Titer bei den mit F18-positiven EDEC belasteten Ferkeln (VERDONCK et al., 2002). Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Stärke der Immunantwort gehabt haben könnten, sind die Anzahl und Dichte der Fimbrien-Rezeptoren auf den Enterozyten und die Anwesenheit von hitzelabilem *E. coli*-Enterotoxin bei dem F4-positiven ETEC-Stamm, da dieses Adjuvans-ähnliche Fähigkeiten besitzt (RAPPUOLI et al., 1999; VERDONCK et al., 2002).

Der Hauptbildungsort für das Stx2e scheint das Ileum zu sein, was mit der Kolonisationscharakteristik der EDEC übereinstimmt. So war bei Infektionsversuchen im Verozell-Neutralisationstest mehr Stx2e im Darminhalt des Ileums als im Darminhalt aus Kolon oder Rektum nachweisbar (CORNICK et al., 2000). Auch der Übertritt des Toxins in das Blut erfolgt schnell im Rahmen des Infektionsgeschehens. Bereits ab dem 2. Tag *p.i.* war Stx2e (= erster Messtag) bei 73 % der klinisch und 14 % der subklinisch infizierten Ferkel nachweisbar. Dabei war das Toxin an Erythrozyten gebunden und kam nicht frei im Serum oder in der Zerebrospinalflüssigkeit vor (CORNICK et al., 1999; CORNICK et al., 2000; MATISE et al., 2003). Der Stx2e-Titer in der Erythrozytenfraktion erreichte bei den klinisch erkrankten Ferkeln zeitgleich mit dem Auftreten klinischer Symptome seinen Höhepunkt. Auch bei den asymptomatisch erkrankten Ferkeln korrelierten die vaskulären Nekrosen in den meisten Fällen mit der Anwesenheit von Stx2e im Blut. Dabei waren zwei verschiedene Erythrozyten-Typen zu unterscheiden: Erythrozyten, die große Mengen (HB["high-binding"])-Phänotyp) und Erythrozyten, die geringe Mengen Stx2e binden (LB["low-binding"])-Phänotyp) konnten. Vermutlich exprimierten Erythrozyten vom LB-Phänotyp weniger Gb4-Rezeptoren auf der Oberfläche. Im Gegensatz zu Stx von *Shigella dysenteriae* war außer einer geringen Bindung an Monozyten keine Bindung von Stx2e an neutrophile Granulozyten, Lymphozyten oder Thrombozyten feststellbar (MATISE et al., 2003). Bei *in vitro* Untersuchungen an humanen Erythrozyten wurde ebenfalls gezeigt, dass die Shigatoxine an die Erythrozyten binden. Hier war die Bindungsintensität und -affinität aber von der jeweiligen Blutgruppe abhängig. Dies gibt Grund zur Annahme, dass bei Menschen ein Zusammenhang zwischen der Toxinbindungsstärke an Erythrozyten und dem klinischen Schweregrad besteht (BITZAN et al., 1994). Inwieweit dies aber auf das Schwein übertragbar ist, ist noch unklar (CORNICK et al., 2000).

## 2.2 Edema Disease *E. coli* (EDEC)

EDEC gehören überwiegend den Serogruppen O138:K81, O139:K82 und O141:K85 an und sind in der Regel hämolytisch (BARTH et al., 2007; BERTSCHINGER und GYLES, 1994;

GANNON et al., 1988; LINGGOOD und THOMPSON, 1987; MARQUES et al., 1987; TSCHOLSHIEW, 2006). Sie besitzen zwei Hauptvirulenzfaktoren: F18-Fimbrien und Shigatoxin 2e (BERTSCHINGER et al., 1990). Durch die Ausbildung der F18-Fimbrien sind die EDEC befähigt, sich im Dünndarm an Epithelzellen anzuheften. Die Bindung zwischen F18-Fimbrien und dem F18-Fimbrien-Rezeptor "ECF18" auf den Darmepithelzellen ermöglicht die Kolonisation des Darmes. Da bei neugeborenen Schweinen noch keine ECF18-Rezeptoren vorhanden sind, sondern diese erst in den ersten drei Lebenswochen zunehmend exprimiert werden, nimmt die Empfänglichkeit für die Adhäsion der EDEC mit dem Alter der Ferkel zu (NAGY et al., 1992a). Es werden zwei Antigenvarianten der F18-Fimbrien unterschieden: F18ab- (früher: F107-Fimbrien) und F18ac-Fimbrien (früher: 2134P-, 8813- bzw. Av24-Fimbrien) (WITTIG et al., 1994). Dabei kommen F18ab-Fimbrien gehäuft bei *E. coli*-Enterotoxin-negativen und F18ac-Fimbrien gehäuft bei *E. coli*-Enterotoxin-positiven Stämmen vor (CHENG et al., 2005; NAGY et al., 1997). Das ECF18R-Gen ist auf dem Chromosom 6 (SSC6) der Schweine lokalisiert, ebenso wie das Gen für das Porcine-Stress-Syndrom (VOEGELI et al., 1996). Struktur und Biochemie des ECF18-Rezeptors sind bisher unbekannt. Da das Vorhandensein des ECF18R dominant vererbt wird, könnte durch gezielte Selektion der Anteil von Schweinen in der Population erhöht werden, die keinen ECF18R besitzen und daher gegen die Infektion mit F18-bildenden *E. coli* unempfindlich sind. Derzeit sieht der Anteil resistenter Ferkel in der Schweiz wie folgt aus: Edelschwein 11 %, Piétrain 5 %, Land-, Duroc- und Hampshireschwein 1 % (VOEGELI et al., 1997). Allerdings ist das Fehlen von ECF18R häufig mit erhöhter Anfälligkeit für die maligne Hyperthermie der Schweine verbunden, weshalb die züchterische Selektion schwierig ist (VOEGELI et al., 1997).

Neben den F18-Fimbrien wird noch AIDA (adhessin involved in diffuse adherence) als weiterer Adhäsionsfaktor bei EDEC häufig nachgewiesen. AIDA ist ein afimbriales Protein, welches in der äußeren Membran verankert ist und in den Genen *orfA* und *orfB* kodiert wird (NIEWERTH et al., 2001). Bei 83,4 % der untersuchten EDEC in Deutschland waren AIDA-Gene vorhanden (BARTH et al., 2007). Die starke positive Korrelation von F18-Fimbrien und AIDA beruht vermutlich darauf, dass beide Genloci sich auf demselben Plasmid befinden (MAINIL et al., 2002). Über die Rolle von AIDA im Krankheitsgeschehen der Ödemkrankheit, ist derzeit noch nichts bekannt. Da AIDA bei EPEC und EHEC, die diesen Faktor oft ebenfalls bilden können, an der Adhäsion dieser Erreger an die Darmschleimhaut involviert ist, wird eine ähnliche Rolle auch bei EDEC-Infektionen vermutet (BENZ und SCHMIDT, 1989; CHAPMAN et al., 2006).

Zusätzlich zu den von den *E. coli*-kodierten Virulenzfaktoren, können auch Faktoren auf der Wirtsseite die Entstehung der Ödemkrankheit begünstigen. Hierzu zählen der mit dem Absetzen einhergehende Stress, der Verlust maternaler Antikörper aus der Milch, der

Wechsel zu proteinreichem Futter, Veränderung der Umgebungstemperatur, Stress durch Umställen sowie die bereits erwähnte genetische Prädisposition der Ferkel durch die ECF18-Rezeptor-Ausbildung (BOSWORTH et al., 1996; DEPRez et al., 1986; GANNON et al., 1988; IMBERECHTS et al., 1992).

### 2.3 Der Virulenzfaktor „Shigatoxin 2e“

Das Shigatoxin (syn. Shiga-like-Toxin [SLT], Verotoxin [VT]) ist ein Zytotoxin, das aufgrund seiner Toxizität für Verozellen auch als Verotoxin bezeichnet wurde (KONOWALCHUK et al., 1977). Die Shigatoxine von *E. coli* können serologisch und molekularbiologisch in zwei unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: Stx1, das zu fast 100 % identisch ist mit dem Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* (Stx), und Stx2, das im Gegensatz zu Stx1 nicht mit Anti-Stx-Serum neutralisierbar ist (MARQUES et al., 1987; STROCKBINE et al., 1986). In der Stx1-Gruppe unterscheidet man drei Varianten, die mit den Akronymen Stx1, Stx1c und Stx1d bezeichnet werden (BURK et al., 2003; OHMURA-HOSHINO et al., 2003; ZHANG et al., 2002). In der Stx2-Gruppe sind bisher neun Varianten bekannt: das Stx2, Stx2c, Stx2d (aktivierbar), Stx2d (nicht aktivierbar), Stx2e, Stx2f, Stx2g, Stx2vh-c und Stx2-NV206 (BERTIN et al., 2001; LEUNG et al., 2003; MELTON-CELSA et al., 1998; MEYER et al., 1992; PIERARD et al., 1998; SCHMIDT et al., 2000; SCHMITT et al., 1991; STROCKBINE et al., 1986; WEINSTEIN et al., 1988). Shigatoxine können nicht nur von *E. coli*, sondern auch von Stämmen der Spezies *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* und *Enterobacter cloacae* produziert werden (PATON und PATON, 1998). Verglichen mit den anderen Shigatoxin-Typen von *E. coli* reagiert das Shigatoxin 2e sehr empfindlich auf Hitze. Bereits nach einer Inkubation bei 65 °C für 30 min ist keine Zytotoxizität mehr nachweisbar, dagegen verlor Stx1 während der Inkubation bei 75 °C für 30 min weniger als 5 % seiner Zytotoxizität und Stx2 ungefähr 95 % (GANNON und GYLES, 1990; MACLEOD et al., 1991b).

Shigatoxine, die nicht von *Shigella dysenteriae* stammten, wurden lange aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit diesen als Shiga-like-Toxine bezeichnet. CALDERWOOD und Kollegen etablierten eine neue Nomenklatur nach der Shiga-like-Toxine in Shigatoxine umbenannt wurden. Seitdem wird die für die Ödemkrankheit ursächliche Toxinvariante als Stx2e bezeichnet (CALDERWOOD et al., 1996).

#### Genetik und Struktur

Die Shigatoxine gehören zur Klasse der AB<sub>5</sub>-Proteintoxine. Jedes Shigatoxinmolekül ist aus einer enzymatisch aktiven A- und fünf rezeptorbindenden B-Untereinheiten aufgebaut, die durch nicht-kovalente Bindungskräfte zusammengehalten werden (O'BRIEN und HOLMES, 1987; PATON und PATON, 1998; SANDVIG, 2001).

Die **Gene** für Stx1 und Stx2 sind im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen kodiert, die in das *E. coli*-Chromosom integriert sind (KARCH et al., 1999; SCHMIDT, 2001). Die Nukleotidsequenzen für die *stx1*-Gene wurden auf dem Prophagen VT1-Sakai determiniert (YOKOYAMA et al., 2000). Die *stx2*-Gene wurden auf dem Prophagen VT2-Sakai und im Phagen 933W nachgewiesen (MAKINO et al., 1999; PLUNKETT et al., 1999; YOKOYAMA et al., 2000). Im Gegensatz zu Stx1 und Stx2 ging man lange davon aus, dass die Gene für Shigatoxin 2e ohne Bezug zu Prophagen im bakteriellen Chromosom bestimmter *E. coli*-Stämme lokalisiert sind (MARQUES et al., 1987). Vor wenigen Jahren konnte aber bei einem durchfallkranken Menschen das *E. coli*-Isolat „2771/97“ (O<sub>NT</sub>:H-) isoliert werden, bei dem das *stx2e*-Gen auf dem *stx2e*-konvertierenden Bakteriophagen „Φ27“ kodiert wird (MUNIESA et al., 2000). Bei zwei parallel untersuchten porcinen *stx2e*-kodierenden *E. coli*-Stämmen wurden am *stx2e*-Genlocus ebenfalls Bakteriophagen-homologe Sequenzen nachgewiesen, allerdings waren die entsprechenden Bakteriophagen nicht induzierbar (MUNIESA et al., 2000; RECKTENWALD und SCHMIDT, 2002).

Die Stx-Strukturgene sind für alle Mitglieder der Shigatoxin-Familie gleich angeordnet. Dem Gen für die A-Untereinheit folgt das Gen für die B-Untereinheit, wobei beide Gene durch eine kurze intergenetische Sequenz voneinander getrennt sind. Bei dem *stx2e*-Gen beträgt die intergenetische Sequenz eine Länge von 15 bp und bei dem *stx2*-Gen eine Länge von 14 bp. Das Gen für die A-Untereinheit von *stx2e* (*stxA2e*) ist 957 bp und das für die B-Untereinheit von *stx2e* (*stxB2e*) 261 bp lang (WEINSTEIN et al., 1988). Die A- und die B-Untereinheit weisen jeweils eigene Ribosomenbindungsstellen (Rbs) auf. Die StxA2e-Rbs liegt 14 bp vor dem Start-Codon, die StxB2e-Rbs 12 bp vor dem Start-Codon (WEINSTEIN et al., 1988). Durch unterschiedlich starke Affinitäten der Ribosomenbindungsstellen bei Stx von *Shigella dysenteriae* (und vermutlich auch bei den anderen Shigatoxinen) vor der A- und der B-Untereinheit werden in gleicher Zeit fünfmal mehr Moleküle der B-Untereinheit als Moleküle der A-Untereinheit produziert, was der Stöchiometrie der Untereinheiten von 5:1 im reifen Holotoxin-Molekül entgegen kommt (HABIB und JACKSON, 1993). Die Promotoren von *stx2e* und *stx2* sind identisch und werden aber im Gegensatz zu den Promotoren von *stx* und *stx1* in Anwesenheit von Eisen nicht unterdrückt (SUNG et al., 1990; WEINSTEIN et al., 1988). Die Promotorsequenzen von *stx2e* liegen 152 bp und 130 bp vor der A-Untereinheit, der Terminator befindet sich 345 bp hinter der B-Untereinheit von *stx2e* (SUNG et al., 1990; WEINSTEIN et al., 1988).

Die Nukleotidsequenzen von *stxA2* und *stxA2e* stimmen zu 94 % und von *stxB2* und *stxB2e* zu 79 % überein (WEINSTEIN et al., 1988). Auf Ebene der Aminosäuresequenz sind die beiden Toxine in der A-Untereinheit zu 93 % und in der B-Untereinheit zu 84 % identisch (GYLES et al., 1988; WEINSTEIN et al., 1988). Die Stx2-Familie ist untereinander zu ca. 90 % und zur Stx1-Gruppe zu ca. 55 % homolog (O'BRIEN et al., 1992; WEINSTEIN et al.,

1988). Die *stx*- und *stx1*-Gene unterscheiden sich nur in drei Nukleotiden im Bereich der A-Untereinheit, was zum Austausch von einer Aminosäure führt (Threonin auf Position 45 im Stx entspricht Serin auf Position 45 im Stx1) (STROCKBINE et al., 1988).

Die **A-Untereinheit** besteht aus dem enzymatisch aktiven A<sub>1</sub>-Fragment und dem A<sub>2</sub>-Fragment, das die Verbindung zu den B-Untereinheiten herstellt. Die StxA2e-Untereinheit ist nach Abspaltung des Signalpeptids 297 Aminosäuren lang und besitzt eine Masse von 33.050 Da (MACLEOD und GYLES, 1990; WEINSTEIN et al., 1988). Cysteinreste auf Position 241 der A<sub>1</sub>-Untereinheit und auf Position 260 der A<sub>2</sub>-Untereinheit stellen die Verbindung miteinander über eine Disulfidbrücke her. Dazwischen befindet sich eine Furinschnittstelle (SAMUEL und GORDON, 1994). Durch proteolytische Spaltung wird die StxA2e-Untereinheit in das 27.610 Da schwere A<sub>1</sub>- und das 6.459 Da schwere A<sub>2</sub>-Fragment zerlegt. Für die nicht-kovalente Bindung der StxA-Untereinheit mit den StxB-Untereinheiten stehen vier  $\beta$ -Faltblätter (je zwei des A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Fragments) der StxA-Untereinheit und eine C-terminale  $\alpha$ -Helix aus neun Aminosäuren des StxA<sub>2</sub>-Fragments zur Verfügung (HADDAD und JACKSON, 1993b).

Die **B-Untereinheiten** sind im Holotoxinmolekül zu einem pentameren Ring zusammengelagert. Eine StxB2e-Untereinheit ist ohne Signalpeptid 7.565 Da schwer und besteht aus 68 Aminosäuren (MACLEOD und GYLES, 1990; WEINSTEIN et al., 1988). Die Tertiärstruktur einer StxB-Untereinheit enthält sechs  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta$ 1 -  $\beta$ 6) und eine  $\alpha$ -Helix. Bei der Zusammenlagerung des StxB-Pentameres werden die B-Untereinheiten durch nicht-kovalente Bindung zwischen dem  $\beta$ 2-Faltblatt einer StxB-Untereinheit und dem  $\beta$ 6-Faltblatt der benachbarten StxB-Untereinheit verbunden. Dadurch bilden die  $\alpha$ -Helices der fünf zusammengelagerten StxB-Untereinheiten eine Pore mit einem Durchmesser von 1,1 nm, in die das StxA<sub>2</sub>-Fragment hineinragt (STEIN et al., 1992). Es wird vermutet, dass die B-Untereinheit determiniert, in welchem Kompartiment der *E. coli*-Bakterienzelle sich das Shigatoxin-Holotoxin-Molekül aufhält. Nach der Konstruktion von Hybridtoxinen lagen Toxine mit B-Untereinheiten von Stx/Stx1 und Stx2 überwiegend intrazellulär (90 % bzw. 86 % der aktiven Toxinmenge), dagegen mit StxB2e-Untereinheiten vorwiegend extrazellulär (62 % der aktiven Toxinmenge) vor (WEINSTEIN et al., 1988).

Die StxA2e-Untereinheit ist um fünf Aminosäuren (Y294, T295, I296, G297 und E298) länger als die von Stx/Stx1 und genauso lang wie die A-Untereinheit von Stx2. Dagegen ist die StxB2e-Untereinheit zwei Aminosäuren kürzer als die von Stx2 (N69 und D70). Die A-Untereinheit von Stx2e weist einen niedrigeren isoelektrischen Punkt (IP = 8,7) auf, als die von Stx/Stx1 (11,1) und Stx2 (9,8), dafür ist die B-Untereinheit von Stx2e deutlich basischer (10,2) als die der anderen Toxine (5,4 bis 5,9) (WEINSTEIN et al., 1988).

## Shigatoxin-Rezeptor

Alle Vertreter aus der Familie der Shigatoxine binden an spezifische **Glykosphingolipid-Rezeptoren** auf den Oberflächen der Zielzellen. Stx1 und Stx2 binden an Globotriaosylceramid (Gb3, Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer). Stx2e bindet dagegen bevorzugt an Globotetraosylceramid (Gb4, GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer), welches von anderen Shigatoxinen nicht erkannt wird (BOYD et al., 1993; DEGRANDIS et al., 1989; KEUSCH et al., 1995). Zellen, die nur den Gb3-Rezeptor besitzen, sind noch immer empfänglich gegenüber Stx2e, jedoch nicht so sensibel wie Zellen mit Gb4-Rezeptoren (KEUSCH et al., 1995). Da Gb3 und Gb4 von verschiedenen Zelllinien in unterschiedlicher Menge gebildet werden, ist das Stx2e toxisch für Verozellen, jedoch im Gegensatz zu Stx1 und Stx2 nur wenig zytotoxisch für HeLa-Zellen (GANNON und GYLES, 1990; KEUSCH et al., 1995; WEINSTEIN et al., 1989).

Die Gb3-Rezeptoren sind relativ heterogen, da sie sich trotz identischer Kohlenhydratgruppe, in der Zusammensetzung ihrer Fettsäurekomponenten stark unterscheiden, die die Affinität der Bindung zwischen Toxin und Rezeptor beeinflussen. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Fettsäuren mindestens 12-14 Kohlenstoffatome lang sein müssen, damit das Toxin Gb3 als Rezeptor erkennt (LINGWOOD, 1996; PELLIZZARI et al., 1992). Die Lipidkomponente der Glykosphingolipid-Rezeptoren wird von Ceramiden gebildet. Ceramide bestehen aus dem zweiwertigen langkettigen Aminoalkohol Sphingosin oder einem Dihydrosphingosinmolekül, an das über eine Amidbindung eine langkettige Fettsäure gebunden ist (PELLIZZARI et al., 1992). Bei der Rezeptorbindung von Shigatoxin kommt es zur Ausbildung von Wasserstoff-Brücken zwischen polaren und sauren Seitenketten der B-Untereinheit und polaren Gruppen der Kohlenhydratketten in den Rezeptormolekülen (STEIN et al., 1992). Stx2e bindet vermutlich an die  $\beta$ 1-3-Galaktosestruktur der Kohlenhydratkette des Gb4-Rezeptors; im Gegensatz zu Stx1 und Stx2, die an die terminale Galabiose binden, die bei dem Gb4-Rezeptor subterminal liegt (DEGRANDIS et al., 1989). Im StxB2e-Molekül stabilisieren vermutlich die Aminosäuren Q64 und K66 durch Wechselwirkung mit dem N-Acetyl-Glucosaminrest des Gb4-Rezeptors die Bindung zwischen Stx2e und Gb4-Rezeptor, denn eine Doppelmutation (Q64E/K66Q) in StxB2e reduzierte die Bindung an den Gb4-Rezeptor stark, erhöhte aber gleichzeitig die Bindung an den Gb3-Rezeptor. Dies liegt daran, dass die Aminosäuren auf den Positionen 64 und 66 von Stx2e durch diejenigen von StxB2 substituiert wurden, was zu dem Stx2-ähnlichen Bindungsverhalten führte (LING et al., 2000; TYRRELL et al., 1992). Stx1 verfügt über drei Rezeptorbindungsstellen pro StxB1-Molekül (LING et al., 1998). Alle drei Bindungsstellen werden für die Interaktion zwischen Holotoxin und Rezeptor benötigt (SOLTYK et al., 2002).



## Toxinwirkung

Nach oraler Aufnahme der EDEC und Anheftung der Erreger an die ECF18-Rezeptoren der intestinalen Epithelzellen, wird während der Vermehrungsphase der EDEC im Darm das Stx2e gebildet. Dabei heftet sich das Stx2e über Gb3- und Gb4-Rezeptoren an die Basis der Mikrovilli der Enterozyten im Jejunum und Ileum der Ferkel an (WADDELL et al., 1996). Wie das Stx2e aus dem Darm ins Blut eindringt, ist noch unklar.

Der Stx2e-Transport in der Blutbahn erfolgt durch Bindung an Erythrozyten, die einen hohen Gehalt an Gb4-Rezeptoren besitzen, aber durch das Stx2e nicht geschädigt werden (BOYD et al., 1993; CORNICK et al., 1999; CORNICK et al., 2000; MATISE et al., 1999; MATISE et al., 2000). Durch die Bindung an die Erythrozyten ist kein Toxin frei im Serum oder Plasma nachweisbar. Im Gegensatz zu Stx1, bei dem ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Gb3 und der Toxinmenge im Gewebe besteht, scheint es keinen Zusammenhang mit der Gb4-Verteilung und der Stx2e-Menge in den Organen zu geben (BOYD et al., 1993; HEAD et al., 1991; SAMUEL et al., 1990). So wurden insbesondere in der Milz (138,4 nmol/g) und in Nierenmark, Herz, Augenlider und Lunge (52,5 - 27,2 nmol/g) Gb4-Rezeptoren nachgewiesen, dagegen nur wenige Gb4-Rezeptoren in Kolon und Magen (18-10,9 nmol/g) (BOYD et al., 1993). Da jedoch bei an Ödemkrankheit erkrankten Ferkeln in Kolon und Magen meistens Ödeme und Läsionen vorzufinden sind, besteht somit kein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ödemkrankheitsbedingten Läsionen und Ödemen und der Anzahl an Gb4-Rezeptoren.

Nach Bindung von Stx an die Glykolipid-Rezeptoren der Zielzellen werden sie zusammen mit den Rezeptoren hauptsächlich über Clathrin-ummantelte Gruben aufgenommen und in die Endosomen weitergeleitet (SANDVIG und VAN DEURS, 1996; TORGERSEN et al., 2005). Von den Endosomen werden die Toxin-Rezeptor-Komplexe retrograd über das Trans-Golgi-Netzwerk und den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und in die Kernhülle transportiert (SANDVIG et al., 1992). Wie der Transport des Stx von *Shigella dysenteriae* zum Golgi-Apparat und weiter zum ER stattfindet, ist nicht genau bekannt, aber es werden folgende Transportwege diskutiert: (a) Über t-SNARE- (Syntaxin 6 und 16) und v-SNARE-Proteine (VAMP3 und VAMP4), (b) ein Rab11-, Rab6- oder Dynamin-abhängiger Transportweg oder (c) über das Proteinkinase C-Isozym PKC $\delta$  (AMESSOU et al., 2007; LAUVRAK et al., 2004; MALLARD et al., 2002; TORGERSEN et al., 2007; WILCKE et al., 2000). Beim retrograden Transport wurden COPI-ummantelte Vesikel oder der Rab6-abhängige Transport in Betracht gezogen (SANDVIG und VAN DEURS, 2002c; WHITE et al., 1999). Vom ER ins Zytosol gelangt das Stx entweder über den Sec61-Translokator oder Chaperone, die im ER lokalisiert sind (SANDVIG und VAN DEURS, 2002c; YU und HASLAM, 2005). Für die Steuerung des Transports soll die Fettsäurekettenlänge der toxin-gebundenen Gb3-Isoformen eine wichtige Rolle spielen (ARAB und LINGWOOD, 1998). Ab-

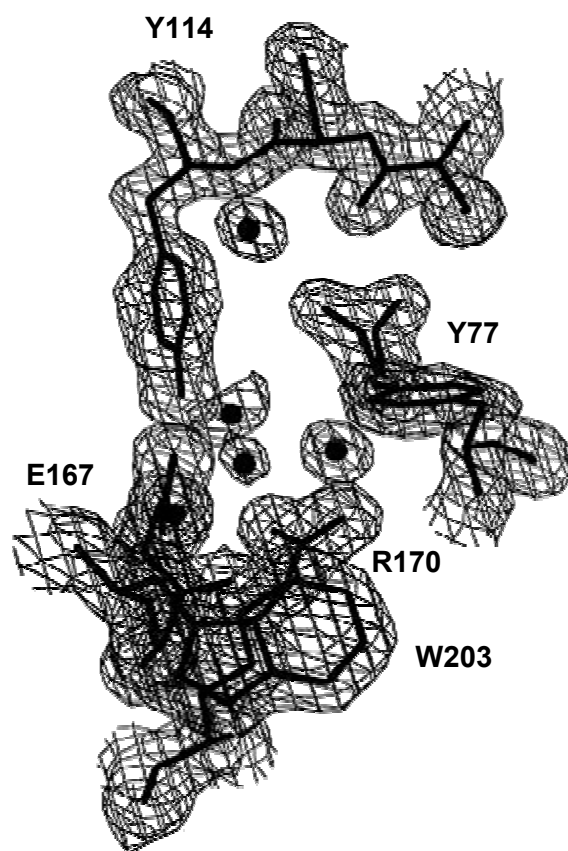
schließlich kehrt der Rezeptor zur Zelloberfläche zurück, während das Toxin in der Zelle verbleibt.

In den Endosomen oder im Trans-Golgi-Netzwerk wird die A-Untereinheit durch Furin bei einem pH-Wert von 5 - 6 in das A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Fragment gespalten, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (GARRED et al., 1995b; GARRED et al., 1997; LEA et al., 1999; MACLEOD et al., 1991b; SAMUEL und GORDON, 1994). Furin, eine Calcium-sensitive Serinprotease, ist im Golgi-Apparat und in den Endosomen vorzufinden und erkennt die Konsensussequenz Arg-X-X-Arg, welche sich bei StxA2e an den Positionen 247 bis 250 befindet (siehe auch **Abbildung 2** auf Seite 26) (GARRED et al., 1995b; SAMUEL und GORDON, 1994). Durch Reduktion der Disulfidbrücke wird die A<sub>1</sub>-Untereinheit aktiviert und über die ER-Membran ins Zytosol transportiert. Das A<sub>1</sub>-Fragment besitzt N-Glykosidase-Aktivität und depurinert an Position 4324 in der 28S rRNS der 60S Ribosomen ein Adenosin. Dies führt zu einer Inhibition der Elongationsfaktor 1-abhängigen Aminoacyl-tRNS-Bindung an den Ribosomen. Die Inhibition der Peptidkettenelongation inaktiviert irreversibel das betroffene Ribosom. Die Blockade der Proteinsynthese führt schließlich zum Zelltod (PATON und PATON, 1998). Das A<sub>1</sub>-Fragment von Stx1 ist aber offenbar nicht nur für eukaryontische Zellen toxisch, sondern auch für *E. coli* selbst. Darauf weist die Beobachtung hin, dass die gentechnische Überexpression von StxA1 bei dem entsprechend manipulierten *E. coli*-Stamm eine verringerte Proteinbiosynthese und reduziertes Wachstum nach sich zog (SKINNER und JACKSON, 1998).

Nach DERESIEWICZ et al. (1992) spielen nur fünf Aminosäuren im enzymatisch aktiven (syn. katalytischen) Zentrum des StxA<sub>1</sub>-Fragments für seine toxische Aktivität eine wichtige Rolle. Die Basis der Tasche wird durch E167 und R170 gebildet (**Abbildung 1**). Die phenolischen Ringe von Y77 und Y114 begrenzen die obere Seitenwand und W203 schließt die Tasche zur Seite hin ab. Höchstwahrscheinlich stellt das Arginin auf Position 170 über ionische Wechselwirkung mit dem Ribose-Phosphat-Rückgrat die Verbindung zwischen Toxin und der 28S rRNS her. Die aromatischen Ringe von Y77 und Y114 und von W203 stabilisieren diese Bindung und richten den Adeninrest an der Position 4324 der rRNS aus. Ein Säurekatalysator, bei dem es sich um die saure phenolische Hydroxylgruppe von Y77 handeln könnte, protoniert ein Stickstoffatom am Adeninring und destabilisiert die Kohlenstoff-Stickstoffverbindung zwischen dem C1 der Ribose und dem N9 des Adenins. Das protonierte Adenin dissoziiert von der Ribose und hinterlässt ein positiv geladenes Oxocarboniumion im Ribosering, das durch E167 stabilisiert wird. Ein Wassermolekül greift das positiv geladene Oxocarboniumion an, hydroxyliert die Ribose und stellt somit den Protonendonator, das Y77, wieder her (DERESIEWICZ et al., 1992).

Durch die Abspaltung des Adeninrestes kommt es wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung der 28S rRNS und infolgedessen zu einer Abnahme der Affinität des betroffenen

Ribosoms zum eukaryotischen Elongationsfaktor 1 (eEF1). Daraus resultiert eine verminderte eEF1-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNS an die Ribosomen (OBRIG et al., 1987). Die Folge ist eine vollständige und irreversible Inaktivierung der Ribosomen, die zum Zeitpunkt der Toxinwirkung an mRNA gebunden und biosynthetisch aktiv sind, da Shigatoxine die ribosomalen 60S-Untereinheiten nur dann inaktivieren können, wenn diese Bestandteile von vollständigen Ribosomen sind (REISBIG et al., 1981). Durch die gleichzeitige Gabe von 120 nM tRNS im Überschuss konnten die Ribosomen vor der Inaktivierung durch 9 pM StxA<sub>1</sub> teilweise geschützt werden, da die tRNS und das Toxin um die Bindung an der Akzeptorstelle vom Ribosom konkurrieren (SKINNER und JACKSON, 1997).



**Abbildung 1:**  
**Schematische Darstellung der enzymatisch aktiven Tasche in der A<sub>1</sub>-Untereinheit von Stx2e**

Abbildung modifiziert für Stx2e (FRASER et al., 2004). Die einzelnen Molekülmodelle sind als schwarze Stäbe, die Wassermoleküle als gefüllte Kreise dargestellt.

## 2.4 Ödemkrankheitsmodelle

Zur Klärung der Pathogenese und der Entwicklung von therapeutischen oder prophylaktischen Maßnahmen ist ein reproduzierbares, robustes und praktikables Tiermodell der Ödemkrankheit erforderlich. Insbesondere bei der Zulassung von Impfstoffen oder Arzneimitteln werden Prüfungen an Tieren zur Effizienz und Sicherheit gefordert (ANONYM, 2003). In der Literatur sind bereits mehrere experimentelle Modelle der Ödemkrankheit beschrieben worden, die in der **Tabelle 2** vergleichend aufgelistet sind. Die Modelle können in zwei

Gruppen eingeteilt werden: **(a)** Infektionsmodelle, bei denen Tiere mit lebenden EDEC infiziert wurden und **(b)** Intoxikationsmodelle, bei denen die Tiere mit Stx2e belastet wurden. Als bevorzugte Tierart dienten dabei Ferkel, da es bei Verwendung von Mäusen nahezu ausschließlich zur Ausprägung zentralnervöser Störungen kam, was die Beurteilung der Erkrankung erschwerte (DOBRESCU und VAN WIJNENDAELE, 1979; GANNON und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1990). Die Infektion der Tiere erfolgte mit EDEC-Lebendkulturen und die Intoxikation wurde sowohl mit EDEC-Kulturextrakten als auch mit hochgradig aufgereinigtem Stx2e durchgeführt. Als Parameter zur Effizienz der Modelle wurden meist die Mortalität der belasteten Tiere, der Schweregrad der klinischen Erkrankung, die pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen oder auch die Inkubationszeit herangezogen.

Als charakteristische Ödemkrankheitssymptome (in **Tabelle 2** unter „ED-Klinik“ subsummiert) wurden das Vorhandensein von Augenlidödemen und das Auftreten von neurologischen Störungen, die sich in Ataxie, Kopfschiefhaltung, Ruderbewegungen oder Paralyse äußern, interpretiert (CLUGSTON et al., 1974b; CORNICK et al., 1999; CORNICK et al., 2000; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD et al., 1991c; MATISE et al., 1999; MATISE et al., 2000; PICKRELL et al., 1969b; SMITH und HALLS, 1968; TIMONEY, 1950; TSUKAHARA et al., 2005; WADDELL et al., 1998). Symptome, die bei natürlich infizierten Ferkeln vereinzelt beschrieben wurden, galten ebenfalls als typisch: Krämpfe, Inappetenz, reduzierte Gewichtszunahme und Dyspnoe (KAUSCHE et al., 1992; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD et al., 1991c; TIMONEY, 1950). Als pathognomonische Zeichen der Ödemkrankheit (in **Tabelle 2** als „ED-Patho“ bezeichnet) wurden Ödeme und vaskuläre Läsionen bezeichnet. Die Ödeme waren meist in der Subkutis von Augenlidern und Nasenrücken, aber auch in der Submukosa und Subserosa von Magen, Dünndarm, Kolonspirale und der Gallenblase vorzufinden. Von Ödemen betroffen waren auch das Gehirn (Hirnstamm, Pia Mater), die Mesenteriallymphknoten, Lungen und Nieren, sowie die Lebersubserosa (BOYD et al., 1993; CLUGSTON et al., 1974c; GANNON et al., 1988; KAUSCHE et al., 1992; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD et al., 1991c; PICKRELL et al., 1969b; TIMONEY, 1950; WADDELL et al., 1998).

Die Inkubationszeit variierte in den Modellen stark in Abhängigkeit von dem gewählten Inokulum und dem Applikationsweg. So zeigten sich bereits sieben Stunden nach *i.v.*-Inokulation von 3 ng/kg KG aufgereinigtem Stx2e, dagegen erst 10 bis 48 Stunden nach intravenöser Intoxikation mit EDEC-Extrakten und 4 bis 10 Tage nach oraler EDEC-Infektion erste klinische Zeichen der Ödemkrankheit (Augenlidödeme und Inappetenz) (CLUGSTON und NIELSEN, 1974a; CORNICK et al., 1999; CORNICK et al., 2000; GANNON et al., 1988; GANNON et al., 1989; MACLEOD und GYLES, 1990; MATISE et al., 2003).

Tabelle 2: Ödemkrankheitsmodelle in der Literatur

Inokulum <i>E. coli</i> bzw. Toxin	Dosis <sup>1</sup>	Tierart & Alter	Appl. Klinik <sup>2</sup>	Pathologie/ Pathohistologie <sup>2</sup>	Literatur
S1191 (O139, Stx2e, F18, ST-II)	10 <sup>10</sup> KbE	Ferkel 3 Wo	oral ED-Klinik: 0 - 40 %	ED-Läsionen: 67 - 90 %	CORNICK et al., 1999, 2000; KAUSCHE et al., 1992; MATISE et al., 1999, 2000, 2003
O139:K12:H1	k. A.	Ferkel 6-8 Wo (SPF)	oral k. A.	Darmödeme und -gefäßläsionen	METHYAPUN et al., 1984
O139:K82:H1	3x 1,3x10 <sup>10</sup> KbE	Ferkel 3 Wo (Gnot.)	oral M: 12,5 %	Dünndarmverstopfung	MINIATS et al., 1970
1362-1 (O139, Stx2e, F18, ST)	2x 10 <sup>10</sup> KbE 3x 3,9x10 <sup>8</sup> KbE	Ferkel 3 Wo	oral ED-Klinik + Durchfall: vorhanden, aber nicht quantifiziert	Darmödeme: 100 %	TSUKAHARA et al., 2005, 2007
O141:K85ac	10 <sup>10</sup> KbE	Ferkel 8 Wo	oral ED-Klinik + Durchfall: 37 %	Magenödeme: 42 - 100 %	SMITH and Halls, 1968
O138-Extrakt, gefällt mit AS	3,2 mg Gesamt- protein/kg KG	Ferkel 8-14 Wo	<i>i.v.</i> M: 25 % ED-Klinik: 50 %	k. A.	CLUGSTON et al., 1974a
O139-Extrakt, gefällt mit AS	2,2 - 3,5 mg Ge- samtprotein/kg KG	Ferkel 8-14 Wo	<i>i.v.</i> M: 20 - 25 % ED-Klinik: 25 - 80 %	ED-Läsionen: 40 %	CLUGSTON et al., 1974a
O139:K82:H1-Extrakt	2x 100 - 300 ml	Ferkel 4-6 Wo	oral M: 0 % ED-Klinik + Durchfall: 100 %	ED-Patho: 33 - 100 %	PICKRELL et al., 1969b
O139:K82:H1-Extrakt und -Lebendkulturen	2x 100 - 300 ml + 250-750 ml Le- bendkultur an 2 weiteren Tagen	Ferkel 4-6 Wo	oral M: 0 % ED-Klinik + Durchfall: 100 %	ED-Patho: 66 - 100 %	PICKRELL et al., 1969b

Fortsetzung der **Tabelle 2** auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle

## Fortsetzung der Tabelle 2

Inokulum Stamm bzw. Toxin	Dosis <sup>1</sup>	Tierart & Alter	Appl. Klinik <sup>2</sup>	Pathologie/ Pathohistologie <sup>2</sup>	Literatur
O139:K82:H1 - Extrakt - Leberkulturen - Ultraschalllysat - hypoton. Säure-Salz-Extrakt	20 - 50 ml	Ferkel 4-6 Wo	<i>i.v.</i> ED-Klinik + Durchfall: vorhanden, <i>i.p.</i> aber nicht quantifiziert	ED-Ödeme: 50 - 100 % 100 % hämorrhagische Gastro- enteritis	PICKRELL et al., 1969a
O141:K85, gefällt mit AS	0,21 mg Gesamt- protein/kg KG	Ferkel 4-8 Wo (SPF)	<i>i.v.</i> ED-Klinik + Durchfall: vorhanden, aber nicht quantifiziert	ED-Patho: 100 %	GANNON et al., 1989
O141-Extrakt, gefällt mit AS	2,1 mg Gesamt- protein/kg KG	Ferkel 8-14 Wo	<i>i.v.</i> M: 25 % ED-Klinik: 25 %	k. A.	CLUGSTON et al., 1974a
Überstand Dünndarminhalt von an ED gestorbenen Ferkel	2-44,8 ml	Ferkel (9-27 kg)	<i>i.v.</i> ED-Klinik: 35 %	ED-Patho: vorhanden, aber nicht quantifiziert	TIMONEY, 1950
<i>E. coli</i> var. haem.-Extrakt (gefohren/aufgetaut)	12-15 ml	Ferkel (12-28 kg)	<i>i.v.</i> ED-Klinik: 100 %	ED-Patho: 50 - 100 %	TIMONEY, 1957
O139-Lyophilisat, gefällt mit AS	0,30, 0,40 bzw. 0,62 mg	Maus (20-25 g)	<i>i.v.</i> Paralyse: 42 - 57 % Tod 24-48 h <i>p.i.</i>	k. A.	DOBRESCU et al., 1979
Kulturüberstände (u. a. O141:K85), gefällt mit AS	0,2 ml	Maus 6-8 Wo	<i>i.v.</i> Paralyse: vorhanden, aber nicht quantifiziert	k. A.	GANNON et al., 1990
aufgereinigtes rStx2e	3 ng/kg KG	Ferkel 4-8 Wo	<i>i.v.</i> ZNS-Störungen: vorhanden, aber nicht quantifiziert	ED-Patho: vorhanden, aber nicht quantifiziert	MACLEOD und GYLES, 1990
aufgereinigtes rStx2e	1,5 - 48 ng/kg KG	Ferkel 5-6 Wo (SPF)	<i>i.v.</i> ED-Klinik: 50 -100 % 7 - 28 h <i>p.i.</i>	ED-Patho: 33 - 100 %	MACLEOD et al., 1991c

Fortsetzung der Tabelle 2 auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle

## Fortsetzung der Tabelle 2

Inokulum Stamm bzw. Toxin	Dosis <sup>1</sup>	Tierart & Alter	Appl. Klinik <sup>2</sup>	Pathologie/ Pathohistologie <sup>2</sup>	Literatur
aufgereinigtes rStx2e	24 ng/kg KG	Ferkel ca. 3 Wo	<i>i.v.</i> ED-Klinik: 100 %	ED-Patho: 100 %	BOYD et al., 1993
aufgereinigtes rStx2e mit PBS	1 µg	Ferkel 6 h	<i>i.v.</i> ED-Klinik: 100 %	k. A.	WADDELL UND GYLES, 1995
aufgereinigtes rStx2e mit DOC	40 µg	Ferkel 5-6 Wo	<i>i.i.</i> k. A.	ED-Läsionen: 90 %	WADDELL UND GYLES, 1995
aufgereinigtes rStx2e mit PBS und DOC	400 µg	Ferkel 5-6 Wo	<i>i.i.</i> ED-Klinik: 100 %, 24 h <i>p.i.</i>	ED-Patho: 100 %	WADDELL UND GYLES, 1995
aufgereinigtes rStx2e mit NaHCO <sub>3</sub>	20 bzw. 100 µg	Ferkel 6 h	<i>i.g.</i> ED-Klinik: vorhanden, aber nicht quantifiziert	ED-Patho: vorhanden, aber nicht quantifiziert	WADDELL UND GYLES, 1995
aufgereinigtes rStx2e	0,9 pg (= 1 LD <sub>50</sub> )	Maus 4-6 Wo	<i>i.p.</i> ZNS-Störungen: vorhanden, aber nicht quantifiziert	k. A.	MACLEOD und GYLES, 1990

**Erläuterungen:** **AS** = Ammoniumsulfat; **DOC** = Natriumdesoxycholat; **ED** = Ödemkrankheit; **ED-Läsionen** = vaskuläre Läsionen in Arterien und Arteriole; **ED-Klinik** = Augenlidödeme und neurologische Störungen (Ataxie, Kopfschiefhaltung, Ruderbewegungen); **k. A.** = keine Angabe; **KG** = Körpergewicht; **K** = Kontrollgruppe; **M** = Mortalität; **ED-Patho** = Ödeme und vaskuläre Läsionen; **SPF** = spezifisch pathogen frei; **Stx2e-NT-AK** = Stx2e-neutralisierende Antikörper; **var. haem.** = *variatio haemolytica*; **Wo** = Woche; **Gnot.** = Gnotobionten.

1) Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf ein Tier;

2) Die Prozentangaben geben den Anteil der betroffenen Probanden wieder.

Bei keinem der infizierten Ferkel erhöhte sich die Körpertemperatur. Im Gegenteil, bei fortgeschrittener Paralyse lag die Temperatur sogar unter dem Normbereich (MACLEOD et al., 1991c; TIMONEY, 1950). Bei Ferkeln, die mit gefrorenem-aufgetautem EDEC-Extrakt inokuliert worden waren, kam es 40 Stunden *p.i.* zum Anstieg des Blutdrucks (CLUGSTON et al., 1974b).

Bei Infektionsversuchen waren EDEC vom 1. bis zum 9. Tag *p.i.* im Kot nachweisbar (TSUKAHARA et al., 2005; VERDONCK et al., 2002). Während bei Ferkeln ohne klinische Symptome, am 4. Tag *p.i.* maximal  $1,6 \times 10^8$  KbE/cm des EDEC-Infektionsstammes im Ileum quantifiziert wurden, waren bei den klinisch erkrankten erst am 6. Tag *p.i.* maximal  $2,4 \times 10^8$  KbE/cm vorzufinden (CORNICK et al., 1999; CORNICK et al., 2000; VERDONCK et al., 2002).

Vergleicht man die in der Literatur beschriebenen Inokula und Applikationswege miteinander, so sind Unterschiede in der Reproduzierbarkeit und Spezifität der Symptome zu erkennen. Bei der Verwendung von Stämmen der Serotypen O141:K85 und O139:K82:H1, welche häufig neben Stx2e auch *E. coli*-Enterotoxine exprimieren, können zusätzlich zur typischen Ödemkrankheitssymptomatik auch katarrhalische oder sogar blutige Durchfälle induziert werden (GANNON et al., 1988; KAUSCHE et al., 1992; PICKRELL et al., 1969b; SMITH und HALLS, 1968; TSUKAHARA et al., 2005). Die Dosis der zu applizierenden Erreger variierte selbst bei Stämmen des gleichen Serotyps. So waren mit  $10^{10}$  KbE des Stammes „S1191“ die Ödemkrankheit bei bis zu 40 % der Ferkel auslösbar, bei dem Stamm „1362-1“ genügten bereits  $3,9 \times 10^8$  KbE über drei Tage verteilt (CORNICK et al., 2000; TSUKAHARA et al., 2005). Eine weitere Schwierigkeit bei dem Ödemkrankheitsmodell mit lebenden Erregern ist, dass junge Ferkel als vermindert sensibel anzusehen sind, da diese den ECF18-Rezeptor nur schwach exprimieren (NAGY et al., 1992a). So erkrankten gnotobiotische Ferkel nach oraler Infektion mit  $4,05 \times 10^{10}$  KbE des Stammes *E. coli* O139:K82:H1 vermutlich deshalb nicht an Ödemkrankheit, weil die Ferkel zu dem Zeitpunkt der ersten Infektion erst drei Wochen alt waren und den ECF18-Rezeptor bis dahin nur in geringem Ausmaß ausgebildet hatten (MINIATS, 1970).

CLUGSTON und NIELSEN (1974a) verwendeten zur intravenösen Inokulation der Ferkel *E. coli*-Extrakte. Die Gewinnung der *E. coli*-Extrakte erfolgte, indem die Kulturen der jeweiligen EDEC-Stämme (O138, O139 und O141) zehnmal eingefroren und aufgetaut wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Proteinanteile des Überstandes mit Ammoniumsulfat gefällt, in einer NaCl-Lösung aufgenommen und den Ferkeln verabreicht. Aufgrund der Ammoniumsulfatfällung sollte der LPS-Gehalt im Inokulum reduziert werden. Dennoch verstarben 12 h nach *i.v.*-Verabreichung des mit Ammoniumsulfat gefällten Inokulums ca. 40 % der Ferkel an einem Endotoxinschock. Bei Verwendung eines Inokulums, das ohne den Fällungsschritt hergestellt worden war, verstarben allerdings mehr



als 80 % der Ferkel an einem Endotoxinschock. Durch Präzipitation der Extrakte mit Streptomycin, Ultrafiltration oder die Zugabe von Natriumdesoxycholat konnte die Endotoxinaktivität nochmals verringert werden. Auch zeigten sich bei Verwendung von *E. coli*-Extrakten in Abhängigkeit des O-Antigens Unterschiede im Schweregrad der klinischen Symptome. So waren bei Extrakten aus *E. coli*-Stämmen mit dem O-Antigen O138 und O141 die Ödemkrankheitssymptome weniger stark ausgebildet als bei Extrakten aus *E. coli* O139 (CLUGSTON und NIELSEN, 1974a).

Bei der Verabreichung von aufgereinigtem rStx2e traten als klinische Symptome ausschließlich ZNS-Störungen und/oder Ödembildungen auf. Meist waren 50 - 100 % der Ferkel betroffen im Gegensatz zu den nicht aufgereinigten Inokula, bei denen meist nur 0 - 50 % der Ferkel eine Ödemkrankheitssymptomatik aufwiesen. Sogar bei neugeborenen Ferkeln (6 h alt) gelang es, sowohl nach *i.v.*- als auch nach *i.g.*-Applikation von Stx2e Ödemkrankheit auszulösen. Der Zusatz von 2,5 mM Natriumdesoxycholat zum Inokulum diente der Steigerung der mukosalen Permeabilität für Makromoleküle im Darm. Dadurch wurde die Absorption von rStx2e im Darm gesteigert und es kam zu einer stärkeren Ödembildung in der Submukosa des Ileum, als ohne den Zusatz von Natriumdesoxycholat (WADDELL und GYLES, 1995). In den Modellen, in denen die Ödemkrankheit mit aufgereinigtem rStx2e induziert wurde, korrelierte die Toxindosis negativ mit der Inkubationszeit und positiv mit dem Schweregrad der Ödemkrankheitssymptome. Somit zeigten alle Ferkel, denen 48, 24, 12 bzw. 6 ng/kg KG *i.v.* verabreicht worden waren, 7, 12, 14 bzw. 15 Stunden nach der Inokulation schwere Ödemkrankheitssymptome. Die Verabreichung von 3 ng/kg KG (= LD<sub>50</sub>) rStx2e führte bei 50 % der Ferkel zu starken (Ataxien, Krämpfe und Tod) und bei 50 % zu schwachen (Augenlidödeme und schwankender Gang) Symptomen. Bei denjenigen Ferkeln, die mit der niedrigsten Dosis 1,5 ng/kg KG belastet wurden, traten nur noch bei jedem zweiten Ferkel leichte Symptome der Ödemkrankheit auf. Das in diesem Versuch verabreichte rStx2e war wie die anderen aufgereinigten rStx2e-Inokula zuvor chromatographisch aufgereinigt worden, jedoch war hier zusätzlich eine Affinitätschromatographie durchgeführt worden (MACLEOD et al., 1991c).

Die Applikation von aufgereinigtem rStx2e scheint zur experimentellen Induktion der Ödemkrankheit am besten geeignet zu sein, weil das Stx2e das eigentliche krankmachende Agens darstellt, keine zusätzlichen Symptome auslöst (Diarrhoe, Endotoxinschocks), gut quantifizierbar ist und die Applikationsdosis gut eingestellt werden kann.

## **2.5 Aktive Immunisierung gegen die Ödemkrankheit**

Da die Therapieversuche prognostisch unsicher sind und in der Regel zu spät eingeleitet werden, knüpft man große Hoffnungen an Konzepte, der Erkrankung durch Immunisierung vorzubeugen. Neben der passiven Immunisierung wurde vor allem versucht, durch eine

aktive Immunisierung mit Impfantigenen auf Basis von inaktiviertem Stx2e oder F18-Fimbrien eine Schutzwirkung zu erzielen (BERTSCHINGER et al., 2000; SARRAZIN und BERTSCHINGER, 1997). Am erfolgreichsten war hierbei der Einsatz von Stx2e-Antigen, da dieses Stx2e-neutralisierende und somit protektive Antikörper induziert (MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1991a). Bei der Herstellung entsprechender Stx2e-Toxoid-Impfstoffe wurde das Ziel verfolgt, die zytotoxische Aktivität des Stx2e-Moleküls aufzuheben, dabei aber seine Immunogenität zu erhalten. Hierzu wurde das Stx2e entweder chemisch behandelt oder das *stx2e*-Gen gentechnisch verändert.

### 2.5.1 Impfstoffe auf Basis von chemisch-inaktiviertem Shigatoxin 2e

Zur chemischen Stx2e-Inaktivierung wurden entweder wässrige Glutaraldehyd- oder Formaldehydlösungen verwendet. Die **Tabelle 3** gibt einen Überblick über die in der Literatur bisher beschriebenen Ansätze zur Impfung mit chemisch inaktiviertem Stx2e und der Wirksamkeit derartiger Impfstoffe. Das verwendete Impfantigen war dabei sehr unterschiedlich aufgereinigt. In den ersten Versuchen wurde Stx2e aus Feldisolaten verwendet. Dafür wurden Bakterienkulturen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert, das Gesamtprotein mit Ammoniumsulfat gefällt, in PBS aufgenommen und mit Glutaraldehyd inaktiviert (AWAD-MASALMEH et al., 1989), oder aber direkt die Bakterienkultur mit Formaldehyd inkubiert (GANNON und GYLES, 1990). In späteren Versuchen wurde mit rekombinant hergestelltem Stx2e (rStx2e) gearbeitet. Dazu wurden Polymyxin B-Extrakte der transformierten Bakterienzellen hergestellt (DOCIC und BILKEI, 2003; GORDON et al., 1992; JOHANSEN et al., 2000; KARG und BILKEI, 2002; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1991a; WADDELL et al., 1996). Die so gewonnenen Proteine wurden anschließend noch mittels Kationen-Austauscher-Chromatographie (DOCIC und BILKEI, 2003; GORDON et al., 1992; JOHANSEN et al., 1997; KARG und BILKEI, 2002; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1991a; WADDELL et al., 1996) oder Affinitätschromatographie (DOCIC und BILKEI, 2003; GORDON et al., 1992; JOHANSEN et al., 1997; KARG und BILKEI, 2002; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1991a; WADDELL et al., 1996) aufgereinigt, bevor sie mit Glutaraldehyd oder Formaldehyd inaktiviert wurden.

Die Wirkungsweise der chemischen Detoxifizierung mit Aldehyden beruht dabei auf der Kondensation der Proteine mittels Methylenbrückenbildung zwischen  $\text{NH}_2$  und Carbongruppen (BLASS et al., 1967), was sich in einer willkürlichen Veränderung der Proteinstruktur äußert (FORTH et al., 1992). Um den Erfolg der chemischen Detoxifizierung zu überprüfen, wurde rStx2e mit 0,1 % Glutaraldehyd bzw. 0,1 % Formaldehyd behandelt und die verbliebene Toxizität im Verozell-Zytotoxizitätstest gemessen. Während nach Behandlung mit Glutaraldehyd das rStx2e nicht mehr zytotoxisch war, war nach Formaldehyd-Behandlung noch 14 % Restzytotoxizität vorhanden (MACLEOD und GYLES, 1991a). In einer anderen Untersuchung wurde auch gezeigt, dass die Behandlung mit Formaldehyd zu einer Reduk-

tion der Gb3- und Gb4-Rezeptoraffinität führte. Die Applikation des formaldehydbehandelten Toxoidimpfstoffes induzierte in den Ferkeln zwar Stx2e-neutralisierende Antikörper, aber es kam auch zu Gewichtsverlusten und vaskulären Gehirnläsionen. Die Nachuntersuchung des Toxoidimpfstoffes ergab, dass trotz der Formaldehyd-Behandlung eine Resttoxizität (enzymatische Aktivität) geblieben war, wenn auch hier 800fach reduziert gegenüber dem unbehandelten rStx2e (GORDON et al., 1992).

Die zweimalige Impfung mit formaldehyd- bzw. glutaraldehydbehandelten Stx2e-Impfstoffen induzierte einen hohen Gehalt an neutralisierenden Antikörpern in den Ferkeln (AWAD-MASALMEH et al., 1989; GANNON und GYLES, 1990; GORDON et al., 1992; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1991a; WADDELL et al., 1996). Dabei war der Stx2e-Neutralisationstiter bei zwei Wochen alten, immunisierten Ferkeln niedriger als bei sechs Wochen alten Ferkeln. Nach intravenöser Belastung der Ferkel mit rStx2e (MACLEOD und GYLES, 1991a) oder oraler Verabreichung mit einem EDEC-Stamm (AWAD-MASALMEH et al., 1989) traten aber noch bei bis zu 50 % der immunisierten Ferkel leichte Symptome der Ödemkrankheit wie Augenlidödeme auf. Der Stx2e-Neutralisationstiter lag bei diesen Schweinen niedriger (von 320 bis 640) als bei den nicht erkrankten Tieren (von 5.120 bis 10.240) (MACLEOD und GYLES, 1991a). Die Mortalitätsrate erreichte bei den geimpften Ferkeln, nach oraler Infektion mit einem EDEC-Stamm der Serogruppe O139, einen Wert von maximal 1,8 %. Ferkel, die mit einem apathogenen *E. coli* immunisiert wurden (Placebo-geimpfte Gruppe), schieden den EDEC-Infektionsstamm durchschnittlich vier Tage und die geimpften Ferkel zwei Tage aus. Bis zu 96,2 % der Placebo-geimpften Tiere zeigten mittel- bis hochgradige Symptome (ZNS-Störungen) und 46,9 % der Ferkel starben (AWAD-MASALMEH et al., 1989).

In Betrieben mit Ödemkrankheitsproblemen konnte durch zweimalige Immunisierung der Ferkel mit Glutaraldehyd-inaktiviertem rStx2e vor dem Absetzen die Mortalität von 10,6 % (Kontrolltiere) auf 2 bis 0,8 % (geimpfte Ferkel) gesenkt werden. Ebenfalls zeichneten sich die geimpften im Gegensatz zu den nicht-geimpften Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens durch höhere tägliche Gewichtszunahmen aus (JOHANSEN et al., 1997). Auch KARG und BILKEI erzielten in einem ähnlich aufgebauten Feldversuch wie JOHANSEN und Kollegen, bei denen die Ferkel ebenfalls mit Glutaraldehyd-inaktiviertem rStx2e geimpft wurden, eine Mortalitätsreduktion um ca. 8 %. Beide Feldversuche unterschieden sich nur in der Wahl des eingesetzten Adjuvans (Aluminiumhydroxid bzw. Emulsigen) (JOHANSEN et al., 1997; KARG und BILKEI, 2002).

In einem Bestand mit gehäuftem Auftreten von Ödemkrankheit wurde versuchsweise auch ein heterologes Impfantigen aus Stx2-Toxoid anstelle von Stx2e-Toxoid zur Immunisierung eingesetzt. Zur Detoxifizierung wurde das Stx2 vor der Verimpfung mit 0,3 % Glutaraldehyd

**Tabelle 3: Literaturangaben zur aktiven Immunisierung mit chemisch-inaktivierten Stx2e- bzw. E. coli-Impfstoffen**  
(Tabelle modifiziert nach TSCHOLSHIEW, 2006)

Impfstofftyp	Adjuvans	Inaktivierung des Toxins	Impfling	Appl.	Wirksamkeitsprüfung	Wirksamkeit	Literatur
E. coli (O141:K85 Stx2e)-Kulturen	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Formaldehyd (0,05 %)	Ferkel (4-6 Wo)	4 x i.m. 1 x i.v.	Ak-Nachweis (Stx2e-NT)	Stx2e-NT-Ak	GANNON et al., 1990
Stx2e-Toxoid	-	Glutaraldehyd (0,1 %)	Ferkel (4-6 Wo)	1 x s.k.	EDEC-Challenge (O139, Stx2e, oral, 10 <sup>10</sup> KbE/Ferkel)	MV: 1,8 % MP: 46,9 % ED-Klinik-V: 14,5 % ED-Klinik-P: 96,2 %	AWAD-MASALMEH et al., 1989
rStx2e-Toxoid	15 % Emulsigen	Glutaraldehyd	Ferkel (1-3 Wo)	2 x i.m.	ÖK-Inzidenz (Feldversuch, 1 Betrieb), Ak-Nachweis (ELISA)	MV: 0,9 % MP: 6,9 % Anti-Stx2e-Ak	DOCIC und BILKEI, 2003
rStx2e-Toxoid	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Formaldehyd (1 %)	Ferkel (1-2 Wo)	2 x s.k.	Ak-Nachweis (Stx2e-NT)	Stx2e-NT-Ak	GORDON et al., 1992
rStx2e-Toxoid	15 % Emulsigen	Glutaraldehyd (25 µg/ml)	Ferkel (1-3 Wo)	2 x i.m.	ÖK-Inzidenz (Feldversuch, 2 Betriebe), Ak-Nachweis (ELISA)	MV: 0 % bzw. 0,8 % MP: 6,3 % bzw. 10,6 % Stx2e-Ak	JOHANSEN et al., 1997
rStx2e-Toxoid	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Glutaraldehyd	Ferkel (1-3 Wo)	2 x i.m.	ÖK-Inzidenz (Feldversuch, 1 Betrieb)	Sommer bzw. Winter: MV: 1,0 % bzw. 2,0 % MP: 1,3 % bzw. 10,6 %	KARG und BILKEI, 2002
rStx2e-Toxoid	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Glutaraldehyd (0,4 %)	Ferkel	6 x i.m.	Ak-Nachweis (Stx2e-NT)	Stx2e-NT-Ak	MACLEOD und GYLES, 1990
rStx2e-Toxoid	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Glutaraldehyd (0,1 %)	Ferkel (2+4 Wo)	2 x i.m.	Stx2e-Challenge (6 ng/kg, i.v.) Ak-Nachweis (Stx2e-NT)	MV: 0 % MP: 100 % ED-Klinik-V: 25-50 % Stx2e-NT-Ak	MACLEOD und GYLES, 1991a
rStx2e-Toxoid	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Glutaraldehyd	Kaninchen	5 x s.k.	Ak-Nachweis (Stx2e-NT)	Stx2e-NT-Ak	WADDELL et al., 1996

**Erläuterungen:** Ak = Antikörper; Al<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub> = Aluminiumhydroxid; MP = Mortalität in der nicht geimpften Gruppe; MV = Mortalität in der geimpften Gruppe; Stx2e-Ak = Stx2e-bindende Antikörper; Stx2e-NT-Ak = Stx2e-neutralisierende Antikörper; Stx2e-NT = Stx2e-Neutralisationstest auf Verotoxinen.

behandelt. Seine immunogene Wirksamkeit wurde allein an der Induktion Stx2e-neutralisierender Antikörper abgelesen. Insgesamt konnten nur bei 18,5 % der Impflinge Stx2e-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Diese Ferkel stammten meistens von Muttersauen ab, die selbst einen hohen Neutralisationstiter gegen Stx2 und Stx2e aufwiesen. Hohe Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern konnten durch Immunisierung der Ferkel mit einem Stx2-Toxoidimpfstoff nicht erreicht werden (ALEXA et al., 1998). Insgesamt lassen die Daten in der Literatur den Schluss zu, dass die Verwendung von aufgereinigtem, chemisch inaktiviertem rekombinantem Stx2e als Impfantigen einen besseren Schutz bewirkt, als Stx2e-Toxoid, das aus EDEC-Feldisolaten hergestellt wurde. Die dennoch scheinbar hohe Anzahl an rStx2e-geimpften, aber erkrankten Ferkeln in den Versuchen von MACLEOD und GYLES (1991a) ist vermutlich auf die Schwere der nachfolgenden *i.v.*-Belastung mit aufgereinigtem rStx2e zurückzuführen, die sich auch in einer 100 %igen Mortalitätsrate bei den nicht geimpften Ferkeln äußerte.

### 2.5.2 Impfstoffe auf Basis von gentechnisch-inaktivierten Shigatoxinen

Die chemische Inaktivierung von Shigatoxinen mit Glutaraldehyd oder Formaldehyd führt zu Veränderungen der Shigatoxin-Proteinstrukturen. Da diese Veränderungen eine Epitop-Maskierung zur Folge haben könnten, verfolgten andere Forschergruppen das Ziel, Stx2e durch gentechnisch eingeführte Modifikationen zu inaktivieren. Ein weiterer Grund für die Versuche von gentechnisch-inaktivierten Shigatoxinen war die Resttoxizität der chemisch-inaktivierten Shigatoxine, die auf gentechnischem Wege vollständig aufgehoben werden sollte (GORDON et al., 1992).

Zur gentechnischen Inaktivierung der Shigatoxine wurden sowohl in der A- als auch in der B-Untereinheit der Shigatoxinmoleküle einzelne oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht. Die auf diese Weise hergestellten Shigatoxin-Varianten wurden anschließend auf ihre Zytotoxizität, Enzymaktivität (**Tabelle 4**) sowie Immunität und Protektivität (**Tabelle 5**) im Ferkel geprüft. Die Zytotoxizität von Shigatoxinen wurde an Verozellen getestet. Die Enzymaktivität wurde untersucht, indem diejenige Konzentration an Shigatoxinen ermittelt wurde, die notwendig war, um die Ribosomenaktivität eines Zelllysates zu inhibieren.

### Einführung von Punktmutationen in der A-Untereinheit

Die Auswirkung von Punktmutationen in der A-Untereinheit von Shigatoxinen auf deren toxische und enzymatische Aktivität sind in **Tabelle 4** dargestellt. In der ersten Hälfte der **Tabelle 4** sind die Mutationen aufgelistet, welche im katalytischen Zentrum durchgeführt wurden (Mutation Y77F bis W202A/G203A/R204A) und in der zweiten Hälfte Aminosäuresubstitutionen im Bereich der Furinschnittstelle und/oder Disulfidbrücke (Mutation C241S bis  $\Delta$ H243-A245/ $\Delta$ A252-S258).

Die meisten Untersuchungen beschäftigten sich mit der gezielten Mutagenese im katalytischen Zentrum der Shigatoxine Stx, Stx1 und Stx2 (siehe auch **Abbildung 1**). Hierbei wurde gezeigt, dass der Austausch von nur einer Aminosäure, nämlich der Glutaminsäure auf Position 167 gegen Glutamin (E167Q), die Zytotoxizität gegenüber Verozellen bis zu 300.000fach und die enzymatische Aktivität mehr als 12.500fach reduzierte (OHMURA et al., 1993). Wurde Glutaminsäure auf Position 167 dagegen durch Asparaginsäure ersetzt (E167D), wurde die Toxizität nicht so stark reduziert (BASU et al., 2003; DERESIEWICZ et al., 1992; GORDON et al., 1992; HOVDE et al., 1988; JACKSON et al., 1990a; SKINNER und JACKSON, 1997). Die Reduktion der Zytotoxizität durch Mutationen an Position 167 konnte auch für Stx2e bestätigt werden. So hoben GORDON und Kollegen (1992) durch die Mutation E167Q die Zytotoxizität von rStxA2e zwar nicht vollständig auf, aber reduzierten die Zytotoxizität 10<sup>6</sup>fach und die enzymatische Aktivität 1.500fach. Einfache Mutationen auf den Positionen 77, 114 oder 170 erwiesen sich hinsichtlich der Zytotoxizitäts- und Enzymaktivitätsreduktion als nicht so effektiv wie die Mutationen auf Position 167 (DERESIEWICZ et al., 1992; DERESIEWICZ et al., 1993; GORDON et al., 1992; OHMURA et al., 1993; SAMUEL und GORDON, 1996). Bei Aminosäuresubstitutionen auf den Positionen 77, 114 sowie 170 wurde die stärkste Enzymaktivitätsreduktion durch die Mutation Y77S im rStxA1 erzielt (> 1.000fach). Am geringsten zytotoxisch für Verozellen erwies sich rStxA2e mit der Aminosäuresubstitution R170L (90.000fach reduziert) (DERESIEWICZ et al., 1992; OHMURA et al., 1993). Die Substitution von Tyrosin durch Serin ergab sowohl auf Position 77 als auch auf Position 114 eine bessere Detoxifizierung des rStx1 als der Aminosäureaustausch durch Phenylalanin. Dies liegt vermutlich daran, dass der Aminosäure Serin im Gegensatz zu Tyrosin und Phenylalanin die phenolische Hydroxylgruppe fehlt, welche bei der enzymatischen Wirkung, nämlich der Abspaltung des Adeninrestes von der 28S rRNS, mitbeteiligt ist (DERESIEWICZ et al., 1992; DERESIEWICZ et al., 1993).

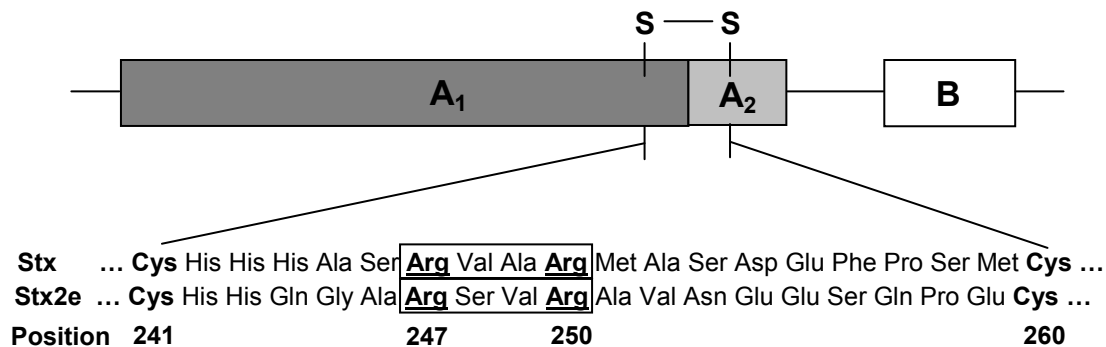
Durch die Substitution an zwei Positionen (E167Q/R170L) konnte die Verozell-Zytotoxizität von rStx2e vollständig eliminiert und so die beste Inaktivierung erzielt werden (MAKINO et al., 2001). Auch bei rStx1 konnte durch die Einführung von verschiedenen Doppelmutationen an Position 167 und 170 (E167Q bzw. E167K und R170L bzw. R170G) die Toxizität von

rStx1 gegenüber Verozellen und Mäusen vollständig aufgehoben werden (ISHIKAWA et al., 2003). In rStx2e wurden durch die Doppelmutation E167D/R170K zwar die Zytotoxizität (10.000fach) und die Enzymaktivität (800fach) reduziert, aber nicht aufgehoben (GORDON et al., 1992; SAMUEL und GORDON, 1996).

Durch die kombinierten Aminosäuresubstitutionen W202A/G203A/R204A im katalytischen Zentrum von rStx von *Shigella dysenteriae* erniedrigte sich die Zytotoxizität im Vergleich zum nativen Stx gegenüber Verozellen 8fach und die enzymatische Aktivität  $10^5$ fach. Infolge der Mutationen wurde die Bindungsstelle von rStx an die 28S rRNS an Position 167 in die enzymatisch aktive Tasche der A<sub>1</sub>-Untereinheit zurückverlagert, wodurch die Bindungsaffinität deutlich herabgesetzt wurde. Bei den Versuchen zum Nachweis der Zytotoxizität, konnte das Toxin die Ziel-RNS trotz des reduzierten Bindungspotentials binden und dessen Adeninring destabilisieren, da entweder durch die lange Inkubationszeit des Versuchs (2 Tage) eine Rückfaltung im mutierten Toxin erfolgte oder die Bindung, trotz der geringeren Affinität in ausreichendem Umfang, zustande kam. Bei dem Test auf enzymatische Aktivität war aufgrund der kürzeren Inkubation (2 h) vermutlich keine Rückfaltung möglich, weshalb die Aktivität von rStx2e<sub>W202A/G203A/R204A</sub> hier scheinbar viel stärker reduziert war (SKINNER und JACKSON, 1997).

Das A<sub>2</sub>-Fragment der Shigatoxine inhibiert die enzymatische Aktivität des A<sub>1</sub>-Fragments, solange es noch über Disulfidbrücken mit ihm verbunden ist (GARRED et al., 1995b). Daher ist die Spaltung der A-Untereinheit an der Furinschnittstelle ausschlaggebend für die Intoxikation der Zelle. Es wurde auch hier versucht, bestimmte Aminosäuren gentechnisch zu substituieren, um die Toxizität des Shigatoxins zu reduzieren (GARRED et al., 1995b). Die Erkennungssequenz für Furin ist Arg-X-X-Arg und befindet sich im Stx2e zwischen den beiden Cysteinen auf Position 241 und 260, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (GARRED et al., 1995b; OLSNES et al., 1981). Die beiden von Furin erkannten Arginine im Stx2e sind R247 und R250 (**Abbildung 2**). Um zu überprüfen, ob eine Spaltung der A-Untereinheit für die enzymatische Aktivität des rStx2e notwendig ist, wurde auf den Positionen 247 und/oder 250 das Arginin durch Glutamat (R247E, R250E, R247E/R250E) bzw. durch Histidin (R247H, R250H und R247H/R250H) ersetzt. Durch den einzelnen bzw. kombinierten Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamat ging nicht nur die Zytotoxizität vollständig verloren, es wurden vielmehr überhaupt keine intakten Holotoxinmoleküle mit einer AB5-Struktur gebildet. Dagegen ging eine Aminosäuresubstitution von Arginin durch Histidin nur mit einer geringgradigen Reduktion der Zytotoxizität einher und es wurde das rStx2e-Holotoxin ausgebildet. Durch weitere Untersuchungen der Histidin-substituierten Transformanten wurde deutlich, dass nur die rStx2e-Variante mit den beiden Substitutionen R247H/R250H nicht gespalten wurde. Zur Spaltung wurde in diesen Untersuchungen die Serinprotease Trypsin verwendet, die Peptide C-terminal der Aminosäuren Arginin bzw.

Lysin spaltet (OLSEN et al., 2004). SAMUEL und GORDON (1994) vertreten die Meinung, dass Trypsin wie Furin R247 bzw. R250 erkennt. Auch GARRED und Kollegen (1995b) nennen diesen Bereich „trypsin-sensitive region“. Mittels SDS-Page konnte das von dem nativen rStx2e nach Inkubation mit Verozellen abgespaltene A1-Fragment, bzw. das durch



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von StxA und StxA2e im Bereich der Furinschnittstelle (R247 und R250) und der Disulfidbrücke (C241 und C260);  
 umrahmt: Erkennungssequenz von Furin  
 (modifiziert nach GARRED et al., 1997; SAMUEL und GORDON, 1994)

Verdau der A-Untereinheit mit Trypsin gewonnene A1-Fragment sichtbar gemacht werden (SAMUEL und GORDON, 1994). Die Variante rStx2e<sub>R247H/R250H</sub> konnte *in vitro* durch Trypsin nicht gespalten werden. *In vivo* jedoch, konnte eine Spaltung von rStx2e<sub>R247H/R250H</sub> von ca. 20 - 30 % beobachtet werden. Somit konnte eine 2,5fache Verozell-Zytotoxizitäts- und eine 2,3fache Enzymaktivitätsreduktion nachgewiesen werden (SAMUEL und GORDON, 1994).

Im Gegensatz zu rStx2e reduzierten die beiden Aminosäureaustausche R247H/R250H bei rStx die Zytotoxizität und die Enzymaktivität überhaupt nicht (GARRED et al., 1995b). Wahrscheinlich stabilisiert die Disulfidbrücke die beiden A-Fragmente von StxA nach der enzymatischen Spaltung so stark, dass das A<sub>1</sub>-Fragment nicht vom Toxin-Komplex abgesetzt wird und daher blockiert bleibt (GARRED et al., 1997). Um die Rolle der Disulfidbrücke im Stx näher zu studieren, wurde das Cystein an Position 242 durch ein Serin ersetzt. Auf diese Weise modifiziert, reduzierte sich die enzymatische Aktivität von Stx<sub>C242S</sub> nach einer Inkubation von 3 h 5-10fach und nach einer Inkubationszeit von 5 h 100fach. Das Stx<sub>C242S</sub> konnte aber *in vitro* von Furin und Trypsin in das A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Fragment gespalten werden (GARRED et al., 1997).

Für die aktivierende Spaltung der A-Untereinheit in den Wirtszellen scheinen aber nicht nur die Erkennungssequenz für Furin, sondern auch die Sekundär- und Tertiärstruktur zwischen den beiden Cysteinen C241 und C260 eine wichtige Rolle zu spielen. Denn eine rStx-



Variante, in deren Molekül die 10 Aminosäuren H243 - A245 sowie A252 - S258 deletiert worden waren – bei Beibehaltung der Erkennungssequenz für Furin – wurde durch Furin weder *in vitro* noch in den Wirtszellen gespalten. Mit Trypsin konnte diese Variante *in vitro* aber nach wie vor in seine beiden Fragmente zerlegt werden (KURMANOVA et al., 2007). Diese Versuche deuten darauf hin, dass (a) in Verozellen, tatsächlich Furin die für die Aktivierung von Stx entscheidende Proprotein-Konvertase ist, und (b) Sekundär- und Tertiärstrukturen für die StxA-spaltende Wirkung von Furin bedeutend sind.

Mit der punktgenauen Mutagenese im katalytischen Zentrum der Shigatoxin-Typen Stx, Stx1, Stx2 und Stx2e wurde deutlich, dass diese Art der Inaktivierung sehr effektiv ist, um die N-Glykosidase-Aktivität und die Verozell-Zytotoxizität der Shigatoxine zu reduzieren bzw. aufzuheben. Der Grad der Inaktivierung ist abhängig von der Aminosäureposition und der gewählten Aminosäure mit der die Substitution erfolgt. Mutationen im Bereich der Furinschnittstelle zeigten im Vergleich zu Mutationen im katalytischen Zentrum nur eine geringe Reduktion der Enzymaktivität und spielen daher als Impfstoffkandidaten eine untergeordnete Rolle.

**Tabelle 4:**      **Auswirkung von Punktmutationen in der A-Untereinheit von Shigatoxinen auf deren toxische und enzymatische Aktivität**  
(Angaben aus der Literatur)

Mutation Original-AS, Position <sup>1)</sup> , mutierte AS	rStx-Typ	Reduktionsfaktor		Literatur
		Verozell-Zytotoxizität	Enzymaktivität	
<b>Y77F</b>	rStx1	n. t.	10 - 20	DERESIEWICZ et al., 1992
<b>Y77S</b>	rStx1	n. t.	> 1.000	DERESIEWICZ et al., 1992
<b>Y114F</b>	rStxA1	n. t.	30	DERESIEWICZ et al., 1993
<b>Y114S</b>	rStxA1	n. t.	500 - 1.000	DERESIEWICZ et al., 1993
<b>E167D</b>	rStx1	n. t.	220 - 400	BASU et al., 2003; DERESIEWICZ et al., 1992
<b>E167D</b>	rStx2e	10.000	400	GORDON et al., 1992;
<b>E167D</b>	rStxA1	n. t.	1.000	HOVDE et al., 1988
<b>E167D</b>	rStx2	1.000	100	JACKSON et al., 1990a
<b>E167D</b>	rStx	5	ca. 2.000	SKINNER und JACKSON 1997
<b>E167Q</b>	rStx2e	n. t.	n. t.	BOSWORTH et al., 1996
<b>E167Q</b>	rStx2e	1.000.000	1.500	GORDON et al., 1992; SAMUEL et al., 1996
<b>E167Q</b>	rStx1	300.000	> 12.500	OHMURA et al., 1993
<b>R170K</b>	rStx2e	10	5	GORDON et al., 1992; SAMUEL et al., 1996
<b>R170L</b>	rStx1	90.000	250	OHMURA et al., 1993
<b>Y77S/E167Q</b>	rStx2	atoxisch	n. t.	WEN et al., 2006
<b>Y77S/E167Q</b>	rStx1	atoxisch	n. t.	WEN et al., 2006
<b>Y77S/E167Q</b>	rStx1 + rStx2	atoxisch	n. t.	WEN et al., 2006
<b>Y77S/E167Q/ R170L</b>	rStxA2 + rStxB1	atoxisch	n. t.	SMITH et al., 2006
<b>E167D/R170K</b>	rStx2e	10.000	800	GORDON et al., 1992; SAMUEL et al., 1996
<b>E167K/R170G</b>	rStx1	atoxisch	n. t.	ISHIKAWA et al., 2003
<b>E167K/R170L</b>	rStx1	atoxisch	n. t.	ISHIKAWA et al., 2003
<b>E167Q/R170L</b>	rStx1	300.000	2.750	OHMURA et al., 1993
<b>E167Q/R170G</b>	rStx1	atoxisch	n. t.	ISHIKAWA et al., 2003
<b>E167Q/R170L</b>	rStx2e	atoxisch	n. t.	MAKINO et al., 2001
<b>W202A/G203A/ R204A</b>	rStx	8	ca. 200.000	SKINNER et JACKSON, 1997

Fortsetzung und Erläuterungen der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 4**

Mutation Original-AS, Position <sup>1)</sup> , mutierte AS	rStx-Typ	Reduktionsfaktor		Literatur
		Verozell-Zytotoxizität	Enzymaktivität	
<b>C241S</b>	rStx	n. t.	0 - 100 (zeitabhängig)	GARRED et al., 1997
<b>R247E</b>	rStx2e	atoxisch	n. t.	SAMUEL et al., 1994
<b>R247H</b>	rStx2e	0	n. t.	SAMUEL et al., 1994
<b>R250E</b>	rStx2e	atoxisch	n. t.	SAMUEL et al., 1994
<b>R250H</b>	rStx2e	0	n. t.	SAMUEL et al., 1994
<b>R247E/R250E</b>	rStx2e	atoxisch	n. t.	SAMUEL et al., 1994
<b>R247H/R250H</b>	rStx2e	2,5	2,3	SAMUEL et al., 1994
<b>R247H/R250H</b>	rStx	0	0	GARRED et al., 1995b
<b>R247G/R250G</b>	rStx1	n. t.	0	LEA et al., 1999
<b>S146A/A246G/ A252G/S253A</b>	rStx1	n. t.	0	LEA et al., 1999
<b>S146A/A246G R247G/R250G/ A252G/S253A</b>	rStx1	n. t.	0	LEA et al., 1999
<b>S146A/A246G/ R219G/R222G/ R247G/R250G/ A252G/S253A/</b>	rStx1	n. t.	60	LEA et al., 1999
<b>ΔH243-A245/ ΔA252-S258</b>	rStx	n. t.	n. t.	KURMANOVA et al., 2007

**Erläuterungen:** Δ = Deletion; **atoxisch** = keine Zytotoxizität nachweisbar; **n. t.** = nicht getestet;  
**1)** Die Positionsnummern der Aminosäuren wurden denen von Shigatoxin 2e angeglichen (PubMed Genbank Accession-Nr. M21534)

Die Auswirkung von Punktmutationen im katalytischen Zentrum der A-Untereinheit von Shigatoxinen wurde nicht nur hinsichtlich deren toxischer und enzymatischer Aktivität, sondern auch hinsichtlich deren Immunogenität in Ferkelversuchen oder in Mäuseversuchen untersucht. Der angewandte Impfstoff, die Applikationsform und die Wirksamkeit der gentechnisch inaktivierten Impfantigene sind in **Tabelle 5** dargestellt.

GORDON und Kollegen (1992) konnten, wie bereits in **Tabelle 4** dargestellt wurde, durch die Mutation E167Q die Zytotoxizität und die Enzymaktivität von rStx2e stark reduzieren. Der Verlust der Toxizität von rStx2e<sub>E167Q</sub> konnte im Impfvorsuch bestätigt werden, denn nach 2maliger s.k.-Applikation von 50 µg rStx2e<sub>E167Q</sub> an Ferkel waren weder klinische noch pathologische Anzeichen von Ödemkrankheit sichtbar (**Tabelle 5**). Ferner konnten bei den

geimpften Ferkeln Stx2e-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. BOSWORTH und Kollegen (1996) belasteten ihre Ferkel, die mit demselben rStx2e<sub>E167Q</sub>-Impfantigen geimpft worden waren wie die Ferkel im Versuch von GORDON und Kollegen (1992), oral mit einem EDEC-Stamm. Hierbei haben alle Ferkel die EDEC-Belastung überlebt. Somit zeichnete sich das rStx2e<sub>E167Q</sub>-Impfantigen durch ein hohes Maß an Verträglichkeit bei gleichzeitiger protektiver Wirkung aus.

Durch die beiden Substitutionen E167Q/R170L im rStx2e konnten MAKINO und Kollegen (2001) die zytotoxische Aktivität, wie bereits erwähnt, vollständig eliminieren. Im Impf- und Belastungsversuch an Ferkeln zeigte das Impfantigen rStx2e<sub>E167Q/R170L</sub> eine sehr gute protektive Wirksamkeit. Alle mit rStx2e<sub>E167Q/R170L</sub> geimpften Ferkel überlebten eine anschließende EDEC-Belastung, im Gegensatz zu den nicht-geimpften Ferkeln, von denen 40 % verstarben. Bei den geimpften Ferkel war im Vergleich zu den nicht-geimpften ein 3,3facher Anstieg des IgG-Gehalts im Blut und ein 1,6facher Anstieg des intestinalen IgA-Gehalts gegen das Antigen rStx2e<sub>E167Q/R170L</sub> im ELISA detektierbar (MAKINO et al., 2001). ISHIKAWA und Kollegen (2003) erzielten durch Doppelmutation auf den Positionen 167 und 170 im rStx1 ebenfalls eine sehr gute Wirksamkeit der Impfantigene rStx1<sub>E167K/R170G</sub>, rStx1<sub>E167K/R170L</sub> und rStx1<sub>E167Q/R170G</sub>, und zwar in Impf- und Belastungsversuchen in Mäusen (ISHIKAWA et al., 2003).

WEN und Kollegen (2006b) stellten eine Doppelmutante Y77S/E167Q für rStx1 und rStx2 her und überprüften in einem Immunisierungsversuch inwieweit eine Kreuzneutralisation durch die beiden gentechnisch modifizierten Toxine aufgebaut werden würde. Aber Mäuse, die mit rStx1<sub>Y77S/E167Q</sub>- bzw. rStx2<sub>Y77S/E167Q</sub>-basierten Impfstoffen geimpft wurden, produzierten nur Antikörper und neutralisierende Antikörper gegen rStx1 bzw. rStx2. Eine Kreuzneutralisation war nicht vorhanden. Die anschließende Mischbelastung mit rStx1 und rStx2 überlebten nur 20 % der Mäuse. Die gleichzeitige Impfung von rStx1<sub>Y77S/E167Q</sub> und rStx2<sub>Y77S/E167Q</sub> führte hingegen zur Bildung von Antikörpern und neutralisierenden Antikörpern gegen beide Stx-Typen und alle geimpften Mäuse überlebten den rStx1/rStx2-Challenge (WEN et al., 2006b). Durch die Entwicklung einer Hybrid-Subunit-Vakzine, die aus der rStxA2<sub>Y77S/E167Q/R170L</sub>-Untereinheit und der rStxB1-Untereinheit bestand, wurde eine gute protektive und immunogene Wirkung sowohl gegen rStx1 als auch gegen rStx2 erzielt (SMITH et al., 2006). Die Forscher verwendeten hierbei die StxB1-Untereinheit, da diese eine bessere immunogene Wirkung aufweist als StxB2 (SMITH et al., 2006).

Sowohl das rStx2e-Impfantigen mit der Einzelmutation E167Q als auch rStx2e mit der Doppelmutation E167Q/R170L zeichnete sich durch eine gute immunogene als auch protektive Wirkung aus. Das gleiche trifft für die Impfantigene mit Aminosäuresubstitutionen auf den Positionen 167/170 im rStx1 zu.

**Tabelle 5: Auswirkung von Punktmutationen in der A-Untereinheit von Shigatoxinen auf deren Immunogenität**  
(Angaben aus der Literatur)

<b>Mutation</b> Original-AS, Position <sup>1)</sup> , mutierte AS	<b>rStx-Typ</b>	<b>Adjuvans</b>	<b>Impfling + Appl.</b>	<b>Wirksamkeitsprüfung</b>	<b>Wirksamkeit</b>	<b>Literatur</b>
<b>E167Q</b>	rStx2e	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Ferkel s.k.	EDEC-Challenge (oral, S1191), Ak-Nachweis (Stx2e-NT)	MV: 0 %, MP: 36 % Stx2e-NT-Ak	BOSWORTH et al., 1996
<b>E167Q</b>	rStx2e	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	Ferkel s.k.	Ak-Nachweis (Stx2e-NT)	Stx2e-NT-Ak	GORDON et al., 1992; SAMUEL et al., 1996
<b>Y77S/E167Q</b>	rStx2	TiterMax <sup>®</sup> Gold	Maus <i>i.p.</i>	rStx1/rStx2-Challenge ( <i>i.p.</i> , 50x LD <sub>50</sub> ) Ak-Nachweis (WB, Stx2e-NT)	MV: 80 %, MP: 100 % Stx2-Ak und Stx2-NT-Ak	WEN et al., 2006
<b>Y77S/E167Q</b>	rStx1	TiterMax <sup>®</sup> Gold	Maus <i>i.p.</i>	rStx1/rStx2-Challenge ( <i>i.p.</i> , 50x LD <sub>50</sub> ) Ak-Nachweis (WB, Stx2e-NT)	MV: 80 %, MP: 100 % Stx1-Ak und Stx1-NT-Ak	WEN et al., 2006
<b>Y77S/E167Q</b>	rStx1 + rStx2	TiterMax <sup>®</sup> Gold	Maus <i>i.p.</i>	rStx1/rStx2-Challenge ( <i>i.p.</i> , 50x LD <sub>50</sub> ) Ak-Nachweis (WB, Stx2e-NT)	MV: 0 %, MP: 100 % Stx1/Stx2-Ak und Stx1/Stx2-NT-Ak	WEN et al., 2006
<b>Y77S/E167Q/ R170L</b>	rStxA2 + rStxB1	TiterMax <sup>®</sup> Gold	Maus <i>i.p.</i>	rStx1/rStx2-Challenge ( <i>i.p.</i> , 10x LD <sub>50</sub> ) Ak-Nachweis (ELISA, Stx2e-NT)	MV: 0 %-10 %, MP: 100 % Stx1/Stx2-Ak und Stx1/Stx2-NT-Ak	SMITH et al., 2006
<b>E167K/R170G</b>	rStx1	kFA/IFA	Maus, s.k.	Ak-Nachweis, (ELISA, Stx2e-NT)	Stx1-Ak und Stx1-NT-Ak	ISHIKAWA et al., 2003
<b>E167K/R170L</b>	rStx1	kFA/IFA	Maus s.k.	rStx1-Challenge ( <i>i.p.</i> ) Ak-Nachweis (ELISA, Stx2e-NT)	MV: 0 %, MP: 100 % Stx1-Ak und Stx1-NT-Ak	ISHIKAWA et al., 2003
<b>E167Q/R170G</b>	rStx1	kFA/IFA	Maus s.k.	Ak-Nachweis (ELISA, Stx2e-NT)	Stx1-Ak und Stx1-NT-Ak	ISHIKAWA et al., 2003
<b>E167Q/R170L</b>	rStx2e	-	Ferkel oral	EDEC-Challenge (oral, KY010), Ak-Nachweis (ELISA)	MV: 0 %, MP: 40 % Stx2e-Ak	MAKINO et al., 2001

**Erläuterungen:** Δ = Deletion; **Ak** = Antikörper; **Al<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>** = Aluminiumhydroxid; **iFA** = inkomplettes Freundesches Adjuvans; **kFA** = komplettes Freundesches Adjuvans; **MP** = Mortalität in der Placebo-geimpften Gruppe; **MV** = Mortalität in der geimpften Gruppe; **Stx-NT**-**Ak** = Stx-neutralisierende Antikörper; **Stx-NT** = Stx-Neutralisationstest auf Verotoxinen; **WB** = Westernblot-Analyse.  
1) Die Positionsnummern der Aminosäuren wurden denen von Shigatoxin 2e angeglichen (PubMed Genebank Accession-Nr. „M21534“)

### Einführung von Punktmutationen in der B-Untereinheit

Auch durch Veränderungen an der Primärstruktur der B-Untereinheit von Stx2e, kann dessen toxische Aktivität vermindert werden (**Tabelle 6**). In allen Fällen, in denen der molekulare Mechanismus dieser Reduktion näher untersucht wurde, zeigte sich eine Verminderung der Affinität der B-Untereinheit zu dem Gb3- und/oder Gb4-Rezeptor. Das Ziel der Studien waren Mutanten herzustellen, deren Shigatoxine ihre Zytotoxizität verloren hatten, weil sie gar nicht erst an ihre Zielzellen binden konnten.

Das Bindungsverhalten von StxB2e ließ sich dem von StxB2 angleichen indem die Aminosäuren auf den Positionen 64 und 66 durch diejenigen von Stx2 (Q64E/K66Q) ersetzt wurden. Das Resultat war eine stark reduzierte Gb4- und eine erhöhte Gb3-Rezeptorerkennung. Wurden aber nicht beide Aminosäuren gleichzeitig ersetzt, sondern nur die eine oder die andere Aminosäure (Q64E oder K66Q) ausgetauscht, dann blieb das Bindungsverhalten von rStx2e weitgehend unverändert. Nach der *i.v.*-Injektion von rStx2e<sub>Q64E/K66Q</sub>, rStx1 oder rStx2e an Ferkel, war eine 2- bzw. 5fach reduzierte geringere Bindung an Zellen des Gastrointestinaltrakts bzw. an Erythrozyten von rStx2e<sub>Q64E/K66Q</sub> und rStx1 als von rStx2e zu erkennen. Alle drei Toxintypen riefen vergleichbare Gehirnläsionen hervor, aber Ödeme in der Submukosa wurden nur bei mit rStx2e belasteten Ferkeln festgestellt (BOYD et al., 1993). Im Gegensatz zu rStx2, erkannte rStx2e<sub>Q64E/K66Q</sub> noch immer den Gb4-Rezeptor, so dass neben Q64 und K66 vermutlich noch weitere Bindungsstellen für Gb4 im StxB2e-Molekül vorhanden sein müssen (LING et al., 2000; TYRRELL et al., 1992). So wurden andere Substitutionen (N54S und S57E) an der rStxB2e-Untereinheit vorgenommen, welche aber zu keiner Bindungsänderung führten, wenn sie einzeln eingeführt wurden. Die Kombination der beiden Substitutionen (rStxB2e<sub>N54S/S57E</sub>) reduzierte die Gb3- und Gb4-Bindung des Moleküls deutlich. Durch eine zusätzliche Mutation an Position 52 (rStx2e<sub>I52K/N54S/S57E</sub>) war schließlich weder eine Gb3- noch eine Gb4-Rezeptorbindung mehr erkennbar (TYRRELL et al., 1992).

Für Stx und Stx2 wurden ähnliche Untersuchungen durchgeführt. Hier hoben bereits einzelne Substitutionen (R32C, A42T und G59D) die Verozell-Zytotoxizität des rStx2 vollständig auf und reduzierten die von rStx um den Faktor  $10^3$  bis  $10^6$ . Bindungsstudien ergaben, dass das gentechnisch veränderte rStx2 schwach bis gar nicht an die Gb3-Rezeptoren binden konnte (PERERA et al., 1991). Die *i.p.*-Applikation von Ultraschalllysaten der rStx2<sub>R32C</sub><sup>-</sup>, rStx2<sub>A42T</sub><sup>-</sup> und rStx2<sub>G59D</sub><sup>-</sup>-exprimierenden *E. coli* überlebten alle belasteten Mäuse, im Gegensatz zu denjenigen Tieren, denen entsprechende Präparate eines rStx2-exprimierenden *E. coli* verabreicht worden waren. Kaninchen, die Präparate der rStx2<sub>R32C</sub><sup>-</sup>, rStx2<sub>A42T</sub><sup>-</sup> und rStx2<sub>G59D</sub><sup>-</sup>-Mutanten *i.m.* verabreicht bekamen, bildeten auch Stx2-neutralisierende Antikörper (PERERA et al., 1991). Die Substitution F30A in rStx1 verminderte dessen Gb3-Bindung, eine  $10^5$ fache Reduktion in der Zytotoxizität gegenüber Verozellen und einer

2,8fachen Minderung der Toxizität für Mäuse (BAST et al., 1997; SOLTYK et al., 2002; WOLSKI et al., 2001). Eine zusätzliche Mutation an Position 61 (G61T) reduzierte die Zytotoxizität von rStx1<sub>F30AG61T</sub> 10<sup>6</sup>fach und die Toxizität für Mäuse 140fach im Vergleich zum nicht mutierten rStx1 (BAST et al., 1997; SOLTYK et al., 2002; WOLSKI et al., 2001). Die Applikation von rStx1<sub>F30A</sub> an Kaninchen induziert die Bildung Stx1-neutralisierender-Antikörper (BAST et al., 1997; SOLTYK et al., 2002; WOLSKI et al., 2001).

**Tabelle 6: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in der rStxB2e-Untereinheit auf die Rezeptorerkennung und/oder Zytotoxizität von rStx2e**  
(Angaben aus der Literatur)

<b>Mutation</b> Original-AS, Position, mutierte AS	<b>Änderung der Rezeptorbindung</b>	<b>Reduktion der Toxizität<sup>1)</sup></b> [Reduktionsfaktor]	<b>Literatur</b>
<b>N17D</b>	keine	10	JACKSON et al., 1990b, TYRRELL et al., 1992
<b>R26K</b>	keine	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>I52K</b>	keine Gb3-Bindung, keine Gb4-Bindung	100	JACKSON et al., 1990b, TYRRELL et al., 1992
<b>N54S</b>	keine	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>S57E</b>	keine	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>Q64E</b>	n. t.	0	JACKSON et al., 1990b
<b>Q64E</b>	keine	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>Q64STOP</b>	keine Gb3-Bindung, keine Gb4-Bindung	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>K66Q</b>	keine	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>N17D/Q64E</b>	n. t.	10	JACKSON et al., 1990b
<b>S24E/R26K</b>	keine Gb3-Bindung, keine Gb4-Bindung	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>I52K/Q64E</b>	n. t.	10	JACKSON et al., 1990b
<b>N54S/S57E</b>	schwache Gb3-Bindung, reduzierte Gb4-Bindung	n. t.	TYRRELL et al., 1992
<b>Q64E/K66Q</b>	vermehrte Gb3-Bindung, reduzierte Gb4-Bindung	100	BOYD et al., 1993; LING et al., 2000; TYRRELL et al., 1992
<b>I52K/N54S/S57E</b>	keine Gb3-Bindung, keine Gb4-Bindung	n. t.	TYRRELL et al., 1992

**Erläuterungen:** 1) gemessen im Verozell-Zytotoxizitätstest  
**AS** = Aminosäure; **n. t.** = nicht getestet

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte und Puffer sind im Anhang (ab Seite 132) aufgelistet.

#### 3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit eingesetzten *E. coli*-Referenz- und Kontrollstämme sind in der **Tabelle 7** aufgelistet. Alle Stämme wurden entweder in LB-Medium mit 30 % (v/v) Glycerin bei -70 °C gelagert, oder nach Plattenabschwemmung mit Serumbouillon mit 10 % (w/v) Glukose lyophilisiert und bei 4 °C gelagert.

#### 3.2 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVOs)

Bei den verwendeten gentechnisch veränderten Organismen handelte es sich um Abkömmlinge von *E. coli*-B- und *E. coli*-K12-Stämmen, in deren Genom DNS-Fragmente von Wildtyp-*E. coli*-Stämmen über rekombinante Plasmide eingebracht worden waren (siehe auch **Tabelle 9**). Alle Stämme sind mit ihren relevanten Eigenschaften in der **Tabelle 8** aufgelistet. Die GMOs wurden in LB-Medium mit 30 % (v/v) Glycerin bei -70 °C gelagert.

**Tabelle 7: Überblick über die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme**

Stamm	Serovar	wichtige Eigenschaften	Herkunft	Referenz
299	O139:K82	<i>stx2e</i> , <i>fedA</i> , α-Hämolyse	Schwein	IHIT
412	O139:K82	<i>stx2e</i> , <i>fedA</i> , α-Hämolyse	Schwein	Z
E57	O138:K81	<i>stx2e</i> , <i>fedA</i> , <i>estap</i> , <i>estb</i> , α-Hämolyse	Schwein	W
BLR(DE3)	B-Derivat	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB (r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>) gal dcm Δ (srl-recA) 306::Tn10 (DE3)</i> , chromosomal kodierte Tetracyclin-Resistenz	k. A.	N
23	B-Derivat	BLR(DE3, pET24b(+))	k. A.	B
XL1-Blue	K12-Derivat	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacIqZΔM15 Tn10)</i> , super-kompetente Zellen, chromosomal kodierte Tetracyclin-Resistenz	k. A.	S

**Erläuterungen:** **IHIT:** Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Giessen; **B:** Dr. S. Barth, IHIT; **k. A.:** keine Angabe; **N:** Fa. Novagen (über Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim); **S:** Fa. Stratagene, Heidelberg; **W:** Dr. C. Wray, Central Veterinary Laboratory, Addelstone, UK (WOODWARD und WRAY, 1990); **Z:** Dr. K. Ziebell, Guelph, Canada.



**Tabelle 8: Überblick über die gentechnisch hergestellten *E. coli*-B- und *E. coli*-K12-Stämme**

GVO-Bezeichnung (Kurzbezeichnung)	<i>E. coli</i> -Spender- Organismus (Serovar, Stamm)	Plasmid	<i>E. coli</i> -B- bzw. -K12- Empfänger- Stamm	Induktor <sup>1)</sup>
<b>SB200</b>	O139:K82 „412“	pHIT-IV-41	BLR(DE3)	IPTG
<b>SB221</b>	O139:K82 „412“	pHIT-IV-42	BLR(DE3)	IPTG
<b>SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 (QD)</b>	XL1-Blue (pHIT-VI-47)	pHIT-IV-47	BLR(DE3)	IPTG
<b>SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 (QLD)</b>	XL1-Blue (pHIT-VI-48)	pHIT-IV-48	BLR(DE3)	IPTG
<b>SB221<sub>E167Q</sub> #9 (Q)</b>	XL1-Blue (pHIT-VI-49)	pHIT-IV-49	BLR(DE3)	IPTG
<b>SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 (QL)</b>	XL1-Blue (pHIT-VI-50)	pHIT-IV-50	BLR(DE3)	IPTG
<b>XL1-Blue(pHIT-VI-47)</b>	SB221	pHIT-IV-47	XL1-Blue	n. e.
<b>XL1-Blue(pHIT-VI-48)</b>	SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1	pHIT-IV-48	XL1-Blue	n. e.
<b>XL1-Blue(pHIT-VI-49)</b>	SB221	pHIT-IV-49	XL1-Blue	n. e.
<b>XL1-Blue(pHIT-VI-50)</b>	XL1-Blue (pHIT-VI-49)	pHIT-IV-50	XL1-Blue	n. e.

**Erläuterungen:** 1) IPTG = Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid  
n. e. = nicht erforderlich.

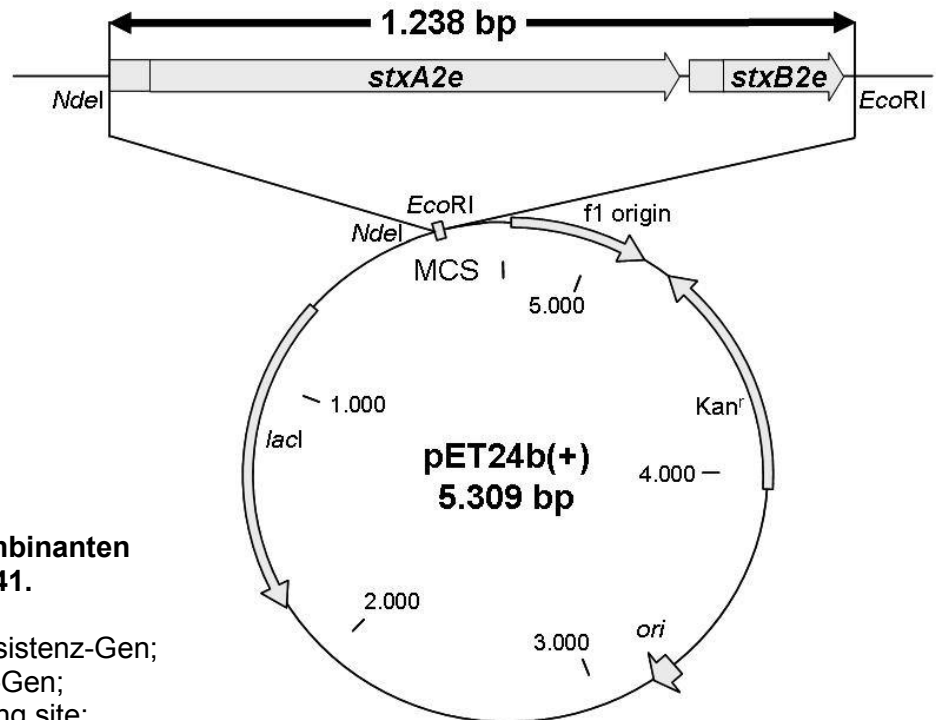
### 3.3 Plasmide

In dieser Arbeit wurden GVOs verwendet, zu deren Herstellung das kommerziell erhältliche pET-24b(+)-Plasmid verwendet wurde. Alle damit hergestellten Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften sind in der **Tabelle 9** aufgeführt. Exemplarisch für alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide ist die Genkarte des Plasmides pHIT-IV-41 in der **Abbildung 3** dargestellt.

**Tabelle 9: Überblick über die verwendeten Plasmide**

Plasmid	relevante Eigenschaften	Herkunft	
<b>pET-24b(+)</b>	5.309 bp, Kan <sup>r</sup> , T7-Promotor, T7-Transskriptionsstart, T7-Terminator; C-terminales His-Tag- (Linkersequenz aus 14 Aminosäuren und einen Marker, bestehend aus sechs Histidinen) kodierende Sequenz, <i>lacI</i>	N	
<b>pHIT-VI-41</b>	pET-24b(+>:: <i>stx2e</i> Insert: <i>stxAB2e</i> Genprodukte: rStxA2e rStxB2e	6.502 bp, Kan <sup>r</sup> , Schnittstellen <i>EcoRI</i> und <i>NdeI</i> (1.238 bp); (319 AS) und (87 AS) mit eigener Signalsequenz, kein Marker	diese Arbeit
<b>pHIT-VI-42</b>	pET-24b(+>:: <i>stx2e</i>	wie pHIT-VI-41 Punktmutation im <i>stxA2e</i> -Gen, an Position 420 Adenin durch Guanin ersetzt, keine Änderung der Aminosäuresequenz	diese Arbeit
<b>pHIT-VI-47</b>	pET-24b(+>:: <i>stx2e</i> <sub>E167QA216D</sub>	wie pHIT-VI-41 Punktmutationen im <i>stxA2e</i> -Gen; Genprodukt rStxA2e mit den Aminosäuresubstitutionen E167Q und A216D	diese Arbeit
<b>pHIT-VI-48</b>	pET-24b(+>:: <i>stx2e</i> <sub>E167QR170LA216D</sub>	wie pHIT-VI-41 Punktmutationen im <i>stxA2e</i> -Gen; Genprodukt rStxA2e mit den Aminosäuresubstitutionen E167Q, R170L und A216D	diese Arbeit
<b>pHIT-VI-49</b>	pET-24b(+>:: <i>stx2e</i> <sub>E167Q</sub>	wie pHIT-VI-41 Punktmutationen im <i>stxA2e</i> -Gen; Genprodukt rStxA2e mit der Aminosäuresubstitution E167Q	diese Arbeit
<b>pHIT-VI-50</b>	pET-24b(+>:: <i>stx2e</i> <sub>E167QR170L</sub>	wie pHIT-VI-41 Punktmutationen im <i>stxA2e</i> -Gen; Genprodukt rStxA2e mit den Aminosäuresubstitutionen E167Q und R170L	diese Arbeit

**Erläuterungen:** **N:** Fa. Novagen (über Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim);  
**Kan<sup>r</sup>:** Kanamycinresistenz-Gen; **lacI** = *lac*-Repressor-Gen.



**Abbildung 3:**  
Genkarte des rekombinanten  
Plasmides pHIT-VI-41.

**Kan<sup>r</sup>** = Kanamycinresistenz-Gen;  
**lacI** = *lac*-Repressor-Gen;  
**MCS** = multiple cloning site;  
**ori** = Replikationsursprung.

### 3.4 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antikörper und Testseren als Primärantikörper eingesetzt. In der **Tabelle 10** sind die relevanten Eigenschaften aufgelistet. Die eingesetzten Sekundärantikörper sind mit ihren jeweiligen Spezifitäten und Gebrauchsverdünnungen in der **Tabelle 11** wiedergegeben.

### 3.5 Serumproben

In den neun durchgeführten Tierversuchen wurden insgesamt 974 Blutproben von 382 Ferkeln gewonnen, davon 817 Blutproben aus Immunisierungsversuchen. Die Blutproben wurden von IDT Biologika GmbH in Rodleben abzentrifugiert. Die dabei gewonnenen Serumproben wurden gekühlt an das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere verbracht, dort archiviert und bei -20 °C gelagert.

### 3.6 Tiere

Zur Entwicklung des intravenösen Intoxikationsmodelles sowie zur Durchführung von Immunisierungsversuchen wurden 388 Hybridschweine (Kreuzung aus Deutscher Landrasse und Deutschem Edelschwein) aus eigener Zucht der IDT Biologika GmbH (Herkunft: IDT-Bestand) im Alter von sechs Wochen eingesetzt.

**Tabelle 10: Überblick über die eingesetzten Primärantikörper (Antikörper und Testseren)**

Bezeichnung	Beschreibung	Spezifität	Gebrauchsverdünnung	Herkunft (Referenz)
BC5BB12	monoklonaler Antikörper (Aszites, Maus)	StxB2	1:100 (Stx2e-NT-Test)	F. P. Downes, Institut für Parasitologie, North Carolina, USA ( <b>D</b> )
1E8	monoklonaler Antikörper (Hybridomazell-Überstand)	Alphatoxin von <i>Clostridium perfringens</i>	1:3 (Stx2e-NT-Test)	H. Schoepe, IHIT, Giessen
R-2226/02	polyklonales Antiserum (Pferd)	Rohtoxoid Stx2e	1:500 (Immunoblot)	L. O. Andresen, Danish Veterinary Institute, Department of Bacteriology, Copenhagen, DK (2000) ( <b>J</b> )
R-2657/02	Antiserum (Kaninchen)	Rohtoxin Stx2e	1:60 (Stx2e-NT-Test)	A. Tscholshiew, IHIT, Giessen ( <b>T</b> )
RIDASCREEN® Verotoxin ELISA	Mischung aus monoklonalen Antikörpern (Maus)	Stx1 + Stx2	Vorbeschichtung (RIDASCREEN® Verotoxin ELISA)	Art.-Nr.: C2201 Fa. R-Biopharm AG, Darmstadt
VT136/8-H4	monoklonaler Antikörper (Maus)	Stx2	800 ng / Napf (SIFIN-ELISA)	Fa. Sifin GmbH, Berlin, Chargen-Nr.: 380705

**Erläuterungen:** **D** = Downes et al., 1988; **J** = Johansen et al., 2000; **T** = Tscholshiew, 2006.

**Tabelle 11: Überblick über verwendete Konjugate und Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Maus-anti-Stx1+Stx2-Peroxidase	laut Herstellerangaben (RIDASCREEN® Verotoxin ELISA)	Kat.-Nr.: C2201, Fa. R-Biopharm AG, Darmstadt
„VT135/6-B9“ Maus-anti-Stx2-Peroxidase (monoklonaler Antikörper)	1:1.500 (SIFIN-ELISA)	Fa. Sifin GmbH, Berlin Chargen-Nr.: 250505
Ziege-anti-Pferd-IgG-Peroxidase	1:1.000 (Immunoblot)	Art.-Nr.: 108-036-003 Fa. Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Schwein-IgG-Meerrettich-Peroxidase	1:3.000 (ELISA <sub>rStx2e</sub> )	Art.-Nr.: 114-035-003 Fa. Dianova, Hamburg

### 3.7 Bakteriologische Methoden

#### 3.7.1 Anzucht von Bakterien

**Starterkultur.** Die Anzucht der Bakterien erfolgte mittels Schüttelkultur in LB-Medium unter aeroben Bedingungen über 14-18 h bei 37 °C (180 U/min). Bei der Anzucht von transformierten *E. coli*-Zellen wurden den Nährmedien die erforderlichen Antibiotika (30 µg/ml Kanamycin und 12,5 µg/ml Tetracyclin) zugesetzt.

**Induktion transformierter *E. coli*-Zellen.** Von rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurden Starterkulturen angezüchtet. Die Starterkultur wurde dann 1:100 (v:v) in frischem LB-Medium mit Kanamycin und Tetracyclin verdünnt und bis zum Erreichen der gewünschten OD<sub>600 nm</sub> weiter inkubiert (30 °C oder 37 °C, 180 U/min). Anschließend wurde der Kultur IPTG zur Induktion der Proteinexpression hinzugefügt. Die aus der Starterkultur in frischem LB-Medium angezüchtete Bakteriensuspension, wird im Folgenden als **Kultur** bezeichnet.

#### 3.7.2 Keimzahlbestimmung

**Photometrische Bestimmung.** Die optische Dichte von Keimsuspensionen wurde in einem Photometer bei 600 nm bestimmt. Zur Messung wurde 1 ml der zu bestimmenden Keimsuspension eingesetzt. Die Keimdichte [in Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) je ml Suspension] wurde dann mit der Formel „Keimzahl [KbE/ml] = OD<sub>600 nm</sub> x 10<sup>9</sup>“ berechnet.

**Tropfplattenverfahren.** Die Keimzahlbestimmung im Tropfplattenverfahren erfolgte in Anlehnung an die „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG“. Nach Standardanzucht einer Bakterienkultur in LB-Medium wurde die Suspension 1:100 (v/v) in frischem LB-Medium verdünnt und für weitere 20 h (30 °C und 37 °C, 180 U/min) inkubiert. Nach Messung der OD<sub>600 nm</sub> wurde eine log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe in steriler, physiologischer NaCl-Lösung angelegt. Je Verdünnungsstufe wurden je 10 µl auf zwei Blut-Agar-Platten aufgetropft (Doppelansatz) und über die Platte verteilt. Die Platten wurden für 16 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden diejenigen Platten ausgewertet, bei denen zwischen 30 und 300 Kolonien gut abgrenzbar waren. Die Keimzahl in der Ausgangsbouillon wurde dann nach der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = (\text{Anzahl der Kolonien} \times 100) \times \text{Verdünnungsstufe}$$

#### 3.7.3 Sterilitätskontrolle

Die Sterilitätskontrollen der Impfstoffe erfolgten gemäß dem Deutschen Arzneibuch (DAB) 10 (Abschnitt V. 2. 1. 1). Nach Inokulation von je 100 µl Impfstoff auf Blutagar und LB-Agar mit Kanamycin und Tetracyclin folgte eine Inkubation bei 37 °C über 24 h. Zusätzlich wurden 5 ml Serumbouillon mit 500 µl Impfstoff beimpft und bei 37 °C für 14 Tage inkubiert. Alle 24 h wurde die Bouillon visuell auf Trübung geprüft. Die Impfstoffe wurden als steril klassifiziert,

wenn während des Beobachtungszeitraumes weder eine Trübung der Bouillon noch Bakterienwachstum auf Blut- oder LB-Agar feststellbar war.

### 3.7.4 Dekontamination

Wurden bei Impfstoffen nach der Herstellung im Rahmen der Sterilitätskontrolle vermehrungsfähige *E. coli*-Bakterien nachgewiesen, wurde eine Sterilisation der Impfstoffe durchgeführt. Hierfür wurden die Impfstoffe in eine sterile Petrischale überführt und für 5 min mit UV-Licht (800 mJ) in der UV-Kammer Stratalinker 1800 bestrahlt. Anschließend wurde der Impfstoff steril in Reaktionsgefäße aliquotiert und erneut einer Sterilitätskontrolle unterzogen.

## 3.8 Molekulargenetische Methoden

### 3.8.1 Präparation von DNS

**Plasmid-DNS.** Präparation von Plasmid-DNS wurde gemäß den Anweisungen der Fa. Qiagen, Hilden, mit dem „Plasmid Mini Kit“ bzw. „Plasmid Midi Kit“ durchgeführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNS mit Isopropanol gefällt, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in *A. dest.* aufgenommen.

**Genomische DNS.** Zum Einsatz von genomischer DNS in PCR-Ansätzen wurden 50 µl einer Standardanzucht der Bakterien mit 100 µl *A. dest.* versetzt und für 10 min bei 100 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

### 3.8.2 Bestimmung von DNS-Konzentrationen

**Photometrische Bestimmung.** Die Bestimmung von DNS-Konzentrationen in wässrigen Lösungen erfolgte in einem Beckman Photometer des Typs DU-640 wobei die Konzentration der DNS nach der Formel

$$\text{ssDNS-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{320 \text{ nm}} - \text{OD}_{260 \text{ nm}}) \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

bzw.

$$\text{dsDNS-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{320 \text{ nm}} - \text{OD}_{260 \text{ nm}}) \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

errechnet wurde.

**Agarosegelelektrophorese.** Bei der Bestimmung der DNS-Menge durch Agarosegelelektrophorese wurden als Marker der „100 bp Ladder“ (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) oder „ $\lambda$ -HindIII/EcoRI“ (Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) auf dem Agarosegel mitgeführt. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der einzelnen Markerbanden mit der Probenbande konnte dann die DNS-Konzentration des fraglichen DNS-Fragments unter Berücksichtigung der eingesetzten Mengen des Markers und der Probe abgeschätzt werden.

### 3.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Untersuchung von *E. coli*-Stämmen kamen verschiedene PCR-Tests zum Einsatz. Die Bakterien wurden zunächst im Standardverfahren angezüchtet. Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Fa. Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe bzw. der Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellt und sind in der **Tabelle 12** aufgelistet. Sie wurden mit *A. dest.* auf eine Konzentration von 100 bzw. 20 pmol eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die PCRs wurden mit den entsprechenden Parametern in dem Thermocycler TC1 durchgeführt.

**stx2e-PCR.** Der Nachweis des *stx2e*-Gens wurde mittels *stx2e*-PCR durchgeführt. Ein Reaktionsansatz (30 µl) enthielt 1 x NH<sub>4</sub>-Mix, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 133 µl je Nukleotid, 0,5 µM je Primer, 0,03 U/µl PANScripT DNA Polymerase und 3 µl Bakteriensuspension. Als Positivkontrollen dienten die *E. coli*-Stämme 412 und E57, als Negativkontrolle wurde anstelle der Bakteriensuspension *A. dest.* eingesetzt. Die Amplifikation wurde in dem Thermocycler nach dem folgenden Profil durchgeführt: 5 min Denaturierung bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung (94 °C), 1 min Anlagerung (55 °C) und 1 min 30 sek Verlängerung (72 °C). Jeder Test wurde mit einer Inkubation für 5 min bei 72 °C abgeschlossen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 2 %-igen Agarosegelen.

**XL-PCR.** Für die Herstellung von Klonierungsinserts und Sequenzierungsmatrizen wurde die *rTth*-XL-Polymerase mit „proof-reading“-Aktivität gewählt. Die Reaktionsgemische (50 µl) enthielten 1 µl genomische DNS, 1,6 U *rTth*-XL-Polymerase, 1,1 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0,32 µM von jedem Primer und 320 µM je Desoxyribonukleotid. Die Amplifikation setzte sich zusammen aus einer anfänglichen Denaturierungsphase von 1 min, gefolgt von 32 Zyklen mit je 15 sek Denaturierung (94 °C) und 5 min Annealing- und Extensionsphase (57 °C), wobei ab dem 16. Zyklus die Annealing- und Extensionsphase um 15 sek / Zyklus verlängerte. Die abschließende Verlängerungsphase dauerte 10 min (72 °C).

**pET-PCR.** Zur Bestimmung der Insertgröße bei transformierten *E. coli*-B-Stämmen wurde die pET-PCR durchgeführt. Ein 30 µl Reaktionsansatz enthielt 1 x NH<sub>4</sub>-Mix, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,03 U/µl PANScripT DNA Polymerase, 0,5 µM je Primer, 133 µM je Nukleotid, sowie ca. 3 x 10<sup>5</sup> Bakterienzellen. Als Kontrolle wurde der *E. coli*-Stamm 23 verwendet. Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler nach dem folgenden Profil durchgeführt: 9 min Denaturierung bei 94 °C, anschließend 30 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung (94 °C), 30 sek Anlagerung (57 °C) und 2 min Verlängerung (72 °C). Abschließend folgte eine Inkubation für 5 min bei 72 °C. Die Auftrennung der Fragmente wurde in 1,5 %-igen Agarosegelen durchgeführt.

**Mutations-PCR.** Zur Einführung und Amplifikation der Mutationen im *stxA2e*-Gen enthielten die Reaktionsansätze (50 µl) folgende Komponenten: 1x Reaktionspuffer, 2,5 U *PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA Polymerase, 125 ng je Primer, 1 µl dNTP-Mix, sowie als Matrize 5 ng Plas-

mid-Präparation des Spender-Stammes. Zur Kontrolle wurden 10 ng pWhitescript™-Plasmid mit den im Kit enthaltenen Kontrollprimern anstatt 5 ng Plasmid und den Mutationsprimern (rStx2e<sub>E167Q</sub>-for und rStx2e<sub>E167Q</sub>-rev oder rStx2e<sub>R170L</sub>-for und rStx2e<sub>R170L</sub>-rev) eingesetzt. Alle Komponenten, außer der Matrizen-DNS und den Primern stammten aus dem QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit. Die Amplifikation wurde nach dem folgenden Profil durchgeführt: 30 sek Denaturierung bei 95 °C, anschließend 16 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung (95 °C), 1 min Anlagerung (55 °C) und 6 min 30 sek Verlängerung (68 °C).



Tabelle 12: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide

PCR	Primer	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation	Position <sup>1)</sup>	Datenbank	Eintrag-Nr.
<b>XL-PCR</b>	022-Stx2e-2	AACCGTGAATTCCTCAGTTAAACTTCACC	stxA2e	242-262	PM	M21534
	022-Stx2e-3	TATATGCATATGAAGTGATATTTGTTAAAG	stxB2e	<u>1462-1477</u>		
<b>XL-PCR</b>	022-Stx2e-5	AAGGAAATGGTCTCAAATGAAGTGTATATTTAAAG	stxA2e	242-263	PM	M21534
	022-Stx2e-6	TAAATAAGGTCCTCCGGCTCAGTTAAACTTCACCTG	stxB2e	<u>1460-1479</u>		
<b>stx2e-PCR &amp; XL-PCR</b>	Stx2e-1	AATAGTATACGGACAGCGAT	stxA2e	1072-1091	PM	M21534
	Stx2e-2	TCTGACATCTCTGGTTGACTC	stxB2e	<u>359-378</u>		
<b>pET-PCR &amp; XL-PCR</b>	pET-A	GTTATGCTAGTTAATTGCTCAGCGG	pET-24b(+)	64-87	N	pET-24b(+)
	pET-B	CCCGCGAAATTAATACGACTCAC		<u>314-336</u>		
<b>XL-PCR</b>	Franck-Stx2-1	GTGCCCTGTACTGGGTTTTTCTTC	stxA2	206-229	PM	L 11078
	Franck-Stx2-2	AGGGTCGATATCTCTGTCC		<u>304-323</u>		
<b>XL-PCR</b>	LIN-5'	GAACGAAAATAATTTATATGT	stxA1/stxA2	442-461	PM	M19473
	LIN-3'	TTTGATTGTTACAGTCAT	stxB1/stxB2	<u>1321-1338</u>		
<b>Mutations-PCR</b>	rStx2e <sub>E167Q</sub> -for	CACGTGCACAGCACAAGCC <b>TTT</b> TACGGTTCAGGC	stxA2e	552-583	PM	M21534
	rStx2e <sub>E167Q</sub> -rev	GCCTGAACCGTAA <b>AGC</b> TTGTGCTGTGACAGTG		<u>552-583</u>		
<b>Mutations-PCR</b>	rStx2e <sub>R170L</sub> -for	GTCACAGCACAAAGC <b>CTT</b> ACTGTTTCAGGCAAATAC	stxA2e	556-589	PM	M21534
	rStx2e <sub>R170L</sub> -rev	GTATTTGCCTGAAC <b>AGT</b> AAAGGCTTGTGCTGTGAC		<u>556-589</u>		

**Erläuterungen:** 1) Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der angegebenen Datenbank; die Positionen der Gegenstrangprimer sind unterstrichen;

**N** = Fa. Novagen, **PM** = EMBL/PubMed GenBank;

**fett** = Punktmutationsstellen.

### 3.8.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von PCR-Amplifikaten und Plasmiden erfolgte in horizontalen Flachbettgelelen mit 0,5 bis 2 %-iger Agarose, wobei elektrische Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand über 1 bis 2,5 h angelegt wurde. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Bei der Auftrennung von PCR-Produkten wurden die Gele vor dem Gießen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Der Probenauftrag erfolgte nach Mischen des PCR-Ansatzes im Verhältnis von 1:6 (v/v) mit 6x Loading-Puffer. Zur Bestimmung der molekularen Masse wurde der GeneRuler™ 100 bp DNS Ladder Plus mitgeführt. Zur Anfärbung der Plasmid-DNS wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in ein Ethidiumbromidbad (2 mg/l) eingelegt. Die Sichtbarmachung erfolgte durch UV-Licht.

### 3.8.5 DNS-Restriktion

**EcoRI, NdeI.** Für die Klonierung des *stx2e*-Gens aus dem *E. coli*-Stamm 412 in den pET-24b(+)-Vektor wurden die XL-PCR-Amplifikate und der pET-24b(+)-Vektor mit *EcoRI* und *NdeI* gemäß den Anweisungen der Hersteller restringiert. Der *EcoRI*-Restriktionsansatz (50 µl Gesamtvolumen) beinhaltete 10x *EcoRI*+ Puffer, 20 U *EcoRI* und 0,65 µg Insert oder 3 µg pET-24b(+)-Vektor-DNS. Die Inkubation erfolgte über 16 h bei 37 °C, dann wurde eine alkoholische Fällung mit 1/10 Vol Na-Acetat und 3 Vol 100 % Ethanol und anschließendem Waschen mit 70 % Ethanol durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte die Restriktion mit *NdeI* (50 µl Gesamtvolumen) unter folgender Zusammensetzung des Reaktionsansatzes: 2x One-Phor-All Buffer Plus, 20 U *NdeI* und 0,13 µg *EcoRI*-restringiertes Insert oder 0,6 µg *EcoRI*-restringierte pET-24b(+)-Vektor-DNS. Nach Inkubation (16 h, 37 °C) wurden die DNS-Fragmente erneut wie oben beschrieben gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen.

**HindIII.** Um die Einführung bzw. den Wegfall der Restriktionsschnittstelle für *HindIII* bei der *stxA2e*-Mutation zu überprüfen, wurde folgender Reaktionsansatz (20 µl Gesamtvolumen) verwendet: 1x Puffer R+, 15 µl PCR-Amplifikat aus der *stx2e*-PCR und 3 U *HindIII*. Die Testansätze wurden zentrifugiert (14.000 g, 5 sek), inkubiert (14-18 h, 37 °C), und anschließend 5 µl auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen.

**DpnI.** Zur Einführung einer gezielten Punktmutation erfolgte der Verdau der parenteralen Matrizen-Plasmid-DNS mittels *DpnI* (10 U/µl). Pro Ansatz wurden 10 µl *DpnI* hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in XL1-Blue superkompetente Zellen.

### 3.8.6 DNS-Klonierung in pET-24b(+)

Nach der *EcoRI*-, *NdeI*-Restriktion und einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Präzipitation wurden die DNS-Fragmente mit Hilfe einer Agarose-Gel-Extraktion aufgereinigt, bevor sie weiter verwendet wurden.

**Ligation.** Die sticky-end Ligation der restringierten DNS-Fragmente wurde in Ligationsansätzen mit 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Sie enthielten 1 x Ligationspuffer, 0,5 U T4-Ligase und 500 ng Gesamt-DNS in einem molaren Verhältnis von 1:4 von Insert:Vektor. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 4 °C.

**Kompetente *E. coli*-Zellen.** Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch chemische Behandlung der Zellen (HANAHAN, 1983). Die Bakterienzellen wurden für 16 h bei 37 °C angezüchtet. Diese Kultur wurde dann 1:100 (v/v) mit frischem LB-Medium verdünnt, bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 weiter inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (4.000 x g, 5 min, 4 °C) und in eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, um anschließend in TFB II-Puffer resuspendiert und à 200 µl bei -70 °C gelagert zu werden.

**Transformation.** Zur Transformation wurden die Zellsuspensionen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng (1 µl) bzw. 400 ng (4 µl) von dem Ligationsansatz vermischt und für 20 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeimpuls von 90 sek bei 42 °C wurde die Zellsuspension erneut für 90 sek auf Eis gelagert. Danach wurde sie mit 4 Vol LB-Medium versetzt und für 55 min bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin und Tetracyclin ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.8.7 Ortspezifische Mutagenese

Die Einführung von Mutationen erfolgte nach Anweisung des Herstellers mit dem Quick-Change® Site-Directed Mutagenesis Kit. Nach Durchführung der Mutations-PCR (siehe **Kapitel 3.8.3**) wurde die parenterale Matrizen-Plasmid-DNS mit dem im Kit gelieferten *DpnI* verdaut. Die Transformation in die im Kit enthaltenen superkompetenten XL1-Blue-Zellen wurde mittels Hitzeschock wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.8.8 DNS-Sequenzierung

Als Matrize für die Sequenzierungsreaktion wurden entweder PCR-Amplifikate oder Plasmid-Präparationen verwendet. Die Sequenzierung von Nukleotidsequenzen wurde bis Juni 2005 durch Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung Genomics, der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt, danach durch die Firma GENterprise GmbH, Mainz.

### 3.9 Proteinpräparative und -analytische Methoden

#### 3.9.1 Übersicht über die hergestellten Stx2e- und rStx2e-Präparate

Zur Überprüfung der Lokalisation und Menge von Shigatoxin 2e innerhalb der Bakterienzelle und in deren Umgebung wurden verschiedene Kulturbestandteile hergestellt. Die **Abbildung 4** gibt einen Überblick über die Kulturbestandteile und über ihre im Folgenden verwendeten Bezeichnungen.

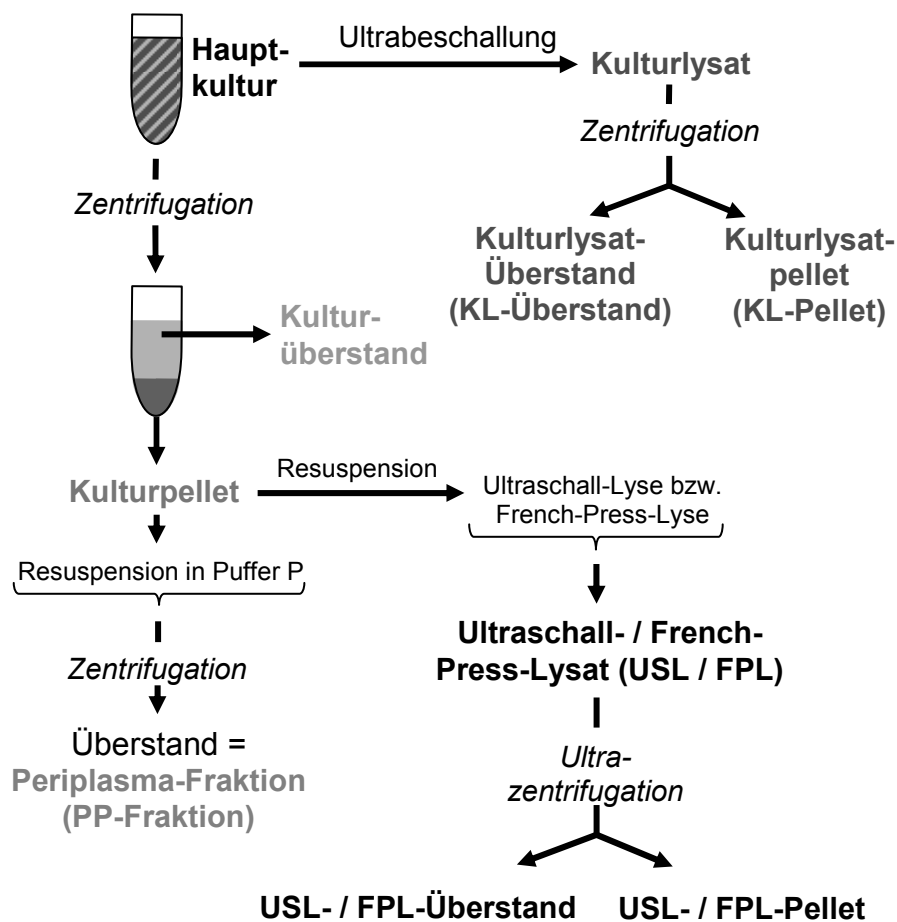
#### 3.9.2 Präparation von Shigatoxin 2e aus Bakterienzellysat

**French-Press-Lyse.** Nach Standardanzucht wurde die Bakteriensuspension 1:100 (v/v) in frisch hergestelltem, nicht autoklaviertem LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika verdünnt und bis zum Erreichen einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,45 bis 0,6 weiter inkubiert (30 °C bzw. 37 °C, 180 U/min). Die Ernte der Bakterien erfolgte nach 24 h Inkubation durch Zentrifugation (4 °C, 20 min, 8.000 x g). Nach Verwerfen des Kulturüberstandes wurde das Pellet in 50 ml eiskalter NaCl-Lösung resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in der French-Press bei einem Druck von 20.000 bar und einer Flussrate von ca. 3 ml/min. Nach Ultrazentrifugation des Lysates (4 °C, 2 h, 100.000 x g) wurde der Überstand gewonnen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

**Ultraschall-Lyse.** Die Bakterienzellen wurden wie zur French-Press-Lyse angezüchtet und inkubiert. Dann wurde zur Induktion der Proteinexpression IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM bzw. 1 mM der Kultur hinzugefügt und die Kultur für weitere 4 h bzw. 20-24 h aerob inkubiert (30 °C bzw. 37 °C, 180 U/min). Anschließend erfolgte die Toxingewinnung entweder als Ultraschalllysat-Überstand (USL-Überstand) oder als Kulturlysatüberstand (KL-Überstand). Zur Gewinnung des USL-Überstands wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (4 °C, 20 min, 4.500 x g) und der Überstand gewonnen. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 1/10 oder 1/4 des Ausgangsvolumens mit steriler NaCl-Lösung resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurde die Bakteriensuspension zweimal für 20 sek mit 20 sek Pause auf Eis mit Ultraschall behandelt (Stufe 4-5, Dauerbetrieb) und zentrifugiert (4 °C, 1 h, 2.880 x g). Danach wurde der Überstand gewonnen und ultrazentrifugiert (4 °C, 2 h, 100.000 x g). Abschließend wurde erneut Überstand gewonnen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Die Herstellung des KL-Überstandes erfolgte durch zweimalige Ultrabeschallung der Kultur. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min, 15.800 x g) und der dabei gewonnene Überstand wurde aliquotiert und bei -70 °C eingefroren.

Zur Herstellung von rStx2e-Chargen, die in Belastungsversuchen an Ferkeln eingesetzt werden sollten, wurden die entsprechenden Bakterien initial in Anwesenheit von 1 mM IPTG für 24 h angezüchtet (30 °C und 180 U/min). Die Zellyse und Zentrifugationsschritte erfolgten

wie bei der Herstellung von USL-Überstand. Hierbei wurden die Bakterien in 1/10 des Ausgangsvolumens steriler NaCl-Lösung resuspendiert.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Gewinnung von unterschiedlichen Bestandteilen aus *E. coli*-Kulturen

### 3.9.3 Präparation von Shigatoxin 2e aus dem Periplasma (Polymyxin-B-Methode)

Den nach Standardanzucht angezüchteten Bakterien wurde zur Induktion der Proteinexpression IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM bzw. 1 mM der Kultur hinzugefügt und die Kultur für weitere 4 h bzw. 24 h aerob inkubiert (30 °C bzw. 37 °C, 180 U/min). Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation (4 °C, 25 min, 4.500 x g). Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet von 100 ml Kultur in 1 ml Puffer P resuspendiert und auf Eis inkubiert (30 °C). Nach der Zentrifugation (10 min, 15.000 x g) wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### 3.9.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ nach der „Bicinchoninic-Acid-(BCA)“-Methode zur kolorimetrischen Bestimmung und Quantifizierung von Proteinen bestimmt. Die Testdurchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

#### 3.9.5 Tricine-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricine-SDS-PAGE)

Zur Kontrolle der Proteinexpression in rekombinanten *E. coli*-B-Stämmen wurden zu definierten Zeitpunkten während der Inkubation je 1 ml der induzierten Kultur abgenommen, die Keimdichte darin photometrisch bestimmt, und dann ein Aliquot der Kultur mit  $6 \times 10^7$  KbE abzentrifugiert (10 min, 15.800 x g). Das Pellet bzw. 20 µl des KL-Überstandes wurden mit 20 µl Tricine-Probenpuffer versetzt und mittels Tricine-SDS-PAGE untersucht (SCHÄGGER und VON JAGOW, 1987). Die Tricine-SDS-PAGE wurde in vertikalen, jeweils 1 mm dicken 4 %-igen Sammelgelen und 10 %-igen Trenngelen unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde eine Elektrophoresekammer für Proteingele verwendet. Die zwei Glasscheiben wurden mit den Abstandshaltern in den Gießstand eingespannt, anschließend das Trenngel blasenfrei einpipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30-40 min Inkubation bei RT zur Polymerisation der Gelmatrix, wurde das Isopropanol abgenommen, die Oberfläche des Trenngels zweimal mit *A. dest.* gespült und das Sammelgel darauf pipettiert. Der Probenkamm wurde zwischen den Scheiben platziert und für weitere 30 min Polymerisationszeit abgewartet. Danach wurden die Gele in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt, die Probenkämme entfernt und Kathodenpuffer in die innere Pufferkammer gefüllt. Vor dem Probenauftrag wurden die Proben für 10 min auf 100 °C erhitzt und dann in die mit Kathodenpuffer ausgespülten Geltaschen pipettiert. Nach dem Beladen des Gels wurde die äußere Pufferkammer mit Anodenpuffer gefüllt. Als Molekularmassenmarker wurde der „SeeBlue® Plus 2 Pre-Stained Standard“ verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 - 120 Volt für ca. 2 - 2,5 h über eine effektive Trennstrecke von 5,5 cm. Anschließend wurde das Gel entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel 30 min in Fixierlösung fixiert. Durch eine 30-minütige Inkubation bei RT (ggf. über Nacht) in Färbelösung und anschließendem Entfärben in 10 %-iger Essigsäure wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Zur Haltbarmachung wurden die Tricine-Polyacrylamidgele auf Filterpapier gelegt und unter Vakuum für 2 h bei 80 °C getrocknet.

#### 3.9.6 rStx2e-haltiges und rStx2e-freies-Challengematerial

Die für die Etablierung und Evaluierung des Ödemkrankheitsmodells verwendeten rStx2e-haltigen und rStx2e-freien-Chargen wurden, wie im **Kapitel 3.9.2** beschrieben, hergestellt. Es handelt sich um USL-Überstände der Stämme SB221 und 23. Insgesamt wurden zwei Chargen vom Stamm SB221 und drei Chargen vom Stamm 23 eingesetzt. Die Eigenschaften der verwendeten Chargen sind in **Tabelle 19** (Seite 82) zusammengefasst.

### 3.9.7 Impfantigene

Die Stx2e-Impfantigene wurden wie im **Kapitel 3.9.2** beschrieben hergestellt, nur dass zusätzlich zur chemischen Inaktivierung der rStx2e-Charge (rStx2e/01/05) bzw. den Placebo-Chargen (USL-Überstand aus Stamm 23 bzw. NaCl-Lösung) Glutaraldehyd bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) zugegeben und inkubiert wurde (4 °C, 24 h, 40 U/min). Als gentechnisch inaktiviertes Impfantigen (rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06) wurde der USL-Überstand einer 20 h-Kultur (ohne IPTG) vom Stamm SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 verwendet. Anschließend wurden sowohl das chemische als auch die gentechnisch inaktivierten Impfantigene auf Sterilität geprüft, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Die **Tabelle 13** gibt eine Übersicht über alle hergestellten Impfantigene dieser Arbeit.

Direkt vor der Applikation an die Ferkel wurden 1,4 ml Impfantigen mit 0,6 ml Adjuvans von Mitarbeitern der IDT Biologika GmbH vermischt. Eine Impfdosis besaß somit ein Gesamtvolumen von 2 ml. Alle verwendeten Adjuvantien sind in der **Tabelle 15** (siehe Seite 59) aufgelistet. In allen Immunisierungsversuchen (**D** bis **I**) wurde Aluminiumhydroxid als Adjuvans eingesetzt und in dem **Versuch I** zusätzlich die Montanide IMS2525, IMS1313, IMS251C, ISA27 und ISA35.

**Tabelle 13: Überblick über die verwendeten Impfantigene**

Impfantigen-Charge	Beschreibung der relevanten Inhaltsstoffe
rStx2e/01/05 <sub>GA</sub> rStx2e/06/05 <sub>GA</sub> rStx2e/02/06 <sub>GA</sub>	Ultraschalllysat-Überstand aus SB221 = rStx2e/01/05, mit 0,1 % Glutaraldehyd behandelt
rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	Ultraschalllysat-Überstand aus SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2
23/03/05 <sub>GA</sub> 23/06/05 <sub>GA</sub>	Ultraschalllysat-Überstand aus Stamm 23 [BLR(DE3), pET-24(b)] mit 0,1 % Glutaraldehyd behandelt
NaCl <sub>GA</sub>	NaCl-Lösung mit 0,1 % Glutaraldehyd behandelt

### 3.10 Serologische Methoden

#### 3.10.1 Immunoblot

Mittels Tricine-SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden unter Verwendung des Semi-Dry-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden auf die Graphitanode der Elektroblokkammer die auf die Größe des Gels zugeschnittenen Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran, in folgender Reihenfolge aufgebaut: vier in Anodenpuffer I und zwei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere, die in PBS getränkte Nitrozellulosemembran, das

in Anodenpuffer II äquilibrierte Tricine-SDS-PAGE-Gel und sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Nach Auflage der Graphit-Kathode erfolgte der Transfer ( $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Membran, RT, 90 min). Dann wurde die Nitrozellulosemembran in 1 x PBS eingelegt (RT, 16-18 h). Anschließend wurde die Membran in Blockierungsreagenz für 1 h bei RT inkubiert (1:10 [v/v] Blockstammlösung in *A. dest.* verdünnt). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween (jeweils 20 ml, 5 min, RT) wurde die Membran den entsprechenden Serumproben (verdünnt in PBS-Tween) für eine Stunde bei RT ausgesetzt. Nach einem wie oben durchgeführten Waschschrift wurde das entsprechende Konjugat zugegeben (RT, 1 h). Vor der Substratzugabe wurde die Membran dreimal in 1 x PBS (20 ml, 5 min, RT) gewaschen. Anschließend wurde die Substratlösung aufgetragen (10 ml, 30 min, RT) und die Enzymreaktion nach Sichtbarwerden der Banden durch zweimaliges Waschen mit *A. dest.* gestoppt (je 20 ml, 5 min, RT).

### **3.10.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay für Antikörper gegen Stx2e (ELISA<sub>rStx2e</sub>)**

Der Nachweis von *E. coli*-spezifischen IgG-Antikörpern in Serumproben wurde mit dem ELISA<sub>rStx2e</sub> durchgeführt, bei dem als Fangantigen die rStx2e-Chargen rStx2e/11/04 bzw. rStx2e/01/05 dienten. Als feste Phase dienten U-96-Polysorp-Mikrotiterplatten, die mit 400 ng Fangantigen (die Angabe bezieht sich auf den Proteingehalt der verwendeten rStx2e-Charge) / 100  $\mu\text{l}$  Coating-Puffer / Napf bzw. nur mit 100  $\mu\text{l}$  Coating-Puffer durch Inkubation für 1 h bei 37 °C beschichtet wurden. Es folgte das Blocken durch Inkubation mit 200  $\mu\text{l}$  PBS-Tween pro Napf (1 h, 37 °C). Anschließend wurden die Serumproben (1:100 in PBS-Tween, 100  $\mu\text{l}$  / Napf, 90 min, 37 °C) zugegeben. Alle Serumproben wurden im Dreifachansatz sowohl in mit Fangantigen beschichteten als auch in nur mit Coating-Puffer beschichteten Nöpfen getestet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch die Zugabe des Konjugats (1:3.000 verdünnt in PBS-Tween, Inkubation 1 h, 37 °C). Nach allen Schritten wurden die Platten jeweils dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS-Tween für 5 min bei RT auf einem Mikrotiterplattenschüttler gewaschen. Zuletzt folgten die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  / Napf ABTS-Substratlösung und anschließende Inkubation der Platten bei 37 °C bis das Positivkontrollserum die gewünschte optische Dichte von 1,3 - 1,4 erreichte. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Für den Null-Wert (Blank) wurden drei Nöpfe in den ersten vier Inkubationsschritten immer nur mit 100  $\mu\text{l}$  PBS-Tween / Napf belegt. Dann wurde die ABTS-Substratlösung zugegeben. Als interne Referenzen wurden bei der Untersuchung von Schweineserumproben auf jeder Platte mitgeführt: eine Negativkontrolle (R-1382/00, ein Serum das in Vorversuchen einen niedrigen Antikörpertiter gezeigt hatte), sowie eine Positivkontrolle, bei der es sich um ein hochtitriges Serumgemisch {Serum IV56 und Serum IV142, von zwei an Ödemkrankheit erkrankten Schweinen [Verhältnis 1:1 (v/v)]} handelte.



Der Serum-IgG-Titer [Standard %] einer Serumprobe wurde schrittweise wie folgt errechnet:

1. Blankabzug zur Normalisierung aller OD-Messwerte (OD) einer Mikrotiterplatte:  

$$OD_N = \text{OD-Messwert} - \text{Blank-OD-Messwert}$$
2. Arithmetischer Mittelwert ( $OD_{NM}$ ) der dreifach ermittelten, normalisierten OD-Messwerte ( $OD_N$ ):  

$$OD_{NM} = (OD_{N1} + OD_{N2} + OD_{N3}) / 3$$
3. Interassay-Standardisierung unter Verwendung des  $OD_{NM}$  der Positivkontrolle:  

$$OD_{NMS} = OD_{NM} \times (1,3 / OD_{NMPosKo})$$
4. Abzug der Hintergrundbindung, um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Mikrotiterplatte zu eliminieren:  

$$OD_{NMSH} = OD_{NMS+Ag} - OD_{NMS-Ag}$$
5. Reduktion des Messwertes um den halben Messwert für das Negativkontrollserum:  

$$OD_{NMSHN} = OD_{NMSH} - (OD_{NMSHNegKo} \times 0,5)$$
6. Angabe des Titers als Anteil [%] von der  $OD_{NMSHN}$  des Positivkontrollserums:  

$$\text{Serum-IgG-Titer [Std. \%]} = (OD_{NMSHN} / OD_{NMSHNPosKo}) \times 100$$

Ergebnisse, die mit dem ELISA<sub>rStx2e</sub> erzielt wurden, wurden nicht als "positiv", "fraglich" und "negativ" befundet.

### 3.10.3 RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

Der semiquantitative Nachweis von Stx2e wurde mit dem kommerziellen Sandwich-ELISA (RIDASCREEN® Verotoxin ELISA) durch Ermittlung der halbmaximalen optischen Dichte ( $OD_{50}/ml$ ) nach dem Prinzip der Endpunkttitration durchgeführt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Gemäß den Angaben des Herstellers wurde der Cut-Off für jeden RIDASCREEN® Verotoxin ELISA wie folgt berechnet:

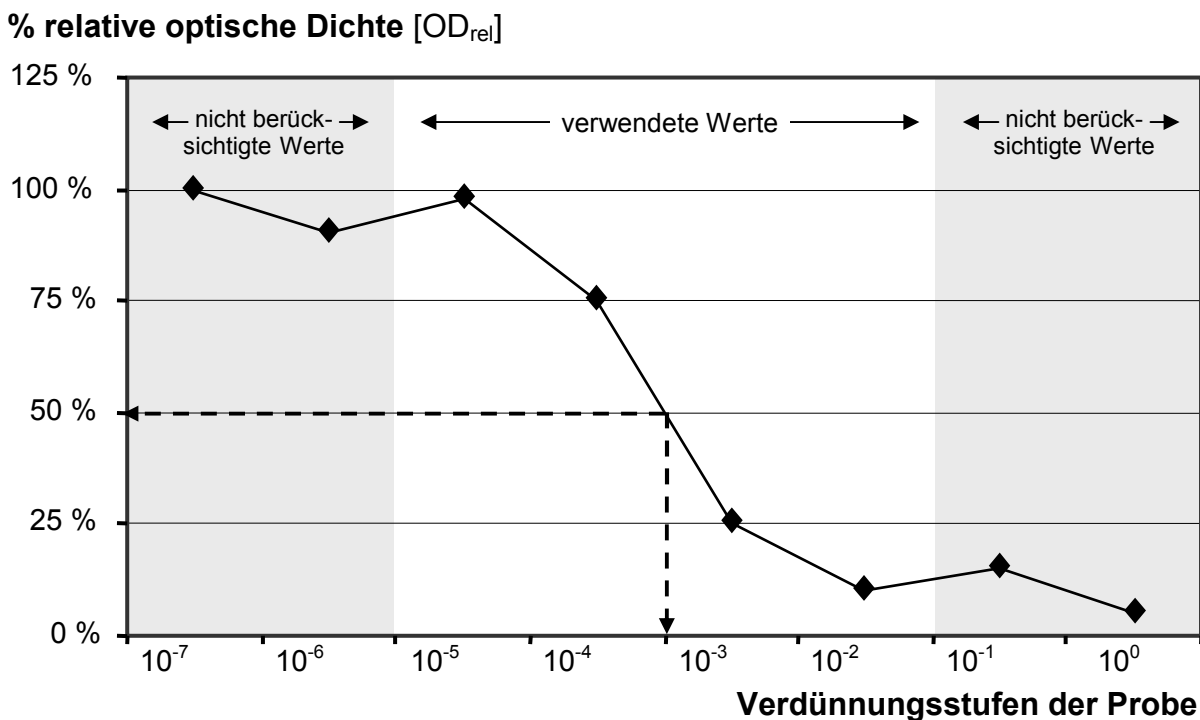
$$\text{Cut-Off} = OD_{\text{abs}} \text{ der Negativkontrolle} + 0,1$$

Proben mit einem  $OD_{\text{abs}}$ -Wert über dem Cut-Off wurden als positiv beurteilt, dagegen Proben, die unter dem errechneten Cut-Off lagen, als negativ.

Die Berechnung der halbmaximalen (50 %) optischen Dichte pro Milliliter ( $OD_{50}/ml$ ) erfolgte nach der von GENTRY und DALRYMPLE (1980) beschriebenen Methode (GENTRY und DALRYMPLE, 1980). Dazu wurden die ermittelten  $OD_{\text{abs}}$ -Werte (absolute optische Dichte der Probe  $xy = \text{optische Dichte}_{450 \text{ nm}} - \text{optische Dichte}_{620 \text{ nm}}$ ) einer logit-log-Transformation unterzogen, um eine Linearisierung des mittleren Abschnitts der Kurve zu erreichen (Berechnung mit Microsoft® Excel 2003). Als Untergrenze (UG) wurde die  $OD_{\text{abs}}$  des kleinsten ermittelten Wertes minus 0,001 und als Obergrenze (OG) die  $OD_{\text{abs}}$  des höchsten ermittelten Wertes plus 0,001 eingesetzt. Die Formel der logit-log-Transformation lautete wie folgt:

$$\text{logit-log-OD}_{\text{abs}} = \log_{10} [(OD_{\text{abs}} - UG) / (OG - OD_{\text{abs}})].$$

Im nächsten Schritt wurde derjenige Kurvenabschnitt ermittelt, bei dem die optische Dichte bei 50 % lag. Zwei Messwerte oberhalb und zwei Messwerte unterhalb der 50 %-igen optischen Dichte, wurden dann zur Berechnung der  $OD_{50}/\text{ml}$  herangezogen (schematisch in der **Abbildung 5** dargestellt). Es wurde nur dann ein Messwert zur Berechnung der Toxinkonzentration eingesetzt, wenn die Kurve vor dem Beenden des oberen Plateaus abfiel oder wenn die Kurve nach dem Erreichen des unteren Plateaus anstieg. Mittels Microsoft® Excel 2003 wurden anschließend die Steigung „m“ ( $m = \text{INDEX}(\text{RGP}(\text{A:B};\text{C:D});1)$ ) und der Y-Achsenabschnitt „b“ ( $b = \text{INDEX}(\text{RGP}(\text{A:B};\text{C:D});2)$ ) des entsprechenden Kurvenabschnitts berechnet. Dabei war A die kleinste gültige  $\text{logit-log-OD}_{\text{abs}}$ , B die größte gültige  $\text{logit-log-OD}_{\text{abs}}$ , C die  $\log_{10}$ -Verdünnungsstufe der kleinsten gültigen  $\text{logit-log-OD}_{\text{abs}}$  und D die  $\log_{10}$ -Verdünnungsstufe der größten gültigen  $\text{logit-log-OD}_{\text{abs}}$ .



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung zur Auswahl der gültigen Werte für die Berechnung der Stx2e-Konzentration einer Probe [ $OD_{50}/\text{ml}$ ] im RIDASCREEN® Verotoxin ELISA.

Mit diesen beiden Werten wurde dann die Toxinkonzentration in  $OD_{50}/\text{Vertiefung}$  berechnet [ $OD_{50}/\text{Vertiefung} = 10$  bzw.  $4^{(b/m)}$ ], um nachfolgend dann durch Multiplikation des errechneten Wertes mit 10 die Toxinkonzentration der Probe in  $OD_{50}/\text{ml}$  zu ermitteln.

### 3.10.4 SIFIN-Stx2e-ELISA

Der SIFIN-Stx2e-ELISA wurde zum Nachweis und zur Quantifizierung von Stx2e und rStx2e eingesetzt. Nach Beschichtung einer U-96-Polysorp-Mikrotiterplatte mit 800 ng Fangantikörper „VT 136/8-H4“ / Napf in Coating-Puffer (Inkubation RT, 16-18 h, feuchte Kammer) und dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen (100 µl Blockpuffer/Napf, 1 h, 37 °C) wurden die Näpfe im Ein- oder Zweifachansatz mit dem Probenmaterial belegt (100 µl/Napf, RT, 1 h). Dann erfolgte die Zugabe von 110 ng des Detektions-Antikörpers „VT 135/6-B9“ (1:1.500 in PBS-Tween, 100 µl/Napf, RT, 1 h). Zwischen allen Schritten wurden die Platten jeweils fünfmal mit 300 µl PBS-Tween gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch Zugabe von POD-Substrat (TMB-Fertigreagenz, 100 µl/Napf, RT, lichtgeschützt, 15 min). Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 100 µl/Napf gestoppt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte in einem Plattenphotometer bei einer Testwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Als Positivkontrollen wurden auf jeder Platte im Doppelansatz mitgeführt: rStx2e/01/05 (1:8.192, 1:16.384, 1:32.768 verdünnt in PBS-Tween) und rStx2e/03/05 (1:1.024, 1:2.048, 1:4.096 und 1:8.192 verdünnt in PBS-Tween). Als weitere Kontrollen wurde eine Substrat-Kontrolle (anstelle der Probe und des POD-Substrats wurden 100 µl PBS-Tween pipettiert) und eine Detektions-Antikörper-Kontrolle (anstelle der Probe wurden 100 µl PBS-Tween pipettiert) eingesetzt.

Die Stx2e-Konzentration in einer Probe [OD %<sub>rStx2e</sub>] wurde schrittweise wie folgt errechnet:

1. Normalisierung aller OD-Messwerte (OD) einer Mikrotiterplatte:

$$OD_N = OD_{450 \text{ nm}} - OD_{620 \text{ nm}}$$

2. Arithmetischer Mittelwert (OD<sub>NM</sub>) der dreifach ermittelten, normalisierten OD-Messwerte:

$$OD_{NM} = (OD_{N1} + OD_{N2} + OD_{N3}) / 3$$

3. Angabe des Toxintiters als Anteil [%] von der OD<sub>NM</sub> der Toxincharge rStx2e/03/05

[OD %<sub>rStx2e</sub>], Verdünnungsstufe 1:2.048:

$$\text{Stx2e-Konzentration [OD\%}_{r\text{Stx2e}}] = [(OD_N - OD_{N\text{SubsKo}}) / (OD_{N\text{rStx2e/03/05,1:2048}} - OD_{N\text{SubsKo}})]$$

Die Befundung der Titer im SIFIN-Stx2e-ELISA erfolgte anhand der in **Tabelle 14** gelisteten Grenzwerte.

**Tabelle 14: Befunderhebung bei den im SIFIN-Stx2e-ELISA getesteten STEC2e-Isolaten**

Beurteilung	Definition des Cut-Off	Toxintiter [OD % <sub>rStx2e</sub> ]	
		Kulturüberstand	Lysat-Überstand
<b>Negativ</b>	≤ MW + 1 SD	OD % <sub>rStx2e</sub> ≤ 31,59	OD % <sub>rStx2e</sub> ≤ 18,13
<b>Fraglich</b>	> MW + 1 SD bis ≤ MW + 2 SD	31,59 < OD % <sub>rStx2e</sub> ≤ 44,70	18,13 < OD % <sub>rStx2e</sub> ≤ 25,23
<b>Einfach positiv</b>	> MW + 2 SD bis ≤ MW + 3 SD	44,70 < OD % <sub>rStx2e</sub> ≤ 57,81	25,23 < OD % <sub>rStx2e</sub> ≤ 32,33
<b>Zweifach positiv</b>	> MW + 3 SD	57,81 < OD % <sub>rStx2e</sub>	32,33 < OD % <sub>rStx2e</sub>

**Erläuterung:** MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung.

### 3.11 Zellkulturmethoden

#### 3.11.1 Kultivierung von Verozellen

Die Verozellen (ATCC Nr. CRL-1587; LGC-Promochem GmbH, Wesel) wurden in Plastik-Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>) für 72 - 96 h bei 37 °C, 5 Vol. % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde steriles RPMI-Medium verwendet. Zum Splitten der Zellen wurden Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit HEPES-Puffer entfernt. Nach Zugabe von 0,25 %-iger Trypsinlösung und EDTA-Puffer erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die dadurch abgelösten Zellen wurden zentrifugiert (20 °C, 7 min, 202 x g) und das Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert. Ein Aliquot (20 µl) wurde 1:10 (v:v) mit Trypanblau-Lösung versetzt. Die Bestimmung der Anzahl lebender Verozellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die für den jeweiligen Test erforderliche Zelldichte wurde anschließend durch Zugabe von RPMI-Medium eingestellt.

#### 3.11.2 Verozell-Zytotoxizitätstest

Der Gehalt von aktivem Stx2e in Lösungen und Suspensionen wurde durch Ermittlung der für Verozellen zu 50 % zytotoxischen Dosis (CD<sub>50</sub>/ml) mittels Endpunkttitration bestimmt. Der Test wurde in einem Dreifachansatz in F-96-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die fragliche Stx2e-haltige Lösung wurde in steriler NaCl-Lösung in log<sub>10</sub>-Verdünnungsstufen (50 µl / Vertiefung) titriert. Als Positivkontrolle diente 1 %-ige SDS-Lösung und als Negativkontrolle sterile NaCl-Lösung (jeweils 50 µl / Vertiefung). Als Referenzcharge wurde (ab April 2005) die Charge rStx2e/03/05 (über 9 log<sub>10</sub>-Verdünnungsstufen) mitgeführt. Im Anschluss wurden jeweils 4 x 10<sup>4</sup> Verozellen und RPMI-Medium / 100 µl / Vertiefung pipetiert. Bei jedem Test wurden die äußeren Vertiefungen der Platten jeweils mit 100 µl steriler NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz beschickt. Dann wurden die Platten für 96 h bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 Vol. % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Ablesung erfolgte zum einen durch die mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie und zum anderen mit Hilfe des kolorimetrischen MTT-Tests in der Modifikation von TADA und Kollegen (TADA et al., 1986). Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass der den einzelnen Reaktionsansätzen zugesetzte Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in die Zellen eindringt, sein Tetrazoliumring durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen wird (Bildung von Formazan), und dadurch die Farbe von schwach gelb nach dunkelblau umschlägt. Mit dem Detergens SDS lysiert man nun die Zellen und setzt das gebildete Formazan frei, dessen Konzentration dann photometrisch gemessen werden kann. Bei der Durchführung dieses Tests wurde am Ende der Inkubationszeit (96 h) 25 µl der MTT-Lösung jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte zugegeben und die Platte unter Schwenken (37 °C, 4 h, 136 U/min) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde in jede Vertiefung 100 µl 10 %-ige SDS-Lösung pipettiert und die Platte für weitere 18-20 h bei gleichen Bedingungen (37 °C, 136 U/min) inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Reaktionsansätze mit dem Plattenphotometer durch Differenzmessung bei der Testwellenlänge  $OD_{540\text{ nm}}$  und der Referenzwellenlänge  $OD_{690\text{ nm}}$  ( $OD = OD_{540\text{ nm}} - OD_{690\text{ nm}}$ ). Die absolute optische Dichte ( $OD_{\text{abs}}$ ) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze:

$$OD_{\text{abs}} = [OD_{\text{Ansatz 1}} + OD_{\text{Ansatz 2}} + OD_{\text{Ansatz 3}}] / 3.$$

Der Test wurde anhand der Stoffwechselaktivitäten in der Positiv- ( $OD_{\text{pos}}$ ) und der Negativkontrolle ( $OD_{\text{neg}}$ ) in der jeweiligen Mikrotiterplatte normalisiert. Dabei diene die folgende Formel zur Ermittlung der relativen optischen Dichte:

$$OD_{\text{rel}} [\text{in } \%] = [(OD_{\text{abs}} - OD_{\text{pos}}) / (OD_{\text{neg}} - OD_{\text{pos}})] \times 100.$$

Die Berechnung der verozytotoxischen Dosis 50 % pro Milliliter ( $CD_{50}/\text{ml}$ ) erfolgte wie in 3.10.3 für den RIDASCREEN® Verotoxin ELISA beschrieben, nach der Methode von GENTRY und DARYMPLE (1980). Als Untergrenze (UG) wurde hier jedoch die  $OD_{\text{abs}}$  der Positivkontrolle ( $OD_{\text{pos}}$ ) eingesetzt, sofern alle  $OD_{\text{rel}}$ -Werte der jeweiligen Verdünnungsreihe  $\geq 0\%$  lagen. Ansonsten wurde der kleinste  $OD_{\text{abs}}$ -Wert minus 0,001 als Untergrenze verwendet. Als Obergrenze (OG) wurde die  $OD_{\text{abs}}$  der Negativkontrolle ( $OD_{\text{neg}}$ ) eingesetzt, sofern alle  $OD_{\text{rel}}$ -Werte der jeweiligen Verdünnungsreihe  $\leq 100\%$  waren, sonst wurde ebenfalls der größte  $OD_{\text{abs}}$ -Wert plus 0,001 als Obergrenze verwendet.

Nachdem die logit-log-Transformation durchgeführt und derjenige Kurvenabschnitt ermittelt worden war, bei dem 50 % relative Zellaktivität vorlag, erfolgte die Berechnung der  $CD_{50}$ -Stx2e-Konzentration je Testansatz [ $CD_{50}/\text{Vertiefung} = 10^{(b/m)}$ ], um nachfolgend dann durch Multiplikation des errechneten Wertes mit 20 die  $CD_{50}$ -Stx2e-Konzentration je Milliliter zu ermitteln. Bei der folgenden Dokumentation der Ergebnisse werden alle Stx2e-Konzentrationen stets in  $CD_{50}/\text{ml}$  für Verozellen angegeben.

### 3.11.3 Stx2e-Neutralisationstest (Stx2e-NT-Test)

Serumproben wurden in einem modifizierten Verozell-Zytotoxizitätstest auf Stx2e-neutralisierende Antikörper untersucht. Der Test basierte auf dem Prinzip der Endpunkttitration, bei dem die Serumproben im Dreifachansatz in  $\log_2$ -Verdünnungsstufen titriert wurden. Vor dem Test wurden die Serumproben durch Inkubation für 30 min bei 56 °C inaktiviert und mit RPMI-Medium 1:20 (v/v) verdünnt. Dann wurden die Proben mit einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l pro Vertiefung auf 96-F-Mikrotiterplatten im Neutralisationstest eingesetzt und in  $\log_2$ -Stufen verdünnt. Jede Probe wurde jeweils im Dreifachansatz sowohl mit nativem Stx2e der Charge 299/08/04 (4  $CD_{50}$ /Vertiefung in RPMI-Medium; 50  $\mu$ l/Vertiefung) als auch ohne Stx2e (Positivkontrolle 1; RPMI-Medium; 50  $\mu$ l/Vertiefung) geprüft. Bei der Charge 299/08/04 handelt es sich um ein French-Press-Lysat-Überstand von dem *E. coli*-Feldstamm „299“ (93.000  $CD_{50}$ /ml, 860  $OD_{50}$ /ml). Als Positivkontrolle 2 wurde der monoklonale Antikörper BC5BB12 (50  $\mu$ l/Vertiefung; 1:100 [v/v] in RPMI-Medium vorverdünnt) oder die Serumprobe R-2657/02 (50  $\mu$ l/Vertiefung; 1:20 [v/v] in RPMI-Medium vorverdünnt) verwendet. Als Negativkontrollen dienten (1) der monoklonale Antikörper 1E8 (unverdünnt), (2) steriles RPMI-Medium und (3) 1 %-ige SDS-Lösung (jeweils 50  $\mu$ l/Vertiefung). Dann wurde die 96-F-Mikrotiterplatte für 1 h bei RT inkubiert, bevor die Verozellen (4 x 10<sup>4</sup> Verozellen in 50  $\mu$ l RPMI-Medium/Vertiefung) zugegeben wurden und der Test für 96 h bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 Vol. % CO<sub>2</sub> inkubiert wurde.

Die Ablesung des Stx2e-Neutralisationstests erfolgte ebenfalls wie beim Verozell-Zytotoxizitätstest zum einen durch die mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie und zum anderen mit Hilfe des kolorimetrischen MTT-Tests. Hierfür wurden nach 96 h Inkubation 25  $\mu$ l der MTT-Lösung jeder Vertiefung zugegeben und die Platte unter Schwenken (37 °C, 4 h, 136 U/min) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde in jede Vertiefung 100  $\mu$ l 10 %-ige SDS-Lösung pipettiert und die Platte über weitere 18-20 h bei gleichen Bedingungen (37 °C, 136 U/min) inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit dem Plattenphotometer durch Differenzmessung bei der Testwellenlänge  $OD_{540\text{ nm}}$  und der Referenzwellenlänge  $OD_{690\text{ nm}}$  ( $OD = OD_{540\text{ nm}} - OD_{690\text{ nm}}$ ). Die absolute optische Dichte ( $OD_{\text{abs}}$ ) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze:

$$OD_{\text{abs}} = [OD_{\text{Ansatz 1}} + OD_{\text{Ansatz 2}} + OD_{\text{Ansatz 3}}] / 3.$$

Diese Messwerte wurden dann anhand der Positivkontrolle 1 (Probe ohne Stx2e) und Negativkontrolle 3 (Ansatz mit 1 %-iger SDS-Lösung) in der jeweiligen Mikrotiterplatte normalisiert. Dabei diente die folgende Formel zur Ermittlung der relativen optischen Dichte:

$$OD_{\text{rel}} [\text{OD } \%] = [(OD_{\text{abs Probe mit Stx2e}} - OD_{\text{abs SDS}}) / (OD_{\text{abs Probe ohne Stx2e}} - OD_{\text{abs SDS}})] \times 100.$$

Der Stx2e-Neutralisationstest wurde dann für auswertbar befunden, wenn die  $OD_{rel}$  der Negativkontrolle 2 (steriles RPMI-Medium) unter 40 OD % lag.

Alle Werte wurden einer Interassay-Standardisierung unterzogen, in dem die Werte auf die  $OD_{rel}$  der Negativkontrolle 2 und der Positivkontrolle R-2657/02 wie folgt normalisiert wurden:

1. Abzug der Negativkontrolle 2:  $OD_{relN} [OD \%] = OD_{rel} - OD_{rel\ Medium}$

2. Normalisierung anhand der Positivkontrolle R-2657/02:

$$OD_{relNP} [OD \%] = \frac{OD_{relN}}{OD_{relN\ R-2657/02}} \times 100$$

Als letzter Schritt folgte für die quantitative Angabe der Stx2e-neutralisierenden Antikörper eine Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (VF) der Serumprobe im Test:

3. Titer an Stx2e-nAk [ $Std_{NT} \%$ ] =  $OD_{relNP} \times VF$ .

Als Verdünnungsfaktor wurde diejenige größtmögliche Verdünnungsstufe der Serumprobe herangezogen, in der die  $OD_{rel}$  größer oder gleich 50 OD % lag. Bei Serumproben, die bereits in der niedrigsten getesteten Verdünnung eine  $OD_{rel}$  von 50 OD % oder weniger besaßen, wurde der  $OD_{relNP}$ -Wert mit 2 multipliziert. Anhand dieser Berechnung wurde eine Serumprobe dann als positiv beurteilt, wenn die Stx2e-nAK einen Titer von mehr oder gleich als 10  $Std_{NT} \%$  erreichten, oder negativ, wenn die Titer kleiner 10  $Std_{NT} \%$  waren.

### 3.12 Tierexperimentelle Methoden

#### 3.12.1 Prinzip des etablierten Ödemkrankheitsmodells

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden von IDT Biologika GmbH in Rodleben durchgeführt. Zur Modellierung der Ödemkrankheit wurden Läufer Schweine im Alter von sechs Wochen mit rekombinantem Stx2e intravenös inokuliert. Insgesamt wurden drei Intoxikationsversuche durchgeführt: zwei mit der Charge rStx2e/11/04 (**Tierversuche A** und **B**) und einer mit der Charge rStx2e/01/05 (**Tierversuch C**). Als rStx2e-freies *E. coli*-Lysat dienten die Chargen 23/11/04 (**Versuch A**), 23/02/05 (**Versuch B**) und 23/03/05 (**Versuch C**). Die Ferkel wurden mit Stx2e in verschiedenen Dosierungen (**Tabelle 15**) intravenös inokuliert. In der Woche nach der Intoxikation wurden bei den Ferkeln täglich der Allgemeinzustand, Futterverbrauch, Ödembildung, Stimmenveränderungen und das Gewicht kontrolliert und die erhobenen Daten protokolliert. In der 7. Lebenswoche wurden die Ferkel unter Blutentzug mittels intravenöser Applikation von T61<sup>®</sup> getötet und einer pathologisch-anatomischen sowie -histologischen Beurteilung der Organe unterzogen. Die in der 5. und 7. Lebenswoche entnommenen Serumproben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Die **Versuche A** bis **C** wurden beim Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt (Ref. 203, Willy-Lohmann Str. 7, 06114 Halle) unter der Nummer IDT A05/2004 von IDT Biologika GmbH angezeigt und die **Versuche D** bis **I** unter der Nummer IDT A03/2004.

### 3.12.2 Tierhaltung

Die Ferkel wurden während des Versuchszeitraumes in Gruppen gehalten, mit einem Ferkelstarterfutter ohne antibiotisch wirksame Leistungsförderer gefüttert und über Tränkeanlagen *ad libitum* mit Wasser versorgt. Die Raumtemperatur im Stall betrug  $21 \pm 2$  °C und die Luftfeuchtigkeit 40 - 65 Vol. %.

### 3.12.3 Impfungen

Es wurden insgesamt sechs Immunisierungsversuche (**Versuche D bis I**) durchgeführt. Die Ferkel wurden jeweils am 9. Lebenstag und am 28. Lebenstag geimpft. Eine Impfdosis setzte sich aus 1,4 ml Impfantigen und 0,6 ml Adjuvans zusammen und wurde intramuskulär verabreicht. Mit 35 Tagen wurden die Ferkel abgesetzt. In allen Immunisierungsversuchen wurde chemisch inaktiviertes rStx2e als Impfantigen eingesetzt und in den Impfversuchen **H** und **I** zusätzlich gentechnisch inaktiviertes rStx2e-Impfantigen.

### 3.12.4 Intravenöse Inokulation von rStx2e

In allen sechs Immunisierungsversuchen erfolgte die intravenöse Inokulation mit der rekombinanten rStx2e/01/05-Charge am 37./38. Lebenstag. Zwei Wochen später wurden die Ferkel getötet und sezirt bzw. aus Tierschutzgründen auch schon vorher euthanasiert. Während des gesamten Versuchs wurden die gleichen Parameter wie beim Intoxikationsversuch erhoben und protokolliert. Die Serumproben, die unmittelbar vor der 1. bzw. 2. Impfung sowie vor der rStx2e/01/05-Belastung und am Tag der Tötung entnommen worden waren, wurden archiviert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.12.5 Parameter bei der Versuchsauswertung

Die aus den Ferkelversuchen entnommenen Serumproben wurden einerseits im Stx2e-Neutralisationstest auf Stx2e-neutralisierende Antikörper und im ELISA<sub>rStx2e</sub> auf *E. coli*-spezifische IgG-Antikörper untersucht. Als weiterer Parameter zur Auswertung der Versuche wurde die Mortalität in der Versuchsgruppe herangezogen.

### 3.12.6 Übersicht über die durchgeführten Tierversuche

Die **Tabelle 15** gibt einen Überblick über alle neun durchgeführten Ferkelversuche die in der Zeit von November 2004 bis Juni 2006 durchgeführt worden sind. Die Anzahl der Versuchstiere betrug 388, wovon 94 Ferkel im Ödemkrankheitsmodell (**Tierversuche A, B und C**) und 294 Ferkel in den Immunisierungsversuchen (**Tierversuche D, E, F, G, H und I**) eingesetzt wurden.



Tabelle 15: Überblick über die durchgeführten Tierversuche

Tierversuch Nr.	Gruppen-Nr.	Anzahl Ferkel	Impfstoff		Challengematerial		
			Impfantigen-Charge	Dosis <sup>1)</sup>	Adjuvans	Charge	Dosis [CD <sub>50</sub> ] <sup>1)</sup>
<b>A</b>							
1	4	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/11/04	1,50 Mio	
2	4	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/11/04	0,75 Mio	
3	5	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/11/04	0,25 Mio	
4	4	keine Impfung	entfällt	entfällt	23/11/04	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	
5	4	keine Impfung	entfällt	entfällt	23/11/04	0,75 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	
6	5	keine Impfung	entfällt	entfällt	23/11/04	0,25 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	
<b>B</b>							
1	9	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/11/04	1,50 Mio	
2	8	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/11/04	1,00 Mio	
3	9	keine Impfung	entfällt	entfällt	23/02/05	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	
<b>C</b>							
1	14	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	1,50 Mio	
2	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	1,00 Mio	
3 <sup>2)</sup>	7	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
4	11	keine Impfung	entfällt	entfällt	23/03/05	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	
<b>D</b>							
1	10	rStx2e/01/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
2	10	rStx2e/01/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,50 Mio	
3	10	„E. coli-Placebo“ 23/03/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
4	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
5	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,50 Mio	
6	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	kein Challenge	entfällt	
<b>E</b>							
1a	10	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
1b	10	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,75 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
1c	10	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,15 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
2	10	„NaCl-Placebo“ NaCl <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
3	10	„E. coli-Placebo“ 23/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
4	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,75 Mio	
5	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	kein Challenge	entfällt	

Fortsetzung der Tabelle 15 und Erläuterungen auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 15

Tierversuch Nr.	Gruppen-Nr.	Anzahl Ferkel	Impfstoff		Challengematerial		
			Impfantigen-Charge	Dosis <sup>1)</sup>	Adjuvans	Charge	Dosis [CD <sub>50</sub> ] <sup>1)</sup>
F	1	7	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	5	8	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	6	8	keine Impfung	entfällt	entfällt	kein Challenge	entfällt
G	1	8	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,15 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	2	7	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	15.000 CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	3	8	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	1.500 CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	4	8	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,75 Mio
H	1	10	rStx2e/02/06 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	2	10	rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	3	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	kein Challenge	entfällt
	4	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,75 Mio
I	1	10	rStx2e/02/06 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	2	10	rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	IMS2525	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	3	10	rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	IMS1313	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	4	10	rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	IMS251C	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	5	10	rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	ISA27	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	6	10	rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	ISA35	rStx2e/01/05	0,75 Mio
	7	10	keine Impfung	entfällt	entfällt	rStx2e/01/05	0,75 Mio

**Erläuterungen:** 1) **CD<sub>50</sub>-Äquival.** = Das verabreichte Impfantigen- und Challenge-Material der Placebo-Chargen entsprach im Gesamtproteingehalt der Charge rStx2e/01/05.

2) **Versuch C, Gruppe 3** = Ferkel aus Gruppe 4 (rStx2e-freies *E. coli*-Lysat-behandelte Tiere), welche mit einer CD<sub>50</sub>-Dosis von 0,75 Mio rStx2e/01/05 inokuliert wurden.

**Al<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>** = Aluminiumhydroxid;

Die zytotoxische Stx2e-Dosis [CD<sub>50</sub>] wurde im Verozell-Zytotoxizitätstest ermittelt.

Die Stx2e-Dosis [OD<sub>50</sub>] wurde im RIDASCREEN® Verotoxin ELISA ermittelt.

Eine Impfantigendosis von 15.750 OD<sub>50</sub> entsprach einer Stx2e-Dosis von 1,5 Mio CD<sub>50</sub> der Charge rStx2e/01/05.

### 3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm "Microsoft® Office Excel 2003" (Version 11.03.1897.00) und „SPSS for Windows“ (Version 15.0.1, Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.) durchgeführt. Die Signifikanzschwellen sind **Tabelle 16** aufgeführt.

**Tabelle 16: In der vorliegenden Arbeit verwendete Signifikanzschwellen**

<b>Signifikanz</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Abkürzung</b>
hoch signifikant	$p \leq 0,001$	***
signifikant	$0,001 < p \leq 0,01$	**
schwach signifikant	$0,01 < p \leq 0,05$	*
nicht signifikant	$p > 0,05$	n. s.

### 3.14 Bilddokumentation

Zur Dokumentation von Ergebnissen wurden Elektropherogramme und Immunoblots mit dem Bilddokumentationssystem Modell E.A.S.Y. 429K (Fa. Herolab, Wiesloch) aufgenommen. Die molekularen Massen wurde an digitalisierten Bildern (TIFF-Format) mit Hilfe des Programms „Easy Win 32“ (Version 1.00.70 15.12.95, Fa. Herolab, Wiesloch) bestimmt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Rekombinante Herstellung von Shigatoxin 2e

#### 4.1.1 Klonierung des *stx2e*-Gens in den Expressionsvektor pET-24b(+)

Zur Herstellung von rStx2e wurden die Shigatoxingene *stxA2e* und *stxB2e* aus dem *E. coli*-Stamm „412“ mittels XL-PCR amplifiziert. Die hierfür eingesetzten Oligonukleotide wiesen vor dem Start-Codon von *stxA2e* und nach dem Stop-Codon von *stxB2e* Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Eco*RI auf, anhand derer eine gerichtete Ligation in den mit *Nde*I und *Eco*RI geschnittenen Plasmidvektor pET-24b(+) erfolgte. Nach Transformation des Plasmidkonstruktes in den *E. coli*-B-Stamm BLR(DE3) erfolgte eine erste Selektion von Transformanten anhand der Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin und Tetracyclin. Von den so erhaltenen 240 Transformanten wurden zwei Transformanten (SB200 und SB221) für eine nähere Charakterisierung ausgewählt.

#### 4.1.2 Genetische Identitätsprüfung der Transformanten

Mit Hilfe der Insert-umgreifenden pET-PCR wurde das Vorhandensein des gewünschten Vektorplasmids und die Größe des inserierten DNS-Fragments untersucht (**Abbildung 6**). Aus dem SB200 und SB221 ließ sich auf diese Weise DNS amplifizieren, die in ihrer Größe (ca. 1.500 bp) dem rechnerisch erwarteten DNS-Amplifikat (1.468 bp) entsprach. Das Vektorplasmid ohne *stx2e*-Insert aus dem Stamm 23 ergab in der pET-PCR ein Amplifikat der Größe von 274 bp. Auch mit der Insert-spezifischen *stx2e*-PCR konnten aus den beiden untersuchten Transformanten DNS-Fragmente erzeugt werden, welche der errechneten Größe (ca. 733 bp) entsprachen.

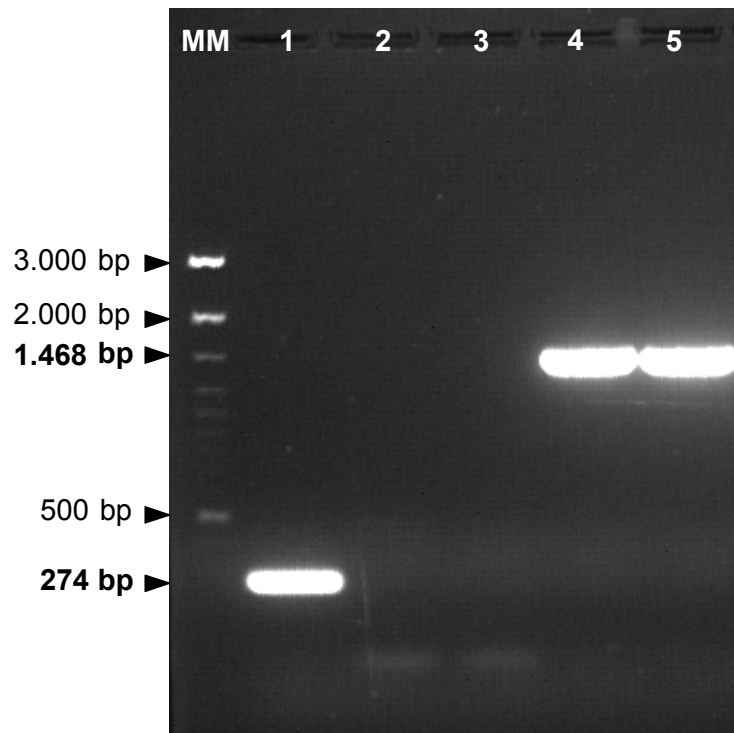
Die Sequenzierung der in SB221 klonierten *stx2e*-Gensequenzen ergab, dass die Sequenz in SB221 zu 100 % identisch war mit der von WEINSTEIN und Kollegen (1989) veröffentlichten *stx2e*-Gensequenz (**Abbildung 9**). Dagegen war in dem Stamm SB200 die Base Adenin an Position 420 durch die Base Guanin ersetzt, was jedoch nicht mit einer Änderung der Aminosäuresequenz einherging. Aufgrund der Substitution in SB200 wurde nur der Stamm SB221 für die weiteren Untersuchungen herangezogen.

### 4.2 Herstellung von gentechnisch mutiertem rStx2e

#### 4.2.1 Einführung von ortspezifischen Mutationen in das *stx2e*-Gen

Zur Herstellung eines gentechnisch inaktivierten rStx2e-Impfantigens, sollten Punktmutationen in die Nukleotidsequenz des *stxA2e*-Gens eingeführt werden, welche zu Änderungen der Aminosäuresequenz im katalytischen Zentrum des Toxins führen. Ausgesucht wurden die zu mutierenden Positionen 167 und 170, bei denen eine deutliche Minderung der Toxizität bei einer einfach Substitution von Glutamat durch Glutamin an Position 167 (E167Q),

und eine nicht mehr messbare Toxizität für Verozellen bei zusätzlicher Substitution von Arginin durch Leucin an Position 170 (R170L) beschrieben wurden (BOSWORTH et al., 1996; GORDON et al., 1992; MAKINO et al., 2001; MATISE et al., 2001).



**Abbildung 6: Nachweis des *stx2e*-Gens bei *E. coli*-B-Stämmen mittels Insert-umgreifender pET-PCR (B)**  
 (Elektropherogramm eines 2 %-igen Agarosegels nach Ethidiumbromid-Färbung)

<b>1:</b> Negativkontrolle 1 - Stamm 23	<b>4:</b> SB200
<b>2:</b> Negativkontrolle 2 - BLR(DE3)	<b>5:</b> SB221
<b>3:</b> Negativkontrolle 3 - <i>A. dest.</i>	

**MM** = Molekularmassenmarker GeneRuler 100 bp Ladder Plus

Die beiden Mutationen sollten nacheinander in das *stxA2e*-Gen eingeführt werden. In dem ersten Schritt sollte eine Mutante mit E167Q-Substitution entstehen, aus der im zweiten Schritt eine Mutante mit E167Q/R170L-Substitutionen hergestellt werden sollte. Der Plan sah ferner vor, im ersten Schritt zusätzlich an Position 168 eine stille Mutation einzuführen. Diese führte zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz, fügte aber eine *Hind*III-Restriktionsschnittstelle in das Gen ein, wodurch eine schnellere Überprüfung der erfolgreichen Mutation ermöglicht werden sollte. Im zweiten Schritt der Mutationen sollte die *Hind*III-Restriktionsschnittstelle wieder entfernt und durch die ursprüngliche Sequenz ersetzt werden.

Die Einführung der Mutationen erfolgte mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit. Die beiden Primerpaare rStx2e-E167Q-for und rStx2e-E167Q-rev bzw. rStx2e-R170L-for und rStx2e-R170L-rev beinhalteten die entsprechenden Punktmutationen und durch die *Pfu-Turbo*<sup>®</sup> DNA-Polymerase erfolgte die Verlängerung der Primersequenzen am Matrizenstrang. Durch *DpnI* wurde anschließend die als Matrize eingesetzte parenterale Plasmid-DNS verdaut. Da *DpnI* ausschließlich methylierte DNS restringiert, blieb die neusynthetisierte, unmethylierte DNS erhalten. Anschließend wurden XL1-Blue-Zellen mittels Hitzeschock mit der neusynthetisierten DNS transformiert. Die XL1-Blue-Zellen zirkularisierten die aufgenommenen DNS-Stränge selbst zu intakten Plasmiden. Um die rStx2e-Proteine reguliert exprimieren zu können, wurden die mutierten Plasmide in BLR(DE3)-Stämme umklontiert, da in XL1-Blue-Stämmen die für die Transkription von Genen auf pET-24b(+)-Vektoren benötigte T7-DNS-RNS-Polymerase nicht vorhanden ist.

#### 4.2.2 Genetische Identitätsprüfung der Transformanten

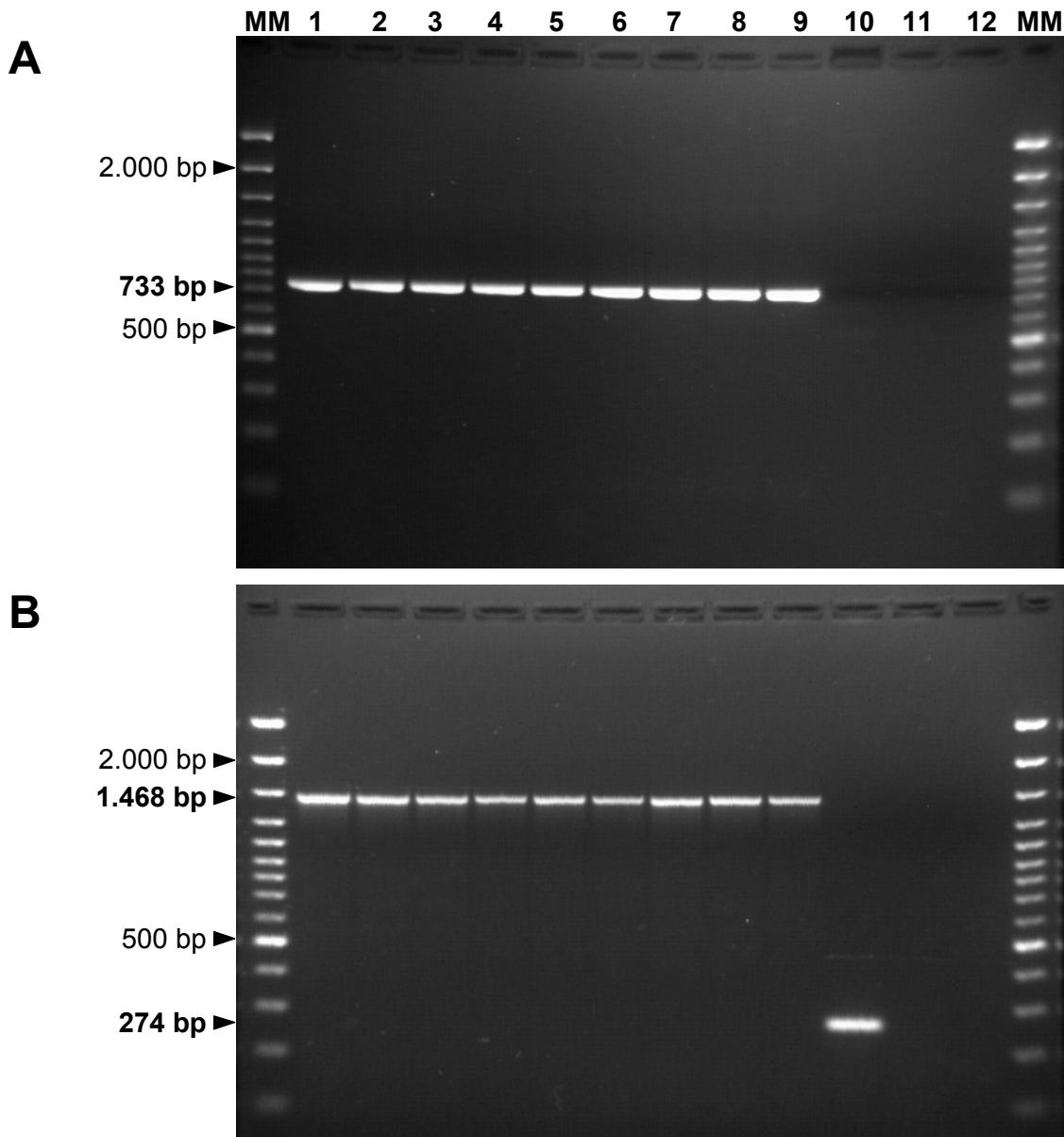
Nach Transformation in XL1-Blue- bzw. BLR(DE3)-Zellen wurden die Transformanten ausschließlich auf Kanamycin/Tetracyclin-haltigen Nährmedien kultiviert. Da die Kanamycin-Resistenz auf dem pET-24b(+)-Plasmid kodiert wird, wurde sichergestellt, dass sich nur noch Transformanten mit einem intakten Plasmid vermehrten. Die Tetracyclin-Resistenz ist sowohl im XL1-Blue als auch im BLR(DE3) chromosomal kodiert, so dass zusätzlich auch eine Selektion auf die Wirtszellen erfolgte. Zur Identitäts- und Reinheitskontrolle wurde neben der Fähigkeit, sich unter dem Kanamycin/Tetracyclin-Selektionsdruck zu vermehren, stets auch die Morphologie der Einzelkolonien (Form, Farbe, Oberfläche, Größe, Randstrukturen) beurteilt. Abweichende Kolonien, welche z.B. in der Größe differierten, wurden nicht weiter untersucht.

Zur genotypischen Identitätsprüfung wurden die vier „Vorläufer-XL1-Blue-Transformanten“ und die daraus abgeleiteten vier BLR(DE3)-Transformanten mit den jeweiligen Kontrollen mittels Insert-spezifischer *stx2e*-PCR (**Abbildung 7-A**) und Insert-umgreifender pET-PCR (**Abbildung 7-B**) getestet. Hierbei reagierten alle acht getesteten Transformanten so, wie es bei ordnungsgemäßer Transformation und Klonierung zu erwarten war: aus allen Transformanten ließ sich mittels der *stx2e*-PCR ein ca. 733 bp großes DNS-Fragment amplifizieren, mit der pET-PCR ein ca. 1.486 bp großes Fragment.

Durch die im ersten Mutationsschritt „E167Q“ eingeführte und im zweiten Mutationsschritt „R170L“ wieder entfernte *HindIII*-Restriktionsschnittstelle war über einen Restriktionsversuch an den Amplifikaten aus der *stx2e*-PCR eine schnelle zusätzliche Überprüfung der Mutanten möglich. Wie in der **Abbildung 8** dargestellt ist, konnten bei allen Mutanten die gewünschten Restriktionsergebnisse (Spuren 1, 3, 5 und 7, Einführung der E167Q-Mutation, alle Amplifi-

kate restringiert, Spuren 2, 4, 6 und 8, Einführung der R170L-Mutation, keines der Amplifikate restringiert) erzielt werden.

Im letzten Kontrollschritt wurden die Nukleotidsequenzen der *stx2e*-Gene in den BLR(DE3)-Transformanten bestimmt. Die doppelsträngigen DNS-Sequenzierungen wurden an Plasmid-DNS (Plasmide pHIT-VI-47, pHIT-VI-48, pHIT-VI-49 und pHIT-VI-50) durchgeführt, welche aus den BLR(DE3)-Transformanten präpariert worden waren. Dabei zeigte sich, dass die Mutationen, stets in der vorher geplanten Art und Weise, in die *stxA2e*-Gensequenz eingebaut worden waren. In den *stxA2e*-Gensequenzen der Transformanten SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 und SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 war offenbar infolge einer spontanen Punktmutation ein weiteres Nukleotid substituiert worden, was die Aminosäuresequenz an Position 216 änderte. Dabei wurde Alanin durch Asparaginsäure (A216D) ersetzt. Die ermittelten Nukleotidsequenzen sind in der **Abbildung 9** mit der *stx2e*-Sequenz des Stammes SB221 und der publizierten Sequenz M21534 (WEINSTEIN et al., 1988) dargestellt. In **Abbildung 10** ist die Aminosäuresequenz von StxA2e des Stammes SB221 und die veröffentlichte Sequenz AAA19189 (WEINSTEIN et al., 1988) abgebildet.



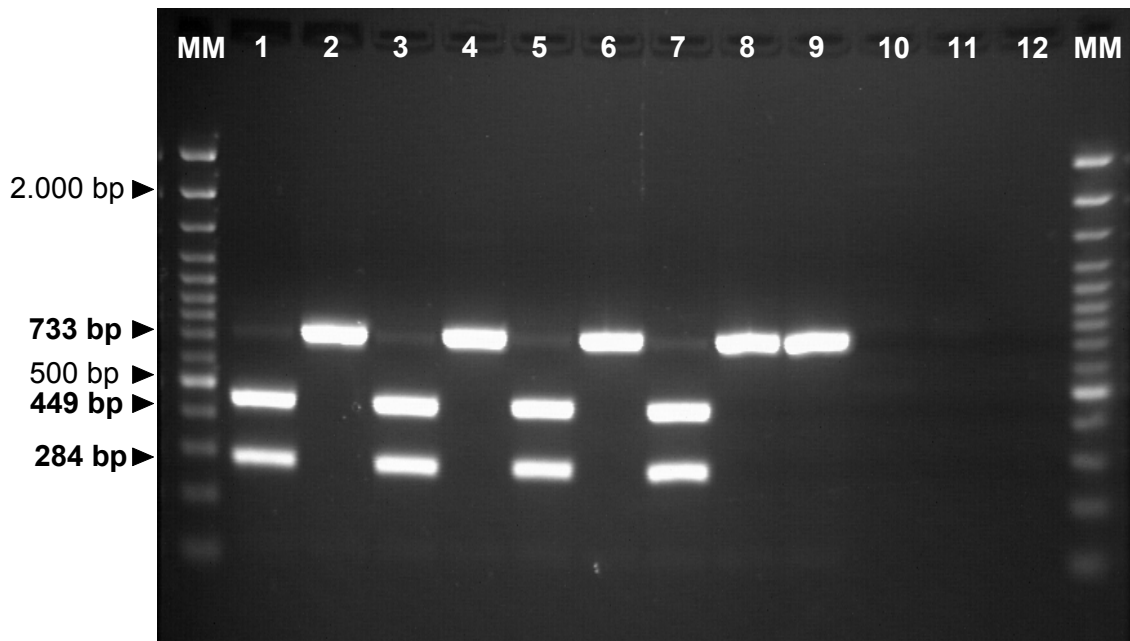
**Abbildung 7: Nachweis des *stx2e*-Gens bei *E. coli*-K12- und -B-Stämmen mittels Insert-spezifischer *stx2e*-PCR (A) und Insert-umgreifender pET-PCR (B)**

(Elektropherogramm von 2 %-igen Agarosegelen nach Ethidiumbromid-Färbung)

- |                         |  |  |
|-------------------------|--|--|
| 1: XL1-Blue(pHIT-VI-47) | 5: SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1      | 9: Positivkontrolle SB221                |
| 2: XL1-Blue(pHIT-VI-48) | 6: SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7 | 10: Negativkontrolle 1 - Stamm 23        |
| 3: XL1-Blue(pHIT-VI-49) | 7: SB221 <sub>E167Q</sub> #9           | 11: Negativkontrolle 2 - BLR(DE3)        |
| 4: XL1-Blue(pHIT-VI-50) | 8: SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2      | 12: Negativkontrolle 3 - <i>A. dest.</i> |

**MM** = Molekularmassenmarker GeneRuler 100 bp Ladder Plus





**Abbildung 8: Nachweis der durch gezielte Mutation eingeführten *HindIII*-Schnittstelle im *stx2e*-Gen bei *E. coli*-K12- und -B-Transformanten**

(Elektropherogramm eines 2 %-igen Agarosegels nach Ethidiumbromid-Färbung)

Die in der *stx2e*-PCR hergestellten Amplifikate (733 bp) wurden mit *HindIII* verdaut und zerfielen bei vorhandener Schnittstelle in ein 449 bp und ein 284 bp großes Fragment.

**1:** XL1-Blue(pHIT-VI-47)

**5:** SB221<sub>E167QA216D</sub> #1

**9:** Positivkontrolle SB221

**2:** XL1-Blue(pHIT-VI-48)

**6:** SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7

**10:** Negativkontrolle 1 - Stamm 23

**3:** XL1-Blue(pHIT-VI-49)

**7:** SB221<sub>E167Q</sub> #9

**11:** Negativkontrolle 2 - BLR(DE3)

**4:** XL1-Blue(pHIT-VI-50)

**8:** SB221<sub>E167QR170L</sub> #2

**12:** Negativkontrolle 3 - *A. dest.*

**MM** = Molekularmassenmarker GeneRuler 100 bp Ladder Plus



Fortsetzung der **Abbildung 9**

		640	650	660	670	680	690	700
M21534		TATACGATGACGCCGAAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGAGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGT						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		710	720	730	740	750	760	770
M21534		ATCGGGGAGAGGCTGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATACAGCGATACTTGGTACTGT						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		..... <b>A</b> .....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		..... <b>A</b> .....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		780	790	800	810	820	830	840
M21534		GGCCGTTTACTGAATTGCCATCATCAGGGCGCGCTTCTGTTTCGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCA						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		850	860	870	880	890	900	910
M21534		GAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCCGTTATAAAAATAAACAATACATTATGGGAAAGTAATACAGCAG						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		920	930	940	950	960	970	980
M21534		CAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTCTTTATATACAACCTGGTGAA <b>TGA</b> AAGGAGTTAAGA <b>ATGAAGAA</b>						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
M21534		<b>GATGTTTATAGCGGTTTATTTGCATTGGTTTCTGTTAATGCAATGGCG</b> GCGGATTGTGCTAAAGGTAAA						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
M21534		ATTGAGTTTTCCAAGTATAATGAGGATAATACCTTTACTGTGAAGGTGTCAGGAAGAGAATACTGGACGA						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
M21534		ACAGATGGAATTTGCAGCCATTGTTACAAAGTGCTCAGCTGACAGGGATGACTGTAACAATCATATCTAA						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						
		1200	1210	1220	1230			
M21534		TACCTGCAGTTCAGGCTCAGGCTTTGCCAGGTGAAGTTTAACT <b>TGA</b>						
SB221		.....						
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....						
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....						
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....						
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....						

**Erläuterungen:** . = identisch zu M21534;  
 kursiv: Start- und Stopcodons von *stxA2e* bzw. *stxB2e*;  
umrahmt: Signalpeptid-kodierende Sequenzen der A- bzw. B-Untereinheit;  
unterstrichen: intergenischer Bereich zwischen *stxA2e* und *stxB2e*.

**Abbildung 10: Aminosäuresequenzvergleich von rStxA2e aus den Plasmiden pHIT-VI-42, pHIT-VI-47, pHIT-VI-48, pHIT-VI-49 und pHIT-VI-50 und der veröffentlichten StxA2e-Sequenz GenBank Accession „AAA19189“**

		-20	-10	1	10	20	30	40	50	
AAA19189		<u>MK</u> CILLKWILCLLLGFSVSYSQEFTIDFSTQQSYVSSLNSIRTAISTPLEHISQGATSVSVINHTPPGSYI								
SB221		.....								
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....								
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....								
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....								
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....								
		60	70	80	90	100	110	120		
AAA19189		SVGIRGLDVYQERFDHLRLIIERNNLYVAGFVNNTTNTFYRFSDFAHISLPGVTTISMTDSSYTTLQRV								
SB221		.....								
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....								
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....								
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....								
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....								
		130	140	150	160	170	180	190		
AAA19189		AALERSGMQISRHSLSVSSYLALMEFSGNTMTRDASRAVLRFTVTVAEALRFRQIQREFRLALSETAPVYT								
SB221		.....								
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....								
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....								
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....								
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....								
		200	210	220	230	240	250	260		
AAA19189		MTPEDVDLTLNWGRISNVLPFYRGEAGVRVGRISFNNSAAILGTVAVILNCHHQGARSVRVAVNEESQPEC								
SB221		.....								
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....								
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....								
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....								
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....								
		270	280	290						
AAA19189		QITGDRPVIKINNTLWESNTAAAFNLRKQSQSLYTTGE								
SB221		.....								
SB221 <sub>E167QA216D</sub> #1		.....								
SB221 <sub>E167QR170LA216D</sub> #7		.....								
SB221 <sub>E167Q</sub> #9		.....								
SB221 <sub>E167QR170L</sub> #2		.....								

**Erläuterungen:** . = identisch zu AA19189;  
umrahmt: Signalpeptid der A-Untereinheit.

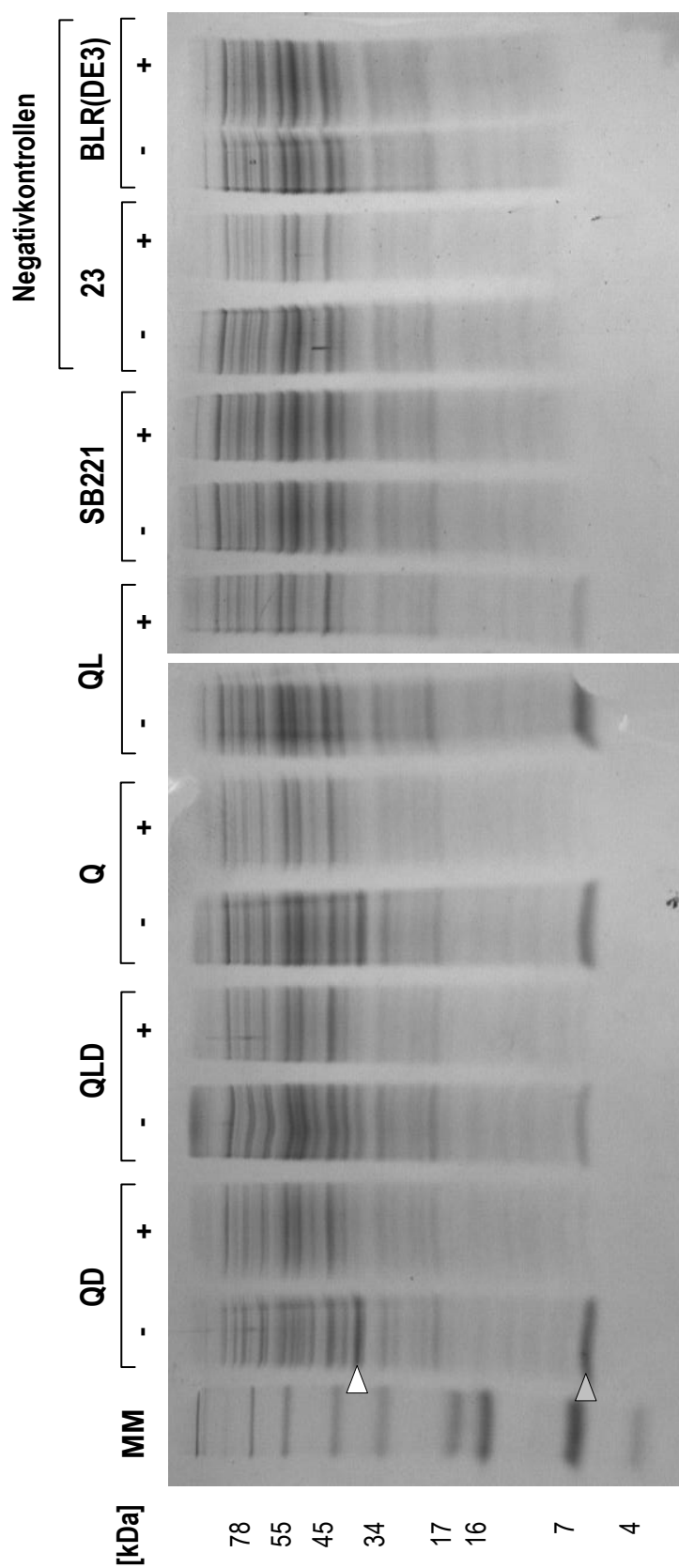
### 4.3 Charakterisierung von rStx2e und gentechnisch mutiertem rStx2e

#### 4.3.1 Qualitativer Nachweis der Bildung von rStx2e und rStx2e<sub>MUT</sub> durch transformierte *E. coli*-Stämme

Die Expression der rStx2e-Proteine wurde bei allen fünf hergestellten BLR(DE3)-Transformanten in KL-Überständen untersucht. Die Kulturen wurden hierfür im Doppelansatz in An- und Abwesenheit des Induktors IPTG (1 mM) angezchtet. Die gewonnenen KL-Überstände wurden anschließend mittels Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot analysiert.

Im erwarteten Molekularmassenbereich der rStxA2e-Untereinheit (35,6 kDa mit bzw. 33,1 kDa ohne Signalpeptid) waren mittels Tricine-SDS-PAGE in IPTG-freien Kulturen der Stämme SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 und SB221<sub>E167Q</sub> #9 dominierende Proteinbanden sichtbar, die bei den Kontrollstämmen (Stamm 23 und BLR[DE3] ohne *stx2e*-Gen) stets fehlten (**Abbildung 11**). Keine Banden im Größenbereich der rStxA2e-Untereinheit waren in den Präparaten aus IPTG-freien Kulturen der Stämme SB221, SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 und SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 und paradoxerweise bei allen fünf Transformanten nach Anzucht mit IPTG erkennbar. Ohne die Zugabe von IPTG war bei den vier Stämmen mit den gentechnisch mutierten rStx2e-Varianten eine dominierende Proteinbande sichtbar, deren molekulare Masse in etwa (ca. 6,9 kDa) der der rStxB2e-Untereinheit (9,7 kDa mit bzw. 7,6 kDa ohne Signalpeptid) entsprach. Wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG angezchtet, war nur bei dem Stamm SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 eine entsprechende Proteinbande sichtbar. Unabhängig von der Zugabe von IPTG zu den Kulturen waren verdächtige Banden in den Kulturlysat-Überständen der Stämme SB221, 23 und BLR(DE3) nicht nachweisbar.

Um die Transformanten mit einem sensitiveren System auf die Bildung der rStxA2e- und rStxB2e-Untereinheiten zu untersuchen, wurde eine Immunoblot-Analyse eingesetzt. Alle Stx2e-Transformanten wurden im Immunoblot mit dem Serum R-2226/02 überprüft (**Abbildung 12**). Im erwarteten Massenbereich der rStxA2e- und rStxB2e-Untereinheit waren bei allen fünf Transformanten nach Anzucht in Abwesenheit von IPTG die erwarteten Proteinbanden nachweisbar. In den KL-Überständen von den mit IPTG stimulierten Stämmen SB221<sub>E167Q</sub> #9, SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 und SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 war eine rStxA2e-ähnliche Bande, bei dem Stamm SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 eine rStxB2e-ähnliche Bande sichtbar. In dem KL-Überstand von Stamm SB221 nach Anzucht mit IPTG, sowie in den KL-Überständen der Kontrollstämme 23 und BLR(DE3) konnten keine entsprechenden Banden detektiert werden.



**Abbildung 11: Proteinprofile aus KL-Überständen von *E. coli*-B-Transformanten mit und ohne IPTG-Induktion**

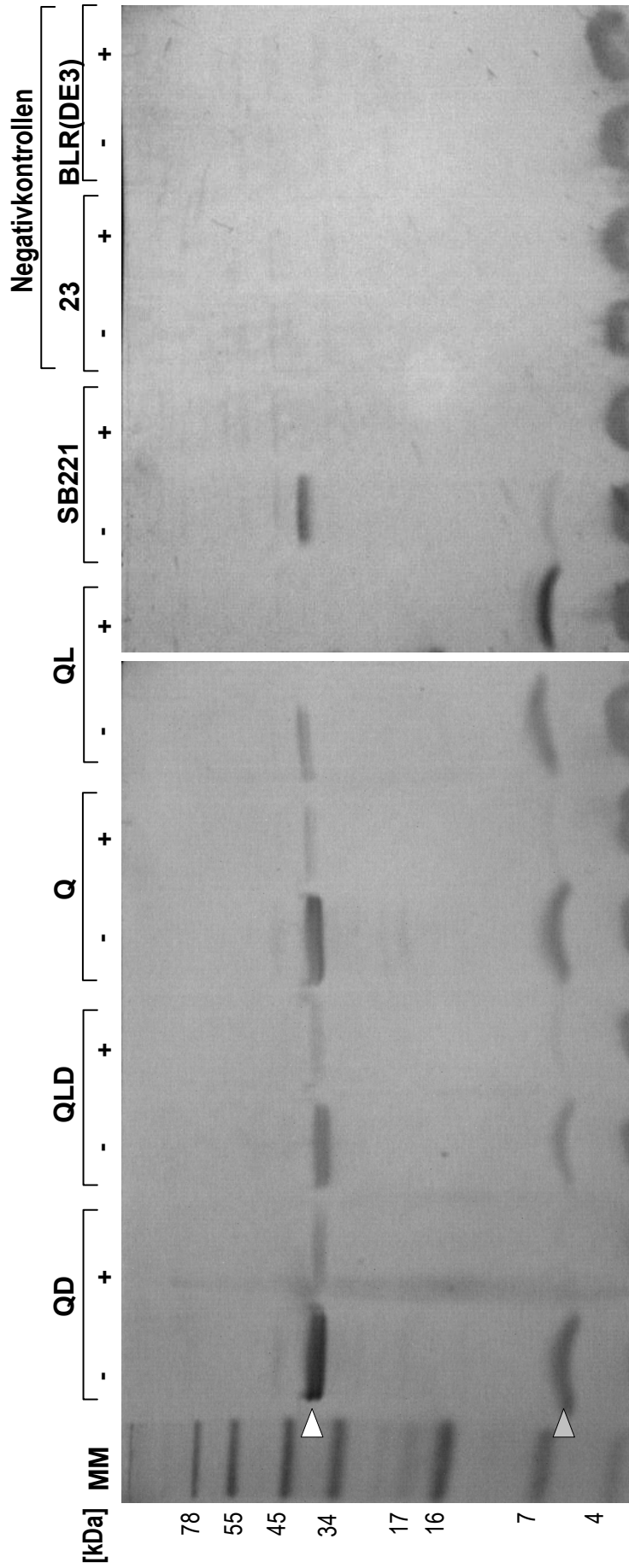
(10 %-ige Tricine-PAGE, Coomassie-Färbung, Probenauftrag 20 µl KL-Überstand je Spur)

**QD:** SB221<sub>E167QA216D</sub> #1, **QLD:** SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7, **Q:** SB221<sub>E167Q</sub> #9, **QL:** SB221<sub>E167QR170L</sub> #2;

**+** : Anzucht mit 1 mM IPTG, **-** : Anzucht ohne IPTG;

**Δ** : rStxA2e (35,6 kDa mit bzw. 33,1 kDa ohne Signalpeptid), **▷** : rStxB2e (9,7 kDa mit bzw. 7,6 kDa ohne Signalpeptid);

**MM:** Molekularmassenmarker SeeBlue™ Plus 2.



**Abbildung 12:** Nachweis der rStxA2e- und rStxB2e-Untereinheit in KL-Überständen von *E. coli*-B-Transformanten unter Verwendung von Stx2e-spezifischem Pferdeserum (R-2226/02)

(Immunoblot, Probenauftrag 20 µl je Spur, Serumverdünnung 1:100);

**QD:** SB221<sub>E167QA216D</sub> #1, **QLD:** SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7, **Q:** SB221<sub>E167Q</sub> #9, **QL:** SB221<sub>E167QR170L</sub> #2;

+ : Anzucht mit 1 mM IPTG, - : Anzucht ohne IPTG;

△ : rStxA2e (35,6 kDa mit bzw. 33,1 kDa ohne Signalpeptid), ▴ : rStxB2e (9,7 kDa mit bzw. 7,6 kDa ohne Signalpeptid);

**MM:** Molekularmassenmarker SeeBlue™ Plus 2.

#### 4.3.2 Subzelluläre Lokalisation und zytotoxische Aktivität von rStx2e und mutiertem rStx2e

Um rStx2e und rStx2e<sub>MUT</sub> in der *E. coli*-B-Zelle zu lokalisieren, wurden die folgenden drei Zellkompartimente gewonnen: Kulturüberstand, Periplasma-Fraktion (PP-Fraktion) und Ultraschalllysate-Überstand (USL-Überstand). Bei dem Kulturlysate-Überstand (KL-Überstand) handelte es sich, wie in **Kapitel 3.9.2** beschrieben, um Ultraschalllysate der gesamten Kultur, die durch Zentrifugation von Bakterienstämmen grob gereinigt worden waren. Die Kulturen waren hierfür parallel mit und ohne IPTG-Zusatz (1 mM) angesetzt worden. Die in den Fraktionen enthaltenen rStx2e-Mengen wurden anschließend im SIFIN-Stx2e-ELISA und im Verozell-Zytotoxizitätstest quantifiziert.

In der **Abbildung 13** sind die Ergebnisse gegenüber gestellt (die Einzelwerte befinden sich im Anhang in **Tabelle 26**). Mit dem SIFIN-Stx2e-ELISA (**Abbildung 13A**) konnte das meiste rekombinante Stx2e sowohl bei dem Stamm SB221 als auch bei den Stx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten zellassoziiert (USL-Überstand) nachgewiesen werden. Dabei bildeten der Stamm SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 mit 401,9 OD %<sub>rStx2e</sub> und der Stamm SB221<sub>E167Q</sub> #9 mit 385,9 OD %<sub>rStx2e</sub> am meisten rStx2e-Antigen, der Stamm SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 und der Stamm SB221 am wenigsten. Im Kulturüberstand, als Maß für das frei in die Kultur sezernierte Protein, war deutlich weniger rStx2e-Antigen nachweisbar, am wenigsten aber in der PP-Fraktion.

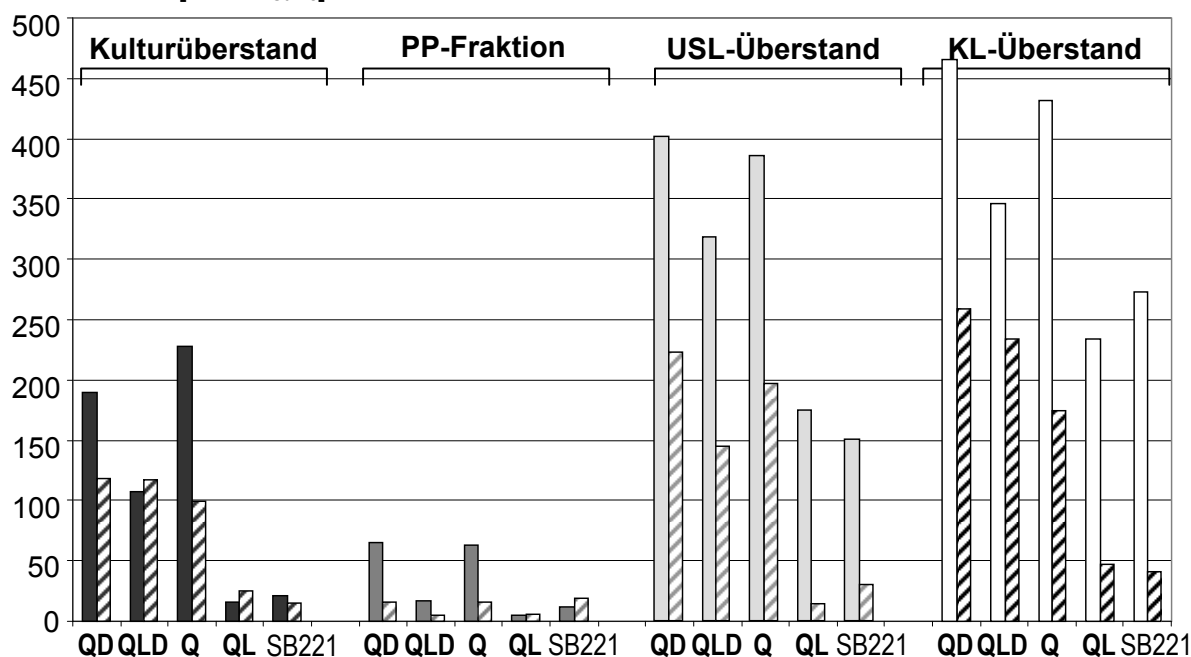
Um zu erfassen, ob die zusätzliche Mutation an Position 216 einen Einfluß auf die gebildete Menge rStx2e<sub>MUT</sub> hat, wurden die für die vier Zellkompartimente ermittelten ELISA-Werte gemittelt und mit Hilfe des t-Tests auf Unterschiede untersucht. Es zeigte sich, dass weder die Toxinmenge des Stammes SB221<sub>E167Q</sub> #9 sich signifikant von der Toxinmenge des Stammes SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 noch die des Stammes SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 sich von der des Stammes SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 unterschied ( $p > 0,05$ ), die zusätzliche Mutation A216D veränderte die Toxinexpression somit nicht signifikant. Ohne die Zugabe von IPTG bildeten sowohl der Stamm SB221 als auch die rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten stets mehr rStx2e-Antigen, als wenn das Anzuchtmedium mit 1 mM IPTG supplementiert worden war.

Bei der Überprüfung der zytotoxischen Aktivität der verschiedenen Präparate im Verozell-Zytotoxizitätstest zeigte sich, dass unabhängig von der Anwesenheit des IPTG in der PP-Fraktion und im Kulturüberstand der rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten keine Zytotoxizität nachweisbar war (**Abbildung 13B**). In den USL-Überständen der nicht mit IPTG-behandelten Kulturen von SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 (333 CD<sub>50</sub>/ml), SB221<sub>E167Q</sub> #9 (372 CD<sub>50</sub>/ml) und SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 (34 CD<sub>50</sub>/ml) war aber noch eine geringe zytotoxische Aktivität vorhanden. Alle Fraktionen von SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 waren atoxisch. Dagegen reagierten alle von Stamm SB221 untersuchten Zellkompartimente hochgradig zytotoxisch. Die zytotoxische Aktivität nahm dabei in der folgenden Reihenfolge zu: PP-Fraktion (mit IPTG 270 CD<sub>50</sub>/ml bzw. ohne IPTG 3.500 CD<sub>50</sub>/ml), Kulturüberstand (mit IPTG 14.900 CD<sub>50</sub>/ml bzw. ohne IPTG 41.400 CD<sub>50</sub>/ml)

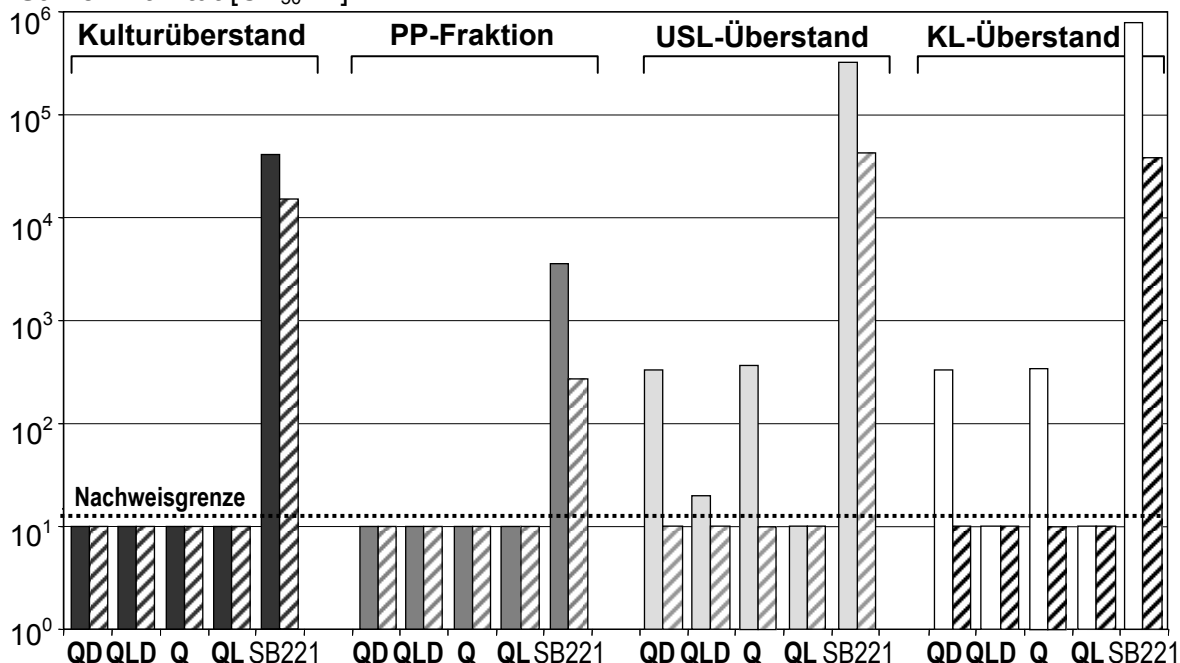


und USL-Überstand (mit IPTG 42.700 CD<sub>50</sub>/ml bzw. ohne IPTG 324.000 CD<sub>50</sub>/ml).

### A Stx2e-Titer [OD %<sub>rStx2e</sub>]



### B Stx2e-Aktivität [CD<sub>50</sub>/ml]



**Abbildung 13: Quantifizierung von rStx2e in den verschiedenen Kulturbestandteilen**

**A: Stx2e-Nachweis im SIFIN-Stx2e-ELISA (Probenverdünnung 1:128)**

**B: Nachweis von aktivem Stx2e im Verozell-Zytotoxizitätstest**

**QD:** SB221<sub>E167QA216D</sub> #1, **QLD:** SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7, **Q:** SB221<sub>E167Q</sub> #9,

**QL:** SB221<sub>E167QR170L</sub> #2, **PP-Fraktion** = Periplasma-Fraktion;

**USL-Überstand** = Ultraschalllysat-Überstand;

**KL-Überstand** = Kulturlysat-Überstand;

■ Anzucht ohne IPTG, ▨ Anzucht mit 1 mM IPTG.

### 4.3.3 Einfluss der Kulturbedingungen auf die rStx2e-Expression

Um Parameter zu identifizieren, die die Bildung von rStx2e in den Transformanten verstärken, wurden die Transformanten unter verschiedenen Kulturbedingungen angezüchtet. Variiert wurden die Herstellung des Mediums (autoklaviert bzw. nicht autoklaviert), die Zugabe von Glukose zur Starterkultur und/oder Kultur und der Einfluss der IPTG-Zugabe (ohne bzw. mit 1 mM) zur Kultur (**Tabelle 17**).

Nach 20 h Inkubation wurden die Bakterienzellen zentrifugiert und der Kulturüberstand gewonnen. Die Bestimmung der gebildeten rStx2e- bzw. rStx2e<sub>MUT</sub>-Menge erfolgte im SIFIN-Stx2e-ELISA nach dem Prinzip der Endpunkttitration. Zur einfacheren Vergleichbarkeit der rStx2e- bzw. rStx2e<sub>MUT</sub>-Mengen sind in der **Tabelle 17** die reziproken Werte der letzten noch positiven log<sub>2</sub>-Verdünnung angegeben.

Insgesamt wurden sechs verschiedene Inkubationsbedingungen ausgetestet. Zwei Inkubationsbedingungen wurden dabei für einige Stämme wiederholt durchgeführt. Dabei differierten die Mengen an rStx2e trotz identischer Bedingungen von Ansatz zu Ansatz stark (z. Bsp. SB221<sub>E167QR170L</sub> #2: Starterkultur mit autoklaviertem Medium und Kultur mit nicht autoklaviertem Medium, stets ohne Glukose und IPTG, rStx2e<sub>E167QR170L</sub> #2-Menge zwischen 64 und 1.024). Insgesamt wurde das meiste rStx2e bzw. rStx2e<sub>MUT</sub> nachgewiesen, wenn die Bakterien in autoklaviertem Medium in der Starterkultur und nicht autoklaviertem Medium in der Kultur inkubiert wurden. Bei den rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten war ohne IPTG-Zugabe im Kulturüberstand mehr rStx2e<sub>MUT</sub> nachweisbar, als in den Vergleichsansätzen mit 1 mM IPTG. Dagegen war bei dem Stamm SB221 im Kulturüberstand mehr rStx2e nachweisbar, wenn die Kultur 1 mM IPTG enthalten hatte. Allerdings lag die nachgewiesene Menge rStx2e bei dem Stamm SB221 meist einige log<sub>2</sub>-Stufen niedriger, als die von den Mutanten sezernierte Menge an rStx2e<sub>MUT</sub>.

Der Einsatz von Glukose sowohl in der Starterkultur als auch in der Kultur führte dabei stets zu einer niedrigeren rStx2e- bzw. rStx2e<sub>MUT</sub>-Menge, als wenn die Kulturen ohne Glukose angezüchtet wurden. Allerdings war in glukosehaltigem Medium die Expression von rStx2e bzw. rStx2e<sub>MUT</sub> durch IPTG meistens induzierbar, so dass in den Kulturen mit IPTG meist mehr rStx2e bzw. rStx2e<sub>MUT</sub> vorhanden war als in Kulturen ohne IPTG.

**Tabelle 17: Nachweis von rStx2e bzw. rStx2e<sub>MUT</sub> in *E. coli*-Kulturüberständen nach 20-stündiger Inkubation**  
(Ergebnisse aus dem SIFIN-Stx2e-ELISA)

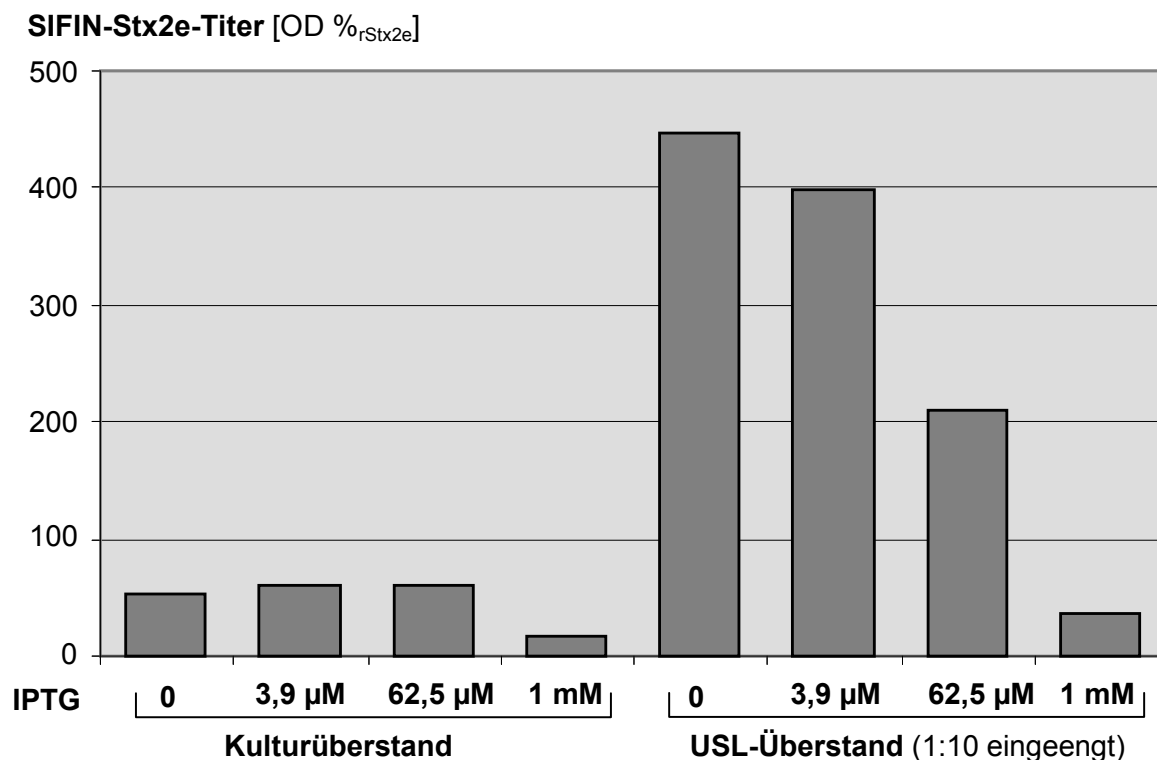
Inkubationsbedingungen		rStx2e <sub>MUT</sub> -Mengen in Kulturüberständen <sup>1)</sup>											
Starterkultur	Kultur	SB221		QD		QLD		Q		QL			
		0 mM	1 mM	0 mM	1 mM	0 mM	1 mM	0 mM	1 mM	0 mM	1 mM		
autoklaviert <sup>2)</sup>	autoklaviert	< 32	64	< 32	< 32	4.096	512	32	32	< 32	< 32		
autoklaviert	nicht autoklaviert	256	512	1.024	512	n. t.	n. t.	1.024	256	1.024	256		
		< 32	64	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	64	256		
nicht autoklaviert	nicht autoklaviert	< 32	< 32	n. t.	n. t.	256	128	n. t.	n. t.	32	64		
		< 32	64	256	256	128	512	64	64	512	512		
autoklaviert, 0,5 % Glukose	nicht autoklaviert	64	128	n. t.	n. t.	32	128	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.		
autoklaviert, 0,5 % Glukose	nicht autoklaviert, 0,5 % Glukose	< 32	32	n. t.	n. t.	< 32	< 32	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.		
nicht autoklaviert, 0,5 % Glukose	nicht autoklaviert, 0,5 % Glukose	< 32	< 32	< 32	256	< 32	256	< 32	< 32	< 32	256		

**Erläuterungen:** QD: SB221<sub>E167QA216D</sub> #1, QLD: SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7, Q: SB221<sub>E167Q</sub> #9, QL: SB221<sub>E167QR170L</sub> #2.

- 1) Angegeben ist der reziproke Wert der letzten getesteten Verdünnung mit > 44,7 OD %<sub>rStx2e</sub> im SIFIN-Stx2e-ELISA.
- 2) LB-Medium wurde vor der Verwendung autoklaviert oder direkt nach der Herstellung verwendet („nicht autoklaviert“).

n. t. = nicht getestet; 0 mM / 1 mM = ohne bzw. mit 1 mM IPTG-Zugabe (f.c.) in der Kultur.

Für den Stamm SB221<sub>E167QR170L</sub> #2, der auch zur Herstellung des Impfantigens für die Tierversuche H und I diente, wurde der Einfluss der IPTG-Konzentration genauer geprüft. Hierzu wurde IPTG in verschiedenen Konzentrationen der Kultur zugegeben und anschließend die gebildete Menge rStx2e<sub>E167QR170L</sub> sowohl im Kultur- als auch im USL-Überstand mittels SIFIN-Stx2e-ELISA gemessen (**Abbildung 14**). Während in den Kulturüberständen die Menge an rStx2e<sub>E167QR170L</sub> bei den IPTG-Konzentrationen 3,9 µM, 62,5 µM und ohne IPTG nahezu identisch war, wurde sie durch Zugabe von 1 mM IPTG um mehr als die Hälfte reduziert. Noch deutlicher wurde dieser Effekt in den untersuchten USL-Überständen, in denen die rStx2e<sub>E167QR170L</sub>-Mengen bei Zunahme der IPTG-Konzentration kontinuierlich abnahmen. Bei Berücksichtigung der herstellungsbedingten Einengung der USL-Überstände um den Faktor 10 zeigte sich, dass die Menge rStx2e<sub>E167QR170L</sub> unabhängig von der IPTG-Zugabe in den Kulturüberständen größer war als in den USL-Überständen (ohne IPTG: KL-Überstand 54 OD %<sub>rStx2e</sub> und USL-Überstand 45 OD %<sub>rStx2e</sub>; 1 mM IPTG: KL-Überstand 18 OD %<sub>rStx2e</sub> und USL-Überstand 3,6 OD %<sub>rStx2e</sub>).



**Abbildung 14:** Nachweis von rStx2e<sub>MUT</sub> in Kultur- und Ultraschalllysate-Überständen von Stamm SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration in der Kultur (Ergebnisse aus dem SIFIN-Stx2e-ELISA, Probenverdünnung 1:2.048)

#### 4.4 Herstellung und Charakterisierung von rStx2e- und rStx2e<sub>MUT</sub>-Impfantigen-Chargen

Um die Auswirkung der chemischen Behandlung zu untersuchen, wurden verschiedene Testchargen an rStx2e aus USL-Überständen vom *E. coli*-Stamm SB221 hergestellt und mit Glutaraldehyd oder Formaldehyd behandelt. Zum Vergleich wurde Testmaterial aus der Kultur des *E. coli*-Stammes 23 (Bezeichnung "*E. coli*-Placebo") auf dieselbe Art und Weise hergestellt und behandelt. Vor und nach der Behandlung mit Glutaraldehyd oder Formaldehyd wurden von allen Testansätzen Aliquots entnommen und auf ihre Zytotoxizität für Verozellen, ihren rStx2e-Gehalt mittels RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA und ihren Gesamtproteingehalt getestet. USL-Überstände aus Kulturen des rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 wurden in derselben Weise untersucht. Alle Testchargen und ihre Eigenschaften sind in der **Tabelle 18** aufgelistet.

##### 4.4.1 Impfantigen aus chemisch inaktiviertem rStx2e

Entsprechend den Hinweisen in der Literatur (MACLEOD und GYLES, 1991a) wurde versucht, rStx2e durch Inkubation mit Glutaraldehyd (*f. c.* 0,1 %) zu inaktivieren. Tatsächlich konnte Glutaraldehyd die zytotoxische Wirkung von rStx2e (bezogen auf die unbehandelte Charge rStx2e/01/05) um den Faktor 1.000 bis 2.000 reduzieren (rStx2e/01/05<sub>GA</sub>, rStx2e/06/05<sub>GA</sub> bzw. rStx2e/02/06<sub>GA</sub>). Allerdings wurde das so behandelte Toxin auch im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA schlechter erkannt (Reduktion um den Faktor 12 bzw. 52).

Die Versuche, die Verozell-Zytotoxizität des rStx2e mit Formaldehyd zu inaktivieren, verliefen dagegen nicht so erfolgreich. So besaß rStx2e/06/05<sub>FA-0,3%</sub> zwar eine ähnliche Stx2e-Antigenmenge wie rStx2e/01/05 (157.400 OD<sub>50</sub>/ml zu 210.000 OD<sub>50</sub>/ml, RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA), war aber stärker toxisch als das Ausgangsmaterial (335 Mio CD<sub>50</sub>/ml). Variationen in der Formaldehyd-Konzentration (*f. c.* 0,3 bzw. 1 %), der Einwirkdauer (24 h bzw. 72 h) und der Einwirktemperatur (4 °C bzw. 37 °C) ergaben nur zum Teil bessere Ergebnisse. So wurde durch die erhöhte Einwirktemperatur zwar eine Reduktion der Zytotoxizität um den Faktor 291 erzielt, aber gleichzeitig nahm die Menge an Gesamtprotein um den Faktor 6 ab (bezogen auf die Charge rStx2e/03/05).

Bei den mit Glutaraldehyd und vor allem bei den mit Formaldehyd behandelten *E. coli*-Placebo-Chargen kam es im Vergleich zu der unbehandelten Charge 23/03/05 (CD<sub>50</sub>/ml < 20) zu einer scheinbaren Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber Verozellen.

#### 4.4.2 Impfantigen aus gentechnisch inaktiviertem rStx2e (rStx2e<sub>MUT</sub>)

Durch die gentechnisch eingeführten Mutationen in der rStxA2e-Untereinheit auf Position 167 und 170 entfiel bei der Impfantigen-Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 die Inaktivierung durch Glutaraldehyd. Zur Erzeugung eines gentechnisch inaktivierten rStx2e<sub>MUT</sub>-Impfantigens wurde von dem Stamm SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 USL-Überstand gewonnen und nachfolgend charakterisiert. Die Testergebnisse wiesen aus, dass dieses Material um den Faktor 33.784 weniger toxisch war und 3,9-mal soviel Antigen enthielt wie die rStx2e-Charge rStx2e/01/05, die aus dem USL-Überstand des Stammes SB221 hergestellt worden war. Setzt man voraus, dass der RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA das rStx2e und das SB221<sub>E167QR170L</sub> gleich gut erkannte, dann ergibt sich für die gleiche im ELISA ermittelte Antigenmenge sogar eine um den Faktor 132.278 geringere toxische Aktivität der Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06.

Im Vergleich zu den Glutaraldehyd-inaktivierten Impfantigen-Chargen (rStx2e/01/05<sub>GA</sub>, rStx2e/06/05<sub>GA</sub> bzw. rStx2e/02/06<sub>GA</sub>) war die Zytotoxizität von rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 für Verozellen noch einmal um den Faktor 34 geringer und die im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA ermittelte rStx2e-Konzentration um den Faktor 206 größer (**Tabelle 18**).

#### 4.5 Etablierung und Validierung des Ödemkrankheitsmodells

In Zusammenarbeit mit der IDT Biologika GmbH wurde ein Ödemkrankheitsmodell (syn. Stx2e-Challengemodell) an Absatzferkeln etabliert, um die protektive Wirkung der chemisch und gentechnisch inaktivierten Impfantigene zu überprüfen. Hierzu sollte die Ödemkrankheit durch parenteral verabreichtes rStx2e in sechs Wochen alten Ferkeln ausgelöst werden. Als rStx2e-Challenge-Material wurden nicht aufgereinigte USL-Überstände vom Stamm SB221 verwendet. Die Ferkel, die mit rStx2e-freiem *E. coli*-Lysat behandelt wurden, bekamen anstelle von rStx2e-haltigem Challenge-Material USL-Überstände vom Stamm 23 verabreicht (*E. coli* BLR(DE3, pET-24b[+]), um auszuschließen, dass andere Bestandteile in dem USL-Überstand als rStx2e für Ödemkrankheit-ähnliche Symptome verantwortlich waren. Die rStx2e-Belastung wurde gemäß den Anforderungen des Europäischen Arzneibuches 4.6 auf 0,75 Mio CD<sub>50</sub>/Ferkel eingestellt, damit mindestens eine Mortalität von 40 % und eine Morbidität von 85 % unter den mit rStx2e-freiem *E. coli*-Lysat behandelten Tieren bzw. den Kontrolltieren erreicht wird (ANONYM, 2003).

**Tabelle 18: Einfluss von chemischen und gentechnischen Inaktivierungsmethoden auf die Antigenität und Zytotoxizität von rStx2e- bzw. Placebo-Chargen.**

Chargen-Bezeichnung	Ausgangsmaterial <sup>1)</sup>		Gesamtprotein-gehalt [µg/ml]	Toxizität für Verozellen <sup>2)</sup> [CD <sub>50</sub> /ml]	rStx2e-Antigenmenge <sup>3)</sup> [OD <sub>50</sub> /ml]
	Stamm	Chargen-Bezeichnung			
<b><u>rStx2e-Antigen</u></b>					
rStx2e/01/05 <sub>GA</sub>	SB221	rStx2e/01/05	2.874	10.000	17.000
rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	SB221	rStx2e/01/05	3.643	20.000	4.400
rStx2e/02/06 <sub>GA</sub>	SB221	rStx2e/01/05	3.005	18.500	4.000
rStx2e/06/05 <sub>FA-0,3% (24 h/4 °C)</sub>	SB221	rStx2e/01/05	2.306	335.000.000	157.400
rStx2e/03/05 <sub>GA</sub>	SB221	rStx2e/03/05	819	3.800	100
rStx2e/03/05 <sub>FA-0,3% (24 h/4 °C)</sub>	SB221	rStx2e/03/05	419	106.000	11.100
rStx2e/03/05 <sub>FA-1% (24 h/4 °C)</sub>	SB221	rStx2e/03/05	406	122.000	8.800
rStx2e/03/05 <sub>FA-1% (24 h/37 °C)</sub>	SB221	rStx2e/03/05	236	4.400	11.000
rStx2e/03/05 <sub>FA-1% (72 h/37 °C)</sub>	SB221	rStx2e/03/05	260	1.650	3.150
<b><u>gentechnisch inaktiviertes rStx2e-Antigen</u></b>					
rStx2e <sub>E167QR170L</sub> /02/06	SB221	--	1.616	592	825.400
	E167QR170L				
<b><u>E. coli-Placebo</u></b>					
23/03/05 <sub>GA</sub>	Stamm 23	23/03/05	1.779	700	negativ <sup>4)</sup>
23/06/05 <sub>GA</sub>	Stamm 23	23/03/05	2.263	1.400	n. t.
23/06/05 <sub>FA-0,3% (24 h/4 °C)</sub>	Stamm 23	23/03/05	1.283	37.400	n. t.
<b><u>NaCl-Placebo-Antigen</u></b>					
NaCl <sub>GA</sub>		NaCl-Lösung	1.136	n. t.	n. t.
NaCl <sub>FA-0,3% (24 h/4 °C)</sub>		NaCl-Lösung	488	n. t.	n. t.

- Erläuterungen:**
- 1) Ausgangsmaterial für chemisch behandelte Impfantigen-Chargen:  
**rStx2e/01/05:** 1.834 µg/ml Protein, 20 Mio CD<sub>50</sub>/ml, 210.000 OD<sub>50</sub>/ml;  
**rStx2e/03/05:** 1.450 µg/ml Protein, 480.000 CD<sub>50</sub>/ml, 26.000 OD<sub>50</sub>/ml;  
**23/03/05:** 1.451 µg/ml Protein, < 20 CD<sub>50</sub>/ml, OD<sub>50</sub>/ml negativ.
  - 2) Die **CD<sub>50</sub>/ml** wurde im Verozell-Zytotoxizitätstest ermittelt.  
(Messgrenze des Systems 20 CD<sub>50</sub>/ml)
  - 3) Die **OD<sub>50</sub>/ml** wurde im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA ermittelt.
  - 4) **negativ** befundet, da Extinktionswert unterhalb des Cut-Offs;  
**n. t.** = nicht getestet.

Zur Etablierung und Evaluierung des Ödemkrankheitsmodells wurden drei Tierversuche (**A**, **B** und **C**) mit zwei unterschiedlichen rStx2e-Chargen durchgeführt (**Tabelle 15**). Die rStx2e- und rStx2e-freien *E. coli*-Lysat-Chargen sind mit ihren relevanten Eigenschaften in **Tabelle 19** aufgelistet. Die zwei eingesetzten Toxin-Chargen (rStx2e/11/04 und rStx2e/01/05) unterscheiden sich in ihrem Gesamtproteingehalt und ihrer zytotoxischen Aktivität. Sie wurden anhand der Verozell-Zytotoxizität eingestellt und verabreicht (zwischen 0,25 und 1,5 Mio CD<sub>50</sub>/Dosis/Ferkel). Die Toxin-Charge rStx2e/11/04 wies im Verozell-Zytotoxizitätstest eine zytotoxische Aktivität von 445.000 CD<sub>50</sub>/ml auf. Im Vergleich dazu besaß die Charge rStx2e/01/05 eine 45fach höhere Toxizität. Im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA wies die Charge rStx2e/01/05 eine 191fach höhere rStx2e-Konzentration auf als die Charge rStx2e/11/04. Die rStx2e-freien *E. coli*-Lysat-Chargen wurden anhand ihres Gesamtproteingehaltes verdünnt und den Toxin-Chargen angepasst. Es konnte bei beiden rStx2e-freien *E. coli*-Lysat-Chargen keine Toxizität gegenüber Verozellen nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des Testsystems wurde die Toxizität als kleiner 20 CD<sub>50</sub>/ml angegeben.

**Tabelle 19: Eigenschaften des rStx2e-haltigen und rStx2e-freien Challenge-Materials**

Chargen-Bezeichnung	Herkunft <sup>1)</sup>	Gesamtproteingehalt [µg/ml]	Toxin-konzentration <sup>2)</sup> [CD <sub>50</sub> /ml]	Antigenmenge <sup>3)</sup> [OD <sub>50</sub> /ml]
rStx2e/11/04	USL-Überstand von Stamm SB221	320	445.000	1.100
rStx2e/01/05	USL-Überstand von Stamm SB221	1.834	20.000.000	210.000
23/11/04	USL-Überstand von Stamm 23	329	< 20	negativ <sup>4)</sup>
23/02/05	USL-Überstand von Stamm 23	550	< 20	negativ
23/03/05	USL-Überstand von Stamm 23	1.451	< 20	negativ

**Erläuterungen:** 1) Anzucht bei 30 °C über 24 h; 1 mM IPTG für 24 h;  
 2) Die CD<sub>50</sub>/ml wurde im Verozell-Zytotoxizitätstest ermittelt;  
 3) Die OD<sub>50</sub>/ml wurde im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA ermittelt;  
 4) **negativ** befundet, da Extinktionswert unterhalb des Cut-Offs;  
**USL-Überstand** = Ultraschalllysat-Überstand.



#### 4.5.1 Mortalität in Abhängigkeit von der rStx2e-Dosis

In dem von uns entwickelten Modell diente die mit dem verabreichten rStx2e verursachte Mortalität als primärer Parameter, um die Auslösung der Ödemkrankheit zu erkennen und um ihren Schweregrad zu bemessen. Um zu prüfen, ob verschiedene rStx2e-Chargen unterschiedlich wirksam waren, wurden in den drei zunächst unternommenen Versuchen zwei Chargen in jeweils mehreren Dosen getestet.

In allen drei Tierversuchen (**A**, **B** und **C**) ergab sich ein direkter Zusammenhang zwischen der eingesetzten rStx2e-Dosis und der Mortalität in den Tiergruppen (**Tabelle 20**). Bei Betrachtung aller 94 Ferkel ergab sich eine signifikante, positive Korrelation ( $p = 0,026$ ). Um Unterschiede in den rStx2e-Chargen zu erfassen wurden auch die Tiergruppen einzeln miteinander verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den **Versuchen A** und **B** ( $p = 0,016$ ) sowie **A** und **C** ( $p = 0,035$ ), dagegen kein signifikanter Zusammenhang zwischen den **Versuchen B** und **C** ( $p = 0,580$ ).

Laut IDT Biologika GmbH traten bereits 24 h nach der Applikation von 0,75 Mio bis 1,5 Mio  $CD_{50}$  (Chargen rStx2e/11/04 bzw. rStx2e/01/05) Augenlidödeme, Koordinationsstörungen, Schreckhaftigkeit und rudernde Bewegungen auf (LÜDER, 2005). Die Toxin-Charge rStx2e/01/05 führte bei gleicher Dosis zu einer höheren Sterblichkeit als die Charge rStx2e/11/04. So verstarben bei einer rStx2e-Dosis von 1,50 Mio  $CD_{50}$  der Charge rStx2e/11/04 69 % der Ferkel, dagegen bei 1,50 Mio  $CD_{50}$  der Charge rStx2e/01/05 alle Ferkel. Beim Einsatz von 1,0 Mio bzw. 0,75 Mio  $CD_{50}$  lag der Unterschied bezüglich der Mortalität zwischen beiden eingesetzten Chargen bei 40 % bzw. 21 %. Sowohl die Applikation von 0,25 Mio  $CD_{50}$  rStx2e/11/04 als auch die Verabreichung der rStx2e-freien *E. coli*-Lysat-Chargen (23/11/04 und 23/02/05) haben alle Ferkel überlebt.

#### 4.5.2 Humorale Immunantwort auf die intravenöse rStx2e-Applikation

Die Ferkel wurden vor und nach der intravenösen rStx2e-Applikation auf *E. coli*-spezifische- und Stx2e-neutralisierende Antikörper untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es (1) auszuschließen, dass vor rStx2e-Applikation schon entsprechende Antikörper vorhanden waren, und (2) die spezifische humorale Immunantwort der Ferkel auf eine einmalige Verabreichung von rStx2e zu überprüfen. Insgesamt standen 157 Serumproben aus den **Versuchen A**, **B** und **C** zur Untersuchung auf *E. coli*-spezifisches IgG sowie Stx2e-neutralisierende Antikörper zur Verfügung.

**Tabelle 20: Wirkung verschiedener rStx2e-Chargen und -Dosen als Challenge-Material im Ödemkrankheitsmodell an sechs Wochen alten Absatzferkeln**

Tier-versuch Nr.	Grup-pen-Nr.	Challengematerial		Anzahl Ferkel		
		Charge	Dosis [CD <sub>50</sub> ] <sup>1)</sup>	Gesamt	Tot	Mortalität [%]
A, B	1, 1	rStx2e/11/04	1,50 Mio	13	9	69
B	2	rStx2e/11/04	1,00 Mio	8	4	50
A	2	rStx2e/11/04	0,75 Mio	4	2	50
A	3	rStx2e/11/04	0,25 Mio	5	0	0
C	1	rStx2e/01/05	1,50 Mio	14	14	100
C	2	rStx2e/01/05	1,00 Mio	10	9	90
C	3	rStx2e/01/05	0,75 Mio	7	5	71
A	4	23/11/04	1,50 Mio-Äquival.	4	0	0
A	5	23/11/04	0,75 Mio-Äquival.	4	0	0
A	6	23/11/04	0,25 Mio-Äquival.	5	0	0
B	3	23/02/05	1,50 Mio-Äquival.	9	0	0
C	4	23/03/05	1,50 Mio-Äquival.	11	0	0

**Erläuterungen:** 1) **Äquival.** = Äquivalente, d.h. die Dosis der rStx2e-freien *E. coli*-Lysat-Chargen wurde anhand des Gesamtproteingehalts der jeweils verabreichten Dosis von rStx2e/01/05 angepasst. rStx2e-haltiges und rStx2e-freies *E. coli*-Lysat wurden jeweils intravenös appliziert.

### Bestimmung von *E. coli*-spezifischen Serum-IgG-Antikörpern

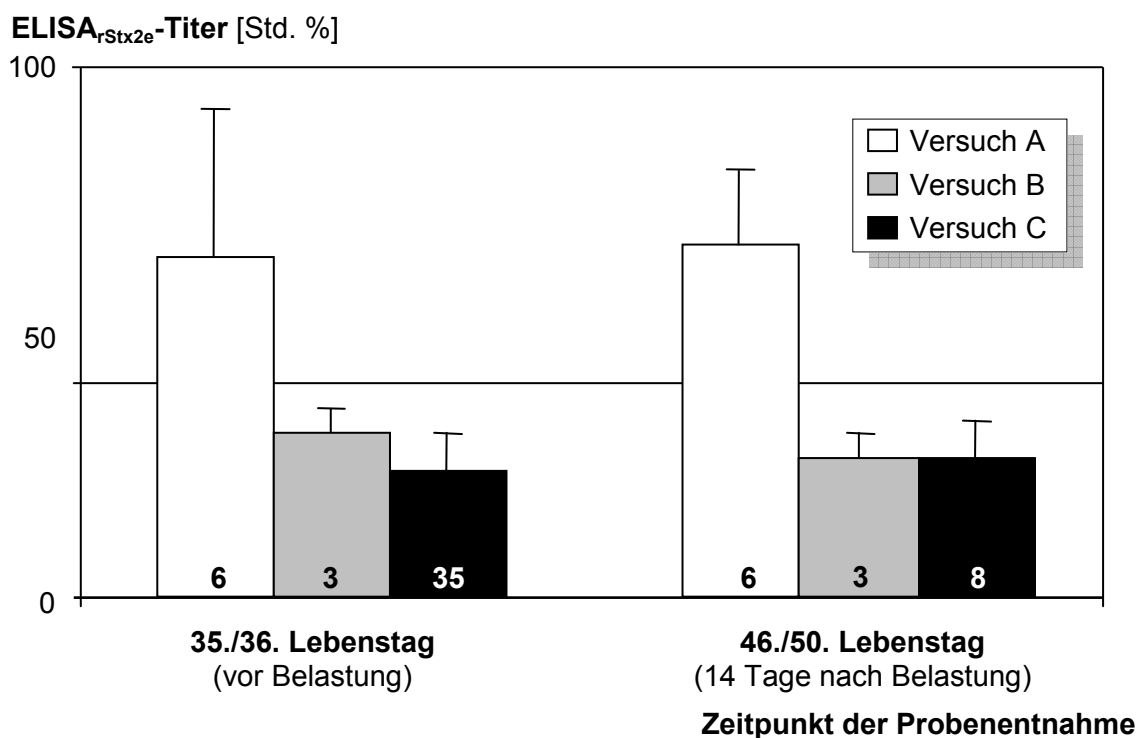
Die Untersuchung der Serumproben erfolgte im ELISA<sub>rStx2e</sub>. Die Serumproben wurden zum Teil für diese Untersuchungen gruppenweise gepoolt. Die erzielten Messwerte sind im Einzelnen im Anhang in der **Tabelle 27** (ab Seite 145) aufgelistet. Aus dem **Versuch A** standen Serumproben vor der Belastung vom 2. und 36. Lebenstag, sowie 14 Tage nach der Applikation von rStx2e vom 50. Lebenstag zur Verfügung. Aus den **Versuchen B** bzw. **C** lagen Serumproben vom 36. bzw. 35. Lebenstag (vor rStx2e-Applikation) und dem 50. bzw. 46. Lebenstag (14 Tage nach rStx2e-Applikation) vor.

Es war kein Unterschied zwischen den am 35./36. Lebenstag (vor rStx2e-Applikation) und den am 46./50. Lebenstag (nach rStx2e-Applikation) ermittelten Titern zu erkennen (**Abbildung 15**). Ferner lagen die Titer im **Versuch A** im Mittel sowohl am 35./36. Lebenstag als auch am 46./50. Lebenstag über den ermittelten Titern in den **Versuchen B** und **C**.

### Bestimmung von Stx2e-neutralisierenden Serum-Antikörpern

Die Untersuchung auf Stx2e-neutralisierende Serum-Antikörper erfolgte im Stx2e-Neutralisationstest auf Verozellen. Die Serumproben wurden für diese Untersuchung gruppenweise gepoolt und getestet. Zur Überprüfung der Stx2e-Neutralisation wurden die Serumpools gegen natives Stx2e (Charge **299/08/04**: 3.718 µg/ml Protein, 93.000 CD<sub>50</sub>/ml, 860 OD<sub>50</sub>/ml) getestet. Alle erhaltenen Einzelwerte sind im Anhang in der **Tabelle 27** aufgelistet.

In keinem der untersuchten Serumpools aus den drei Versuchen waren Stx2e-neutralisierende Antikörper nachweisbar.



**Abbildung 15: Nachweis von *E. coli*-spezifischen Antikörpern bei Ferkeln vor und nach Belastung**  
(Ergebnisse aus dem ELISA<sub>rStx2e</sub>; n = Anzahl untersuchter Serumproben bzw. Serumpools pro Zeitpunkt)

#### 4.6 Immunisierungsversuche an Ferkeln

Es wurden insgesamt sechs **Immunisierungsversuche (D bis I)** an Ferkeln durchgeführt. In allen Versuchen wurden Impfstoffe mit Impfantigen aus chemisch inaktiviertem rStx2e (rStx2e<sub>GA</sub>), und in den **Immunisierungsversuchen H und I** zusätzlich Impfstoffe mit gentechnisch inaktiviertem rStx2e (rStx2e<sub>E167QR170L/02/06</sub>) eingesetzt (**Tabelle 21**). Die Antigenosis der Impfstoffe mit chemisch inaktiviertem Impfantigen wurde anhand der Charge rStx2e/01/05 eingestellt und verabreicht. So enthielt eine Impfdosis zwischen 1.500 und

1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten bzw. 15,75 und 15.750 OD<sub>50</sub>. Die gentechnisch inaktivierte Impfantigen-Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 wurde anhand der im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA, ermittelten rStx2e-Menge eingestellt. Somit besaß eine rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06-Impfantigen-dosis eine OD<sub>50</sub> von 15.750, was einer rStx2e/01/05-Dosis von 1,5 Mio CD<sub>50</sub> entsprach. Als Kontrollen dienten Placebo-geimpfte und nicht geimpfte Ferkel. Die Placebo-Chargen wurden wie die rStx2e-freien *E. coli*-Lysat-Chargen in den **Versuchen A, B und C** auf denselben Gesamtproteingehalt eingestellt wie die Toxin-Chargen. Innerhalb eines Immunisierungsversuchs wurden die Ferkel zweimal geimpft. Zur Überprüfung des Impfschutzes, wurden die Ferkel 9 bis 10 Tage nach der zweiten Immunisierung intravenös mit der Toxin-Charge rStx2e/01/05 belastet.

#### 4.6.1 Wirkung von rStx2e-Impfstoffen auf die Mortalität im Ödemkrankheitsmodell

Eine zusammenfassende Betrachtung der **Versuche D bis I** ist in **Tabelle 21** dargestellt. Beim Einsatz der chemisch inaktivierten Impfantigene war ein Zusammenhang zwischen der verabreichten Impfantigen-dosis und der Mortalität innerhalb der Tiergruppen erkennbar. Somit hatten 98 -100 % der Ferkel die rStx2e-Belastung überlebt, wenn sie mit rStx2e<sub>GA</sub>-Impfantigen in Dosen von 1,50 Mio und 0,75 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten geimpft worden waren. Mit abnehmender Impfdosis nahm der Anteil überlebender Ferkel ab. So überlebten bei einer Impfdosis von 150.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten nur noch 83,4 %, bei 15.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten nur noch 28,6 % und bei einer Impfdosis von 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten kein Ferkel die Belastung. In den sechs durchgeführten Immunisierungsversuchen (**Versuche D bis I**) waren keine Unterschiede in Bezug auf die Wirksamkeit zwischen den drei verschiedenen Glutaraldehyd-inaktivierten rStx2e/01/05-Chargen (rStx2e/01/05<sub>GA</sub>, rStx2e/06/05<sub>GA</sub> und rStx2e/02/06<sub>GA</sub>) erkennbar.

Bei denjenigen Ferkeln, die in den **Versuchen H und I** mit gentechnisch inaktiviertem Impfantigen (Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06) geimpft worden waren, lag die Sterblichkeit insgesamt bei 18 %. Hierbei waren jedoch je nach eingesetztem Adjuvans Unterschiede zu erkennen. Bei Verwendung der Montanide IMS1313 und IMS251C (**Versuch I**) überlebten alle Ferkel die Belastung. Wurden dagegen Impfstoffe mit Aluminiumhydroxid (**Versuche H und I**) oder dem Montanid IMS2525 (**Versuch I**) als Adjuvans verwendet, starben 40 % bzw. 12,5 % der Ferkel. Ein Ferkel, das den Impfstoff mit dem Montanid ISA35 (**Versuch I**) erhielt, überlebte die Belastung nicht.

Placebo-geimpfte Ferkel zeigten eine Mortalitätsrate von insgesamt 70 %, und bei den Kontrolltieren (nicht geimpft, aber belastet) lag die Mortalität über alle Versuche bei 83 % (**Versuche D bis I**). Alle Ferkel, die weder geimpft noch belastet wurden, überlebten den gesamten Versuchszeitraum.

Die Bestimmung der Effizienz der Impfantigene rStx2e<sub>GA</sub> (rStx2e/01/05<sub>GA</sub>, rStx2e/06/05<sub>GA</sub> und rStx2e/02/06<sub>GA</sub>) bzw. rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 erfolgte über alle **Versuche (D bis I)** mit den jeweils belasteten Ferkeln. Gemessen am Schutz der Ferkel gegenüber der rStx2e-Belastung waren geimpfte Ferkel signifikant besser geschützt als die Kontrollferkel (nicht geimpfte und die Placebo-geimpften Ferkel, n = 86). Für rStx2e<sub>GA</sub>-geimpfte Ferkel (n = 88) ergab sich eine 3,87 höhere Wahrscheinlichkeit zu überleben ("Relatives Risiko") als für die Kontrollferkel, für die mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06-geimpften Ferkel (n = 33) sogar eine 3,93 höhere Wahrscheinlichkeit. Insgesamt ergibt sich somit eine Odds Ratio für die rStx2e<sub>GA</sub>-geimpften Ferkel von 15,9 (95 %-Konfidenzintervall: 7,7 – 32,7) und für die rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06-geimpften Ferkel von 17,2 (95 %-Konfidenzintervall: 6,2 – 47,1) im Rahmen der rStx2e-Belastung zu überleben. Bei Betrachtung aller geimpften Ferkel unabhängig vom verwendeten Impfstoff ergibt sich eine Odds Ratio von 16,1 (95 %-Konfidenzintervall: 8,3 – 31,6).

Tabelle 21: Überblick über die durchgeführten Immunisierungsversuche und die in ihnen ermittelten Mortalitätsraten

Tierversuch Nr.	Gruppen-Nr.	Impfstoff			Challengematerial			Anzahl Ferkel	
		Impfantigen-Charge	Dosis <sup>1)</sup>	Adjuvans	Charge	Dosis [CD <sub>50</sub> ]	Gesamt	Tot	Mortalität [%]
<b>D</b>	1	rStx2e/01/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	0	0
	2	rStx2e/01/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,5 Mio	10	1	10
	3	„E. coli-Placebo“ 23/03/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	4	40
	4		keine Impfung		rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	8	80
	5		keine Impfung		rStx2e/01/05	0,5 Mio	10	8	80
	6		keine Impfung		kein Challenge		10	0	0
<b>E</b>	1a	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	2 <sup>2)</sup>	20
	1b	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,75 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	1 <sup>2)</sup>	10
	1c	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,15 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	0	0
	2	„NaCl-Placebo“ NaCl <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	9	90
	3	„E. coli-Placebo“ 23/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> -Äquival.	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	8	80
	4		keine Impfung		rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	9	90
<b>F</b>	5		keine Impfung		kein Challenge		10	0	0
	6	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	7	0	0
			keine Impfung		rStx2e/01/05	0,75 Mio	8	6	75
<b>G</b>	1		keine Impfung		kein Challenge		8	0	0
	2	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,15 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	8	3	37
	3	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	15.000 CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	7	5	71
	4	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	1.500 CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	8	8	100
<b>H</b>	1		keine Impfung		rStx2e/01/05	0,75 Mio	8	6	75
	2	rStx2e/02/06 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	0	0
	3	rStx2eE-167QR170L/02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	4	40
	4		keine Impfung		kein Challenge		10	0	0
			keine Impfung		rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	8	80

Fortsetzung der Tabelle 21 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 21

Tierversuch Nr.	Gruppen-Nr.	Impfstoff		Challengematerial			Anzahl Ferkel		
		Impfantigen-Charge	Dosis <sup>1)</sup>	Adjuvans	Charge	Dosis [CD <sub>50</sub> ]	Gesamt	Tot	Mortalität [%]
1		rStx2e/02/06 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	Al <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub>	rStx2e/01/05	0,75 Mio	1	0	0
2		rStx2eE <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	IMS2525	rStx2e/01/05	0,75 Mio	8	1	12
3		rStx2eE <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	IMS1313	rStx2e/01/05	0,75 Mio	9	0	0
4		rStx2eE <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	IMS251C	rStx2e/01/05	0,75 Mio	5	0	0
5		rStx2eE <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	ISA27	rStx2e/01/05	0,75 Mio	0	--	--
6		rStx2eE <sub>E167QR170L</sub> /02/06	15.750 OD <sub>50</sub>	ISA35	rStx2e/01/05	0,75 Mio	1	1	100
7		keine Impfung			rStx2e/01/05	0,75 Mio	10	10	100

**Erläuterungen:** 1) **CD<sub>50</sub>-Äquival.** = Die verabreichte Impfantigen-Dosis an Placebo-Chargen entsprach im Gesamtproteingehalt der Charge rStx2e/01/05.

2) Diese Ferkel sind an Pneumonie / Pleuritis erkrankt und gestorben.

3) Im **Versuch I** wurden je Gruppe 10 Ferkel geimpft, jedoch wurden nicht alle Ferkel der rStx2e-Belastung unterzogen.

**Al<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>** = Aluminiumhydroxid;

Die zytotoxische Stx2e-Dosis [**CD<sub>50</sub>**] wurde im Verzell-Zytotoxizitätstest ermittelt.

Die Stx2e-Dosis [**OD<sub>50</sub>**] wurde im RIDASCREEN® Verotoxin ELISA ermittelt.

Eine Impfantigendosis von 15.750 OD<sub>50</sub> entsprach einer Stx2e-Dosis von 1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten der Charge rStx2e/01/05.

#### 4.6.2 Humorale Immunantwort auf die Impfung mit rStx2e-Impfstoffen

Von den mit rekombinantem Shigatoxoid immunisierten Ferkeln wurden Serumproben gewonnen und mit dem ELISA<sub>rStx2e</sub> auf *E. coli*-spezifisches IgG (**Versuche D** und **E**) bzw. im Stx2e-Neutralisationstest auf Stx2e-neutralisierende Antikörper (**Versuche D** bis **I**) untersucht. Vorrangiges Ziel dieser Untersuchungen war es, anhand der humoralen Immunantwort der Ferkel die Eigenschaften der verschiedenen Impfstoffe zu quantifizieren. So sollte geklärt werden, ob (1) die rStx2e-Impfstoffe in der Lage sind die Bildung von zirkulierenden Stx2e-neutralisierenden Antikörpern zu induzieren, (2) die Antikörpertiter durch mehrfache rStx2e-Applikation gesteigert werden können und (3) die Menge der Stx2e-neutralisierenden Antikörper im Serum als Maß für die Immunität herangezogen werden kann.

##### 4.6.2.1 Induktion von Antikörpern gegen *E. coli*-Antigene

Die Serumproben aus den **Versuchen D** und **E** wurden mit dem ELISA<sub>rStx2e</sub> untersucht und hierfür teilweise gruppenweise gepoolt und getestet. Erreichte eine gepoolte Serumprobe einen Wert von 50 Std. % oder mehr, wurden alle Serumproben, die in diesem Pool vertreten waren, einzeln nachgetestet. Alle einzelnen Messwerte sind im Anhang in **Tabelle 27** aufgelistet.

Bei allen Ferkelgruppen in den **Versuchen D** und **E** konnte 19 Tage nach der ersten Impfung (am 28. Lebenstag) der niedrigste ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer nachgewiesen werden, wogegen alle Ferkelgruppen am 55. Lebenstag (nach der Belastung), den höchsten ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer aufwiesen (**Tabelle 22**). Die mittleren ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer am ersten und am dritten Untersuchungszeitpunkt (9. Lebenstag vor Versuchsbeginn bzw. 37./38. Lebenstag nach der 2. Impfung) lagen stets zwischen den Werten vom 28. und 55. Lebenstag.

Bereits 19 Tage nach der ersten Impfung wiesen die Ferkel der Gruppe 2 (**Versuch D**) im Mittel signifikant höhere ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer auf, als die nicht geimpften Ferkel der Gruppen 4 und 5. Auch im **Versuch E** war ein signifikanter Anstieg bei der Gruppe 1c gegenüber den nicht geimpften bzw. den Placebo-geimpften Ferkeln zu beobachten. Während zwischen den mittleren ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titern der beiden geimpften Tiergruppen aus **Versuch D** am 37. Tag (nach der 2. Impfung) kein signifikanter Unterschied festzustellen war (Gruppen 1 und 2), waren die mittleren ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer der Kontrollgruppen (Placebo, bzw. nicht geimpft) signifikant niedriger. In dem **Versuch E** wiesen die Ferkel der Gruppe 1c zu diesem Zeitpunkt den höchsten mittleren ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer auf. In allen Tiergruppen stieg nach der Belastung der mittlere ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer an. Die mit *E. coli*- oder NaCl-Placebo geimpften Ferkel reagierten im Mittel erst nach der rStx2e-Belastung mit einem deutlichen Titeranstieg.



**Tabelle 22: Nachweis von *E. coli*-spezifischen Serum-IgG-Antikörpern bei Ferkeln vor und nach der Impfung mit rStx2e-Impfstoffen bzw. vor und nach der intravenösen Applikation von rStx2e (Ergebnisse aus dem ELISA<sub>rStx2e</sub>)**

Tier- ver- such- Nr.	Grup- pen- Nr.	Anzahl Ferkel	Impfstoff		Anti-rStx2e-Titer [Std. %] <sup>2)</sup>				
			Impfantigen- Charge	Dosis <sup>1)</sup>	9. LT (Tag der 1. Impfung)	28. LT (19 Tage nach 1. Impfung)	37. / 38. LT (9-10 Tage nach 2. Impfung)	55. LT (17-18 Tage nach Belastung)	
D	1	10	rStx2e/01/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	32,3 ± 29,5 <sup>a</sup>	25,4 ± 18,5 <sup>a</sup>	62,7 ± 26,4 <sup>abcd</sup>	72,1 ± 27,4	
D	2	10	rStx2e/01/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	53,6 ± 33,8 <sup>abc</sup>	45,8 ± 25,7 <sup>abcd</sup>	70,8 ± 41,2 <sup>efgh</sup>	108,3 ± 44,2 <sup>a</sup>	
D	3	10	„ <i>E. coli</i> -Placebo“ 23/03/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> - Äquival.	33,4 ± 2,1 <sup>b</sup>	30,2 ± 13,4	32,6 ± 12,2 <sup>ae</sup>	81,6 ± 26,2	
D	4	10	keine Impfung		46,0 ± 1,6	17,3 ± 2,8 <sup>b</sup>	28,9 ± 8,7 <sup>bf</sup>	55,8 ± 2,2	
D	5	10	keine Impfung		41,8 ± 1,1	14,3 ± 1,9 <sup>c</sup>	26,3 ± 1,0 <sup>cg</sup>	39,2 ± 34,8	
D	6	10	keine Impfung		29,3 ± 0,5 <sup>c</sup>	15,8 ± 1,5 <sup>d</sup>	27,0 ± 1,4 <sup>dh</sup>	40,7 ± 15,4 <sup>a</sup>	
E	1a	10	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub>	57,2 ± 33,8	37,3 ± 11,5	40,6 ± 11,3 <sup>m</sup>	65,0 ± 17,8	
E	1b	10	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,75 Mio CD <sub>50</sub>	34,3 ± 6,6	33,0 ± 9,2	43,9 ± 9,5	71,2 ± 24,6	
E	1c	10	rStx2e/06/05 <sub>GA</sub>	0,15 Mio CD <sub>50</sub>	62,5 ± 25,1	48,7 ± 21,2 <sup>mnop</sup>	62,3 ± 29,0 <sup>mnop</sup>	98,1 ± 40,5 <sup>m</sup>	
E	2	10	„NaCl-Placebo“ NaCl <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> - Äquival.	35,6 ± 0,2	32,7 ± 8,8 <sup>m</sup>	42,1 ± 18,4	60,9 n. b.	
E	3	10	„ <i>E. coli</i> -Placebo“ 23/06/05 <sub>GA</sub>	1,50 Mio CD <sub>50</sub> - Äquival.	49,5 ± 39,2	26,7 ± 7,5 <sup>n</sup>	28,7 ± 11,4 <sup>n</sup>	69,4 ± 37,5	
E	4	10	keine Impfung		30,4 ± 9,4	21,0 ± 8,1 <sup>o</sup>	22,1 ± 6,0 <sup>o</sup>	39,6 n. b.	
E	5	10	keine Impfung		30,7 ± 4,1	27,7 ± 4,7 <sup>p</sup>	33,2 ± 10,2 <sup>p</sup>	37,4 ± 7,4 <sup>m</sup>	

**Erläuterungen:** Darstellung von Mittelwert ± Standardabweichung der Proben einer Gruppe.

LT = Lebenstag; n. b. = nicht bestimmbar, da nur ein Wert vorhanden;

1) **CD<sub>50</sub>-Äquival.** = Die verabreichte Impfantigen-Dosis an Placebo-Chargen entsprach im Gesamtproteingehalt der Charge rStx2e/01/05;

2) Mittelwerte mit identischen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich signifikant (t-Test, p ≤ 0,01).

#### 4.6.2.2 Induktion von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern

Die Untersuchung der Serumproben auf Stx2e-neutralisierende Antikörper erfolgte im Stx2e-Neutralisationstest auf Verozellen. Von allen sechs Immunisierungsversuchen (**Versuche D bis I**) wurden die Serumproben vor der ersten Immunisierung (Nullproben) und 9 bis 10 Tage nach der zweiten Immunisierung (vor der rStx2e-Belastung) getestet. Aus den **Versuchen D und E** wurden die Serumproben 19 Tage nach der ersten Impfung und 17 bis 18 Tage nach der rStx2e-Belastung untersucht. Für den Stx2e-Neutralisationstest wurden die Serumproben teilweise gruppenweise gepoolt und getestet. Erzielte eine Poolprobe einen  $OD_{rel}$ -Wert von 50 % relativer Zellaktivität oder mehr, wurden die Serumproben dieses Pools einzeln nachgetestet. Für Serumproben nach der zweiten Immunisierung, bei denen eine relative Zellaktivität von  $\geq 50$  % nachgewiesen wurde, wurde der Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörper [ $Std_{NT}$  %] mittels Endpunkttitration bestimmt. Alle ermittelten Einzelmesswerte sind im Anhang in der **Tabelle 27** dargestellt.

In keinem der sechs **Immunisierungsversuche D bis I** waren vor der ersten Impfung Stx2e-neutralisierende Antikörper in einer Poolprobe nachweisbar, da alle Ferkel einen Stx2e-nAkt-Titer von weniger als 10  $Std_{NT}$  % aufwiesen. Auch waren Stx2e-neutralisierende Antikörper bei den Kontrollferkeln (Placebo-geimpfte Gruppen bzw. nicht geimpft) vor der Belastung mit rStx2e niemals vorhanden.

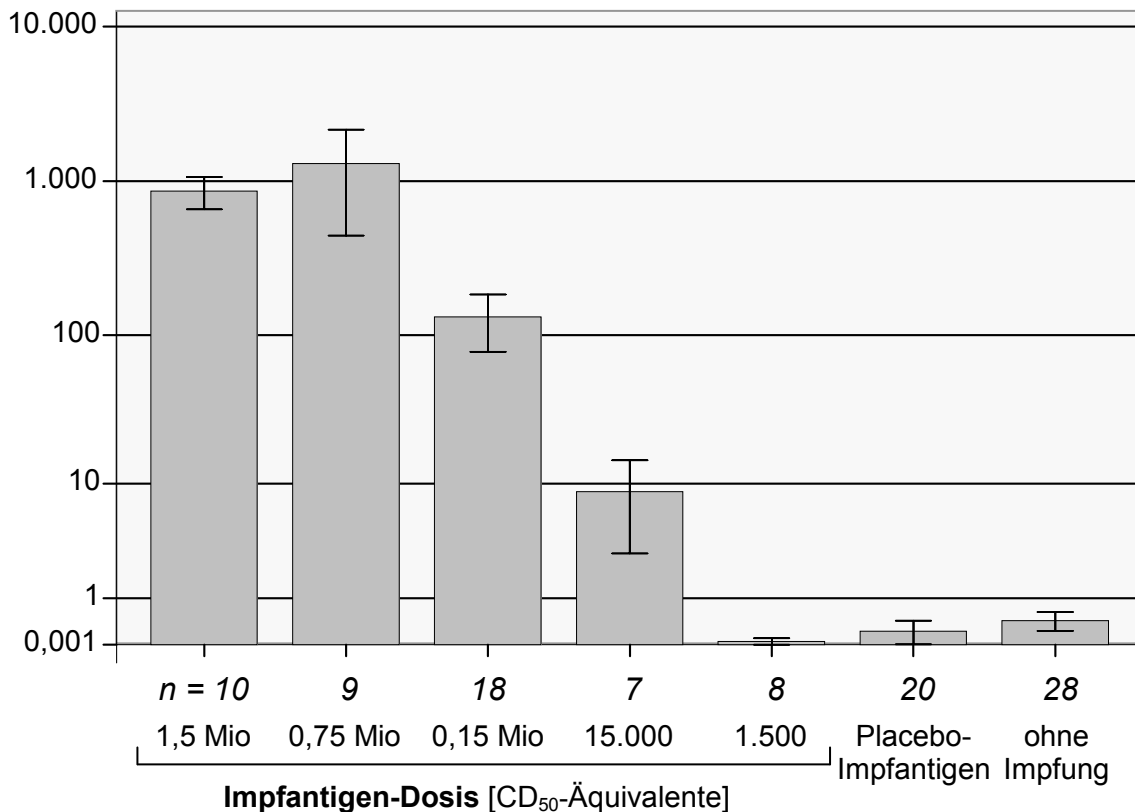
In dem **Immunisierungsversuch D** traten bereits 17 Tage nach der ersten Immunisierung mit 1,5 Mio  $CD_{50}$ -Äquivalenten der Charge rStx2e/01/05<sub>GA</sub> bei zwei Ferkeln (Serumprobe R-3181/05 und R-3183/05) Stx2e-neutralisierende Antikörper mit Titern von 31,2 und 39,2  $Std_{NT}$  % auf. Nach der zweiten Impfung wiesen 19 der 20 mit 1,5 Mio  $CD_{50}$ -Äquivalenten der Charge rStx2e/01/05<sub>GA</sub> geimpften Ferkel Stx2e-neutralisierende Antikörper auf. Ein mit rStx2e/01/05<sub>GA</sub> geimpftes Ferkel, in dessen Serumprobe auch nach der zweiten Immunisierung ein Stx2e-Titer von weniger 10  $Std_{NT}$  % nachgewiesen wurde, überlebte als einziges der geimpften Ferkel die rStx2e-Belastung nicht.

Bei den **Versuchen E und G** wurde deutlich, dass die minimal zu verimpfende Antigendosis für rStx2e/06/05<sub>GA</sub> bei 0,75 Mio  $CD_{50}$ -Äquivalenten liegen muss, damit Stx2e-neutralisierende Antikörper von  $> 10$   $Std_{NT}$  % bei jedem Impfling induziert werden. Ferkel, die mit 1,5 Mio bzw. mit 0,75 Mio  $CD_{50}$ -Äquivalenten der Charge rStx2e/06/05<sub>GA</sub> immunisiert worden waren, wiesen in diesen Versuchen die höchsten Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern auf und überlebten alle die Belastung mit rStx2e. Drei Ferkel (zwei mit 1,5 Mio- und eins mit 0,75 Mio  $CD_{50}$ -Äquivalenten der Charge rStx2e/06/05<sub>GA</sub> geimpft) verstarben laut Mitteilung von IDT Biologika GmbH an Pneumonie und Pleuritis. Bei der darauffolgenden, bakteriologischen Untersuchung der drei verstorbenen Ferkel konnten Mykoplasmen, *Hämophilus parasuis*, *Streptococcus suis* und  $\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken nachgewiesen werden (LÜ-

DER, 2005). Bei den mit 0,15 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten der Charge rStx2e/06/05<sub>GA</sub> geimpften Schweine überlebten 83,4 % die Belastung, von denen 80 % Stx2e-neutralisierende Antikörper von > 10 Std<sub>NT</sub> % aufwiesen. Von den sieben mit 15.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten von rStx2e/06/05<sub>GA</sub> geimpften Ferkeln überlebten nur zwei Ferkel (28,6 %), von denen nur bei einem (14,3 %) Stx2e-neutralisierende Antikörper detektiert werden konnten. Bei keinem der mit 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten von rStx2e/06/05<sub>GA</sub> immunisierten Ferkel waren Stx2e-neutralisierende Antikörper nachweisbar. Wie in der **Abbildung 16** dargestellt ist, nahm mit abnehmender Impfantigen-Dosis die Höhe der Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörper ab. Zur Prüfung der Mittelwertunterschiede auf Signifikanz wurden alle Titer logarithmiert. Die daraus ermittelten arithmetischen Mittelwerte wurden dann einer ANOVA-Analyse mit dem post-hoc-Test nach Bonferroni unterworfen. Die Analyse ergab, dass die Ferkel-Gruppen, in denen mit Impfdosen von mindestens 0,15 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten je Ferkel geimpft worden war, im Mittel signifikant höhere Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern aufwiesen als die Kontrollgruppen (Placebo-geimpfte Gruppen bzw. nicht geimpfte Ferkel). Zwischen den Ferkeln, die mit 1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten geimpft worden waren, und denen die 0,75 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten erhalten hatten, bestand kein signifikanter Unterschied. Diese beiden Gruppen besaßen jedoch im Mittel einen signifikant höheren Titer als diejenige Ferkelgruppe, in denen 0,15 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalente je Ferkel und Impfung verabreicht worden war ( $p \leq 0,001$ ).

Neben dem chemisch inaktivierten rStx2e wurde auch gentechnisch inaktiviertes rStx2e (rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06) an Ferkel verimpft, wobei in dem **Tierversuch H** Aluminiumhydroxid und im **Tierversuch I** die Montanide IMS2525, IMS1313, IMS251C, ISA27 und ISA35 als Adjuvans eingesetzt wurden. Als Positivkontrollgruppe dienten in diesen Versuchen Ferkel, die mit rStx2e/06/05<sub>GA</sub> (1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten, Adjuvans Aluminiumhydroxid) geimpft wurden, und als Negativkontrollgruppe nicht geimpfte Ferkel. Es wurde in diesen Versuchen deutlich, dass die Stärke der Immunreaktion bei den Impfungen (gemessen an den Titern Stx2e-neutralisierender Antikörper) nicht nur vom Impfantigen und seiner Dosis, sondern auch von dem verwendeten Adjuvans abhing (**Abbildung 17**). So erwies sich die Kombination aus rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 und IMS1313 als diejenige Kombination, die Stx2e-neutralisierende-Antikörper bei allen Ferkeln besonders stark induzierte. Am schwächsten reagierten die Ferkel, wenn sie mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 in Kombination mit Aluminiumhydroxid geimpft wurden. Die Antikörpertiter zeigten die größte Spannweite in denjenigen Gruppen, die rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 mit Adjuvans IMS251C oder Adjuvans ISA27 bekommen hatten. Während einige der Ferkel Stx2e-neutralisierende Antikörper von 10.964 Std<sub>NT</sub> % oder mehr aufwiesen, waren bei anderen Ferkeln dieser Gruppen keine Stx2e-neutralisierenden Antikörper (Titer < 10 Std<sub>NT</sub> %) nachweisbar. Trotzdem lag der mittlere Titer in der Gruppe der mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 und IMS251C geimpften Ferkel signifikant höher als in der Gruppe der nicht immunisierten Ferkel.

### Titer der Stx2e-neutralisierenden Antikörper (Mittelwert +/- Standardfehler)



#### Abbildung 16: Nachweis Stx2e-neutralisierender Serum-Antikörper bei Ferkeln nach zweimaliger Impfung mit der Impfantigen-Charge rStx2e/06/05<sub>GA</sub>

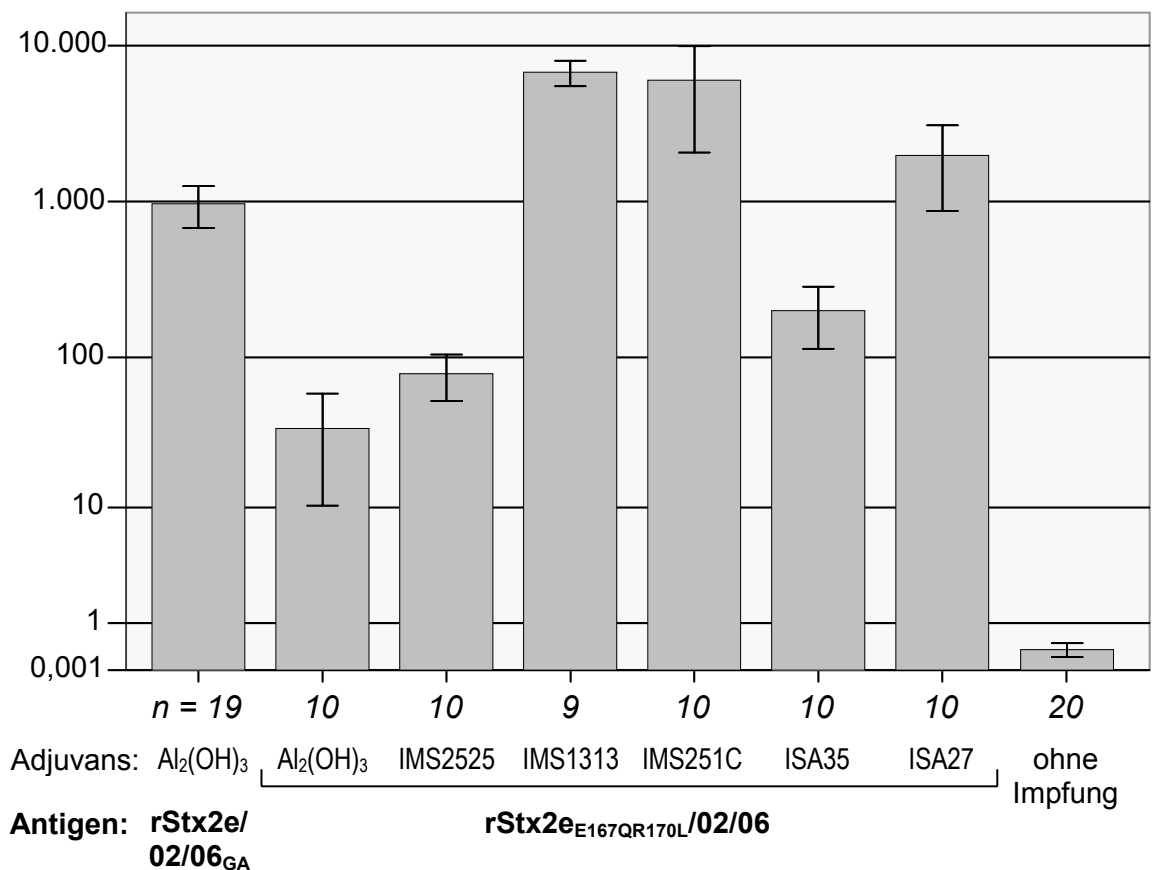
Ergebnisse aus dem Stx2e-Neutralisationstest, Serumproben aus den **Versuchen E und G**, genommen am 37. bzw. 38. Lebenstag, das heißt 9 bis 10 Tage nach der 2. Impfung;  
 n = Anzahl Proben/Pools je Gruppe.

Nach Logarithmierung der Std<sub>NT</sub> %-Werte zeigte sich, dass alle geimpften Ferkel-Gruppen, einen signifikant höheren Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern aufwiesen als die nicht geimpften Kontrolltiere. Die mittleren Stx2e-nAk-Titer der Gruppen, die mit rStx2e/06/05<sub>GA</sub> (1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten, Adjuvans Aluminiumhydroxid) oder rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 (Adjuvans IMS1313 oder IMS251C) geimpft worden waren, zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander. Diese drei Gruppen besaßen aber alle signifikant höhere Stx2e-nAk-Titer als die Ferkelgruppen, die mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 und den Adjuvantien Aluminiumhydroxid, IMS2525 oder ISA35 geimpft worden waren. Die Ferkel, die mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 und dem Adjuvans ISA27 immunisiert wurden, wiesen nur gegenüber den nicht geimpften Ferkeln und den mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 und Aluminiumhydroxid geimpften Ferkeln einen signifikant höheren Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern auf (ANOVA-Analyse mit post-hoc Test nach Bonferroni, 0,001 < p ≤ 0,038).

Da einige der Ferkel, die mit gentechnisch inaktivierten rStx2e geimpft worden waren, nach der zweiten Immunisierung deutlich höhere Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern aufwiesen, wurden von 10 ausgewählten Ferkeln auch die Serumproben untersucht, die bereits nach der ersten Immunisierung (28. LT.) genommen worden waren. Eines dieser Ferkel wies bereits nach einmaliger Immunisierung einen Titer von 143,8 Std<sub>NT</sub> % auf. Hierbei handelte es sich um ein Ferkel aus der mit rStx2e/06/05<sub>GA</sub> geimpften Gruppe. Die Serumproben von den mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06-geimpften Ferkeln lagen zu diesem Zeitpunkt ausnahmslos unter der Nachweisgrenze.

Somit konnte in allen sechs Immunisierungsversuchen sowohl bei den mit rStx2e/06/05<sub>GA</sub>- als auch bei den rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06-geimpften Ferkeln eine Serokonversion zwischen den beiden Zeitpunkten vor der ersten Impfung und nach der zweiten Impfung beobachtet werden.

#### Titer der Stx2e-neutralisierenden Antikörper (Mittelwert +/- Standardfehler)



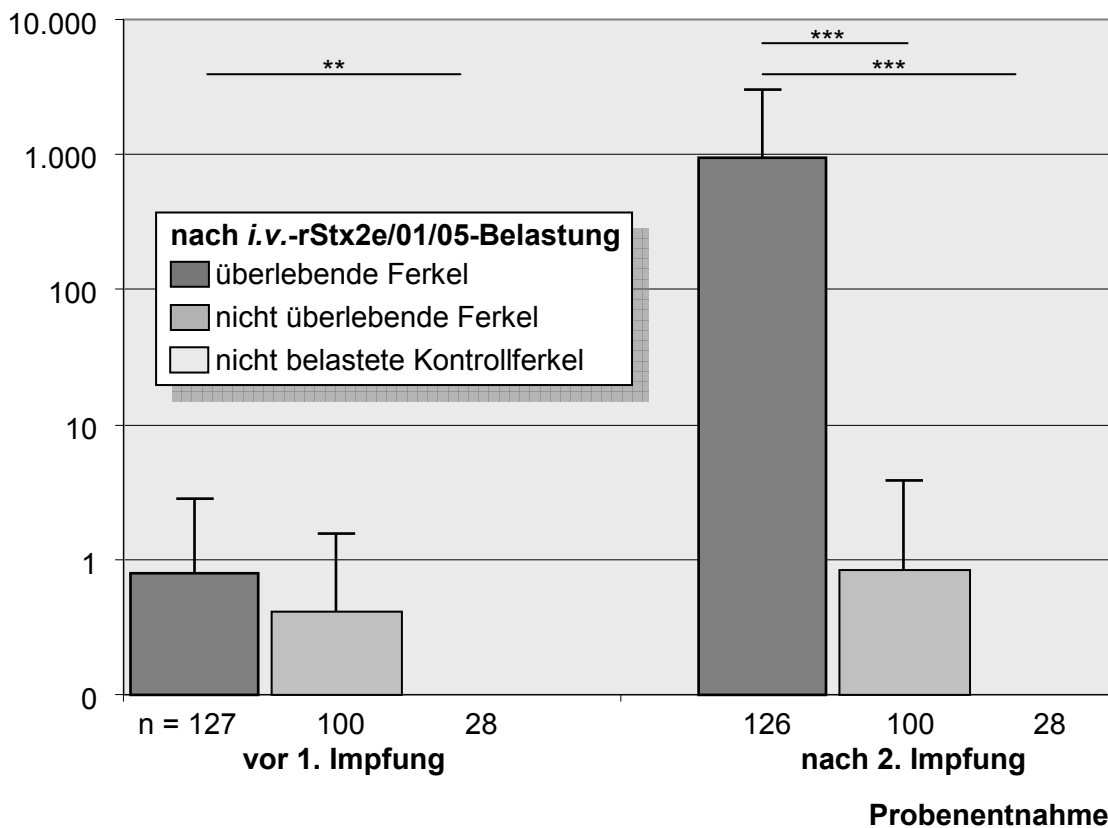
**Abbildung 17: Nachweis Stx2e-neutralisierender Serum-Antikörper bei Ferkeln nach zweimaliger Impfung mit rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 in Abhängigkeit von dem verwendeten Adjuvans (Impfdosis je 1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten)** Ergebnisse aus dem Stx2e-Neutralisationstest, Serumproben aus den **Versuchen H** und **I**, genommen am 37. bzw. 38. Lebenstag, das heißt 9 bis 10 Tage nach der 2. Impfung; n = Anzahl Proben/Pools je Gruppe.

#### 4.6.2.3 Zusammenhang zwischen dem Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern und der Mortalität

Zusätzlich wurde geprüft, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Titern an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern vor der intravenösen Belastung mit einer tödlichen Dosis an rStx2e und dem Überleben der Ferkel bestand (**Abbildung 18**). Hierzu wurden die Daten aus den **Immunisierungsversuchen D bis I** herangezogen.

Dabei zeigte sich, dass Ferkel, die die rStx2e-Belastung überlebten, nach der zweiten Immunisierung im Mittel signifikant höhere Titer aufgewiesen hatten, als Ferkel die infolge der Intoxifikation verstarben. Ferkel, die weder geimpft, noch belastet wurden und auch Ferkel, die die Belastung nicht überlebten, wiesen stets Titer unter 10 Std<sub>NT</sub> % auf.

#### Stx2e-nAk [Std<sub>NT</sub> %]



**Abbildung 18:** Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern im Serum und dem Überleben des rStx2e-Challenge bei Ferkeln

[Stx2e-Neutralisationstest-Ergebnisse aus **Versuch D bis I**, Serumproben genommen am 9. Lebenstag (vor 1. Impfung) und am 37. bzw. 38. Lebenstag (9 bis 10 Tage nach der 2. Impfung); Mittelwert und Standardabweichung aller Ferkel einer Gruppe]

\*\*\* = hoch signifikanter Unterschied der Mittelwerte (t-Test,  $p \leq 0,001$ )

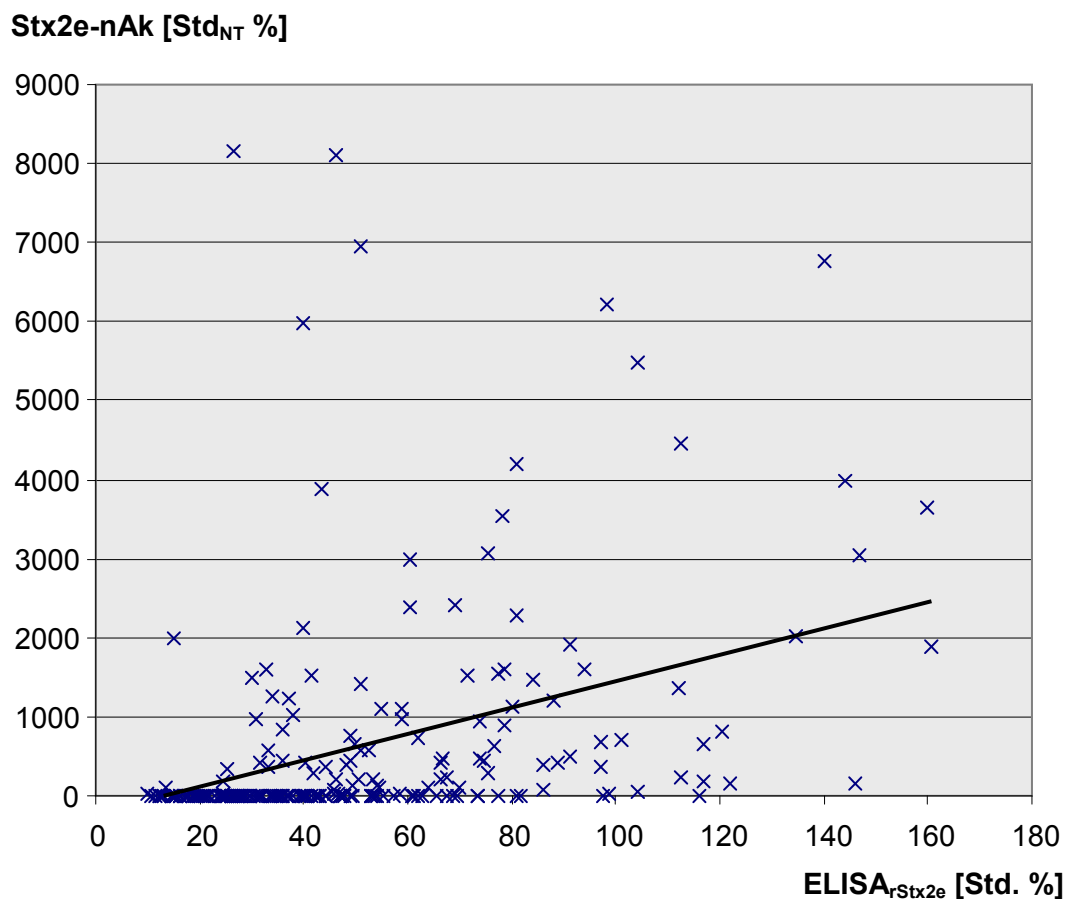
\*\* = signifikanter Unterschied der Mittelwerte (t-Test,  $0,001 < p \leq 0,01$ )

n = Anzahl untersuchter Serumproben

#### 4.6.2.4 Korrelation zwischen den Messdaten aus dem ELISA<sub>rStx2e</sub> und dem Stx2e-Neutralisationstest

Die meisten Serumproben von Ferkeln in den **Versuchen D** und **E** waren sowohl im ELISA<sub>rStx2e</sub> als auch im Stx2e-Neutralisationstest untersucht worden. Um zu prüfen, ob anhand der im ELISA<sub>rStx2e</sub> gemessenen Titer an *E. coli*-spezifischen IgG-Antikörpern auf die Anwesenheit von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern geschlossen werden kann, wurden die Messwerte aus beiden Testsystemen einer Korrelationsanalyse unterzogen (**Abbildung 19**).

Die Werte aus dem ELISA<sub>rStx2e</sub> korrelierten zwar hoch signifikant mit den Std<sub>NT</sub> %-Werten aus dem Stx2e-Neutralisationstest ( $p < 0,001$ ), der Korrelationskoeffizient war aber niedrig ( $r \geq 0,372$ ).



**Abbildung 19:** Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *E. coli*-spezifischen IgG- und Stx2e-neutralisierenden Antikörpern in Serumproben von Ferkeln

(Ergebnisse aus den **Versuchen D** und **E**. Korrelationskoeffizient nach Pearson [ $r$ ] = 0,372; Regressionsgerade [ $y$ ] = 16,694x - 207,79; Signifikanz [ $p$ ] < 0,001)

## 5 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Ziel dieser Doktorarbeit war es, einen Impfstoff auf Basis von rekombinant hergestelltem Stx2e zu entwickeln und dessen immunogene sowie protektive Wirkung an Ferkeln zu testen. Zur rStx2e-Detoxifizierung wurde das rekombinante Shigatoxin 2e einerseits chemisch und andererseits gentechnisch inaktiviert. Um die Protektivität im Ferkel zu quantifizieren wurde ein Ödemkrankheitsmodell etabliert und die humorale Immunantwort der Ferkel erfasst.

### Rekombinante Herstellung von Stx2e

Aufgrund der Daten in der Literatur war zu erwarten, dass aus Feldisolaten Stx2e nicht in ausreichender Menge gewonnen werden kann, um damit ein reproduzierbares Ödemkrankheitsmodell zu entwickeln oder ein Impfantigen herzustellen (MACLEOD und GYLES, 1989). Daher wurde der Weg der rekombinanten Herstellung des Stx2e eingeschlagen. Als Expressionssystem wurde der pET-24b(+)-Vektor und als Wirtszelle der von dem *E. coli*-Stamm B abgeleiteten Stamm BLR(DE3) gewählt. Das pET-Expressionssystem bietet die Möglichkeit, die Proteinexpression über den Induktor IPTG zu steuern. Durch die Zugabe von IPTG zur Kultur kommt es zur Blockade des *lacI*-Repressors und somit zur Freilegung des T7/*lac*- und *lacUV5*-Promotors, was zu einer gezielten Expression des klonierten Proteins führen soll (DUBENDORFF und STUDIER, 1991; STUDIER und MOFFATT, 1986). Da der BLR(DE3)-Stamm die für die Transkription benötigte T7-RNS-DNS-Polymerase aufweist, die über den *lacUV5*-Promotor exprimiert wird, wurde der Stamm mit dem *stx2e*-beinhaltenden-pET-Vektor 24b(+) transformiert.

Zuerst wurde ein *E. coli*-Transformant mit dem gewünschten Insert aus den *stx2e*-Genen für die A- und B-Untereinheiten hergestellt, in dessen *stxA2e*-Gen in weiteren Schritten die Nukleotid-Mutationen für die gewünschten Aminosäuresubstitutionen E167Q bzw. R170L eingeführt wurden. Um Konformationsveränderungen an den rStx2e-Holotoxinen zu vermeiden, wurde das natürliche Stopcodon von *stxB2e* bei der Klonierung erhalten. Damit konnte vermieden werden, dass die His-Tag kodierende Sequenz aus pET-24b(+) an die B-Untereinheit angehängt wird. Die beiden *stx2e*-Gene besitzen bei STEC-2e-Feldisolaten jeweils eigene Ribosomenbindungsstellen (Rbs) (WEINSTEIN et al., 1988). Die Ribosomenbindungsstelle vor dem *stxA2e*-Gen, die laut Literatur die schwächere der beiden *stx2e*-assoziierten Rbs ist, wurde im Rahmen der Klonierung durch die Rbs von pET-24b(+) ersetzt, die vor *stxB2e* dagegen beibehalten (HABIB und JACKSON, 1993).

Der eingeschlagene Weg der Klonierung erwies sich als sehr erfolgreich, da bereits im dritten Transformationsdurchgang *stx2e*-tragende *E. coli*-Transformanten gewonnen wurden,



in die in den weiteren Schritten die gewünschten Nukleotid-Substitutionen eingeführt wurden. Die Verwendung von rStx2e im Rahmen des Ödemkrankheitsmodells setzt voraus, dass das rekombinant hergestellte Protein in seiner Struktur und Funktionalität mit dem Wildtypotoxin übereinstimmt. Auch sollte bei dem Impfantigen nur die gewünschten Aminosäuresubstitutionen eingeführt werden, der Rest des rStx2e<sub>MUT</sub> dagegen nicht verändert werden, um nicht potentiell protektive Epitope zu zerstören. Die Überprüfung der Transformanten wurde sowohl auf DNS-Ebene (pET-PCR, stx2e-PCR und Sequenzanalyse) als auch auf Proteinebene (Tricine-SDS-PAGE, Immunoblot, Verozell-Zytotoxizitätstest, RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA und SIFIN-Stx2e-ELISA) durchgeführt. Dabei wurde die Identität der stx2e-Genprodukte von Stamm SB221 und der rStx2e-Mutanten SB221<sub>E167QA216D</sub> #1, SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7, SB221<sub>E167Q</sub> #9 und SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 durch Vergleich mit den publizierten Sequenzdaten bestätigt (WEINSTEIN et al., 1988).

Bei der Sequenzanalyse der rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 und SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 wurde eine nicht geplante Mutation auf Position 216 festgestellt, bei der Alanin durch Asparaginsäure (A216D) ersetzt wurde. Trotz der "proof-reading" Aktivität der *Pfu Turbo*® DNA Polymerase ist offenbar ein Lesefehler verursacht worden, der sich auf die Aminosäuresequenz von rStxA2e ausgewirkt hat. Zu der Frage, ob die Toxizität oder die Immunogenität von StxA2e durch den Austausch von Alanin durch Asparaginsäure auf Position 216 beeinträchtigt wird, sind in der Literatur keine Angaben zu finden. Da sich jedoch bei Stx, Stx1 und Stx2 auf Position 216 eine Asparaginsäure befindet, ist es unwahrscheinlich, dass sich die Aminosäuresubstitution A216D bei Stx2e negativ auf dessen Toxizität ausgewirkt hat (JACKSON et al., 1987; UNKMEIR und SCHMIDT, 2000).

Das rStx2e konnte sowohl nativ, als auch nach der gezielten Einführung von Punktmutationen als inaktiviertes Toxoid in deutlich größeren Mengen als bei dem EDEC-Feldisolat Stamm 299 gewonnen werden. Somit wiesen die USL-Überstände von rStx2e (rStx2e/01/05) einen 244fach und die USL-Überstände von rStx2e<sub>MUT</sub> (rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06) einen 960fach höheren Antigen-Gehalt auf als der USL-Überstand vom EDEC-Feldisolat Stamm 299. Auch im Verozell-Zytotoxizitätstest zeigte die Charge rStx2e/01/05 eine 215fach stärkere Toxizität auf als der USL-Überstand vom Stamm 299. Dies stimmt mit den Angaben in der Literatur überein, denn MACLEOD und GYLES konnten in ihren rStx2e-haltigen USL-Überständen eine 100fach stärkere Verozell-Zytotoxizität nachweisen als in USL-Überständen von EDEC-Feldisolaten (O139:K12) (MACLEOD und GYLES, 1989).

Wie die SDS-PAGE- und die Immunoblotanalyse deutlich machten, bildeten die gentechnisch veränderten *E. coli*-Stämme, und zwar sowohl SB221 als auch die rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten, mehr rStx2e, wenn sie ohne IPTG angezüchtet wurden als mit IPTG-Zugabe in der Kultur. Dies bestätigte sich auch bei der Bestimmung der rStx2e-Verteilung auf die verschiedenen Bakterienzellkompartimente mittels Verozell-Zytotoxizitätstest und SIFIN-Stx2e-

ELISA. Gleichzeitig wurde auch ein Einfluss von IPTG auf das Wachstumsverhalten der Bakterien deutlich. So wurden bei SB221<sub>E167QR170L</sub> #2 nach Inkubation ohne IPTG eine 1,2fach höhere optische Dichte der Bakterienkultur erreicht als mit 1 mM IPTG. Ursache der verminderten rStx2e-Expression und der reduzierten Bakterienzellvermehrung könnte sein, dass das rStx2e für den *E. coli*-Stamm BLR(DE3) selbst toxisch war, wie das für Stx bei SKINNER und JACKSON (1998) beschrieben wurde. Durch die Induktion mit IPTG würde das vermehrt gebildete Stx2e zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese in den *E. coli*-Zellen führen, was das reduzierte Wachstum der Kulturen erklären würde. Allerdings ließ sich der inhibitorische Effekt auf das Bakterienwachstum bei Stx in der Untersuchung von SKINNER und JACKSON durch die Mutation von Stx zu Stx<sub>E167D</sub> komplett aufheben. Dies war in der hier durchgeführten Untersuchung mit Stx2e aber nicht zu beobachten, denn auch bei den rStx2e-Mutanten wurde weniger rStx2e<sub>MUT</sub> gebildet, wenn zur Kultur IPTG zugegeben wurde. Allerdings war in den Zellkompartimenten in denen viel rStx2e<sub>MUT</sub> vorlag (USL-Lysate der rStx2e-Mutanten) auch noch Zytotoxizität gegenüber Verzellen nachweisbar, wenn auch nur in geringer Menge. Ursächlich hierfür könnte sein, dass das Stx2e einen stärkeren toxischen Effekt auf die Ribosomen von Prokaryonten hat, als das Stx, die über andere Epitope vermittelt werden könnte.

Eine weitere Ursache für die inhibierende Wirkung des IPTG könnte ein defekter *lac*-Repressor sein, wodurch die Expression der Proteine durch Zugabe von IPTG nicht gesteigert werden kann, da die Gene bereits im nicht induzierten Zustand abgelesen werden. Da nicht die kompletten Plasmide, sondern nur das jeweilige *stx2e*-Insert mittels Sequenzierung überprüft wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das *lac*-Repressorgen defekt war. Gegen die These vom defekten *lac*-Repressor sprechen aber die Ergebnisse mit Glukose-Zusätzen im Anzuchtmedium, nach denen die Zugabe von 0,5 % Glukose zur Starterkultur und auch zu den Kulturen von Stamm SB221 und den rStx2e-Mutanten die Basalexpression von rStx2e und rStx2e<sub>MUT</sub> unterdrückte. Dies deutet eher darauf hin, dass das *lac*-Repressorgen intakt war, der *lacUV5*-Promotor unter den hier verwendeten Standardkulturbedingungen aber dennoch nicht hinreichend reprimiert wurde. Es ist bekannt, dass *E. coli*-Bakterien bei Mangel an Glukose andere Kohlenstoffquellen wie z. B. Glyzerol verstoffwechseln und es dadurch zu einem Anstieg von cAMP kommt. cAMP bildet mit dem Genaktivatorprotein CRP (cAMP Rezeptor Protein) einen Komplex, der vor den *lacUV5*-Promotor bindet und die Expression der T7-RNS-DNS-Polymerase stimuliert. Die Bildung von cAMP wird durch das Phosphotransferasesystem (PTS) kontrolliert (SCHLEGEL, 1992). Aufgrund der vermehrten Bildung der T7-RNS-DNS-Polymerase kommt es zu einer gesteigerten rStx2e-Expression (GROSSMAN et al., 1998). Durch den Zusatz von Glukose zur *E. coli*-Kultur reduzierte sich die Basalexpression von rStx2e bei Stamm SB221 und den rStx2e-Mutanten, jedoch resultierte dies auch in einer geringeren rStx2e- und rStx2e<sub>MUT</sub>-Ausbeute.

Daher wurde bei der Produktion der rStx2e-Toxin- und rStx2e-Impfantigenchargen auf den Zusatz von Glukose zur *E. coli*-Kultur verzichtet. Durch die Effekte des Glukose-Zusatzes wurde immerhin bestätigt, dass das pET-Expressionssystem intakt ist und funktioniert.

Da es bei der kommerziellen Produktion von rStx2e-Impfantigen wichtig ist, große Mengen an rStx2e herzustellen, wurde einerseits untersucht, in welchem Zellkompartiment am meisten rStx2e bzw. rStx2e<sub>MUT</sub> vorlag, und andererseits mit welcher Methode die größten Mengen an rStx2e und rStx2e<sub>MUT</sub> gewonnen werden können. In den Bakterienzellen lag das meiste rStx2e und rStx2e<sub>MUT</sub> zellassoziiert vor, deutlich geringere Mengen waren direkt im Periplasma oder aber in der Umgebung der Bakterienzellen nachweisbar. Dies entspricht Angaben in der Literatur, nach denen rekombinantes und natives Stx2e ebenfalls überwiegend zellassoziiert in den Ultraschallpräparaten der Bakterien vorlag (MACLEOD und GYLES, 1989). Stx1 ist ebenfalls wie Stx2e zellassoziiert, während Stx2 vorwiegend im Kulturüberstand vorzufinden ist (STROCKBINE et al., 1986). In der hier vorliegenden Untersuchung war nur wenig Toxin im periplasmatischen Raum nachweisbar, so dass das Stx2e anscheinend schnell in den Kulturüberstand ausgeschleust wird. Derzeit sind in der Literatur keine Angaben über die Funktionalität der Stx2e-Signalpeptide, die Ausschleusung von Stx2e aus dem Zytoplasma oder den Ort des Zusammenbaus von Stx2e zu finden. MAKINO und Kollegen beobachteten die größte rStx2e-Menge im Kulturüberstand. Nach Einführung der Mutation E167Q/R170L verschob sich das Mengenverhältnis vom Überstand zugunsten des Zytoplasmas. Daher wird vermutet, dass die Aminosäuresubstitutionen zu Konformationsveränderungen am rStxA2e führten, und diese dann sekundär die Fähigkeit zur Sekretion veränderten (MAKINO et al., 2001).

Neben dem Effekt der reduzierten bzw. sogar aufgehobenen Verozell-Zytotoxizität der rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten wurde von diesen auch circa 16.200fach mehr Toxoid gebildet, als rStx2e von dem Stamm SB221. In beiden eingesetzten ELISA-Systemen (SIFIN-Stx2e-ELISA und RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA) wurde die vermehrte rStx2e<sub>MUT</sub>-Expression im Vergleich zur rStx2e-Expression bestätigt. Die bessere Ausbeute liegt möglicherweise daran, dass das rStx2e<sub>MUT</sub> weniger toxisch für die Bakterienzellen ist als rStx2e und somit die rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten mehr rStx2e<sub>MUT</sub> bilden können. Bei den rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten SB221<sub>E167QA216D</sub> #1 und SB221<sub>E167QR170LA216D</sub> #7 konnte kein signifikanter Einfluss durch die zusätzliche, nicht geplante Mutation A216D in der A1-Untereinheit von rStx2e auf die gebildete Antigenmenge festgestellt werden.

Obwohl die Anzuchtbedingungen nicht variiert wurden, setzten insbesondere die rStx2e<sub>MUT</sub>-Transformanten bei den verschiedenen Versuchen jeweils deutlich unterschiedlich große Mengen an rStx2e<sub>MUT</sub> in den Kulturüberstand frei. Eine mögliche Ursache für die geringe Reproduzierbarkeit könnte sein, dass es sich hierbei trotz des konsequenten Verwendens von stets frisch angesetzten Medien und Puffer um ein sensibles System handelte, bei dem

bereits minimale pH-Änderungen die Expressionsstärke beeinflussen können. Eine weitere Erklärung könnte im Alter der Subkulturen begründet liegen, das zwischen 2 und maximal 20 Tagen variierte.

### **Etablierung eines Ödemkrankheitsmodells**

Um einen Impfstoff gegen die Ödemkrankheit auf seine immunogenen und protektiven Eigenschaften prüfen zu können, musste zuerst ein Ödemkrankheitsmodell etabliert werden. In Anlehnung an die Vorgaben zum Modell der Saugferkeldiarrhoe (Europäische Pharmakopöe 4.6.) sollte in dem zu etablierenden Ödemkrankheitsmodell bei den Kontrolltieren mindestens eine 40 %-ige Mortalität und 85 %-ige Morbidität erreicht werden (ANONYM, 2003). Anhand der Daten in der Literatur wurde ein Ferkelmodell basierend auf der *i.v.*-Applikation von rStx2e entwickelt (MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD et al., 1991c). Dies hatte zum einen den Vorteil, dass die rStx2e-Menge vorab mittels RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA und Verozell-Zytotoxizitätstest quantifizierbar war, auf seine biologische Aktivität geprüft werden konnte und entsprechend der verursachten Ödemkrankheitssymptome in seiner Dosis genau einstellbar war. Durch die intravenöse Applikation war zudem die Menge an rStx2e, denen die Probanden ausgesetzt wurden, genauer dosierbar als wenn lebende EDEC-Bakterien oral appliziert werden. Die *i.v.*-Applikation erschien angesichts der kleinen Gruppengrößen auch deswegen vorteilhafter, weil die Belastung auf diese Weise homogener und die Ergebnisse besser reproduzierbar waren. Die orale Applikation von lebenden EDEC-Bakterien birgt das Problem, dass externe Einflussfaktoren (Futteraufnahme, -art, Tränke) sich stärker auswirken können und durch größere Tierzahlen kompensiert werden müssen. Bei der Applikation von rStx2e kommen zudem variabel exprimierte andere Virulenzeigenschaften des zur Belastung eingesetzten Stammes, wie beispielsweise die Expression von Enterotoxinen und Fimbrien, nicht so zum Tragen wie bei einem Infektionsversuch.

Durch intravenöse Applikation des rekombinant hergestellten Stx2e konnte die Ödemkrankheit erfolgreich bei sechs Wochen alten Absetzferkeln hervorgerufen werden. Bereits 24 h nach der Applikation von 0,75 Mio bis 1,5 Mio  $CD_{50}$  rStx2e/11/04 bzw. rStx2e/01/05 traten deutliche Symptome der Ödemkrankheit auf (LÜDER, 2005). Beobachtet wurden Augenlidödeme, schwankender Gang, Koordinationsstörungen, rudernde Bewegungen, veränderte Stimme und Schreckhaftigkeit. Da bei den Ferkeln, die mit rStx2e-freiem *E. coli*-Lysat behandelt wurden, keine entsprechenden Symptome auftraten, waren diese Symptome dem rekombinanten Stx2e zuzuschreiben. Durchfälle wurden während des Versuchszeitraumes bei keinem der Ferkel festgestellt (LÜDER, 2005). Dies stimmt mit den

publizierten Studien überein, bei denen die Ferkel ebenfalls intravenös mit rStx2e belastet wurden (MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD et al., 1991c).

Anhand der durch die IDT Biologika GmbH übermittelten Daten zur Mortalität in den verschiedenen Versuchsgruppen wurde vor allem bei den Versuchen A und B ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,016$ ) zwischen der verabreichten rStx2e-Dosis und der Sterblichkeit festgestellt. Dies liegt daran, dass in beiden Versuchen dieselbe Toxin-Charge (rStx2e/11/04) eingesetzt wurde. Die Korrelation zwischen der verabreichten rStx2e-Dosis und der Mortalität war bei den Versuchen A und C dagegen schwach ( $p = 0,035$ ) und bei den Versuchen B und C sogar gar nicht signifikant ( $p = 0,580$ ). In Versuch C wurde im Vergleich zu den Versuchen A und B die Toxin-Charge rStx2e/01/05 eingesetzt, was die nicht signifikante Korrelation erklärt. Es zeigte sich, dass die Reproduzierbarkeit der Dosis-Einstellung zwischen den beiden eingesetzten rStx2e-Chargen schwankte. So starben bei einer Dosis von 1 Mio  $CD_{50}$  der Charge rStx2e/01/05 insgesamt 90 % der Ferkel, dagegen beim Einsatz der Charge rStx2e/11/04 nur 50 %.

Aufgrund der Mortalitätsunterschiede wurden daher die beiden rStx2e-Chargen im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA nachuntersucht. Die Untersuchung der beiden zur Belastung auf jeweils 1,0 Mio  $CD_{50}$  eingestellten Toxin-Chargen im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA ergab tatsächlich, dass die Charge rStx2e/01/05 ca. 4,2 mal soviel rStx2e-Antigen enthielt wie die Charge rStx2e/11/04. Der unterschiedliche  $OD_{50}$ -Gehalt erklärt somit die voneinander abweichende Toxizität im Tierversuch trotz angeblich gleichem  $CD_{50}$ -Gehalt. Ab diesem Zeitpunkt wurden zur Quantifizierung von rStx2e-Mengen stets beide Tests (Verozell-Zytotoxizitätstest und RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA) angewandt. Außerdem wurde der Verozell-Zytotoxizitätstest insoweit modifiziert, dass ab diesem Zeitpunkt ein Aliquot der rStx2e-Charge rStx2e/03/05 bei jedem Test als Standard mitgeführt wurde, um die Vergleichbarkeit der an verschiedenen Tagen durchgeführten Tests zu gewährleisten. Anhand der jeweils ermittelten Standardkurve wurde der entsprechende Test dann als gültig (die ermittelte Toxizitätsdosis des Standards musste zwischen 450.000 und 500.000  $CD_{50}/ml$  liegen) oder nicht gültig bewertet. Der Verozell-Zytotoxizitätstest diente zur Bestimmung der toxischen Aktivität von *E. coli*-Präparaten und lieferte die Daten, nach denen die rStx2e<sub>GA</sub>-Impfantigen-Dosen eingestellt wurden. Der RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA wurde insbesondere zur Quantifizierung und Einstellung von rStx2e<sub>MUT</sub>-Impfantigen verwendet.

Die Überprüfung des Ödemkrankheitsmodells erfolgte primär anhand der Mortalität der Ferkel nach Applikation von rStx2e, da es sich um einen leicht erfassbaren, gut standardisierbaren und mit der Literatur vergleichbaren Parameter handelt. Außerdem wurden die Daten über die klinischen und pathologischen Parameter aus den durchgeführten Versuchen A bis I von der IDT Biologika GmbH nicht zur Verfügung gestellt.

Neben der Mortalität wurde bei den Ferkeln auch die humorale Immunantwort (Anwesenheit von *E. coli*-spezifischen IgG- und Stx2e-neutralisierenden Antikörpern) auf die Belastung mit rStx2e untersucht. In keinem der beiden Nachweissysteme war ein Anstieg spezifischer Antikörpertiter zu beobachten, weder im ELISA<sub>rStx2e</sub> zum Nachweis *E. coli*-spezifischer IgG-Antikörper noch im Verozell-Neutralisationstest zum Nachweis Stx2e-neutralisierender Antikörper. Dies stimmt mit den Angaben in der Literatur zu natürlichen STEC-2e-Infektionen überein. Auch GANNON und Kollegen (1988) fanden in Serumproben von 45 Saug- und Absetzferkeln, welche zum Teil sogar kulturell-bakteriologisch positiv für EDEC waren, keine Stx2e-neutralisierenden Antikörper. Bei den serologischen Verlaufsuntersuchungen von WIELER und Kollegen (1995) in einem Betrieb mit Ödemkrankheit wurde gezeigt, dass die Ferkel erst 2-3 Wochen nach dem Absetzen im Immunoblot nachweisbare Antikörpermengen aufwiesen. Für die Beobachtung, dass solche Antikörper nach der Belastung bei unseren Ferkel nicht auftraten, könnte ursächlich sein, dass der Zeitraum zwischen *i.v.*-Inokulation und Probennahme (14 d) zu kurz war, um hinreichende Antikörpermengen zu bilden. Andererseits kann aber auch die nur einmalige, kurzfristige Exposition gegenüber dem Antigen zu wenig gewesen sein. Es ist vorstellbar, dass erst die anhaltende oder mehrfach wiederholte Exposition und Auseinandersetzung mit Stx2e, wie sie vermutlich bei der natürlichen EDEC-Infektion bzw. Einwirkung von Stx2e stattfindet, die Immunantwort gegen dieses Antigen forciert.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der Versuche A, B und C dahingehend bewerten, dass die Applikation von aufgereinigtem rStx2e zur Induktion der experimentellen Ödemkrankheit im Ferkel am besten geeignet erscheint, weil es das eigentliche krankmachende Agens darstellt, keine zusätzlichen Symptome auslöst (Diarrhoe, Endotoxinschocks), gut quantifizierbar ist und die Applikationsdosis gut eingestellt werden kann.

### **Chemische und gentechnische Inaktivierung von rStx2e**

Das Stx2e stellt ein hochpotentes Toxin dar, von dem bereits 3 ng/kg KG bei intravenöser Verabreichung in der Lage sind bei den betroffenen Ferkel Ödemkrankheit auszulösen (MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD et al., 1991c). Um das mögliche Risiko von auftretenden Impfschäden aufgrund der hohen rStx2e-Toxinaktivität möglichst gering zu halten, muss das Stx2e-Holotoxin vor der Applikation an die Ferkel einer Detoxifizierung unterzogen werden. Als Verfahren zur Inaktivierung von Shigatoxinen sind die Inkubation in wässrigen Formaldehyd- oder Glutaraldehydlösungen (DOCIC und BILKEI, 2003; GORDON et al., 1992; JOHANSEN et al., 1997; KARG und BILKEI, 2002; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1991a; WADDELL et al., 1996) und gentechnische Modifikationen durch Aminosäuresubstitutionen im katalytischen Zentrum der A-Untereinheit beschrieben

worden (BASU et al., 2003; DERESIEWICZ et al., 1992; GORDON et al., 1992; HOVDE et al., 1988; JACKSON et al., 1990a; SKINNER und JACKSON, 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Zytotoxizität des rStx2e mit Glutaraldehyd und Formaldehyd ebenfalls sehr effektiv reduziert werden. Die inaktivierende Wirkung von Formaldehyd war dabei stärker bei 37 °C als bei 4 °C. Dennoch schnitt Glutaraldehyd insgesamt besser ab als Formaldehyd. So reduzierte die Behandlung mit 0,1 % Glutaraldehyd die Zytotoxizität der Charge rStx2e/01/05 um den Faktor 1.000 bis 2.000.

Neben dem Wirksamkeitsnachweis offenbarten die Untersuchungen, dass die rStx2e-Detoxifizierung mit Aldehyden aber auch mit einigen Nachteilen behaftet war. Denn alle auf diese Weise hergestellten rStx2e-Impfantigen-Chargen wiesen bei der Überprüfung im Verozell-Zytotoxizitätstest noch Resttoxizität auf. Dies beruhte bei einigen mit Formaldehyd hergestellten Chargen sicherlich auf der unvollständigen rStx2e-Detoxifizierung. Bei anderen Chargen dürfte diese Toxizität dagegen durch Aldehydreste verursacht worden sein. Denn auch *E. coli*-Placebo-Impfantigene reagierten nach der Behandlung mit Glutaraldehyd bzw. mit Formaldehyd im Test toxisch, das hierfür verwendete Ausgangsmaterial (Charge 23/03/05) dagegen nicht.

Ein weiterer, vor allem technisch nachteiliger Effekt der Aldehydbehandlung bestätigte sich für die Antikörper-basierte Quantifizierung der Impfantigene. So wurden in den rStx2e-haltigen Lösungen nach deren Behandlung mit Aldehyd (unter Beachtung des Verdünnungseffektes) mit dem RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA stets ein geringerer rStx2e-Antigen-Gehalt gemessen als vorher, beispielsweise nach Glutaraldehydbehandlung um den Faktor 12 – 52 weniger. Wahrscheinlich haben viele rStx2e-Moleküle unter der Einwirkung von Glutaraldehyd oder Formaldehyd Epitope zur Bindung der monoklonalen Antikörper im ELISA verloren, weshalb sie im ELISA nicht mehr erkannt wurden. Bei der Verwendung von Formaldehyd war dieser Effekt deutlicher als beim Einsatz von Glutaraldehyd, was man als Hinweis auf eine stärker degradierende Wirkung des Formaldehyds werten kann. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits bei der Formaldehyd-Inaktivierung des Diphtherie-Toxins von *Corynebacterium diphtheriae*, welches wie Stx2e ein AB-Toxin ist, beobachtet (METZ et al., 2003). Auch hier sank die Antigenkonzentration während der Formaldehyd-Behandlung scheinbar ab. Ein "Epitop-Mapping" machte deutlich, dass tatsächlich nicht die Antigenmenge reduziert worden war, sondern nur die Anzahl der für den Nachweis relevanten Epitope (METZ et al., 2003). In der hier präsentierten Untersuchung wurde deshalb die für die Immunisierung benötigte Menge an rStx2e-Impfantigen immer anhand der toxischen Aktivität (gemessen in  $CD_{50}/ml$ ) des Ausgangsmaterials ermittelt. Um die Dosis der gentechnisch inaktivierten Impfantigene derjenigen der chemisch inaktivierten rStx2e-Antigene anzugleichen, wurden der im RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA gemessene rStx2e-Gehalt (gemessen in  $OD_{50}/ml$ ) des Ausgangsmaterials und etwaige Verdünnungen dieses

Materials als Bezugsgrößen gewählt. Die Dosierungen von inaktivierten Impfantigenen erfolgten deshalb stets in Form von „CD<sub>50</sub>-Äquivalenten“, um die Vergleichbarkeit untereinander und mit den Angaben in der Literatur zu gewährleisten.

Die vom Stx2e ausgehende Resttoxizität sowie die im Impfstoff vorhandenen Aldehydreste liefern Argumente gegen die chemische Herstellung von rStx2e-Toxoidimpfstoffen. GORDON und Kollegen (1992) beobachteten sogar ED-ähnliche Symptome und Gewichtsverluste bei Ferkeln, die mit einem Antigen auf Basis von Formalin-behandeltem rStx2e geimpft worden waren. Man vermutete ebenfalls, dass die aufgetretenen vaskulären Läsionen dadurch entstanden, dass das Toxin nicht vollständig inaktiviert worden war; alternativ könne das behandelte rStx2e-Molekül renaturiert und wieder toxisch geworden sein (GORDON et al., 1992; JOHANSEN et al., 1997; MACLEOD und GYLES, 1991a). Auf Grund der bei gleicher Einwirkkonzentration besseren Wirkung von Glutaraldehyd wurde in den Immunisierungsversuchen der vorliegenden Arbeit ausschließlich Impfstoffe auf Basis mit Glutaraldehyd-behandeltem rStx2e verabreicht.

In der zweiten, parallel zur chemischen Inaktivierung verfolgten Strategie sollte die Toxizität von rStx2e durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren gentechnisch aufgehoben werden. Nach eingehender Prüfung der Fachliteratur, wurden hierfür bestimmte Aminosäuren im katalytischen Zentrum der StxA2e-Untereinheit ausgewählt, um die enzymatische Aktivität des rStx2e-Moleküls zu eliminieren. Die gentechnische Inaktivierung der Shigatoxine mittels Aminosäuresubstitution im katalytischen Zentrum war zuvor bereits von anderen Gruppen am Stx von *Shigella dysenteriae* sowie an Stx1, Stx2 und Stx2e von *E. coli* erfolgreich durchgeführt worden (BASU et al., 2003; DERESIEWICZ et al., 1992; GORDON et al., 1992; HOVDE et al., 1988; JACKSON et al., 1990a; SKINNER und JACKSON, 1997). Innerhalb des katalytischen Zentrums spielen insbesondere die beiden Aminosäuren Glutamat auf Position 167 und Arginin auf Position 170 eine wichtige Rolle für die toxische Wirkung der Shigatoxine (DERESIEWICZ et al., 1992). Der Austausch einer oder beider Aminosäuren kann die Toxizität der Shigatoxine reduzieren bzw. vollständig aufheben (BASU et al., 2003; DERESIEWICZ et al., 1992; GORDON et al., 1992; HOVDE et al., 1988; JACKSON et al., 1990a; SKINNER und JACKSON, 1997). Deshalb wurde für die ortsspezifische Mutagenese im Stx2e die sowohl von BOSWORTH als auch von GORDON und Kollegen beschriebene Mutation von Glutamat zu Glutamin auf Position 167 (E167Q) ausgewählt, welche die Zytotoxizität am stärksten reduziert hatte (**Tabelle 4**). Gleichzeitig wurde erwartet, dass durch den Austausch von nur einer bzw. zwei Aminosäuren die Proteinstruktur und somit protektive Epitope erhalten bleiben. In der Fachliteratur wurde bereits darüber berichtet, dass die s.k.-Applikation von 100 µg rStx2e<sub>E167Q</sub> bei den Ferkeln keinerlei krankhafte Reaktionen verursachte, insbesondere keine ED-ähnlichen Läsionen (GORDON et al., 1992; SAMUEL und GORDON, 1996). In der eigenen Untersuchung



reduzierte die Aminosäuresubstitution E167Q die Zytotoxizität um den Faktor 2.281, die Resttoxizität betrug somit nur noch 342 CD<sub>50</sub>/ml im Gegensatz zu dem Parallelansatz des Stammes SB221 mit 780.000 CD<sub>50</sub>/ml. Dieses Resultat stimmte sehr gut mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein, wonach der Austausch der Aminosäure auf Position 167 die Zytotoxizität von Stx, Stx1, Stx2 und Stx2e zwar verminderte, aber nicht vollständig aufhob (GORDON et al., 1992; JACKSON et al., 1990a; OHMURA et al., 1993; SKINNER und JACKSON, 1997).

Um das rStx2e-Impfantigen vollständig zu inaktivieren, wurde neben der Mutation auf Position 167 eine zusätzliche Aminosäuresubstitution auf Position 170 (Arginin durch Leucin; R170L) eingeführt. Diese Strategie beruhte auf Berichten, dass nach Impfung mit rStx1<sub>E167QR170L</sub> mehr IgG und mehr Stx1-neutralisierende Antikörper induziert wurden als nach Impfung mit rStx1<sub>E167QR170G</sub>. Wahrscheinlich verursacht die Aminosäuresubstitution R170G eine stärkere Konformationsänderung im rStx1-Molekül als R170L, wodurch dann leider auch ein protektives Epitop des Toxins verloren geht (ISHIKAWA et al., 2003). In den eigenen Untersuchungen besaß das rStx2e<sub>E167QR170L</sub> als einzige Mutante keinerlei nachweisbare verozytotoxische Aktivität mehr, denn die Präparate aus allen Kompartimenten der entsprechenden *E. coli*-Bakterien reagierten im Verozell-Zytotoxizitätstest stets negativ. Gleiches wurde für rStx2e und rStx1 beschrieben (ISHIKAWA et al., 2003; MAKINO et al., 2001). Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass noch eine Resttoxizität unterhalb der Nachweisgrenze des Verozell-Zytotoxizitätstests in den entsprechenden Präparationen vorhanden war. Es gibt in der Literatur jedoch keine Hinweise, dass dieser etwaige Rest an aktivem rStx2e noch zu ED-Läsionen in Ferkeln führen kann. So traten selbst auf die s.k.-Applikation von 100 µg rStx2e<sub>E167Q</sub>, das im Verozelltest zwar nur eine geringe aber noch deutlich nachweisbare Zytotoxizität aufwies, keinerlei krankhafte Reaktionen bei den Ferkeln auf (GORDON et al., 1992).

### **Immunisierungsversuche**

Sowohl das chemisch als auch das gentechnisch inaktivierte rStx2e wurde in Immunisierungsversuchen an Ferkeln eingesetzt. Insgesamt wurden sechs kontrollierte Immunisierungsversuche (D bis I) unternommen, in denen fünf verschiedene Antigen-Mengen des Glutaraldehyd-inaktivierten rStx2e und eine Antigendosis der gentechnisch inaktivierten Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 geprüft wurden. Das Impfschema sah jeweils eine zweimalige Impfung der Ferkel mit je einer Impfung am 9. und am 28. Lebenstag vor. Dieses Schema orientierte sich zum einen an der Überlegung, dass bereits zum Absetztermin ausreichend Stx2e-neutralisierende Antikörper vorhanden sein sollten und Ferkel in der Praxis bis zum Absetzen allenfalls zweimal geimpft werden können. Zum anderen sollten die Ferkel

mindestens zweimal geimpft werden, damit der Boostereffekt der zweiten Impfung möglichst hohe Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern induzierte. Dies erschien insbesondere auch deshalb notwendig, weil man nicht ausschliessen kann, dass bei manchen Impfungen maternale, Stx2e-neutralisierende Antikörper vorhanden sind, die mit dem applizierten rStx2e-Impfantigen reagieren und dessen immunogene Wirkung schwächen. In zahlreichen Verlaufsuntersuchungen beim Schwein ist festgestellt worden, dass der Spiegel der maternal erworbenen Immunglobuline im Verlauf der ersten vier Lebenswochen abfällt (BICKHARDT et al., 1968). Bereits während dieser Phase sind die Ferkel aber auch in der Lage eigene Immunglobuline zu synthetisieren (BUTLER et al. 2002). Bezogen auf die Ödemkrankheit konnte LEGE (2003) zeigen, dass Ferkel zum oder kurz nach dem Absetzzeitpunkt immunologisch gegenüber dem Erreger der Ödemkrankheit bzw. dem Stx2e weitestgehend ungeschützt sind, da sie keine oder nur sehr wenige Stx2e-spezifische Antikörper aufwiesen. Somit käme eine Impfung zum Zeitpunkt, an dem der Spiegel an maternalen Antikörpern sicher niedrig ist, zu spät, um noch einen Impfschutz induzieren zu können, der bereits zum Absetztermin der Ferkel voll wirksam ist.

Das verwendete Impfschema orientierte sich zudem an den von MACLEOD und GYLES (1991a) erzielten Ergebnissen, die die erste Impfung allerdings erst am 14. Lebenstag der Ferkel setzten. Der bei uns relativ spät gewählte Absetzzeitpunkt (35. Lebenstag) sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass das Immunsystem der Ferkel ausgereift war und es die Impfung in jedem Fall mit der Bildung von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern beantwortete. Dabei sollten so viele Antikörper gebildet werden, dass sie im Stx2e-NT-Test nachweisbar waren und im Idealfall die Ferkel im Ödemkrankheitsmodell schützten. Aus diesem Grund wurden die Ferkel auch erst am 37. bzw. 38. Lebenstag belastet.

### Mortalität

Sowohl die chemisch (rStx2e<sub>GA</sub>) als auch die gentechnisch inaktivierten Impfantigen-Chargen (rStx2e<sub>E167QR170L/02/06</sub>) zeichneten sich im Ödemkrankheitsmodell durch eine gute Schutzwirkung aus. Dies zeigte sich nach zweimaliger Immunisierung und anschließender intravenöser Belastung der Ferkel anhand einer geringeren Mortalität der geimpften Ferkel gegenüber den Kontrolltieren (Placebo-geimpfte bzw. nicht geimpfte Ferkel).

Die Effizienz der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Impfantigene ist im Vergleich zu anderen Studien als sehr gut anzusehen. Die erhobenen Odds Ratio-Werte von 15,9 für rStx2e<sub>GA</sub>-geimpfte bzw. 17,2 für rStx2e<sub>E167QR170L/02/06</sub>-geimpfte Ferkel zeigen, dass selbst unter den vergleichsweise strengen Kriterien des hier etablierten Ödemkrankheitsmodells (hohe intravenöse rStx2e-Belastung) das Risiko für die Ferkel an der Belastung zu sterben, durch die Impfung erheblich gesenkt werden konnte. Bei JOHANSEN und Kollegen (1997)

wurde im Rahmen eines Feldversuches in zwei von Ödemkrankheit betroffenen Betrieben durch die Immunisierung mit rStx2e<sub>GA</sub> eine Odds Ratio von 25,6 erreicht. Auch AWAD-MASALMEH und Kollegen (1989) erzielten in ihrem Infektionsversuch durch die Impfung mit rStx2e<sub>GA</sub> eine sehr gute Odds Ratio von 47,6. Die bei uns auf den ersten Blick schlechter wirkenden Odds Ratios sind vermutlich in dem verwendeten Belastungsmodell begründet. Dass in unseren Versuchen die Belastung höher war als bei JOHANSEN (1997) und AWAD-MASALMEH und Kollegen (1989), kann man daraus schließen, dass die Mortalität bei denjenigen Ferkeln, denen Stx2e-freies Lysat (Placebo) verimpft worden war, bei 10,6 % und 46,9 % lag. In den durchgeführten Immunisierungsversuchen dieser Arbeit lag die Mortalität der mit Placebo geimpften Ferkel dagegen bei 70 %. Ein Grund für die niedrigere Mortalitätsrate bei JOHANSEN (1997) könnte sein, dass es sich bei ihm um einen Feldversuch handelte, in dem keine zusätzliche orale oder intravenöse Belastung der Ferkel mit EDEC oder Stx2e erfolgte, und somit die Ferkel vermutlich mit geringeren Stx2e-Dosen in Kontakt kamen.

In Versuch E sind insgesamt drei Ferkel, die mit dem Impfstoff auf Grundlage von **chemisch inaktiviertem rStx2e (rStx2e<sub>GA</sub>)** geimpft worden waren, im Laufe des Versuches verstorben, ein Ferkel vor und zwei Ferkel 4 bis 12 Tage nach der rStx2e-Belastung. Die pathologisch-anatomische Untersuchung zeigte, dass alle drei Ferkel an hochgradiger Pneumonie und Pleuritis erkrankt waren (LÜDER, 2005). Da bei der anschließenden bakteriologischen Untersuchung bei allen drei verstorbenen Ferkel Mykoplasmen, *Hämophilus parasuis*, *Streptococcus suis* und  $\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken nachgewiesen wurden, ist ein Zusammenhang mit der Impfung (Impfschaden) bzw. mit der rStx2e-Belastung (Impferkrankung) sehr unwahrscheinlich (LÜDER, 2005).

Beim Einsatz von **rStx2e<sub>GA</sub>-Impfstoff** korrelierte die applizierte rStx2e<sub>GA</sub>-Impfdosis negativ mit der Mortalität infolge der rStx2e-Belastung. Demnach lag die minimale Dosis, bei welcher noch 100 % der Ferkel die rStx2e-Belastung überlebten bei 0,75 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten. In ähnlichen Versuchen erzielten MACLEOD und GYLES (1991a) mit der zweimaligen intramuskulären Applikation von 25  $\mu$ g Glutaraldehyd-inaktiviertem, aufgereinigtem rStx2e pro Dosis eine 100 %-ige Überlebensquote bei der intravenösen rStx2e-Belastung von sechs Wochen alten Ferkeln. Bei ca. 50 % der Tiere waren Ödeme an den Augenlidern zu sehen. AWAD-MASALMEH und Kollegen (1989) applizierten vier bis sechs Wochen alten Ferkeln sogar nur einmal eine Impfdosis von 5 mg Glutaraldehyd-inaktiviertem Stx2e und kamen im anschließenden Belastungsversuch immerhin auf eine Überlebensquote von 98,2 %. Nur 14,5 % der Tiere entwickelten Augenlidödeme. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen sind aber nur eingeschränkt miteinander vergleichbar, denn MACLEOD und GYLES belasteten ihre Ferkel durch die intravenöse Applikation von aufgereinigtem rStx2e (6 ng/kg KG) stärker, was sich in einer 100 %igen Mortalität in der Kontrollgruppe äußerte.

Dagegen prüften AWAD-MASALMEH et al. ihr Impfschema mit einem Infektionsversuch, in dem sie ihre Ferkel oral mit EDEC-Bakterien infizierten, was in der Kontrollgruppe nur zu einer 46,9 %igen Mortalität führte. Die Daten in der Literatur und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedenfalls einheitlich, dass das Glutaraldehyd-inaktivierte Stx2e-Toxoid, zur Verwendung als Impfantigen geeignet ist, da entsprechend geimpfte Tiere bei einer Belastung mit rStx2e bzw. EDEC eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit haben, als nicht geimpfte Tiere.

Auch die **gentechnisch inaktivierte Impfantigen-Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06** zeichnete sich nach zweimaliger Verimpfung durch eine gute Schutzwirkung aus. In Übereinstimmung mit der Literatur (MAKINO und Kollegen, 2001) erwies sich die Impfantigen-Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 im Ferkel als atoxisch, denn bei keinem der damit geimpften Probanden traten nach der Applikation irgendwelche Anzeichen der Ödemkrankheit auf. Je nach eingesetztem Adjuvans waren jedoch deutliche Unterschiede in der Schutzwirkung erkennbar. So überlebten beim Einsatz von Aluminiumhydroxid nur 60 % der Ferkel die rStx2e-Belastung, während bei der Verabreichung der Montanide die Überlebensrate zwischen 87,5 und 100 % lag. Zu Belastungsversuchen nach Impfung mit Montanid-adjuvierten Toxoidimpfstoffen gibt es in der Literatur nach meinem Wissen keine Daten. Vielmehr wurde die Immunogenität dieser Impfstoffe ausschließlich anhand von Antikörperantworten gemessen (AUCOUTURIER et al., 2000; WALDERS et al., 2005). Allein Impfstoffe aus MKS-Viren und Montaniden wurden in Belastungsversuchen an Ferkeln evaluiert. Die Mortalität in den Versuchsgruppen wurde aber nicht explizit aufgelistet (COX et al., 2006).

Auffällig war, dass die Überlebensquoten bei den **nicht geimpften Kontrolltieren** (17 %) und bei den **Placebo-geimpften Kontrolltieren** (30 %) über alle sechs durchgeführten Immunisierungsversuche differierten. Der Unterschied von 13 % ist möglicherweise auf eine antigenunspezifische immunstimulierende Wirkung des Adjuvans Aluminiumhydroxid oder der LPS-Bestandteile in den Placebos zurückzuführen. Aluminiumhydroxid fördert TH2-Immunantworten, LPS hingegen TH1-Immunantworten, womit neben humoralen auch zelluläre Immunantworten gefördert werden (COX und COULTER, 1997).

Zudem fiel auf, dass die Mortalität bei den Placebo-geimpften Ferkeln insgesamt sogar niedriger war als bei den Ferkeln, die mit einer Impfdosis von 15.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten bzw. 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten rStx2e<sub>GA</sub> geimpft worden waren. Hierfür könnten mehrere Effekte verantwortlich sein:

(1) **Unspezifische Stimulation der Immunabwehr durch LPS und andere nicht näher definierte Bakterienzellkomponenten.** Für rStx2e<sub>GA</sub>-Impfstoffe mit einer Antigendosis von 15.000 CD<sub>50</sub>- bzw. 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten wurde das Antigen mit physiologischer NaCl-

Lösung stark verdünnt, um diese Dosis einzustellen. So enthielten diese Impfstoffe auch nur 1/100stel bzw. 1/1.000stel der Protein- und der LPS-Menge, die im Placebo enthalten war. Somit könnte das Immunsystem der Placebo-geimpften Ferkel stärker, wenn auch unspezifisch, stimuliert worden sein, als dasjenige der mit gering dosiertem rStx2e-Impfantigen geimpften Ferkel.

(2) **Die Anzahl der getesteten Ferkel.** Während für die Prüfung der Impfantigen-Dosen von 15.000 CD<sub>50</sub>- und 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten jeweils nur sieben bzw. acht Ferkel eingesetzt wurden, wurden insgesamt 30 Ferkel für die Prüfung des Placebos herangezogen. Bei den mit 15.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten geimpften Ferkeln lag die Mortalität auf nahezu gleichem Niveau wie bei den Placebo-geimpften Ferkeln (71,4 % bzw. 70 %). Die mit 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten geimpften Ferkeln verstarben dagegen alle. Wenn in den beiden Impfguppen nur ein einziges Ferkel mehr überlebt hätte, dann hätte sich die Mortalitätsrate aufgrund der geringen Tierzahl deutlich gesenkt. Dagegen hätte ein weiteres überlebendes Ferkel in der Placebogruppe die Mortalität in dieser Gruppe nur geringfügig verändert.

(3) **Unterschiede zwischen den Immunisierungsversuchen verzerren die Zahlen in der Zusammenschau.** Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Immunisierungsversuche isoliert, dann war die Mortalität aller Versuchstiergruppen im Versuch G höher als in anderen Versuchen, obwohl zum Teil dieselben Impfungen vorgenommen wurden. So wurden in Versuch G, neben den Impfantigendosen von 15.000 und 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten, auch die Impfantigendosis von 150.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten geprüft. Im Versuch G überlebten aber nur 63 % der damit geimpften Ferkel und keines wies Stx2e-neutralisierende Antikörper auf. Im Gegensatz dazu überlebten in Versuch E alle in gleicher Weise geimpften Ferkel und bei der Hälfte der Tiere waren Stx2e-neutralisierende Antikörper nachweisbar. Man kann vermuten, dass die Belastung im Versuch G stärker ausfiel als in den anderen Versuchen. Da im Versuch G leider keine Placebo-Gruppe mitgeführt wurde, ging die mutmaßlich höhere Mortalität auch in dieser Gruppe nicht in die Zusammenschau der Daten ein. Warum die Belastung in den einzelnen Versuchen unterschiedlich ausgefallen sein könnte, ist nicht nachvollziehbar. Da alle Ferkel aus der eigenen Zucht der IDT Biologika GmbH stammten und aufgrund des experimentellen Aufbaus weitestgehend gleich behandelt wurden, sollten Unterschiede in der genetischen Disposition der Ferkel oder bei den Fütterungsmaßnahmen bzw. Haltungsbedingungen kaum einen Einfluss gehabt haben. Ferkel reagieren offenbar sehr individuell auf die Impfungen und die rStx2e-Belastung. Dies wurde auch von BOSWORTH und Kollegen vermutet, die trotz identischer Versuchsdurchführung Unterschiede in der Stx2e-NT-Titerhöhe zwischen einzelnen Ferkelgruppen beobachteten (BOSWORTH et al., 1996).

### Untersuchung der Serumproben im ELISA<sub>rStx2e</sub> und Stx2e-Neutralisationstest

Die Untersuchung der Ferkel auf Stx2e-spezifische Antikörper ging von der Hypothese aus, dass rStx2e-Toxoidimpfstoffe die Impflinge zur Produktion von zirkulierenden Immunglobulinen anregen, die sofort an das intravenös verabreichte rStx2e binden und es dadurch in seiner toxischen Wirkung neutralisieren würden. Es sollte daher auch eine positive Korrelation zwischen dem Titer an solchen Antikörpern und der Belastbarkeit der Immunität bestehen. Zur experimentellen Überprüfung dieser These wurden die Serumproben der geimpften Ferkel im ELISA<sub>rStx2e</sub> auf *E. coli*-spezifische IgG-Antikörper und im Stx2e-Neutralisationstest auf Stx2e-neutralisierende Antikörper untersucht. Das als Fangantigen im ELISA<sub>rStx2e</sub> eingesetzte Proteingemisch entsprach derjenigen rStx2e-Charge, mit der die Ferkel belastet wurden. Hierbei handelte es sich um ein nur grob aufgereinigtes Bakterienzellysate, welches neben dem rStx2e überwiegend andere Proteine und mutmaßlich weitere Antigene enthielt (siehe SDS-PAGE-Analyse in **Abbildung 11**). Als Testantigen im Neutralisationstest gelangten ausschließlich Stx2e-Präparate vom EDEC-Feldstamm 299 zum Einsatz. Dies sollte sicherstellen, dass die in den Ferkeln gegebenenfalls nachzuweisenden neutralisierenden Antikörper tatsächlich in der Lage waren, die zytotoxische Wirkung von Wildtyp-Stx2e zu neutralisieren.

Der ELISA<sub>rStx2e</sub> war weniger aufwändig als der Stx2e-NT-Test. Er wurde deshalb zuerst eingesetzt, um abzuschätzen, wie die Ferkel auf die Impfung reagiert hatten und in welchen Serumproben Stx2e-neutralisierende Antikörper vorhanden sein könnten. Die ELISA-Daten offenbarten, dass die Titer bei den rStx2e<sub>GA</sub>- und Placebo-geimpften Ferkeln in den Immunisierungsversuchen D und E vor allem nach der zweiten Immunisierung stiegen und nach der rStx2e-Belastung noch höher waren. So kam es bei den Ferkeln nach der zweiten Impfung (37./38. LT) zum Anstieg der mittleren *E. coli*-spezifischen IgG-Antikörper-Titer. Insbesondere bei den Ferkeln der Gruppe 1 aus Versuch D (Impfantigendosis 1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalente rStx2e<sub>GA</sub>) und der Gruppe 1c aus dem Versuch E (Impfantigendosis 0,15 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalente rStx2e<sub>GA</sub>) war ein signifikant höherer Titer als bei den nicht geimpften bzw. den mit Placebo geimpften Ferkeln zu beobachten. Dies bestätigt die Angabe in der Literatur, bei denen in einem Feldversuch nach der zweiten Immunisierung der Ferkel mit rStx2e<sub>GA</sub> ein Anstieg von Stx2e-spezifischen Antikörpern im ELISA festgestellt wurde (JOHANSEN et al., 1997). Nach der intravenösen rStx2e-Belastung (55. LT) war in allen Tiergruppen der mittlere ELISA<sub>rStx2e</sub>-Titer höher als zuvor. Dies gab Hoffnung, dass die Impfungen auch eine gegen Stx2e gerichtete Immunantwort induziert hatten.

Im Zuge der weiteren Untersuchungen bestätigte sich, dass die Ergebnisse der Serumproben im ELISA<sub>rStx2e</sub> signifikant mit den Ergebnissen im Stx2e-Neutralisationstest korrelierten (Serumproben aus den Versuchen D und E). Vor der ersten Immunisierung waren bei keinem der Ferkel Stx2e-neutralisierende Antikörper nachweisbar und nach der ersten

Impfung nur bei drei von 56 mit rStx2e<sub>GA</sub>-Impfstoff (Dosis 1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalente) geimpften Ferkeln. Erst nach der zweiten Impfung waren neutralisierende Stx2e-Antikörper bei 55 von 56 der mit 1,5 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten rStx2e<sub>GA</sub> geimpften Ferkel bzw. bei 77 von allen 98 mit rStx2e<sub>GA</sub> geimpften Ferkeln nachweisbar. Nach der rStx2e-Belastung waren die Titer noch einmal höher, was vermuten lässt, dass auch das zur Belastung applizierte, aktive rStx2e einen Booster-Effekt auf das Immunsystem ausübte. Diese Daten belegen, dass die durchgeführte zweimalige Applikation des Impfstoffes gut gewählt war. So konnten einerseits die Stx2e-NT-Titer deutlich geboostert werden und andererseits auch Tiere zur Bildung Stx2e-neutralisierender Antikörper induziert werden, die nach der ersten Impfung noch nicht reagiert hatten. Die Ergebnisse im ELISA<sub>rStx2e</sub> und im Stx2e-Neutralisationstest korrelierten zwar hoch signifikant miteinander, allerdings war der Korrelationskoeffizient mit 0,372 recht niedrig. So gab es erwartungsgemäß Proben mit einem hohen Titer an rStx2e-neutralisierenden Antikörpern aber niedrigen Werten im ELISA<sub>rStx2e</sub> und umgekehrt. Diese Beobachtung war letztlich der Grund, warum die Serumproben aus den Immunisierungsversuchen F bis I ausschließlich im Stx2e-Neutralisationstest untersucht wurden.

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand sind Stx2e-neutralisierende Antikörper die entscheidenden Träger der Immunität gegen die Ödemkrankheit (CAPOZZO et al., 2003; MACLEOD und GYLES, 1991a). So konnten beispielsweise MATISE und Kollegen (2001) Ferkel durch die Applikation von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern vier Tage nach oraler EDEC-Infektion vor dem Ausbruch der Ödemkrankheit bewahren. Die in den Immunisierungsversuchen D bis I der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse stützen das Konzept der humoralen, antitoxischen Immunität als wesentliche Grundlage des Impfschutzes. Denn sowohl bei den Impfstoffen mit chemisch inaktiviertem rStx2e als auch bei der Impfstoff-Charge rStx2e<sub>E167QR170L/02/06</sub> war eine negative Korrelation zwischen den Titern an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern zum Zeitpunkt unmittelbar vor der rStx2e-Belastung und der infolge der Belastung auftretenden Mortalität erkennbar. Alle 90 Ferkel, die einen Titer von  $\geq 10$  Std<sub>NT</sub> % vorzuweisen hatten, überlebten die rStx2e-Belastung. Dagegen verstarben 99 der 127 Ferkel (78 %), bei denen der Titer kleiner als 10 Std<sub>NT</sub> % war. Man kann annehmen, dass diese Korrelation kausal begründet ist. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen ISHIKAWA und Kollegen (2003), wonach Impflinge vor der Wirkung von rStx2e geschützt sind, wenn sie Antikörper aufweisen, die die Zytotoxizität von Stx2e *in vitro* zu neutralisieren vermögen (ISHIKAWA et al., 2003). Der im rStx2e-Neutralisationstest ermittelte Titer von 10 Std<sub>NT</sub> % kann als Grenztiter bezeichnet werden, ab dem ein Ferkel eine 100 %-ige Wahrscheinlichkeit hat, eine intravenöse Inokulation von rStx2e in der Dosis von 0,75 Mio CD<sub>50</sub> zu überleben.

Von allen 65 mit mindestens 0,75 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten rStx2e<sub>GA</sub> geimpften Ferkeln zeigte nur ein Ferkel auch nach der zweiten Impfung keine spezifische Immunantwort gegen das

Impfantigen. Insbesondere bei natürlichen Infektionen werden immer wieder einzelne Tiere beobachtet, die im Gegensatz zu den übrigen infizierten Tieren keine spezifischen Antikörper im Rahmen einer Infektion ausbilden (NIELSEN et al., 1995). Auch bei Immunisierungen wird beschrieben, dass einzelne Tiere mit keiner oder nur einer verminderten Produktion von neutralisierenden Antikörpern gegen bestimmte Antigene oder Viren reagieren. Dies ist bei den sogenannten „Non-Respondern“ auf eine unzureichende B-Zell-Immunantwort zurückzuführen (SHOKRGOZAR und SHOKRI, 2001).

Die höchsten Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern bei Glutaraldehyd-geimpften Ferkeln konnten durch zwei Impfungen mit rStx2e<sub>GA</sub> in den Dosen 1,50 und 0,75 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten erreicht werden. Dabei wurde ein maximaler Titer von 5.260 Std<sub>NT</sub> % (Serumprobe R-5307/06 aus Versuch I) nach zweimaliger Impfung mit einer Dosis von 1,50 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten und von 8.105 Std<sub>NT</sub> % (Serumprobe R-4595/05 aus Versuch E) mit einer Dosis von 0,75 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten induziert. Über Stx2e-neutralisierende Antikörper wird in der Fachliteratur vielfach berichtet, allerdings ohne konkrete Angaben zur Titerhöhe. Nur MACLEOD und GYLES (1991a) kamen in ganz ähnlicher Art und Weise mit zwei intramuskulären Injektionen am 14. und 28. Lebenstag zu Titern in Höhe zwischen 128 und 2.560. Die Titer, die in der vorliegenden Untersuchung mit der gentechnisch inaktivierten Impfantigen-Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 erzielt wurden, lagen nach der zweiten Immunisierung zwischen < 10 und maximal 40.614 Std<sub>NT</sub> % (Serumprobe R-5337/06 aus Versuch I).

Gemessen an den Stx2e-NT-Titern, war das chemisch inaktivierte rStx2e<sub>GA</sub> als Impfantigen immunogener als das gentechnisch inaktivierte rStx2e<sub>E167QR170L</sub> mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans. Dies könnte daran liegen, dass das chemisch inaktivierte Impfantigen das Immunsystem wegen seiner Resttoxizität besser stimulierte, als das atoxische Impfantigen der Charge rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06. Zell- und Gewebeschäden, die womöglich durch die Resttoxizität von rStx2e<sub>GA</sub> entstanden, könnten die Immunantwort nämlich zusätzlich stimuliert haben, da durch tote Zellen, Zelltrümmer und Entzündungsprodukte die Aktivität der dendritischen Zellen und Makrophagen gefördert wird (TIZARD, 2004). Es könnte aber auch sein, dass die Einführung der Mutationen im rStx2e zu Veränderungen der protektiven Epitope geführt hat und in Folge dessen protektive Antikörper in geringerer Zahl induziert werden konnten. Einziger Hinweis in der Literatur, dass die Resttoxizität einen Einfluss auf die Immunogenität haben könnte, findet sich bei GORDON et al. (1992). Dort erwiesen sich chemisch mit Formaldehyd inaktiviertes rStx2e<sub>FA</sub> und gentechnisch an nur einer Position verändertes rStx2e<sub>E167Q</sub> gleichermaßen immunogen, um Stx2e-NT-Titer bei den Ferkeln zu induzieren. Allerdings stellten die Autoren bei ihrer gentechnischen Mutante mittels Verozell-Zytotoxizitätstest eine Resttoxizität fest, wodurch das Immunsystem stimuliert worden sein könnte. Es scheint daher für einen Impfstoff aus immunologischer Sicht von Vorteil zu sein,



wenn er nicht komplett detoxifiziert wurde. Die Adjuvans-Versuche mit dem gentechnisch inaktivierten rStx2e<sub>E167QR170L</sub> deuten aber an, dass eine fehlende Resttoxizität durch ein gutes Adjuvans kompensiert werden kann.

### Adjuvantien

Um bei der Applikation von inaktivierten Erregern oder Proteinen eine ausreichende Immunantwort im Wirt zu erreichen, ist es notwendig, das Impfantigen in Kombination mit einem Adjuvans zu verabreichen. Dabei spielen insbesondere sogenannte Depotadjuvantien eine große Rolle, da sie das mit ihnen verabreichte Antigen verzögert freisetzen und eine Formulierung der Immunantwort prothrahiert über einen längeren Zeitraum provozieren (TIZARD, 2004). Sowohl bei Aluminiumhydroxid als auch bei den verwendeten Montaniden handelt es sich um derartige Depotadjuvantien (AUCOUTURIER et al., 2000). Aluminiumhydroxid ist das bisher zur Immunisierung von Ferkeln mit Stx2e-Impfantigenen am häufigsten eingesetzte Adjuvans (BOSWORTH et al., 1996; GANNON und GYLES, 1990; GORDON et al., 1992; KARG und BILKEI, 2002; MACLEOD und GYLES, 1990; MACLEOD und GYLES, 1991a; WADDELL et al., 1996), weshalb es in der vorliegenden Arbeit als Referenzsubstanz verwendet wurde. Bei den Immunisierungsversuchen, in denen rStx2e<sub>E167QR170L</sub>/02/06 als Impfantigen verwendet wurde, wurden außer Aluminiumhydroxid auch noch fünf verschiedene Montanide (IMS2525, IMS1313, IMS251C, ISA27 und ISA35) eingesetzt. Bei Montaniden handelt es sich, ähnlich wie bei dem weit verbreiteten Freundschem Adjuvans, um Mischungen aus Ölen (Mineralöl und/oder Pflanzenöl) und oberflächenaktiven Substanzen, die aber eine bessere Verträglichkeit aufweisen sollen (AUCOUTURIER et al., 2000). Die exakte Zusammensetzung der Montanide wird von den Herstellern aber geheimgehalten. In Immunisierungsversuchen gegen die Maul- und Klauenseuche an Rindern, Ziegen und Schweinen, bei denen Inaktivimpfstoffe eingesetzt wurden, bewährte sich beispielsweise das Montanid ISA206 als Adjuvans und führte zu höheren Titern an neutralisierenden Antikörpern, als das Aluminiumhydroxid (BARNETT et al., 1996; PATIL et al., 2002). Auch bei dem rStx2e<sub>E167QR170L</sub>-Toxoidimpfstoff der vorliegenden Arbeit wirkten die Montanide als Adjuvans sehr gut. Im direkten Vergleich mit dem Aluminiumhydroxid in den Versuchen H und I zeigte sich, dass insbesondere mit den Montaniden IMS1313, IMS251C und ISA27 sogar deutlich höhere Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern induziert wurden. Es gab aber auch Unterschiede zwischen den eingesetzten Montaniden. Hinsichtlich der Induktion von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern war IMS1313 das wirksamste Adjuvans, gefolgt von IMS251C und ISA27. Die beiden Montanide ISA35 und IMS2525 hatten in diesem Vergleich die geringste Wirkung. Diese Beobachtung bestätigt die gute Adjuvanswirkung von IMS1313, wie sie bereits in der Fachliteratur aus Immunisierungsversuchen zur Bekämpfung der Maul- und Klauenseuche und gegen *Mycoplasma*

*hyopneumoniae* bei Schweinen dokumentiert ist (QUATTROCCHI et al., 2004; WALDERS et al., 2005). Bisher wurden Montanide bei Schweinen nur selten verwendet. Nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bieten sich die Montanide IMS1313, IMS251C und ISA27 als Adjuvans zumindest für einen Toxoid-Impfstoff gegen die Ödemkrankheit als erfolgversprechende Alternativen an.

## Schlussfolgerungen

1. Das Stx2e ist das ursächliche Agens der Ödemkrankheit, da die alleinige Applikation von rStx2e zur Auslösung aller Kardinalsymptome der Krankheit ausreicht.
2. Die intravenöse Applikation von rStx2e an Ferkel ist als Ödemkrankheitsmodell zur Wirksamkeitsprüfung von Stx2e-basierten Toxoidimpfstoffen sehr gut geeignet, aber auch aufwändig und mit Leiden für die Tiere verbunden.
3. Als Impfantigen zur Induktion Stx2e-neutralisierender Antikörper und zur Erzeugung eines Impfschutzes vor dem tödlichen Verlauf einer intravenösen rStx2e-Applikation eignen sich sowohl chemisch (rStx2e<sub>GA</sub>) als auch gentechnisch inaktiviertes rStx2e (rStx2e<sub>E167QR170L/02/06</sub>).
4. Die Immunisierung gegen Stx2e erfordert zwei Impfungen mit einer Antigendosis von jeweils mindestens 0,75 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten rStx2e<sub>GA</sub> bzw. 15.750 OD<sub>50</sub> rStx2e<sub>E167QR170L/02/06</sub>, damit ein Impfschutz aufgebaut wird, der das Überleben im Ödemkrankheitsmodell sichert.
5. Der Erfolg der Immunisierung gegen Stx2e kann an den Titern von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern im Blut der Ferkel abgelesen werden. Der Grenztiter für die 100 %-ige Überlebenschance im intravenösen Ödemkrankheitsmodell betrug in der vorliegenden Arbeit 10 Std<sub>NT</sub> %. Bei der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen kann die Titerbestimmung zumindest in einigen Fällen Versuche im Ödemkrankheitsmodell ersetzen.
6. Montanide, vor allem die Montanide IMS1313, IMS251C und ISA27, haben in rStx2e-Toxoid-Impfstoffen für Ferkel eine gute Adjuvanswirkung.
7. Stx2e kann rekombinant sowohl in seiner biologisch aktiven Form, als auch nach ortsspezifischer Mutagenese als inaktiviertes Toxoid gewonnen werden. Dabei ist die Ausbeute an Antigen deutlich größer als bei der Verwendung von EDEC-Feldisolaten.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Toxoidimpfstoffe gegen die Ödemkrankheit der Schweine auf der Basis von rekombinantem Shigatoxin vom Typ 2e (rStx2e) zu entwickeln und ihre Wirksamkeit an Ferkeln zu prüfen.

Die Stx2e-Gene *stxA2e* und *stxB2e* des *E. coli*-Stammes „412“ wurden in den Plasmidvektor pET-24b(+) inseriert und in kompetenten *E. coli* BLR(DE3)-Zellen kloniert. Die Identität aller rStx2e-Transformanten bzw. die ordnungsgemäße Klonierung und Expression der Stx2e-Gene wurde mit Hilfe von PCR, Sequenzierung, Tricine-SDS-PAGE, Immunoblot und Verozell-Zytotoxizitätstest überprüft. Für die Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen wurde ein standardisiertes und kontrolliertes Ödemkrankheitsmodell etabliert, bei dem rStx2e intravenös an sechs Wochen alte Ferkel verabreicht wurde. In Abhängigkeit von der Dosis traten nach wenigen Stunden typische Symptome der Ödemkrankheit auf (Unterhautschwellungen an Augenlidern und Nasenrücken, Ataxien, Krämpfe, Festliegen, Ruderbewegungen, Todesfälle). In Anlehnung an die Europäische Pharmakopöe wurde die Belastungsdosis auf 750.000 CD<sub>50</sub> pro Ferkel eingestellt (mind. 40 % Mortalität und 85 % Morbidität).

Zur Verwendung als Impfantigen wurde rStx2e chemisch inaktiviert, indem es mit Glutar- oder Formaldehyd behandelt wurde (rStx2e<sub>GA</sub> und rStx2e<sub>FA</sub>). In einem alternativen Ansatz wurden auf gentechnischem Wege rStx2e-Varianten erzeugt, in denen eine, zwei oder drei bestimmte Aminosäuren in der A-Untereinheit des Toxins (E167Q, R170L, A216D) substituiert worden waren. Die Aldehydbehandlungen reduzierten die toxische Aktivität des rStx2e gegenüber Verozellen um den Faktor 1.000 - 2.000, verminderten aber auch die Erkennung des Antigens durch Antikörper im ELISA. Die gentechnisch hergestellte Variante rStx2e<sub>E167QR170L</sub> war um den Faktor 132.278 weniger toxisch als unverändertes rStx2e. Die genetisch veränderten rStx2e-Varianten wurden von den entsprechenden *E. coli* BLR(DE3)-Stämmen stärker exprimiert als unverändertes Stx2e.

Zur Überprüfung ihrer Immunogenität wurden die rStx2e-Impfantigene mit verschiedenen Adjuvantien (Aluminiumhydroxid, Montanide) vermischt und an den Lebenstagen 9 und 28 intramuskulär an Saugferkel verimpft. Placebo-geimpfte und nicht geimpfte Ferkel dienten als Kontrollen. Einige Tage nach dem Absetzen (Lebenstag 37 oder 38) wurden alle Ferkel intravenös mit rStx2e belastet. Vor und nach der Impfung sowie nach der Belastung wurden Serumproben genommen und auf *E. coli*-spezifische Antikörper (ELISA<sub>rStx2e</sub>) sowie rStx2e-neutralisierende Antikörper (Stx2e-Neutralisationstest) untersucht.

Alle getesteten Toxoidimpfstoffe wirkten protektiv, was sich an der im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren Mortalität in den Impfgruppen äußerte. Von dem mit rStx2e<sub>GA</sub>-Antigen geimpften Ferkeln (Antigendosis  $\geq 750.000$  CD<sub>50</sub>-Äquivalente) überlebten 98 % die rStx2e-Belastung. Bei Impfung mit 150.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten überlebten noch 83,4 %, bei 15.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten nur 28,6 %. Mit einer Dosis von 1.500 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten war kein Ferkel zu schützen. Von den Ferkeln, die mit Toxoidimpfstoffen auf Basis von rStx2e<sub>E167QR170L</sub> geimpft worden waren, überlebten 82 % die rStx2e-Belastung, wobei die Mortalitäten in den einzelnen Gruppen je nach eingesetztem Adjuvans deutlich differierten. So überlebten bei Verwendung der Montanide IMS1313 und IMS251C alle Ferkel, dagegen bei Aluminiumhydroxid nur 60 % der Ferkel.

Nach der ersten Immunisierung waren Stx2e-neutralisierende Antikörper nur bei drei (rStx2e<sub>GA</sub>) der insgesamt 160 mit rStx2e<sub>GA</sub>- bzw. rStx2e<sub>E167QR170L</sub>-Toxoidvakzinen geimpften Ferkel (1,9 %) nachweisbar, nach der zweiten Immunisierung dagegen bei 80 % der Ferkel. Bei 92 % der geimpften Ferkel, welche die rStx2e-Belastung überlebten, waren vor der Belastung Stx2e-neutralisierende Antikörper vorhanden gewesen. Alle Ferkel mit einem Titer von  $\geq 10$  Std<sub>NT</sub> % überlebten die rStx2e-Belastung. Die höchsten Titer an Stx2e-neutralisierenden Antikörpern wurden mit dem rStx2e<sub>GA</sub>-Impfstoff in einer Antigendosis von 1,5 oder 0,75 Mio CD<sub>50</sub>-Äquivalenten sowie dem rStx2e<sub>E167QR170L</sub>-Impfstoff in Kombination mit IMS1313 und IMS251C als Adjuvans erzielt. Bei den Kontrollferkeln waren Stx2e-neutralisierende Antikörper vor der rStx2e-Belastung in keinem einzigen Fall nachweisbar.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl die chemisch als auch die gentechnisch inaktivierten rStx2e-Impfantigene im Ferkel eine sehr gute immunogene und protektive Wirkung haben und sich daher zur Herstellung von Toxoidvakzinen gegen die Ödemkrankheit eignen. Um eine hohe Schutzwirkung zu erzielen, ist eine zweimalige Immunisierung mit einer minimalen Impfantigendosis von jeweils 750.000 CD<sub>50</sub>-Äquivalenten (rStx2e<sub>GA</sub>-Antigen) bzw. 15.750 OD<sub>50</sub> (rStx2e<sub>E167QR170L</sub>-Antigen) erforderlich. Das Ödemkrankheitsmodell ist zur Wirksamkeitsprüfung von Stx2e-Toxoidimpfstoffen sehr gut geeignet, es ist aber auch aufwändig und mit Leiden für die Tiere verbunden. Die Quantifizierung von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern kann entsprechende Versuche zumindest in einigen Fällen ersetzen.

## SUMMARY

The objective of the present study was the development and evaluation of toxoid vaccines based on recombinant Shigatoxin 2e (rStx2e) in order to immunize piglets against edema disease.

The Stx2e genes *stxA2e* and *stxB2e* of *E. coli* strain "412" were transferred into the plasmid pET-24b(+) by recombinant DNA technologies and cloned into competent cells of *E. coli* strain BLR(DE3). The identity of all rStx2e transformants and the correct cloning and expression of the Stx2e genes were confirmed by PCR, DNA sequencing, Tricine-SDS-PAGE, immunoblot analysis and a vero cell cytotoxicity assay. In order to test Stx2e-toxoid vaccines for their efficacy a standardized and controlled edema disease model was established where rStx2e was administered intravenously to piglets at six weeks of age. Dependent on the amount of rStx2e administered typical signs of edema disease occurred within a few hours (subcutaneous swelling of eyelids and nosebridges, staggering gaits, paddling, spasms and ataxia). According to the European Pharmacopoeia the rStx2e challenge dose to be used in immunization trials was defined as 750.000 CD<sub>50</sub> per piglet (minimum mortality and morbidity in the control group: 40 % and 85 %, respectively).

Prior to its use as an antigen in vaccines, rStx2e was chemically inactivated by treatment with glutaraldehyde or formaldehyde (rStx2e<sub>GA</sub> und rStx2e<sub>FA</sub>). In an alternative approach genetic engineering was used to generate variants of rStx2e which carried one, two or three amino acid substitutions at defined residues in the A-subunit of Stx2e (E167Q, R170L, A216D). Treatment with glutaraldehyde or formaldehyde reduced the cytotoxicity of rStx2e towards Vero cells by a factor of 1000 to 2000. However, this treatment also impaired the detectability of rStx2e by antibodies in an ELISA. The variant rStx2e<sub>E167QR170L</sub> was 132.278 times less toxic than non-modified rStx2e. In addition, both modified rStx2e variants were produced at higher rates than non-modified rStx2e by their respective *E. coli* strains.

In order to prove their immunogenicity rStx2e antigens were mixed with various adjuvants (aluminium hydroxide, montanides) and administered intramuscularly to suckling piglets at days 9 and 28 of life. Non-vaccinated piglets and piglets vaccinated with a placebo served as controls. A few days after weaning (day 37 or 38) each piglet was challenged intravenously with rStx2e. Prior to and after vaccination as well as after the challenge blood samples were collected and tested for *E. coli* specific (ELISA<sub>rStx2e</sub>) and Stx2e-neutralizing antibodies (Stx2e-neutralization assay).

All tested rStx2e-toxoid vaccines proved protective which manifested itself as a reduced mortality in groups of vaccinated piglets compared to the controls. Piglets survived the rStx2e challenge at 98 %, if they had been vaccinated with rStx2e<sub>GA</sub> (antigen dose  $\geq$  750.000 CD<sub>50</sub>

equivalents). Vaccination with doses of 150.000 and 15.000 CD<sub>50</sub> equivalents resulted in considerable less survivors (83.4 % and 28.6 %, respectively). No protection was achieved by immunization with a dose of 1.500 CD<sub>50</sub> equivalents. Among all piglets vaccinated with rStx2e<sub>E167QR170L</sub> 82 % were able to survive the rStx2e challenge. However, the mortalities in the groups varied considerably depending on the type of adjuvant employed. In cases where montanides IMS1313 and IMS251C were used all piglets survived, while only 60 % of the piglets survived when vaccines had been supplemented with aluminium hydroxyde.

Stx2e neutralizing antibodies were detected only in three (rStx2e<sub>GA</sub>) of 160 piglets (1.9 %) after the first shot of the rStx2e<sub>GA</sub>- or rStx2e<sub>E167QR170L</sub>-toxoid vaccines, respectively. However, 80 % proved positive after the second shot. In 92 % of the immunized piglets which survived the rStx2e challenge Stx2e-neutralizing antibodies had been present prior to the challenge. All piglets with a titer of  $\geq 10$  Std<sub>NT</sub> % survived the challenge. Administration of the rStx2e<sub>GA</sub>-vaccine (antigen doses of 1.5 or 0.75 Mio CD<sub>50</sub> equivalents) or the rStx2e<sub>E167QR170L</sub>-vaccine supplemented with IMS1313 or IMS251C yielded the highest titres of Stx2e-neutralizing antibodies. None of the control piglets showed Stx2e neutralizing antibodies prior to the exposure to rStx2e.

Results suggest that both chemically as well as genetically inactivated rStx2e represent very valuable immunogenic and protective antigens for the production of toxoid vaccines against edema disease. In order to achieve highest degrees of protection it appears essential to vaccinate piglets twice with a minimal dose of 750.000 CD<sub>50</sub> equivalents (antigen rStx2e<sub>GA</sub>) or 15.750 OD<sub>50</sub> (antigen rStx2e<sub>E167QR170L</sub>), respectively, at each time point. The edema disease model is a valuable tool to assess the efficacy of Stx2e-toxoid vaccines. However, this model is laborious and may raise objections due to ethical aspects. At least in some cases it can be replaced by the assessment of Stx2e-neutralizing antibodies in blood samples.

## 7 LITERATUR

- Alexa, P., E. Salajka, J. Hamřík and M. Zizlavsky.** 1998. Oedema disease of swine: Formation of antibodies neutralizing Shiga-like toxin IIv in piglets immunized with the toxoid SLTII. *Vet. Med. - Czech.* 43: 11-16.
- Amessou, M., A. Fradagrada, T. Falguieres, J. M. Lord, D. C. Smith, L. M. Roberts, C. Lamaze and L. Johannes.** 2007. Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J. Cell Sci.* 120: 1457-1468.
- Anonym.** 2003. European Pharmacopoeia 4.6. Monographie-Nr. 01/2004:0962
- Arab, S. and C. A. Lingwood.** 1998. Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *J. Cell. Physiol.* 177: 646-660.
- Aucouturier, J., V. Ganne and A. Laval.** 2000. Efficacy and safety of new adjuvants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916: 600-604.
- Awad-Masalmeh, M., M. Schuh, J. Kofer and E. Quakyi.** 1989. Überprüfung der Schutzwirkung eines Toxoidimpfstoffes gegen die Ödemkrankheit des Absetzferkels im Infektionsmodell. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 96: 419-421.
- Barnett, P. V., L. Pullen, L. Williams and T. R. Doel.** 1996. International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine* 14: 1187-1198.
- Barth, S., A. Tscholshiew, C. Menge, R. Weiss, G. Baljer and R. Bauerfeind.** 2007. Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 120: 307-316.
- Bast, D. J., J. L. Brunton, M. A. Karmali and S. E. Richardson.** 1997. Toxicity and immunogenicity of a verotoxin 1 mutant with reduced globotriaosylceramide receptor binding in rabbits. *Infect. Immun.* 65: 2019-2028.
- Basu, I., W. A. Ferens, D. M. Stone and C. J. Hovde.** 2003. Antiviral activity of shiga toxin requires enzymatic activity and is associated with increased permeability of the target cells. *Infect. Immun.* 71: 327-334.
- Benz, I. and M. A. Schmidt.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 1506-1511.
- Bertin, Y., K. Boukhors, N. Pradel, V. Livrelli and C. Martin.** 2001. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3060-3065.
- Bertschinger, H. U. and J. Pohlenz.** 1974. Cerebrospinal angiopathy in piglets induced through experimental coli-enterotoxemia. *Schweiz. Arch. für Tierheilkd.* 116: 543-554.
- Bertschinger, H. U., M. Bachmann, C. Mettler, A. Pospischil, E. M. Schraner, M. Stamm, T. Sydler and P. Wild.** 1990. Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Vet. Microbiol.* 25: 267-281.
- Bertschinger, H. U. and C. L. Gyles.** 1994. Oedema disease of pigs. In Gyles C. L.: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Verlag CAB International, Wallingford 193-219.

- Bertschinger, H. U., V. Nief and H. Tschape.** 2000. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Vet. Microbiol.* 71: 255-267.
- Bickhardt, K., K.-H. Bähr and G. E.** 1968. Über die Halbwertszeit von passiv erworbenen mütterlichen Immunglobulinen im Saugferkel. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 81: 132-135.
- Bitzan, M., S. Richardson, C. Huang, B. Boyd, M. Petric and M. A. Karmali.** 1994. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infect. Immun.* 62: 3337-3347.
- Blass, Bizzini and Raynaud.** 1967. Etudes sur le mecanisme de la detoxification des toxines par le formaldehyde. *Bull. Soc. France* 10: 3957-3965.
- Bosworth, B. T., J. E. Samuel, H. W. Moon, A. D. O'Brien, V. M. Gordon and S. C. Whipp.** 1996. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect. Immun.* 64: 55-60.
- Boyd, B., G. Tyrrell, M. Maloney, C. Gyles, J. Brunton and C. Lingwood.** 1993. Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targeting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *J. Exp. Med.* 177: 1745-1753.
- Burk, C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bulte and E. Martlbauer.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2106-2112.
- Butler, J. E., P. Weber, M. Sinkora, D. Baker, A. Schoenherr, B. Mayer, and D. Francis.** 2002. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J. Immunol.* 169(12): 6822-6830.
- Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keuch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr and I. K. Wachsmuth.** 1996. Proposed new nomenclature for Shiga-like Toxin (Verotoxin) Family. *ASM News* 62: 118-119.
- Capozzo, A. V., V. Pistone Creydt, G. Dran, G. Fernandez, S. Gomez, L. V. Bentancor, C. Rubel, C. Ibarra, M. Isturiz and M. S. Palermo.** 2003. Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model. *Infect. Immun.* 71: 3971-3978.
- Chapman, T. A., X. Y. Wu, I. Barchia, K. A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, M. Wilson and J. J. Chin.** 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4782-4795.
- Cheng, D., H. Sun, J. Xu and S. Gao.** 2005. Prevalence of fimbrial colonization factors F18ab and F18ac in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema and/or diarrhea in China. *Vet. Microbiol.* 110: 35-39.
- Clugston, R. E. and N. O. Nielsen.** 1974a. Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). I. Detection and preparation of an active principle. *Can. J. Comp. Med.* 38: 22-28.
- Clugston, R. E., N. O. Nielsen and W. E. Roe.** 1974b. Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). II. The development of hypertension after the intravenous administration of edema disease principle. *Can. J. Comp. Med.* 38: 29-33.



- Clugston, R. E., N. O. Nielsen and D. L. Smith.** 1974c. Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). III. Pathology and pathogenesis. *Can. J. Comp. Med.* 38: 34-43.
- Cornick, N. A., I. Matise, J. E. Samuel, B. T. Bosworth and H. W. Moon.** 1999. Edema disease as a model for systemic disease induced by Shiga toxin-producing *E. coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473: 155-161.
- Cornick, N. A., I. Matise, J. E. Samuel, B. T. Bosworth and H. W. Moon.** 2000. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease. *J. Infect. Dis.* 181: 242-251.
- Cox, J. C. and A. R. Coulter.** 1997. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15: 248-256.
- Cox, S. J., N. Aggarwal, R. J. Statham, and P. V. Barnett.** 2003. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine*. 21(13-14): 1336-1347.
- DeGrandis, S., H. Law, J. Brunton, C. Gyles and C. A. Lingwood.** 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J. Biol. Chem.* 264: 12520-12525.
- Deprez, P., C. Van den Hende, E. Muylle and W. Oyaert.** 1986. The influence of the administration of sow's milk on the post-weaning excretion of hemolytic *E. coli* in the pig. *Vet. Res. Commun.* 10: 469-478.
- Deresiewicz, R. L., S. B. Calderwood, J. D. Robertus and R. J. Collier.** 1992. Mutations affecting the activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Biochemistry* 31: 3272-3280.
- Deresiewicz, R. L., P. R. Austin and C. J. Hovde.** 1993. The role of tyrosine-114 in the enzymatic activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Mol. Gen. Genet.* 241: 467-473.
- Dobrescu, L. and F. van Wijnendaele.** 1979. Immunological studies in mice with swine edema disease principle (neurotoxin). *Zentralbl. Veterinärmed. [B].* 26: 239-246.
- Docic, M. and G. Bilkei.** 2003. Vaccination of weaned pigs against oedema disease. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 110: 466-468.
- Dubendorff, J. W. and F. W. Studier.** 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *J. Mol. Biol.* 219: 45-59.
- Forth, W., D. Henschler, Rummel W. and S. K.** 1992. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 6. Auflage. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim; Leipzig; Wien; Zürich.
- Fraser, M. E., M. Fujinaga, M. M. Cherney, A. R. Melton-Celsa, E. M. Twiddy, A. D. O'Brien and M. N. James.** 2004. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* 279: 27511-27517.
- Gannon, V. P., C. L. Gyles and R. W. Friendship.** 1988. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. *Can. J. Vet. Res.* 52: 331-337.
- Gannon, V. P., C. L. Gyles and B. P. Wilcock.** 1989. Effects of *Escherichia coli* Shiga-like toxins (verotoxins) in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 53: 306-312.
- Gannon, V. P. and C. L. Gyles.** 1990. Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. *Vet. Microbiol.* 24: 89-100.
- Garred, O., B. van Deurs and K. Sandvig.** 1995b. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J. Biol. Chem.* 270: 10817-10821.

- Garred, O., E. Dubinina, A. Poleskaya, S. Olsnes, J. Kozlov and K. Sandvig.** 1997. Role of the disulfide bond in Shiga toxin A-chain for toxin entry into cells. *J. Biol. Chem.* 272: 11414-11419.
- Gentry, M. K. and J. M. Dalrymple.** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J. Clin. Microbiol.* 12: 361-366.
- Gordon, V. M., S. C. Whipp, H. W. Moon, A. D. O'Brien and J. E. Samuel.** 1992. An enzymatic mutant of Shiga-like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. *Infect. Immun.* 60: 485-490.
- Grossman, T. H., E. S. Kawasaki, S. R. Punreddy and M. S. Osburne.** 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* 209: 95-103.
- Gyles, C. L., S. A. De Grandis, C. MacKenzie and J. L. Brunton.** 1988. Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 5: 419-426.
- Habib, N. F. and M. P. Jackson.** 1993. Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes. *J. Bacteriol.* 175: 597-603.
- Haddad, J. E. and M. P. Jackson.** 1993b. Identification of the Shiga toxin A-subunit residues required for holotoxin assembly. *J. Bacteriol.* 175: 7652-7657.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Head, S. C., M. A. Karmali and C. A. Lingwood.** 1991. Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. Evidence for B subunit modulation of a subunit function. *J. Biol. Chem.* 266: 3617-3621.
- Hovde, C. J., S. B. Calderwood, J. J. Mekalanos and R. J. Collier.** 1988. Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 2568-2572.
- Imberechts, H., H. De Greve and P. Lintermans.** 1992. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet. Microbiol.* 31: 221-233.
- Ishikawa, S., K. Kawahara, Y. Kagami, Y. Isshiki, A. Kaneko, H. Matsui, N. Okada and H. Danbara.** 2003. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. *Infect. Immun.* 71: 3235-3239.
- Jackson, M. P., J. W. Newland, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1987. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 2: 147-153.
- Jackson, M. P., R. L. Deresiewicz and S. B. Calderwood.** 1990a. Mutational analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin II enzymatic subunits. *J. Bacteriol.* 172: 3346-3350.
- Johansen, M., L. O. Andresen, S. E. Jorsal, L. K. Thomsen, T. E. Waddell and C. L. Gyles.** 1997. Prevention of edema disease in pigs by vaccination with verotoxin 2e toxoid. *Can. J. Vet. Res.* 61: 280-285.
- Johansen, M., L. O. Andresen, L. K. Thomsen, M. E. Busch, H. Wachmann, S. E. Jorsal and C. L. Gyles.** 2000. Prevention of edema disease in pigs by passive immunization. *Can. J. Vet. Res.* 64: 9-14.
- Karch, H., H. Schmidt, C. Janetzki-Mittmann, J. Scheef and M. Kroger.** 1999. Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages. *Mol. Gen. Genet.* 262: 600-607.
- Karg, G. and G. Bilkei.** 2002. The effect of season and vaccination for Glasser's disease and post-weaning Colibacillosis in an outdoor pig unit endemically infected with

- virulent strain of *Haemophilus Parasuis* serotype 5 and pathogenic *Escherichia coli*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 49: 464-468.
- Kausche, F. M., E. A. Dean, L. H. Arp, J. E. Samuel and H. W. Moon.** 1992. An experimental model for subclinical edema disease (*Escherichia coli* enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs. Am. J. Vet. Res. 53: 281-287.
- Keusch, G. T., M. Jacewicz, D. W. Acheson, A. Donohue-Rolfe, A. V. Kane and R. H. McCluer.** 1995. Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for Shiga-like toxin 2e. Infect. Immun. 63: 1138-1141.
- Konowalchuk, J., J. I. Speirs and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 18: 775-779.
- Kurmanova, A., A. Llorente, A. Polesskaya, O. Garred, S. Olsnes, J. Kozlov and K. Sandvig.** 2007. Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. Biochem. Biophys. Res. Commun.
- Kurtz, H. J., M. E. Bergeland and D. M. Barnes.** 1969. Pathologic changes in edema disease of swine. Am. J. Vet. Res. 30: 791-806.
- Kyriakis, S. C., V. K. Tsioloyiannis, J. Vlemmas, S. Lekkas, E. Petridou and K. Sarris.** 1997. The efficacy of enrofloxacin in-feed medication by applying different programmes for the control of post weaning oedema disease in weaned piglets. Zentralbl. Veterinärmed. B. 44: 523-528.
- Lauvrak, S. U., M. L. Torgersen and K. Sandvig.** 2004. Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. J. Cell Sci. 117: 2321-2331.
- Lea, N., J. M. Lord and L. M. Roberts.** 1999. Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. Microbiology 145 (Pt 5): 999-1004.
- Lege, N. (2003).** Untersuchungen zum Vorkommen von Ödemkrankheit-verursachenden *E. coli* (EDEC) und Shigatoxin 2e-spezifischen Antikörpern beim Schwein. Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim and W. C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7549-7553.
- Ling, H., A. Boodhoo, B. Hazes, M. D. Cummings, G. D. Armstrong, J. L. Brunton and R. J. Read.** 1998. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. Biochemistry 37: 1777-1788.
- Ling, H., N. S. Pannu, A. Boodhoo, G. D. Armstrong, C. G. Clark, J. L. Brunton and R. J. Read.** 2000. A mutant Shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb(3): structure of a group II Shiga-like toxin with altered binding specificity. Structure 8: 253-264.
- Linggood, M. A. and J. M. Thompson.** 1987. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease. J. Med. Microbiol. 24: 359-362.
- Lingwood, C. A.** 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. Trends Microbiol. 4: 147-153.
- Lüder, O.** 2005. Persönliche Mitteilung.
- MacLeod, D. L. and C. L. Gyles.** 1989. Effects of culture conditions on yield of Shiga-like toxin-IIv from *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 35: 623-629.
- MacLeod, D. L. and C. L. Gyles.** 1990. Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. Infect. Immun. 58: 1232-1239.
- MacLeod, D. L. and C. L. Gyles.** 1991a. Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. Vet. Microbiol. 29: 309-318.

- MacLeod, D. L., C. L. Gyles, A. Valdivieso-Garcia and R. C. Clarke.** 1991b. Physicochemical and biological properties of purified *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect. Immun.* 59: 1300-1306.
- MacLeod, D. L., C. L. Gyles and B. P. Wilcock.** 1991c. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet. Pathol.* 28: 66-73.
- Mainil, J. G., E. Jacquemin, P. Pohl, A. Kaeckenbeeck and I. Benz.** 2002. DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet. Microbiol.* 86: 303-311.
- Makino, K., K. Yokoyama, Y. Kubota, C. H. Yutsudo, S. Kimura, K. Kurokawa, K. Ishii, M. Hattori, I. Tatsuno, H. Abe, T. Iida, K. Yamamoto, M. Onishi, T. Hayashi, T. Yasunaga, T. Honda, C. Sasakawa and H. Shinagawa.** 1999. Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet. Syst.* 74: 227-239.
- Makino, S., M. Watarai, H. Tabuchi, T. Shirahata, H. Furuoka, Y. Kobayashi and Y. Takeda.** 2001. Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease. *Microb. Pathog.* 31: 1-8.
- Mallard, F., B. L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud and L. Johannes.** 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* 156: 653-664.
- Marques, L. R. M., J. S. M. Peiris, S. J. Cryz and A. D. O'Brien.** 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 33-38.
- Matise, I., T. Sirinarumitr, B. T. Bosworth and H. W. Moon.** 1999. Ultrastructure and DNA fragmentation analysis of arterioles in swine infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473: 163-171.
- Matise, I., T. Sirinarumitr, B. T. Bosworth and H. W. Moon.** 2000. Vascular ultrastructure and DNA fragmentation in swine infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Vet. Pathol.* 37: 318-327.
- Matise, I., N. A. Cornick, S. L. Booher, J. E. Samuel, B. T. Bosworth and H. W. Moon.** 2001. Intervention with Shiga toxin (Stx) antibody after infection by Stx-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 183: 347-350.
- Matise, I., N. A. Cornick, J. E. Samuel and H. W. Moon.** 2003. Binding of shiga toxin 2e to porcine erythrocytes in vivo and in vitro. *Infect. Immun.* 71: 5194-5201.
- Melton-Celsa, A. R., J. E. Rogers, C. K. Schmitt, S. C. Darnell and A. D. O'Brien.** 1998. Virulence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the type of toxin produced by the infecting strain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 51 Suppl: S108-114.
- Methiyapun, S., J. F. Pohlenz and H. U. Bertschinger.** 1984. Ultrastructure of the intestinal mucosa in pigs experimentally inoculated with an edema disease-producing strain of *Escherichia coli* (O139:K12:H1). *Vet. Pathol.* 21: 516-520.
- Metz, B., W. Jiskoot, W. E. Hennink, D. J. Crommelin and G. F. Kersten.** 2003. Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine* 22: 156-167.
- Meyer, T., H. Karch, J. Hacker, H. Bocklage and J. Heesemann.** 1992. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279. *Zentralbl. Bakteriolog.* 276: 176-188.
- Miniats, O. P.** 1970. Response of gnotobiotic pigs to oral infection with an enteropathogenic and with an edema disease strain of *Escherichia coli*. *Can. Vet. J.* 11: 52-56.
- Moxley, R. A.** 2000. Edema disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16: 175-185.

- Mulei, C. M. and T. A. Ngatia.** 1999. An unusual presentation of suspected oedema disease of swine in Kenya. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 70: 100-101.
- Muniesa, M., J. Recktenwald, M. Bielaszewska, H. Karch and H. Schmidt.** 2000. Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* 68: 4850-4855.
- Nagy, B., T. A. Casey, S. C. Whipp and H. W. Moon.** 1992a. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infect. Immun.* 60: 1285-1294.
- Nagy, B., S. C. Whipp, H. Imberechts, H. U. Bertschinger, E. A. Dean-Nystrom, T. A. Casey and E. Salajka.** 1997. Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea. *Microb. Pathog.* 22: 1-11.
- Nielsen, B., D. Baggesen, F. Bager, J. Haugegaard and P. Lind.** 1995. The serological response to *Salmonella* serovars *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47: 205-218.
- Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 143-149.
- O'Brien, A. D. and R. K. Holmes.** 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
- O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvig, A. A. Lindberg and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 180: 65-94.
- Obrig, T. G., T. P. Moran and J. E. Brown.** 1987. The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem. J.* 244: 287-294.
- Ohmura-Hoshino, M., S. T. Ho, H. Kurazono, K. Igarashi, S. Yamasaki and Y. Takeda.** 2003. Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga toxin 1 from bovine *Escherichia coli* strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin. *Microbiol. Immunol.* 47: 717-725.
- Ohmura, M., C. Cao, T. Karasawa, J. Okuda, H. Kurazono, V. P. Gannon, C. L. Gyles and Y. Takeda.** 1993. Purification and some properties of a Vero toxin 2 (Shiga-like toxin II) variant (SLT-IIva) of *Escherichia coli* isolated from infantile diarrhea. *Microb. Pathog.* 15: 399-405.
- Ohmura, M., S. Yamasaki, H. Kurazono, K. Kashiwagi, K. Igarashi and Y. Takeda.** 1993. Characterization of non-toxic mutant toxins of Vero toxin 1 that were constructed by replacing amino acids in the A subunit. *Microb. Pathog.* 15: 169-176.
- Olsen, J. E., D. J. Brown, L. E. Thomsen, D. J. Platt and M. S. Chadfield.** 2004. Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. *Microb. Pathog.* 36: 337-347.
- Olsnes, S., R. Reisbig and K. Eiklid.** 1981. Subunit structure of Shigella cytotoxin. *J. Biol. Chem.* 256: 8732-8738.
- Orban, P., G. Bilkei Papp and A. Bolcskei.** 1993. [The therapeutic effect of central nervous stimulants in edema disease of swine]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 106: 423-425.
- Patil, P. K., J. Bayry, C. Ramakrishna, B. Hugar, L. D. Misra and C. Natarajan.** 2002. Immune responses of goats against foot-and-mouth disease quadrivalent vaccine:

comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide gel vaccines in eliciting immunity. *Vaccine* 20: 2781-2789.

- Paton, J. C. and A. W. Paton.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 450-479.
- Pellizzari, A., H. Pang and C. A. Lingwood.** 1992. Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry* 31: 1363-1370.
- Perera, L. P., J. E. Samuel, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1991. Identification of three amino acid residues in the B subunit of Shiga toxin and Shiga-like toxin type II that are essential for holotoxin activity. *J. Bacteriol.* 173: 1151-1160.
- Pickrell, J. A., J. Simon, R. P. Link, H. E. Rhoades and J. Gossling.** 1969b. An attempt to experimentally produce edema disease in swine by oral administration of *Escherichia coli* serotype O139:K82:H1. *Can. J. Comp. Med.* 33: 72-75.
- Pierard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens and S. Lauwers.** 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3317-3322.
- Plunkett, G., 3rd, D. J. Rose, T. J. Durfee and F. R. Blattner.** 1999. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.* 181: 1767-1778.
- Quattrocchi, V., V. Bianco, N. Fonddevila, S. Pappalardo, A. Sadir and P. Zamorano.** 2004. Use of new adjuvants in an emergency vaccine against foot-and-mouth disease virus: evaluation of conferred immunity. *Dev. Biol. (Basel)* 119: 481-497.
- Rappuoli, R., M. Pizza, G. Douce and G. Dougan.** 1999. Structure and mucosal adjuvant activity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol. Today* 20: 493-500.
- Recktenwald, J. and H. Schmidt.** 2002. The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage phiP27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infect. Immun.* 70: 1896-1908.
- Reisbig, R., S. Olsnes and K. Eiklid.** 1981. The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 256: 8739-8744.
- Samuel, J. E., L. P. Perera, S. Ward, A. D. O'Brien, V. Ginsburg and H. C. Krivan.** 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect. Immun.* 58: 611-618.
- Samuel, J. E. and V. M. Gordon.** 1994. Evidence that proteolytic separation of Shiga-like toxin type IIv A subunit into A1 and A2 subunits is not required for toxin activity. *J. Biol. Chem.* 269: 4853-4859.
- Samuel, J. E. and V. M. Gordon.** 1996. Immunogenic shiga-like toxin II variant mutants. United States Patent, Patent Number: 5,552,144
- Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen and B. van Deurs.** 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* 358: 510-512.
- Sandvig, K. and B. van Deurs.** 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* 76: 949-966.
- Sandvig, K.** 2001. Shiga toxins. *Toxicon* 39: 1629-1635.
- Sandvig, K. and B. van Deurs.** 2002c. Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 1-24.
- Sarrazin, E. and H. U. Bertschinger.** 1997. Role of fimbriae F18 for actively acquired immunity against porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 54: 133-144.

- Schägger, H. and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schlegel, H. G.** 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Thieme Verlag.
- Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler and H. Karch.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1205-1208.
- Schmidt, H.** 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* 152: 687-695.
- Schmitt, C. K., M. L. McKee and A. D. O'Brien.** 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.* 59: 1065-1073.
- Shokrgozar, M. A. and F. Shokri.** 2001. Enumeration of hepatitis B surface antigen-specific B lymphocytes in responder and non-responder normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B surface antigen. *Immunology* 104: 75-79.
- Skinner, L. M. and M. P. Jackson.** 1997. Investigation of ribosome binding by the Shiga toxin A1 subunit, using competition and site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* 179: 1368-1374.
- Skinner, L. M. and M. P. Jackson.** 1998. Inhibition of prokaryotic translation by the Shiga toxin enzymatic subunit. *Microb. Pathog.* 24: 117-122.
- Smith, H. W. and S. Halls.** 1968. The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. *J. Med. Microbiol.* 1: 45-59.
- Smith, M. J., L. D. Teel, H. M. Carvalho, A. R. Melton-Celsa and A. D. O'Brien.** 2006. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine* 24: 4122-4129.
- Soltyk, A. M., C. R. MacKenzie, V. M. Wolski, T. Hiram, P. I. Kitov, D. R. Bundle and J. L. Brunton.** 2002. A mutational analysis of the globotriaosylceramide-binding sites of verotoxin VT1. *J. Biol. Chem.* 277: 5351-5359.
- Stein, P. E., A. Boodhoo, G. J. Tyrrell, J. L. Brunton and R. J. Read.** 1992. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* 355: 748-750.
- Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* 53: 135-140.
- Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.* 170: 1116-1122.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Sung, L. M., M. P. Jackson, A. D. O'Brien and R. K. Holmes.** 1990. Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 6386-6395.
- Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto.** 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93: 157-165.
- Timoney, J. F.** 1950. Oedema disease of swine. *Vet. Rec.* 62: 748-756.
- Tizard, I. R.** 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*. 7th ed. Philadelphia, U.S.A.: Elsevier.

- Torgersen, M. L., S. U. Lauvrak and K. Sandvig.** 2005. The A-subunit of surface-bound Shiga toxin stimulates clathrin-dependent uptake of the toxin. *FEBS Journal* 272: 4103-4113.
- Torgersen, M. L., S. Walchli, S. Grimmer, S. S. Skanland and K. Sandvig.** 2007. PKCdelta is activated by Shiga toxin and regulates its transport. *J. Biol. Chem.*
- Tscholshiew, A.** 2006. Untersuchungen zur Ätiologie und Prophylaxe der Ödemkrankheit von Absetzferkeln. *Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen.*
- Tsukahara, T., N. Nakanishi, K. Nakayama, N. Matsubara and K. Ushida.** 2005. Experimental infection of enterotoxemic *Escherichia coli* associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 1167-1171.
- Tsukahara, T., R. Inoue, N. Nakanishi, K. Nakayama, N. Matsubara and K. Ushida.** 2007. Evaluation of the low dose level of a heat-killed and dried cell preparation of *Enterococcus faecalis* to prevent porcine edema disease using experimental infection model with enterotoxemic *Escherichia coli* in weaning pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 103-109.
- Tyrrell, G. J., K. Ramotar, B. Toye, B. Boyd, C. A. Lingwood and J. L. Brunton.** 1992. Alteration of the carbohydrate binding specificity of verotoxins from Gal alpha 1-4Gal to GalNAc beta 1-3Gal alpha 1-4Gal and vice versa by site-directed mutagenesis of the binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 524-528.
- Uemura, R., M. Sueyoshi, Y. Taura and H. Nagatomo.** 2004. Effect of antimicrobial agents on the production and release of shiga toxin by enterotoxaemic *Escherichia coli* isolates from pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 899-903.
- Unkmeir, A. and H. Schmidt.** 2000. Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect. Immun.* 68: 4856-4864.
- Verdonck, F., E. Cox, K. van Gog, Y. Van der Stede, L. Duchateau, P. Deprez and B. M. Goddeeris.** 2002. Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Vaccine* 20: 2995-3004.
- Voegeli, P., H. U. Bertschinger, M. Stamm, C. Stricker, C. Hagger, R. Fries, J. Rapacz and G. Stranzinger.** 1996. Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Anim. Genet.* 27: 321-328.
- Voegeli, P., E. Meijerink, R. Fries, S. Neuenschwander, N. Vorlander, G. Stranzinger and H. U. Bertschinger.** 1997. [A molecular test for the detection of *E. coli* F18 receptors: a breakthrough in the struggle against edema disease and post-weaning diarrhea in swine]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 139: 479-484.
- Waddell, T. E. and C. L. Gyles.** 1995. Sodium deoxycholate facilitates systemic absorption of verotoxin 2e from pig intestine. *Infect. Immun.* 63: 4953-4956.
- Waddell, T. E., C. A. Lingwood and C. L. Gyles.** 1996. Interaction of verotoxin 2e with pig intestine. *Infect. Immun.* 64: 1714-1719.
- Waddell, T. E., B. L. Coomber and C. L. Gyles.** 1998. Localization of potential binding sites for the edema disease verotoxin (VT2e) in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 62: 81-86.
- Walders, B., A. Raschke, M. Neugebauer, E. Geuther, W. Bertling, C. Reiser, A. Buck, S. Strich and J. Hess.** 2005. Blending of a conventional *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with a positive marker: tracking of immunised pigs by peptide-specific antibodies raised to the marker component. *Res. Vet. Sci.* 78: 135-141.



- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 170: 4223-4230.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, L. P. Perera, R. K. Holmes and A. D. O'Brien.** 1989. *In vivo* formation of hybrid toxins comprising Shiga toxin and the Shiga-like toxins and role of the B subunit in localization and cytotoxic activity. *Infect. Immun.* 57: 3743-3750.
- Wen, S. X., L. D. Teel, N. A. Judge and A. D. O'Brien.** 2006b. Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. *Vaccine* 24: 1142-1148.
- White, J., L. Johannes, F. Mallard, A. Girod, S. Grill, S. Reinsch, P. Keller, B. Tzschaschel, A. Echard, B. Goud and E. H. Stelzer.** 1999. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* 147: 743-760.
- Wieler, L. H., S. Franke, C. Menge, M. Rose, R. Bauerfeind, H. Karch, and G. Baljer.** 1995. Untersuchungen zur Immunantwort bei der Ödemkrankheit von Absetzferkeln mit einer rekombinanten B-Untereinheit des Shiga-like-Toxins-IIe. *Deut. Tierärztl. Wochenschr.* 102 (1): 40-43.
- Wilcke, M., L. Johannes, T. Galli, V. Mayau, B. Goud and J. Salamero.** 2000. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J. Cell Biol.* 151: 1207-1220.
- Wittig, W., R. Prager, M. Stamm, W. Streckel and H. Tschape.** 1994. Expression and plasmid transfer of genes coding for the fimbrial antigen F107 in porcine *Escherichia coli* strains. *Zentralbl. Bakteriologie.* 281: 130-139.
- Wolski, V. M., A. M. Soltyk and J. L. Brunton.** 2001. Mouse toxicity and cytokine release by verotoxin 1 B subunit mutants. *Infect. Immun.* 69: 579-583.
- Yokoyama, K., K. Makino, Y. Kubota, M. Watanabe, S. Kimura, C. H. Yutsudo, K. Kurokawa, K. Ishii, M. Hattori, I. Tatsuno, H. Abe, M. Yoh, T. Iida, M. Ohnishi, T. Hayashi, T. Yasunaga, T. Honda, C. Sasakawa and H. Shinagawa.** 2000. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* 258: 127-139.
- Yu, M. and D. B. Haslam.** 2005. Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect. Immun.* 73: 2524-2532.
- Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius and H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1441-1446.

**ANHANG****Tabelle 23:      Verwendete Geräte**

<b>Gerät / Modell</b>	<b>Firma</b>
Autoklav FVS/2	Fa. Fedegari, Albuzzano, Italien
Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. 429K	Fa. Herolab, Wiesloch
Brutschrank Typ BB 6220	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eismaschine UBE-50-35	Fa. Ziegra, Isernhagen
Elektroblotkammer 2117 Multiphor II	Fa. Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer für Agarosegele (100 ml) (Electro-4)	Fa. HYBAID, Heidelberg
Elektrophoresekammer für Proteingele Minigel-Twin Typ G42	Fa. Biometra GmbH, Göttingen
Eppendorf-Zentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf, Hamburg
Feinwaage AE 163	Fa. Mettler-Waagen GmbH, Giessen
Feinwaage EW600-2M	Fa. Kern, Albstadt
French-Press FA-030	Fa. SLM-Aminco Spectronic Instruments, Rochester, NY, U.S.A.
Gefrierschrank -20 °C GSD2614/01	Fa. Bosch, Jungingen
Gefrierschrank -70 °C HU 9-50 V-T-A	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Geltrockner Gel Dryer 543	Fa. BIO-RAD, München
Inkubationsschüttler (Modelle 3033 und 3032)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Inkubator Typ VT 5042 BK	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kühlschrank	Fa. Bosch, Jungingen
Leuchttisch 2011 Macrovue	Fa. LKB Bromma, Schweden
Magnetrührer (IKAMAG PET)	Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co, Staufen
Mehrkanalpipetten 4421000.013	Fa. Eppendorf, Hamburg
Mikroprozessor pH-Meter pH537	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mikroskop LABOVERT FS	Fa. Leitz, Wetzlar
Mikrowellenofen 2915Q	Fa. Moulinex, Hamburg
Netzgerät Power Supply 3000Xi	Fa. Bio-Rad GmbH, München
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,100 mm)	Fa. Brand GmbH & Co, Wertheim
Photometer Typ DU®640	Fa. Beckman Instruments, Inc. Fullerton, U.S.A.
Pipetten 22-47-005-1	Fa. Eppendorf, Hamburg

Fortsetzung der **Tabelle 23** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 23**

<b>Gerät / Modell</b>	<b>Firma</b>
Plattenphotometer Titertek Multiskan Ascent 354	Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim
Schüttler	Eigenbau der Institutswerkstatt
Sorvall Zentrifuge RC 5B Plus (Rotor: GS-3, SS-34)	Fa. Sorvall Dupont, Bad Homburg
Spannungsgerät GPS 200/400	Fa. Pharmacia, Freiburg
Spannungsgerät 3000 x	Fa. BIO-RAD, München
Sterilbank Laminar® HB 2472	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler TC1	Fa. Applied Biosystems, Foster City, U. S. A
Tischzentrifuge Mikro 20	Fa. Hettich, Radenau-Londorf
Titertek Multidop	Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim
Ultrazentrifuge L8-55 (Rotor Ti75)	Fa. Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Ultraschall Gerät Branson - Sonifier Modell "B-15"	Fa. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
UV-Licht Macrovue Transluminator	Fa. LKB, St. Gabriel, U.S.A.
UV-Kammer Stratalinker 1800	Fa. Stratagene, La Jolla, U. S. A.
Vortex Type RFAX 1R	Fa. MAGV, Rabenau-Londorf
Waage PE 625	Fa. Bosch, Jungingen
Wasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wippe für Gele	Eigenbau der Institutswerkstatt
Zentrifuge 5804R	Fa. Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge / Sepatech Omnifuge 2.0 RS	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau

**Tabelle 24: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Artikel</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nummer</b>
Dialyseschlauch MembraCell™ MWCO 3500, Ø16 mm	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	44310
Einmalkanülen 20 G x 1½ (0,9 x 40 mM)	Fa. Servoprax GmbH, Wesel	L1 0201
Einmalspritze, 1 ml	Fa. Braun, Melsungen	300013
Einmalspritze, 2 ml	Fa. Braun, Melsungen	4606027V
Erlenmeyer-Kolben, 1 Liter	Fa. Brand GmbH & Co, Wertheim	92754
F-96-Loch-Mikrotiterplatten, Flachboden	Fa. Nunc GmbH & Co, Wiesbaden	167008
Filterpapier Gel-Blotting-Papier GB002	Fa. Schleicher & Schuell, Dassel	426693
Glasperlen 0,1 mm	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	N029.1
Nitrocellulose-Membran Typ Protran BA 85	Fa. Schleicher & Schuell, Dassel	10 401190
Objektträger	Fa. IdL GmbH & Co, Nidderau	3872872
PCR-Reaktionsgefäße	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	04.022.1100
Petrischalen 92 x 16 mm	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	09.031.0000
Pipettenspitzen blau	Fa. Ratiolab, Dreieich	2100611
Pipettenspitzen gelb	Fa. Ratiolab, Dreieich	2100601
Pipettenspitzen weiß	Fa. Ratiolab, Dreieich	96.8704
Plastik-Zellkulturflasche (80 cm <sup>2</sup> )	Fa. Nunc, Wiesbaden	178905
Polypropylenröhrchen 15 ml	Fa. Greiner BIO-ONE, GmbH, Frickenhausen	188271
Polypropylenröhrchen 50 ml	Fa. Greiner BIO-ONE, GmbH, Frickenhausen	227261
Polystyrolröhrchen steril	Fa. Sarstedt, Nümbrecht	55468.001
Reaktionsgefäße, SafeLock Tubs, 1,5 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg	0030120.086
Reaktionsgefäße, SafeLock Tubs, 2,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg	0030120.094
Sterilfilter, 0,45 µm	Fa. Schleicher & Schuell GmbH, Dassel	46210
U-96-Polysorp-Mikrotiterplatte, Rundboden	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	475434
UV-Küvette mikro	Fa. Brand GmbH & Co, Wertheim	759200
Zellkultur-Flaschen 80 cm <sup>2</sup>	Fa. Nunc GmbH & Co, Wiesbaden	178905

**Tabelle 25: Verwendete Chemikalien**

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nummer</b>
6-Aminocapronsäure	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	12548
Acrylamidlösung I	Fa. Appli Chem GmbH Darmstadt	A2806 0250
Acrylamidlösung II	Fa. Appli Chem GmbH Darmstadt	A2805 0250
Agarose	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11404
Ammoniumpersulfat	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	A-1433
Anhydrotetracyclin	Fa. IBA GmbH, Göttingen	2-0401-002
Bacto™ Tryptone	Fa. OTTO NORDWALD GmbH, Hamburg	211705
BCA-Protein-Assay Kit	Fa. Pierce, Rockford, Illinois, U.S.A	23225
Blockierungsreagenz für ELISA	Fa. Roche, Mannheim	1112589
Blut-Agar (Basis)	Fa. Merck, Darmstadt	1.10886.0500
Bromphenolblau	Fa. Merck, Darmstadt	8122
Bsal-Restriktionsenzym	Fa. New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main	R0535S
Carbenicillin	Fa. Biomol GmbH, Hamburg	50195
Caseinhydrolysat	Fa. Merck, Darmstadt	2245
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fa. Merck, Darmstadt	1.15444.025
<i>EcoRI</i> -Restriktionsenzym	Fa. Boehringer, Ingelheim	200310
EDTA	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11280
Essigsäure, 96 %-ig	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	3738.2
Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt	1.00983.1011
Ethidiumbromid 1 %-ige Lösung	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
Ficoll 400	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	17.0400.01
Formaldehydlösung 37 %	Fa. Merck, Darmstadt	1.04002.1000
Fötale Kälberserum (FCS)	Fa. PAA, Cölbe	A15-101
Hefe-Extrakt	Fa. Merck, Darmstadt	1.03753.0500
HEPES	Fa. Biomol GmbH, Hamburg	5288
$\lambda$ HindIII/ <i>EcoRI</i> Marker	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0191

Fortsetzung der **Tabelle 25** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 25**

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nummer</b>
<i>Hind</i> III Puffer	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	BR5
<i>Hind</i> III Restriktionsenzym	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER0501
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0242
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0321
Glycerin	Fa. Merck, Darmstadt	8.18709
Glukose-Monohydrat	Fa. Merck, Darmstadt	8842
Isopropanol	Fa. Merck, Darmstadt	1.09634.2511
Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG)	Fa. Merck, Darmstadt	2316.3
Kaliumacetat	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	4986
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt	4936.1000
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck, Darmstadt	4873.1000
Kanamycin Sulfat	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	K4000
Ligase T4 DNA	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	27-0870-03
6x Loading Dye Solution	Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	R0611
Magnesiumchlorid 98 %	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	M-8260
Marker 1 KB Ladder	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe	15615-016
Marker SeeBlue™ Plus2 Pre-Stained Standard	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe	LC 5925
2-Mercaptoethanol	Fa. Fluka, Neu-Ulm	63689
Methanol	Fa. Merck, Darmstadt	CH3085
N'N-Methylen-bis-Acrylamid (Bisacrylamid)	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	7867
MgCl <sub>2</sub>	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	
Mineralöl	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	M-5904
MOPS	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	6979
MTT [3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid]	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	M-2128

Fortsetzung der **Tabelle 25** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 25**

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nummer</b>
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat reinst ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Fa. Merck, Darmstadt	6576
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat reinst ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Fa. Merck, Darmstadt	6345
$\text{NH}_4$ -Mix	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Nukleotide	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	PAN-739026
Nunc-Immuno™ Plates	Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau	475434
PANScript DNA Polymerase	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Fa. PAA, Cölbe	P11-010
Plasmid Midi Kit	Fa. Qiagen, Hilden	12143
Plasmid Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden	12123
RIDASCREEN® Verotoxin-ELISA	Fa. R-Biopharm AG, Darmstadt	C2201
RPMI 1640-Medium + L-Glutamin	Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach	P04-18500
<i>rTth</i> -XL-Polymerase	Fa. Applied Biosystems, Foster City, U. S. A	N8080187
Saccharose	Fa. Merck, Darmstadt	7651
Salzsäure	Fa. Merck, Darmstadt	1.00315.2511
Schwefelsäure 95 %	Fa. Merck, Darmstadt	1.00731.2511
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	20763
SeeBlue Plus 2	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe	LC 5925
Serva Blue G	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	35050
Standard-I-Nährbouillon	Fa. Merck, Darmstadt	1.07882.0500
Streptomycin sulfate	Fa. Merck, Darmstadt	5711
Tetracyclin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	T-3258
TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	35925
20x <i>Tff</i> -Puffer	Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf	102001
<i>Tff</i> -Polymerase	Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf	102010

Fortsetzung der **Tabelle 25** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 25**

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nummer</b>
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) „BlueStar RMB-HRP“	Fa. Adaltis, Freiburg	ODIA91000
Tricine [N-Tris(hydroxymethyl)- methylglycin]	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	37195
Tris (Tris-Hydroxymethyl- Aminomethan)	Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	4855
Trypton	Fa. Difco, Augsburg	123-17-3
Tween 20 <sup>®</sup>	Fa. Merck, Darmstadt	8.22184.0500
Wasserstoffperoxyd	Fa. Merck, Darmstadt	822287
QIAEXII Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen, Hilden	20021
QIAgen Plasmid Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden	12123
Quick <sup>®</sup> ChangeSite-Directed Mutagenesis Kit	Fa. Stratagene, Heidelberg	200518
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ - D-Galactopyranosid)	Fa. Biomol GmbH, Hamburg	5288



**Verwendete Puffer und Medien****Acrylamidlösung I**

Acrylamid	46,5 g
Bisacrylamid	3 g
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

**Acrylamidlösung II**

Acrylamid	48 g
Bisacrylamid	1,5 g
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

**Anodenpuffer I für Immunoblot**

Tris (1 M)	300 ml
Methanol	200 ml
<i>A. dest.</i>	500 ml

**Anodenpuffer II für Immunoblot**

Tris (1 M)	25 ml
Methanol	200 ml
<i>A. dest.</i>	770 ml

**Anodenpuffer für Tricine-Polyacrylamidgele**

Tris (0,2 M)	24,23 g
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
pH einstellen auf 8,9	

**Blockpuffer**

<u>Stammlösung:</u>	
Blockierungsreagenz für ELISA von Boehringer	27 g
<i>A. dest.</i>	100 ml

**Blockstammlösung**

Blockierungsreagenz	27,0 g
<i>A. dest.</i>	100 ml

**Coating-Puffer**

<u>Stammlösung A:</u>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,24 g
<i>A. dest.</i>	ad 200 ml

<u>Stammlösung B:</u>	
NaHCO <sub>3</sub>	1,68 g
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

<u>Gebrauchslösung:</u>	
Stammlösung A	17,0 ml
Stammlösung B	8,0 ml
<i>A. dest.</i>	ad 100ml
pH einstellen auf 10,33	

**Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)**

Tris	242 g
Eisessig	57,10 g
Na-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**Ethidiumbromid-Färbelösung**

Ethidiumbromid 100 µl  
*A. dest.* ad 1 ml

**EDTA-Puffer (0,2 % in HEPES-Puffer)**

Na-EDTA x 2 H<sub>2</sub>O 2 g  
 HEPES-Puffer 100 ml  
*A. dest.* ad 1.000 ml  
 pH einstellen auf 7,4

**Färbelösung**

Essigsäure, (96 %) 100 ml  
 Serva Blue G 25 mg  
*A. dest.* ad 1.000 ml

**Fixierlösung**

Ethanol 250 ml  
 Essigsäure, (96 %) 50 ml  
*A. dest.* ad 500 ml

**HEPES-EDTA 0,1 %**

Hepes-Puffer Stammlösung 100 ml  
 Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O 1 g  
*A. dest.* ad 1.000 ml

**HEPES-Puffer Stammlösung (10 x)**

NaCl 40 g  
 KCl 1,5 g  
 HEPES 11,9 g  
 D-Glukose (wasserfrei) 10 g  
*A. dest.* ad 500 ml  
 pH einstellen auf 7,4

**HEPES-Puffer (1 x)**

HEPES-Puffer-Sammlösung 50 ml  
*A. dest.* ad 500 ml  
 pH einstellen auf 7,4

**Kathodenpuffer für Immunoblot**

Tris (1 M) 25 ml  
 Methanol 200 ml  
 6-Aminocaprinsäure 5,25 g  
*A. dest.* 770 ml

**Kathodenpuffer für Tricine-Polyacrylamidgele**

Tris (0,1 M) 24,23 g  
 Tricine (0,1 M) 35,84 g  
 SDS (0,1 %) 2,00 g  
*A. dest.* ad 2.000 ml

**Loading-Puffer (6 x)**

Bromphenolblau 25 mg  
 Ficoll 400 1,5 g  
*A. dest.* 9,5 ml

**Luria-Bertani - (LB-) Medium**

Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
pH einstellen auf 8,2	

**MTT-Lösung (5 mg/ml)**

MTT	0,5 g
PBS-Lösung (pH 7,4)	100 ml

**NaCl-Lösung (0,89 %)**

NaCl	8,9 g
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**Na-EDTA-Lösung**

Na-EDTA (0,5 M)	186,15 g
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**NZY-Bouillon**

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
pH auf 7,5 einstellen	
autoklavieren	
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	12,5 ml
MgSO <sub>4</sub>	12,5 ml
Glukose (2 M)	10 ml

**PBS (1 x, pH 7,4)**

PBS-Stammlösung	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**PBS-Stammlösung (10 x) für Immunoblot + Zellkultur**

NaCl	100 g
KCl	2,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	18 g
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
pH einstellen auf 7,4	

**PBS-Tween (PBS mit 0,5 % Tween 20)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,47 g
NaCl	8,18 g
Tween 20®	0,5 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
pH einstellen auf 7,2	

**Polyacrylamidsammegel (4 %)**

Tris-HCl (3 M, pH 8,4)	1 ml
Acrylamidlösung II	0,35 ml
<i>A. dest.</i>	2,75 ml
APS (10 %)	50 µl
TEMED	5 µl

**Polyacrylamidtrenngel (10 %)**

Tris-HCl (3 M, pH 8,4)	5 ml
Glycerin (87 %)	2 ml
Acrylamidlösung I	3 ml
<i>A. dest.</i>	5 ml
APS (10 %)	115 µl
TEMED	11,5 µl

**Puffer P**

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	10 ml
Na-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O (0,5 M, pH 8,0)	200 µl
Saccharose	17,1 g
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

**RPMI-Medium**

RPMI 1640 + L-Glutamin	890 ml
FCS	100 ml
Penicillin (10.000 IE/ml) /Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung	10 ml

**Schafblutagar**

Blut-Agar (Basis)	50 g
defibriertes Schafblut	50 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**Serumbouillon**

Standard-I-Nährbouillon	25 ml
Rinderserum	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**Schwefelsäure-Stoppreagenz (0,25 M)**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95 %)	10 ml
<i>A. dest.</i>	ad 390 ml

**1 %-ige SDS-Lösung**

Natriumdodecylsulfat	0,5 g
NaCl	ad 50 ml

**10 %-ige SDS-Lösung**

Natriumdodecylsulfat	100 g
HCl 1 N	10 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**Substratstammlösung für den Immunoblot**

4-Chloro-1-Naphthol	0,06 g
Methanol	20 ml

**Substratgebrauchslösung für den Immunoblot**

Substratstammlösung	3,0 ml
PBS-Lösung (pH 7,4)	7,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,0 µl
<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

**TFB I-Puffer**

CH <sub>3</sub> COOK	30 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
KCl	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glycerin (15 %)	34,5 ml
A. dest.	ad 200 ml
pH einstellen auf 5,8	

**TFB II-Puffer**

NaMops	10 mM
KCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glycerin (15 %)	17,25 ml
A. dest.	ad 100 ml
pH einstellen auf 7,0	

**Tricine-Proteinprobenpuffer (Lämmli-Puffer)**

Tris (0,5 M, pH 6,8)	1 ml
SDS (10 %)	1,6 ml
Glycerol (87 %)	0,8 ml
2-Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenolblau	0,02 g
A. dest.	4 ml

**Trypanblau-Lösung**

Trypanblau	0,20 g
NaCl-Lösung	1.000 ml

**Trypsin-Gebrauchslösung**

Trypsinlösung (0,25 %)	100 ml
HEPES-EDTA (0,1%)	ad 1.000 ml



**Tabelle 27: Übersicht über alle in den Tierversuchen A bis I gewonnenen Serumproben und die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen (Ergebnisse aus ELISA<sub>rStx2e</sub> und Stx2e-Neutralisationstest)**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
A	--	113	2. LT	R-2943/05	283,3	n. t.
A	1	101	2. LT	R-2932/05		
A	1	106	2. LT	R-2936/05	178,9	0,0
A	1	121	2. LT	R-2951/05		
A	1	128	2. LT	R-2958/05		
A	2	104	2. LT	R-2935/05		
A	2	108	2. LT	R-2938/05	254,3	2,1
A	2	125	2. LT	R-2955/05		
A	2	126	2. LT	R-2956/05		
A	3	102	2. LT	R-2933/05		
A	3	103	2. LT	R-2934/05		
A	3	109	2. LT	R-2939/05	117,1	0,0
A	3	118	2. LT	R-2948/05		
A	3	119	2. LT	R-2949/05		
A	4	112	2. LT	R-2942/05		
A	4	115	2. LT	R-2945/05	259,0	0,0
A	4	117	2. LT	R-2947/05		
A	4	127	2. LT	R-2957/05		
A	5	116	2. LT	R-2946/05		
A	5	122	2. LT	R-2952/05	252,8	0,0
A	5	123	2. LT	R-2953/05		
A	5	124	2. LT	R-2954/05		
A	6	107	2. LT	R-2937/05		
A	6	110	2. LT	R-2940/05		
A	6	111	2. LT	R-2941/05	188,9	0,0
A	6	114	2. LT	R-2944/05		
A	6	120	2. LT	R-2950/05		
A	1	101	36. LT	R-2959/05		
A	1	106	36. LT	R-2963/05	48,3	1,5
A	1	121	36. LT	R-2977/05		
A	1	128	36. LT	R-2984/05		
A	2	104	36. LT	R-2962/05		
A	2	108	36. LT	R-2965/05	75,5	0,0
A	2	125	36. LT	R-2981/05		
A	2	126	36. LT	R-2982/05		
A	3	102	36. LT	R-2960/05		
A	3	103	36. LT	R-2961/05		
A	3	109	36. LT	R-2966/05	53,4	0,0
A	3	118	36. LT	R-2974/05		
A	3	119	36. LT	R-2975/05		
A	4	112	36. LT	R-2969/05		
A	4	115	36. LT	R-2971/05	95,2	0,0
A	4	117	36. LT	R-2973/05		
A	4	127	36. LT	R-2983/05		
A	5	116	36. LT	R-2972/05		
A	5	122	36. LT	R-2978/05	49,4	0,0
A	5	123	36. LT	R-2979/05		
A	5	124	36. LT	R-2980/05		
A	6	107	36. LT	R-2964/05		
A	6	110	36. LT	R-2967/05		
A	6	111	36. LT	R-2968/05	68,4	0,0
A	6	114	36. LT	R-2970/05		
A	6	120	36. LT	R-2976/05		

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
A	1	101	50. LT	R-2985/05	57,7	0,0
A	2	104	50. LT	R-2988/05		
A	2	108	50. LT	R-2990/05	83,4	0,0
A	2	125	50. LT	R-3003/05		
A	2	126	50. LT	R-3004/05		
A	3	102	50. LT	R-2986/05		
A	3	103	50. LT	R-2987/05		
A	3	109	50. LT	R-2991/05	60,2	0,0
A	3	118	50. LT	R-2999/05		
A	3	119	50. LT	R-3000/05		
A	4	112	50. LT	R-2994/05		
A	4	115	50. LT	R-2996/05	85,0	0,0
A	4	117	50. LT	R-2998/05		
A	4	127	50. LT	R-3005/05		
A	5	116	50. LT	R-2997/05	52,3	0,0
A	5	122	50. LT	R-3002/05		
A	6	107	50. LT	R-2989/05		
A	6	110	50. LT	R-2992/05		
A	6	111	50. LT	R-2993/05	56,5	0,0
A	6	114	50. LT	R-2995/05		
A	6	120	50. LT	R-3001/05		
B	1	015	36. LT	R-3007/05		
B	1	018	36. LT	R-3008/05		
B	1	154	36. LT	R-3011/05		
B	1	156	36. LT	R-3013/05	25,9	0,0
B	1	158	36. LT	R-3015/05		
B	1	159	36. LT	R-3016/05		
B	1	167	36. LT	R-3022/05		
B	1	170	36. LT	R-3025/05		
B	2	155	36. LT	R-3012/05		
B	2	157	36. LT	R-3014/05		
B	2	160	36. LT	R-3017/05		
B	2	162	36. LT	R-3019/05		
B	2	168	36. LT	R-3023/05	32,5	0,0
B	2	169	36. LT	R-3024/05		
B	2	180	36. LT	R-3026/05		
B	2	181	36. LT	R-3027/05		
B	2	182	36. LT	R-3028/05		
B	3	152	36. LT	R-3009/05		
B	3	153	36. LT	R-3010/05		
B	3	161	36. LT	R-3018/05		
B	3	165	36. LT	R-3020/05		
B	3	166	36. LT	R-3021/05	34,8	0,0
B	3	183	36. LT	R-3029/05		
B	3	184	36. LT	R-3030/05		
B	3	584	36. LT	R-3031/05		
B	3	587	36. LT	R-3032/05		
B	1	015	50. LT	R-3033/05		
B	1	158	50. LT	R-3036/05	20,0	0,0
B	1	159	50. LT	R-3037/05		
B	1	167	50. LT	R-3041/05		
B	2	155	50. LT	R-3034/05		
B	2	157	50. LT	R-3035/05	31,2	0,0
B	2	160	50. LT	R-3038/05		
B	2	162	50. LT	R-3039/05		

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite



Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
B	2	168	50. LT	R-3042/05		
B	2	169	50. LT	R-3043/05		
B	2	180	50. LT	R-3044/05	31,2	0,0
B	2	181	50. LT	R-3045/05		
B	2	182	50. LT	R-3046/05		
B	3	165	50. LT	R-3040/05	24,1	0,0
B	3	183	50. LT	R-3047/05		
C	1	006	35. LT	R-3068/05	21,7	
C	1	007	35. LT	R-3069/05	18,6	
C	1	008	35. LT	R-3070/05	26,0	
C	1	010	35. LT	R-3072/05	23,9	0,0
C	1	019	35. LT	R-3077/05	23,1	
C	1	020	35. LT	R-3078/05	13,4	
C	1	021	35. LT	R-3079/05	21,3	
C	1	026	35. LT	R-3084/05	20,8	
C	1	028	35. LT	R-3086/05	23,4	
C	1	027	35. LT	R-3085/05	24,2	
C	1	031	35. LT	R-3089/05	20,5	0,0
C	1	034	35. LT	R-3090/05	31,4	
C	1	040	35. LT	R-3095/05	28,6	
C	1	046	35. LT	R-3100/05	26,1	
C	2	009	35. LT	R-3071/05	19,0	
C	2	011	35. LT	R-3073/05	20,3	
C	2	012	35. LT	R-3074/05	18,0	0,0
C	2	013	35. LT	R-3075/05	24,0	
C	2	014	35. LT	R-3076/05	19,2	
C	2	024	35. LT	R-3082/05	24,4	
C	2	025	35. LT	R-3083/05	30,0	
C	2	029	35. LT	R-3087/05	21,5	0,0
C	2	030	35. LT	R-3088/05	27,4	
C	2	043	35. LT	R-3097/05	22,2	
C	3	004	46. LT	R-3101/05	17,9	
C	3	022	46. LT	R-3102/05	21,1	
C	3	023	46. LT	R-3103/05	19,6	
C	3	035	46. LT	R-3104/05	20,6	0,0
C	3	036	46. LT	R-3105/05	35,3	
C	3	037	46. LT	R-3106/05	17,4	
C	3	044	46. LT	R-3107/05	39,8	
C	4	004	35. LT	R-3066/05	17,7	
C	4	005	35. LT	R-3067/05	29,8	
C	4	022	35. LT	R-3080/05	19,1	
C	4	023	35. LT	R-3081/05	20,1	0,0
C	4	035	35. LT	R-3091/05	19,1	
C	4	036	35. LT	R-3092/05	37,8	
C	4	037	35. LT	R-3093/05	16,4	
C	4	038	35. LT	R-3094/05	21,2	
C	4	041	35. LT	R-3096/05	32,9	0,0
C	4	044	35. LT	R-3098/05	32,3	
C	4	045	35. LT	R-3099/05	42,2	

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
D	1	1	9. LT	R-3118/05		
D	1	2	9. LT	R-3119/05		
D	1	3	9. LT	R-3120/05	11,5	0,0
D	1	4	9. LT	R-3121/05		
D	1	5	9. LT	R-3122/05		
D	1	6	9. LT	R-3123/05		
D	1	7	9. LT	R-3124/05		
D	1	8	9. LT	R-3125/05	53,2	0,0
D	1	9	9. LT	R-3126/05		
D	1	10	9. LT	R-3127/05		
D	2	11	9. LT	R-3128/05		
D	2	12	9. LT	R-3129/05		
D	2	13	9. LT	R-3130/05	77,5	0,0
D	2	14	9. LT	R-3131/05		
D	2	15	9. LT	R-3132/05		
D	2	16	9. LT	R-3133/05		
D	2	17	9. LT	R-3134/05		
D	2	18	9. LT	R-3135/05	29,7	0,0
D	2	19	9. LT	R-3136/05		
D	2	20	9. LT	R-3137/05		
D	3	21	9. LT	R-3138/05		
D	3	22	9. LT	R-3139/05		
D	3	23	9. LT	R-3140/05	31,9	0,0
D	3	24	9. LT	R-3141/05		
D	3	25	9. LT	R-3142/05		
D	3	26	9. LT	R-3143/05		
D	3	27	9. LT	R-3144/05	34,8	0,0
D	3	"29"	9. LT	R-3145/05		
D	3	29	9. LT	R-3146/05		
D	4	30	9. LT	R-3147/05		
D	4	31	9. LT	R-3148/05		
D	4	32	9. LT	R-3149/05	44,4	0,0
D	4	33	9. LT	R-3150/05		
D	4	34	9. LT	R-3151/05		
D	4	35	9. LT	R-3152/05		
D	4	36	9. LT	R-3153/05		
D	4	37	9. LT	R-3154/05	47,5	0,0
D	4	38	9. LT	R-3155/05		
D	4	39	9. LT	R-3156/05		
D	5	40	9. LT	R-3157/05		
D	5	41	9. LT	R-3158/05		
D	5	42	9. LT	R-3159/05	42,9	0,0
D	5	43	9. LT	R-3160/05		
D	5	44	9. LT	R-3161/05		
D	5	45	9. LT	R-3162/05		
D	5	46	9. LT	R-3163/05		
D	5	47	9. LT	R-3164/05	40,7	0,0
D	5	48	9. LT	R-3165/05		
D	5	49	9. LT	R-3166/05		

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
D	6	50	9. LT	R-3167/05		
D	6	51	9. LT	R-3168/05		
D	6	52	9. LT	R-3169/05	29,6	0,0
D	6	53	9. LT	R-3170/05		
D	6	54	9. LT	R-3171/05		
D	6	55	9. LT	R-3172/05		
D	6	56	9. LT	R-3173/05		
D	6	57	9. LT	R-3174/05		
D	6	58	9. LT	R-3175/05	28,9	0,0
D	6	59	9. LT	R-3176/05		
D	6	60	9. LT	R-3177/05		
D	1	1	28. LT	R-3178/05	13,2	1,9
D	1	2	28. LT	R-3179/05	10,6	0,0
D	1	3	28. LT	R-3180/05	12,2	0,0
D	1	4	28. LT	R-3181/05	24,3	<b>31,2</b>
D	1	5	28. LT	R-3182/05	19,0	0,0
D	1	6	28. LT	R-3183/05	9,8	<b>39,3</b>
D	1	7	28. LT	R-3184/05	30,5	0,0
D	1	8	28. LT	R-3185/05	17,8	3,7
D	1	9	28. LT	R-3186/05	62,8	0,0
D	1	10	28. LT	R-3187/05	53,5	0,0
D	2	11	28. LT	R-3188/05	80,8	7,0
D	2	12	28. LT	R-3189/05	81,6	8,1
D	2	13	28. LT	R-3190/05	73,3	0,0
D	2	14	28. LT	R-3191/05	42,3	0,0
D	2	15	28. LT	R-3192/05	55,1	0,0
D	2	16	28. LT	R-3193/05	40,2	0,0
D	2	17	28. LT	R-3194/05	12,6	0,0
D	2	18	28. LT	R-3195/05	25,4	0,0
D	2	19	28. LT	R-3196/05	21,7	9,0
D	2	20	28. LT	R-3197/05	24,4	0,0
D	3	21	28. LT	R-3198/05	22,9	
D	3	22	28. LT	R-3199/05	56,9	
D	3	23	28. LT	R-3200/05	30,8	0,0
D	3	24	28. LT	R-3201/05	21,5	
D	3	25	28. LT	R-3202/05	34,8	
D	3	26	28. LT	R-3203/05	49,8	
D	3	27	28. LT	R-3204/05	15,7	
D	3	28	28. LT	R-3205/05	24,1	0,0
D	3	29	28. LT	R-3206/05	21,2	
D	3	30	28. LT	R-3207/05	24,4	
D	4	31	28. LT	R-3208/05		
D	4	32	28. LT	R-3209/05		
D	4	33	28. LT	R-3210/05	20,0	0,0
D	4	34	28. LT	R-3211/05		
D	4	35	28. LT	R-3212/05		
D	4	36	28. LT	R-3213/05		
D	4	37	28. LT	R-3214/05		
D	4	38	28. LT	R-3215/05	14,6	0,0
D	4	39	28. LT	R-3216/05		
D	4	40	28. LT	R-3217/05		

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
D	5	41	28. LT	R-3218/05		
D	5	42	28. LT	R-3219/05		
D	5	43	28. LT	R-3220/05	16,1	0,0
D	5	44	28. LT	R-3221/05		
D	5	45	28. LT	R-3222/05		
D	5	46	28. LT	R-3223/05		
D	5	47	28. LT	R-3224/05		
D	5	48	28. LT	R-3225/05	12,4	0,0
D	5	49	28. LT	R-3226/05		
D	5	50	28. LT	R-3227/05		
D	6	51	28. LT	R-3228/05		
D	6	52	28. LT	R-3229/05		
D	6	53	28. LT	R-3230/05	14,7	0,0
D	6	54	28. LT	R-3231/05		
D	6	55	28. LT	R-3232/05		
D	6	56	28. LT	R-3233/05		
D	6	57	28. LT	R-3234/05		
D	6	58	28. LT	R-3235/05	16,8	0,0
D	6	59	28. LT	R-3236/05		
D	6	60	28. LT	R-3237/05		
D	1	1	38. LT	R-3238/05	53,1	<b>209,0</b>
D	1	2	38. LT	R-3239/05	13,6	<b>114,9</b>
D	1	3	38. LT	R-3240/05	50,8	<b>582,0</b>
D	1	4	38. LT	R-3241/05	58,8	<b>≥ 960,4</b>
D	1	5	38. LT	R-3242/05	78,6	<b>≥ 901,6</b>
D	1	6	38. LT	R-3243/05	49,6	<b>≥ 656,2</b>
D	1	7	38. LT	R-3244/05	78,2	<b>≥ 3551,9</b>
D	1	8	38. LT	R-3245/05	101,2	<b>≥ 710,4</b>
D	1	9	38. LT	R-3246/05	45,9	<b>88,5</b>
D	1	10	38. LT	R-3247/05	97,2	<b>690,6</b>
D	2	11	38. LT	R-3248/05	116,7	<b>663,5</b>
D	2	12	38. LT	R-3249/05	134,8	<b>2011,3</b>
D	2	13	38. LT	R-3250/05	120,3	<b>806,0</b>
D	2	14	38. LT	R-3251/05	66,5	<b>208,2</b>
D	2	15	38. LT	R-3252/05	77,5	<b>≥ 1545,0</b>
D	2	16	38. LT	R-3253/05	51,1	<b>≥ 1406,8</b>
D	2	17	38. LT	R-3254/05	15,1	<b>≥ 2006,4</b>
D	2	18	38. LT	R-3255/05	37,9	<b>1011,7</b>
D	2	19	38. LT	R-3256/05	27,7	9,1
D	2	20	38. LT	R-3257/05	60,2	<b>2376,5</b>
D	3	21	38. LT	R-3258/05	44,1	0,0
D	3	22	38. LT	R-3259/05	43,0	0,0
D	3	23	38. LT	R-3260/05	49,2	0,0
D	3	24	38. LT	R-3261/05	21,9	0,0
D	3	25	38. LT	R-3262/05	26,0	0,0
D	3	26	38. LT	R-3263/05	47,8	0,0
D	3	27	38. LT	R-3264/05	23,9	0,0
D	3	28	38. LT	R-3265/05	28,6	0,0
D	3	29	38. LT	R-3266/05	15,3	0,0
D	3	30	38. LT	R-3267/05	26,0	0,0

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
D	4	31	38. LT	R-3268/05		
D	4	32	38. LT	R-3269/05		
D	4	33	38. LT	R-3270/05	37,1	0,0
D	4	34	38. LT	R-3271/05		
D	4	35	38. LT	R-3272/05		
D	4	36	38. LT	R-3273/05		
D	4	37	38. LT	R-3274/05		
D	4	38	38. LT	R-3275/05	20,6	0,0
D	4	39	38. LT	R-3276/05		
D	4	40	38. LT	R-3277/05		
D	5	41	38. LT	R-3278/05		
D	5	42	38. LT	R-3279/05		
D	5	43	38. LT	R-3280/05	27,2	0,0
D	5	44	38. LT	R-3281/05		
D	5	45	38. LT	R-3282/05		
D	5	46	38. LT	R-3283/05		
D	5	47	38. LT	R-3284/05		
D	5	48	38. LT	R-3285/05	25,3	0,0
D	5	49	38. LT	R-3286/05		
D	5	50	38. LT	R-3287/05		
D	6	51	38. LT	R-3288/05		
D	6	52	38. LT	R-3289/05		
D	6	53	38. LT	R-3290/05	28,0	0,0
D	6	54	38. LT	R-3291/05		
D	6	55	38. LT	R-3292/05		
D	6	56	38. LT	R-3293/05		
D	6	57	38. LT	R-3294/05		
D	6	58	38. LT	R-3295/05	26,0	0,0
D	6	59	38. LT	R-3296/05		
D	6	60	38. LT	R-3297/05		
D	1	1	55. LT	R-3298/05	66,2	<b>416,2</b>
D	1	2	55. LT	R-3299/05	26,4	<b>≥ 8167,1</b>
D	1	3	55. LT	R-3300/05	81,0	<b>2287,7</b>
D	1	4	55. LT	R-3301/05	91,1	<b>1915,0</b>
D	1	5	55. LT	R-3302/05	86,1	<b>391,3</b>
D	1	6	55. LT	R-3303/05	36,0	<b>444,4</b>
D	1	7	55. LT	R-3304/05	50,8	<b>≥ 6951,8</b>
D	1	8	55. LT	R-3305/05	73,9	<b>942,8</b>
D	1	9	55. LT	R-3306/05	97,0	<b>374,6</b>
D	1	10	55. LT	R-3307/05	112,1	<b>≥ 1363,5</b>
D	2	11	55. LT	R-3308/05	112,4	<b>≥ 4460,2</b>
D	2	12	55. LT	R-3309/05	144,0	<b>≥ 3990,2</b>
D	2	13	55. LT	R-3310/05	160,6	<b>≥ 1893,6</b>
D	2	14	55. LT	R-3311/05	74,0	<b>484,0</b>
D	2	15	55. LT	R-3312/05	104,1	<b>≥ 5479,0</b>
D	2	16	55. LT	R-3313/05	60,4	<b>≥ 3002,9</b>
D	2	17	55. LT	R-3314/05	32,9	<b>≥ 1612,3</b>
D	2	18	55. LT	R-3315/05	145,9	<b>146,3</b>
D	2	20	55. LT	R-3316/05	140,3	<b>≥ 6775,3</b>
D	3	21	55. LT	R-3317/05	97,6	0,0
D	3	22	55. LT	R-3318/05	116,0	2,7
D	3	26	55. LT	R-3319/05	98,6	<b>19,9</b>

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
D	3	28	55. LT	R-3320/05	70,0	<b>108,6</b>
D	3	29	55. LT	R-3321/05	61,0	0,0
D	3	30	55. LT	R-3322/05	47,0	0,0
D	4	31	55. LT	R-3323/05	57,4	3,6
D	4	35	55. LT	R-3324/05	54,3	<b>109,9</b>
D	5	48	55. LT	R-3325/05	14,5	0,0
D	5	49	55. LT	R-3326/05	63,8	<b>109,8</b>
D	6	51	55. LT	R-3327/05	42,5	
D	6	52	55. LT	R-3328/05	78,7	
D	6	53	55. LT	R-3329/05	46,3	0,0
D	6	54	55. LT	R-3330/05	28,9	
D	6	55	55. LT	R-3331/05	38,9	
D	6	56	55. LT	R-3332/05	27,3	
D	6	57	55. LT	R-3333/05	41,8	
D	6	58	55. LT	R-3334/05	23,9	0,0
D	6	59	55. LT	R-3335/05	44,1	
D	6	60	55. LT	R-3336/05	34,9	
E	1a	221	9. LT	R-4444/05		
E	1a	222	9. LT	R-4445/05		
E	1a	223	9. LT	R-4446/05	16,1	0,0
E	1a	224	9. LT	R-4447/05		
E	1a	225	9. LT	R-4448/05		
E	1a	226	9. LT	R-4449/05	14,2	
E	1a	227	9. LT	R-4450/05	71,4	
E	1a	228	9. LT	R-4451/05	75,4	0,0
E	1a	229	9. LT	R-4452/05	70,9	
E	1a	230	9. LT	R-4453/05	95,2	
E	1b	211	9. LT	R-4454/05		
E	1b	212	9. LT	R-4455/05		
E	1b	213	9. LT	R-4456/05	29,6	0,0
E	1b	214	9. LT	R-4457/05		
E	1b	215	9. LT	R-4458/05		
E	1b	216	9. LT	R-4459/05		
E	1b	217	9. LT	R-4460/05		
E	1b	218	9. LT	R-4461/05	39,0	0,0
E	1b	219	9. LT	R-4462/05		
E	1b	220	9. LT	R-4463/05		
E	1c	241	9. LT	R-4464/05		
E	1c	242	9. LT	R-4465/05		
E	1c	243	9. LT	R-4466/05	36,8	0,0
E	1c	244	9. LT	R-4467/05		
E	1c	245	9. LT	R-4468/05		
E	1c	246	9. LT	R-4469/05	84,5	
E	1c	247	9. LT	R-4470/05	84,4	
E	1c	248	9. LT	R-4471/05	41,3	0,0
E	1c	249	9. LT	R-4472/05	87,2	
E	1c	250	9. LT	R-4473/05	40,9	
E	2	201	9. LT	R-4474/05		
E	2	202	9. LT	R-4475/05		
E	2	203	9. LT	R-4476/05	35,8	0,0
E	2	204	9. LT	R-4477/05		
E	2	205	9. LT	R-4478/05		

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
E	2	206	9. LT	R-4479/05		
E	2	207	9. LT	R-4480/05		
E	2	208	9. LT	R-4481/05	35,5	0,0
E	2	209	9. LT	R-4482/05		
E	2	210	9. LT	R-4483/05		
E	3	231	9. LT	R-4484/05	85,1	
E	3	232	9. LT	R-4485/05	112,4	
E	3	233	9. LT	R-4486/05	23,6	0,0
E	3	234	9. LT	R-4487/05	21,0	
E	3	235	9. LT	R-4488/05	28,3	
E	3	236	9. LT	R-4489/05		
E	3	237	9. LT	R-4490/05		
E	3	238	9. LT	R-4491/05	26,8	0,0
E	3	239	9. LT	R-4492/05		
E	3	240	9. LT	R-4493/05		
E	4	251	9. LT	R-4494/05		
E	4	252	9. LT	R-4495/05		
E	4	253	9. LT	R-4496/05	37,0	0,0
E	4	254	9. LT	R-4497/05		
E	4	255	9. LT	R-4498/05		
E	4	256	9. LT	R-4499/05		
E	4	257	9. LT	R-4500/05		
E	4	258	9. LT	R-4501/05	23,8	1,3
E	4	259	9. LT	R-4502/05		
E	4	260	9. LT	R-4503/05		
E	5	261	9. LT	R-4504/05		
E	5	262	9. LT	R-4505/05		
E	5	263	9. LT	R-4506/05	33,6	0,0
E	5	264	9. LT	R-4507/05		
E	5	265	9. LT	R-4508/05		
E	5	266	9. LT	R-4509/05		
E	5	267	9. LT	R-4510/05		
E	5	268	9. LT	R-4511/05	27,9	0,0
E	5	269	9. LT	R-4512/05		
E	5	271	9. LT	R-4514/05		
E	5	210	9. LT	R-4513/05	17,4	0,0
E	1a	221	28. LT	R-4515/05	21,4	
E	1a	222	28. LT	R-4516/05	23,3	4,6
E	1a	223	28. LT	R-4517/05	33,3	
E	1a	225	28. LT	R-4518/05	32,6	
E	1a	227	28. LT	R-4519/05	50,6	
E	1a	228	28. LT	R-4520/05	50,9	0,0
E	1a	229	28. LT	R-4521/05	45,4	
E	1a	230	28. LT	R-4522/05	41,0	
E	1b	211	28. LT	R-4523/05	30,7	
E	1b	212	28. LT	R-4524/05	36,0	
E	1b	213	28. LT	R-4525/05	30,4	8,6
E	1b	214	28. LT	R-4526/05	28,0	
E	1b	215	28. LT	R-4527/05	32,1	
E	1b	217	28. LT	R-4528/05	36,9	
E	1b	218	28. LT	R-4529/05	54,3	0,0
E	1b	219	28. LT	R-4530/05	27,7	
E	1b	220	28. LT	R-4531/05	21,2	
E	1b	214-II	28. LT	R-4582/05	18,4	0,0

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
E	1c	241	28. LT	R-4532/05	34,8	
E	1c	242	28. LT	R-4533/05	20,9	
E	1c	243	28. LT	R-4534/05	42,3	2,1
E	1c	244	28. LT	R-4535/05	33,6	
E	1c	245	28. LT	R-4536/05	45,9	
E	1c	246	28. LT	R-4537/05	62,1	
E	1c	247	28. LT	R-4538/05	95,2	
E	1c	248	28. LT	R-4539/05	37,7	0,0
E	1c	249	28. LT	R-4540/05	66,8	
E	1c	250	28. LT	R-4541/05	47,7	
E	2	201	28. LT	R-4542/05	45,7	
E	2	202	28. LT	R-4543/05	37,0	
E	2	203	28. LT	R-4544/05	36,2	0,0
E	2	204	28. LT	R-4545/05	19,2	
E	2	205	28. LT	R-4546/05	20,1	
E	2	206	28. LT	R-4547/05	31,1	
E	2	207	28. LT	R-4548/05	24,4	
E	2	208	28. LT	R-4549/05	39,0	0,0
E	2	209	28. LT	R-4550/05	37,4	
E	2	210	28. LT	R-4551/05	37,2	
E	3	231	28. LT	R-4552/05	38,8	
E	3	232	28. LT	R-4553/05	38,6	
E	3	233	28. LT	R-4554/05	25,1	0,0
E	3	234	28. LT	R-4555/05	19,5	
E	3	235	28. LT	R-4556/05	31,1	
E	3	236	28. LT	R-4557/05	19,7	
E	3	237	28. LT	R-4558/05	20,1	
E	3	238	28. LT	R-4559/05	19,2	0,0
E	3	239	28. LT	R-4560/05	27,5	
E	3	240	28. LT	R-4561/05	27,6	
E	--	237-II	28. LT	R-4583/05	15,0	0,0
E	--	237-III	28. LT	R-4584/05	20,8	0,0
E	4	251	28. LT	R-4562/05		
E	4	252	28. LT	R-4563/05		
E	4	253	28. LT	R-4564/05	26,7	0,0
E	4	254	28. LT	R-4565/05		
E	4	255	28. LT	R-4566/05		
E	4	256	28. LT	R-4567/05		
E	4	257	28. LT	R-4568/05		
E	4	258	28. LT	R-4569/05	15,2	0,0
E	4	259	28. LT	R-4570/05		
E	4	260	28. LT	R-4571/05		
E	5	261	28. LT	R-4572/05		
E	5	262	28. LT	R-4573/05		
E	5	263	28. LT	R-4574/05	31,0	0,0
E	5	264	28. LT	R-4575/05		
E	5	265	28. LT	R-4576/05		
E	5	266	28. LT	R-4577/05		
E	5	267	28. LT	R-4578/05		
E	5	268	28. LT	R-4579/05	24,4	0,0
E	5	269	28. LT	R-4580/05		
E	5	271	28. LT	R-4581/05		
E	1a	221	37. LT	R-4585/05	33,1	<b>587,4</b>
E	1a	222	37. LT	R-4586/05	24,3	<b>176,2</b>
E	1a	223	37. LT	R-4587/05	37,0	<b>1232,2</b>
E	1a	224	37. LT	R-4588/05	33,9	<b>1253,1</b>

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite



Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
E	1a	225	37. LT	R-4589/05	39,7	<b>2114,5</b>
E	1a	226	37. LT	R-4590/05	30,0	<b>1504,2</b>
E	1a	227	37. LT	R-4591/05	61,9	<b>744,5</b>
E	1a	228	37. LT	R-4592/05	49,4	<b>136,5</b>
E	1a	229	37. LT	R-4593/05	48,0	<b>402,4</b>
E	1a	230	37. LT	R-4594/05	49,0	<b>453,8</b>
E	1b	211	37. LT	R-4595/05	46,2	<b>8105,2</b>
E	1b	212	37. LT	R-4596/05	48,8	<b>762,5</b>
E	1b	213	37. LT	R-4597/05	44,4	<b>372,0</b>
E	1b	214	37. LT	R-4598/05	33,3	<b>358,9</b>
E	1b	215	37. LT	R-4599/05	67,6	<b>241,1</b>
E	1b	217	37. LT	R-4600/05	54,0	<b>143,3</b>
E	1b	218	37. LT	R-4601/05	55,0	<b>1092,8</b>
E	1b	219	37. LT	R-4602/05	41,8	<b>299,6</b>
E	1b	220	37. LT	R-4603/05	25,4	<b>333,4</b>
E	1c	241	37. LT	R-4604/05	46,0	<b>199,1</b>
E	1c	242	37. LT	R-4605/05	52,8	<b>11,0</b>
E	1c	243	37. LT	R-4606/05	46,5	<b>29,6</b>
E	1c	244	37. LT	R-4607/05	58,4	<b>26,3</b>
E	1c	245	37. LT	R-4608/05	45,7	<b>38,5</b>
E	1c	246	37. LT	R-4609/05	89,0	<b>424,4</b>
E	1c	247	37. LT	R-4610/05	112,6	<b>227,5</b>
E	1c	248	37. LT	R-4611/05	36,0	<b>841,9</b>
E	1c	249	37. LT	R-4612/05	104,4	<b>55,2</b>
E	1c	250	37. LT	R-4613/05	31,5	<b>430,3</b>
E	2	201	37. LT	R-4614/05	23,9	0,0
E	2	202	37. LT	R-4615/05	40,0	0,0
E	2	203	37. LT	R-4616/05	37,7	0,0
E	2	204	37. LT	R-4617/05	26,4	0,0
E	2	205	37. LT	R-4618/05	24,9	0,0
E	2	206	37. LT	R-4619/05	68,5	0,0
E	2	207	37. LT	R-4620/05	24,7	0,0
E	2	208	37. LT	R-4621/05	52,7	0,0
E	2	209	37. LT	R-4622/05	49,0	0,0
E	2	210	37. LT	R-4623/05	73,4	0,0
E	3	231	37. LT	R-4624/05	46,9	0,0
E	3	232	37. LT	R-4625/05	41,4	0,0
E	3	233	37. LT	R-4626/05	19,5	0,0
E	3	234	37. LT	R-4627/05	17,9	0,0
E	3	235	37. LT	R-4628/05	40,1	0,0
E	3	236	37. LT	R-4629/05	16,1	0,0
E	3	237	37. LT	R-4630/05	21,4	0,0
E	3	238	37. LT	R-4631/05	19,8	0,0
E	3	239	37. LT	R-4632/05	35,9	4,3
E	3	240	37. LT	R-4633/05	28,2	0,1
E	4	251	37. LT	R-4634/05		
E	4	252	37. LT	R-4635/05		
E	4	253	37. LT	R-4636/05	26,3	0,0
E	4	254	37. LT	R-4637/05		
E	4	255	37. LT	R-4638/05		
E	4	256	37. LT	R-4639/05		
E	4	257	37. LT	R-4640/05		
E	4	258	37. LT	R-4641/05	17,8	0,0
E	4	259	37. LT	R-4642/05		
E	4	260	37. LT	R-4643/05		

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
E	5	261	37. LT	R-4644/05		
E	5	262	37. LT	R-4645/05		
E	5	263	37. LT	R-4646/05	40,4	0,0
E	5	264	37. LT	R-4647/05		
E	5	265	37. LT	R-4648/05		
E	5	266	37. LT	R-4649/05		
E	5	267	37. LT	R-4650/05		
E	5	268	37. LT	R-4651/05	26,0	0,0
E	5	269	37. LT	R-4652/05		
E	5	271	37. LT	R-4653/05		
E	1c	244	48. LT	R-4654/05	74,7	<b>444,5</b>
E	1a	222	55. LT	R-4655/05	71,5	<b>1517,4</b>
E	1a	223	55. LT	R-4656/05	81,1	<b>4187,8</b>
E	1a	224	55. LT	R-4657/05	39,9	<b>5988,0</b>
E	1a	225	55. LT	R-4658/05	43,4	<b>3893,4</b>
E	1a	227	55. LT	R-4659/05	84,1	<b>1474,0</b>
E	1a	228	55. LT	R-4660/05	50,4	<b>200,8</b>
E	1a	229	55. LT	R-4661/05	80,2	<b>1128,6</b>
E	1a	230	55. LT	R-4662/05	69,2	<b>2411,8</b>
E	1b	211	55. LT	R-4663/05	98,1	<b>6211,6</b>
E	1b	212	55. LT	R-4664/05	78,4	<b>1603,4</b>
E	1b	213	55. LT	R-4665/05	91,0	<b>494,9</b>
E	1b	214	55. LT	R-4666/05	52,4	<b>564,6</b>
E	1b	215	55. LT	R-4667/05	88,2	<b>1195,5</b>
E	1b	217	55. LT	R-4668/05	66,7	<b>464,8</b>
E	1b	218	55. LT	R-4669/05	93,8	<b>1592,5</b>
E	1b	219	55. LT	R-4670/05	41,5	<b>1512,8</b>
E	1b	220	55. LT	R-4671/05	30,8	<b>970,0</b>
E	1b	212-II	55. LT	R-4695/05	75,5	<b>3071,9</b>
E	1c	241	55. LT	R-4672/05	75,4	<b>298,5</b>
E	1c	242	55. LT	R-4673/05	122,0	<b>159,4</b>
E	1c	243	55. LT	R-4674/05	86,1	<b>80,8</b>
E	1c	245	55. LT	R-4675/05	76,7	<b>637,2</b>
E	1c	246	55. LT	R-4676/05	146,8	<b>3052,9</b>
E	1c	247	55. LT	R-4677/05	159,9	<b>3634,8</b>
E	1c	248	55. LT	R-4678/05	58,9	<b>1105,0</b>
E	1c	249	55. LT	R-4679/05	116,9	<b>189,9</b>
E	1c	250	55. LT	R-4680/05	40,4	<b>431,0</b>
E	2	203	55. LT	R-4681/05	60,9	8,1
E	3	233	55. LT	R-4682/05	95,9	0,0
E	3	234	55. LT	R-4683/05	42,9	0,0
E	4	260	55. LT	R-4684/05	39,6	0,0
E	5	261	55. LT	R-4685/05		
E	5	262	55. LT	R-4686/05		
E	5	263	55. LT	R-4687/05	42,7	0,0
E	5	264	55. LT	R-4688/05		
E	5	265	55. LT	R-4689/05		
E	5	266	55. LT	R-4690/05		
E	5	267	55. LT	R-4691/05		
E	5	268	55. LT	R-4692/05	32,1	0,0
E	5	269	55. LT	R-4693/05		
E	5	271	55. LT	R-4694/05		
F	1	1	9. LT	R-4721/06	n. t.	
F	1	2	9. LT	R-4722/06	n. t.	
F	1	3	9. LT	R-4723/06	n. t.	0,0
F	1	4	9. LT	R-4724/06	n. t.	

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
F	1	5	9. LT	R-4725/06	n. t.	
F	1	6	9. LT	R-4726/06	n. t.	0,0
F	1	7	9. LT	R-4727/06	n. t.	
F	1	8	9. LT	R-4728/06	n. t.	
F	5	33	9. LT	R-4753/06	n. t.	
F	5	34	9. LT	R-4754/06	n. t.	0,0
F	5	35	9. LT	R-4755/06	n. t.	
F	5	36	9. LT	R-4756/06	n. t.	
F	5	37	9. LT	R-4757/06	n. t.	
F	5	38	9. LT	R-4758/06	n. t.	0,0
F	5	39	9. LT	R-4759/06	n. t.	
F	5	40	9. LT	R-4760/06	n. t.	
F	6	41	9. LT	R-4761/06	n. t.	
F	6	42	9. LT	R-4762/06	n. t.	0,0
F	6	43	9. LT	R-4763/06	n. t.	
F	6	44	9. LT	R-4764/06	n. t.	
F	6	45	9. LT	R-4765/06	n. t.	
F	6	46	9. LT	R-4766/06	n. t.	0,0
F	6	47	9. LT	R-4767/06	n. t.	
F	6	48	9. LT	R-4768/06	n. t.	
F	1	301	37. LT	R-4816/06	n. t.	<b>504,1</b>
F	1	302	37. LT	R-4817/06	n. t.	<b>2874,0</b>
F	1	303	37. LT	R-4818/06	n. t.	<b>2567,4</b>
F	1	304	37. LT	R-4819/06	n. t.	<b>651,4</b>
F	1	305	37. LT	R-4820/06	n. t.	<b>886,1</b>
F	1	307	37. LT	R-4821/06	n. t.	<b>518,6</b>
F	1	308	37. LT	R-4822/06	n. t.	<b>612,1</b>
F	5	333	37. LT	R-4847/06	n. t.	
F	5	334	37. LT	R-4848/06	n. t.	0,0
F	5	335	37. LT	R-4849/06	n. t.	
F	5	336	37. LT	R-4850/06	n. t.	
F	5	337	37. LT	R-4851/06	n. t.	
F	5	338	37. LT	R-4852/06	n. t.	0,0
F	5	339	37. LT	R-4853/06	n. t.	
F	5	340	37. LT	R-4854/06	n. t.	
F	6	341	37. LT	R-4855/06	n. t.	
F	6	342	37. LT	R-4856/06	n. t.	0,0
F	6	343	37. LT	R-4857/06	n. t.	
F	6	344	37. LT	R-4858/06	n. t.	
F	6	345	37. LT	R-4859/06	n. t.	
F	6	346	37. LT	R-4860/06	n. t.	0,0
F	6	347	37. LT	R-4861/06	n. t.	
F	6	348	37. LT	R-4862/06	n. t.	
G	2	351	9. LT	R-4884/06	n. t.	
G	2	352	9. LT	R-4885/06	n. t.	0,0
G	2	353	9. LT	R-4886/06	n. t.	
G	2	354	9. LT	R-4887/06	n. t.	
G	2	355	9. LT	R-4888/06	n. t.	0,0
G	2	356	9. LT	R-4889/06	n. t.	
G	2	357	9. LT	R-4890/06	n. t.	
G	3	358	9. LT	R-4891/06	n. t.	
G	3	359	9. LT	R-4892/06	n. t.	0,0
G	3	360	9. LT	R-4893/06	n. t.	
G	3	361	9. LT	R-4894/06	n. t.	

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
G	3	362	9. LT	R-4895/06	n. t.	
G	3	363	9. LT	R-4896/06	n. t.	0,0
G	3	364	9. LT	R-4897/06	n. t.	
G	3	365	9. LT	R-4898/06	n. t.	
G	1	366	9. LT	R-4899/06	n. t.	
G	1	367	9. LT	R-4900/06	n. t.	0,0
G	1	368	9. LT	R-4901/06	n. t.	
G	1	369	9. LT	R-4902/06	n. t.	
G	1	370	9. LT	R-4903/06	n. t.	
G	1	371	9. LT	R-4904/06	n. t.	0,0
G	1	372	9. LT	R-4905/06	n. t.	
G	1	373	9. LT	R-4906/06	n. t.	
G	4	374	9. LT	R-4907/06	n. t.	
G	4	375	9. LT	R-4908/06	n. t.	0,0
G	4	376	9. LT	R-4909/06	n. t.	
G	4	377	9. LT	R-4910/06	n. t.	
G	4	378	9. LT	R-4911/06	n. t.	
G	4	379	9. LT	R-4912/06	n. t.	0,0
G	4	380	9. LT	R-4913/06	n. t.	
G	4	381	9. LT	R-4914/06	n. t.	
G	2	351	35. LT	R-4947/06	n. t.	2,0
G	2	352	35. LT	R-4948/06	n. t.	8,9
G	2	353	35. LT	R-4949/06	n. t.	0,0
G	2	354	35. LT	R-4950/06	n. t.	0,0
G	2	355	35. LT	R-4951/06	n. t.	7,0
G	2	356	35. LT	R-4952/06	n. t.	0,5
G	2	357	35. LT	R-4953/06	n. t.	<b>43,0</b>
G	3	358	35. LT	R-4954/06	n. t.	0,4
G	3	359	35. LT	R-4955/06	n. t.	0,0
G	3	360	35. LT	R-4956/06	n. t.	0,0
G	3	361	35. LT	R-4957/06	n. t.	0,0
G	3	362	35. LT	R-4958/06	n. t.	0,0
G	3	363	35. LT	R-4959/06	n. t.	1,8
G	3	364	35. LT	R-4960/06	n. t.	0,0
G	3	365	35. LT	R-4961/06	n. t.	0,0
G	1	366	35. LT	R-4962/06	n. t.	8,7
G	1	367	35. LT	R-4963/06	n. t.	0,0
G	1	368	35. LT	R-4964/06	n. t.	<b>21,4</b>
G	1	369	35. LT	R-4965/06	n. t.	1,9
G	1	370	35. LT	R-4966/06	n. t.	0,0
G	1	371	35. LT	R-4967/06	n. t.	0,0
G	1	372	35. LT	R-4968/06	n. t.	0,0
G	1	373	35. LT	R-4969/06	n. t.	<b>40,5</b>
G	4	374	35. LT	R-4970/06	n. t.	
G	4	375	35. LT	R-4971/06	n. t.	
G	4	376	35. LT	R-4972/06	n. t.	0,0
G	4	377	35. LT	R-4973/06	n. t.	
G	4	378	35. LT	R-4974/06	n. t.	
G	4	379	35. LT	R-4975/06	n. t.	3,0
G	4	380	35. LT	R-4976/06	n. t.	
G	4	381	35. LT	R-4977/06	n. t.	

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
H	1	201	9. LT	R-4987/06	n. t.	
H	1	202	9. LT	R-4988/06	n. t.	
H	1	203	9. LT	R-4989/06	n. t.	1,9
H	1	204	9. LT	R-4990/06	n. t.	
H	1	205	9. LT	R-4991/06	n. t.	
H	1	206	9. LT	R-4992/06	n. t.	
H	1	207	9. LT	R-4993/06	n. t.	
H	1	208	9. LT	R-4994/06	n. t.	0,2
H	1	209	9. LT	R-4995/06	n. t.	
H	1	210	9. LT	R-4996/06	n. t.	
H	2	211	9. LT	R-4997/06	n. t.	
H	2	212	9. LT	R-4998/06	n. t.	
H	2	213	9. LT	R-4999/06	n. t.	0,0
H	2	214	9. LT	R-5000/06	n. t.	
H	2	215	9. LT	R-5001/06	n. t.	
H	2	216	9. LT	R-5002/06	n. t.	
H	2	217	9. LT	R-5003/06	n. t.	
H	2	218	9. LT	R-5004/06	n. t.	0,0
H	2	219	9. LT	R-5005/06	n. t.	
H	2	220	9. LT	R-5006/06	n. t.	
H	3	221	9. LT	R-5007/06	n. t.	
H	3	222	9. LT	R-5008/06	n. t.	
H	3	223	9. LT	R-5009/06	n. t.	0,0
H	3	224	9. LT	R-5010/06	n. t.	
H	3	225	9. LT	R-5011/06	n. t.	
H	3	226	9. LT	R-5012/06	n. t.	
H	3	227	9. LT	R-5013/06	n. t.	
H	3	228	9. LT	R-5014/06	n. t.	0,0
H	3	229	9. LT	R-5015/06	n. t.	
H	3	230	9. LT	R-5016/06	n. t.	
H	4	231	9. LT	R-5017/06	n. t.	
H	4	232	9. LT	R-5018/06	n. t.	
H	4	233	9. LT	R-5019/06	n. t.	0,0
H	4	234	9. LT	R-5020/06	n. t.	
H	4	235	9. LT	R-5021/06	n. t.	
H	4	236	9. LT	R-5022/06	n. t.	
H	4	237	9. LT	R-5023/06	n. t.	
H	4	238	9. LT	R-5024/06	n. t.	3,7
H	4	239	9. LT	R-5025/06	n. t.	
H	4	240	9. LT	R-5026/06	n. t.	
H	1	201	37. LT	R-5066/06	n. t.	<b>208,6</b>
H	1	202	37. LT	R-5067/06	n. t.	<b>1524,9</b>
H	1	203	37. LT	R-5068/06	n. t.	<b>280,5</b>
H	1	204	37. LT	R-5069/06	n. t.	<b>56,8</b>
H	1	205	37. LT	R-5070/06	n. t.	<b>1294,9</b>
H	1	207	37. LT	R-5071/06	n. t.	<b>51,6</b>
H	1	208	37. LT	R-5072/06	n. t.	<b>564,7</b>
H	1	209	37. LT	R-5073/06	n. t.	<b>299,6</b>
H	1	210	37. LT	R-5074/06	n. t.	<b>195,0</b>
H	2	211	37. LT	R-5075/06	n. t.	<b>34,9</b>
H	2	212	37. LT	R-5076/06	n. t.	<b>29,1</b>
H	2	213	37. LT	R-5077/06	n. t.	0,0
H	2	214	37. LT	R-5078/06	n. t.	<b>246,2</b>

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
H	2	215	37. LT	R-5079/06	n. t.	<b>19,8</b>
H	2	216	37. LT	R-5080/06	n. t.	0,0
H	2	217	37. LT	R-5081/06	n. t.	3,7
H	2	218	37. LT	R-5082/06	n. t.	3,2
H	2	219	37. LT	R-5083/06	n. t.	5,4
H	2	220	37. LT	R-5084/06	n. t.	0,0
H	3	221	37. LT	R-5085/06	n. t.	
H	3	222	37. LT	R-5086/06	n. t.	
H	3	223	37. LT	R-5087/06	n. t.	0,0
H	3	224	37. LT	R-5088/06	n. t.	
H	3	225	37. LT	R-5089/06	n. t.	
H	3	226	37. LT	R-5090/06	n. t.	
H	3	227	37. LT	R-5091/06	n. t.	
H	3	228	37. LT	R-5092/06	n. t.	0,0
H	3	229	37. LT	R-5093/06	n. t.	
H	3	230	37. LT	R-5094/06	n. t.	
H	4	231	37. LT	R-5095/06	n. t.	
H	4	232	37. LT	R-5096/06	n. t.	
H	4	233	37. LT	R-5097/06	n. t.	1,4
H	4	234	37. LT	R-5098/06	n. t.	
H	4	235	37. LT	R-5099/06	n. t.	
H	4	236	37. LT	R-5100/06	n. t.	
H	4	237	37. LT	R-5101/06	n. t.	
H	4	238	37. LT	R-5102/06	n. t.	0,0
H	4	239	37. LT	R-5103/06	n. t.	
H	4	240	37. LT	R-5104/06	n. t.	
I	1	301	9. LT	R-5134/06	n. t.	
I	1	302	9. LT	R-5135/06	n. t.	
I	1	303	9. LT	R-5136/06	n. t.	5,3
I	1	304	9. LT	R-5137/06	n. t.	
I	1	305	9. LT	R-5138/06	n. t.	
I	1	306	9. LT	R-5139/06	n. t.	
I	1	307	9. LT	R-5140/06	n. t.	
I	1	308	9. LT	R-5141/06	n. t.	8,4
I	1	309	9. LT	R-5142/06	n. t.	
I	1	310	9. LT	R-5143/06	n. t.	
I	2	311	9. LT	R-5144/06	n. t.	
I	2	312	9. LT	R-5145/06	n. t.	
I	2	313	9. LT	R-5146/06	n. t.	7,5
I	2	314	9. LT	R-5147/06	n. t.	
I	2	315	9. LT	R-5148/06	n. t.	
I	2	316	9. LT	R-5149/06	n. t.	
I	2	317	9. LT	R-5150/06	n. t.	
I	2	318	9. LT	R-5151/06	n. t.	7,1
I	2	319	9. LT	R-5152/06	n. t.	
I	2	320	9. LT	R-5153/06	n. t.	
I	3	321	9. LT	R-5154/06	n. t.	
I	3	322	9. LT	R-5155/06	n. t.	
I	3	323	9. LT	R-5156/06	n. t.	5,9
I	3	324	9. LT	R-5157/06	n. t.	
I	3	325	9. LT	R-5158/06	n. t.	
I	3	326	9. LT	R-5159/06	n. t.	
I	3	327	9. LT	R-5160/06	n. t.	
I	3	328	9. LT	R-5161/06	n. t.	0,0
I	3	329	9. LT	R-5162/06	n. t.	
I	3	330	9. LT	R-5163/06	n. t.	

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
	4	331	9. LT	R-5164/06	n. t.	
	4	332	9. LT	R-5165/06	n. t.	
	4	333	9. LT	R-5166/06	n. t.	0,0
	4	334	9. LT	R-5167/06	n. t.	
	4	335	9. LT	R-5168/06	n. t.	
	4	336	9. LT	R-5169/06	n. t.	
	4	337	9. LT	R-5170/06	n. t.	
	4	338	9. LT	R-5171/06	n. t.	0,0
	4	339	9. LT	R-5172/06	n. t.	
	4	340	9. LT	R-5173/06	n. t.	
	5	341	9. LT	R-5174/06	n. t.	
	5	342	9. LT	R-5175/06	n. t.	
	5	343	9. LT	R-5176/06	n. t.	0,0
	5	344	9. LT	R-5177/06	n. t.	
	5	345	9. LT	R-5178/06	n. t.	
	5	346	9. LT	R-5179/06	n. t.	
	5	347	9. LT	R-5180/06	n. t.	
	5	348	9. LT	R-5181/06	n. t.	0,0
	5	349	9. LT	R-5182/06	n. t.	
	5	401	9. LT	R-5183/06	n. t.	
	6	402	9. LT	R-5184/06	n. t.	
	6	403	9. LT	R-5185/06	n. t.	
	6	404	9. LT	R-5186/06	n. t.	0,0
	6	405	9. LT	R-5187/06	n. t.	
	6	406	9. LT	R-5188/06	n. t.	
	6	407	9. LT	R-5189/06	n. t.	
	6	408	9. LT	R-5190/06	n. t.	
	6	409	9. LT	R-5191/06	n. t.	0,0
	6	410	9. LT	R-5192/06	n. t.	
	6	411	9. LT	R-5193/06	n. t.	
	7	412	9. LT	R-5194/06	n. t.	
	7	413	9. LT	R-5195/06	n. t.	
	7	414	9. LT	R-5196/06	n. t.	0,0
	7	415	9. LT	R-5197/06	n. t.	
	7	416	9. LT	R-5198/06	n. t.	
	7	417	9. LT	R-5199/06	n. t.	
	7	418	9. LT	R-5200/06	n. t.	
	7	419	9. LT	R-5201/06	n. t.	2,8
	7	420	9. LT	R-5202/06	n. t.	
	7	421	9. LT	R-5203/06	n. t.	
	1	301	28. LT	R-5204/06	n. t.	n. t.
	1	302	28. LT	R-5205/06	n. t.	n. t.
	1	303	28. LT	R-5206/06	n. t.	n. t.
	1	304	28. LT	R-5207/06	n. t.	n. t.
	1	305	28. LT	R-5208/06	n. t.	n. t.
	1	306	28. LT	R-5209/06	n. t.	n. t.
	1	307	28. LT	R-5210/06	n. t.	n. t.
	1	308	28. LT	R-5211/06	n. t.	n. t.
	1	309	28. LT	R-5212/06	n. t.	n. t.
	1	310	28. LT	R-5213/06	n. t.	<b>143,8</b>
	2	311	28. LT	R-5214/06	n. t.	n. t.
	2	312	28. LT	R-5215/06	n. t.	n. t.
	2	313	28. LT	R-5216/06	n. t.	n. t.
	2	314	28. LT	R-5217/06	n. t.	n. t.
	2	315	28. LT	R-5218/06	n. t.	n. t.
	2	316	28. LT	R-5219/06	n. t.	n. t.
	2	317	28. LT	R-5220/06	n. t.	n. t.

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std. <sub>NT</sub> %]
	2	318	28. LT	R-5221/06	n. t.	n. t.
	2	319	28. LT	R-5222/06	n. t.	n. t.
	2	320	28. LT	R-5223/06	n. t.	n. t.
	3	321	28. LT	R-5224/06	n. t.	n. t.
	3	322	28. LT	R-5225/06	n. t.	0,0
	3	323	28. LT	R-5226/06	n. t.	0,0
	3	324	28. LT	R-5227/06	n. t.	0,0
	3	325	28. LT	R-5228/06	n. t.	n. t.
	3	326	28. LT	R-5229/06	n. t.	0,0
	3	327	28. LT	R-5230/06	n. t.	0,0
	3	328	28. LT	R-5231/06	n. t.	n. t.
	3	329	28. LT	R-5232/06	n. t.	0,0
	3	330	28. LT	R-5233/06	n. t.	n. t.
	4	331	28. LT	R-5234/06	n. t.	n. t.
	4	332	28. LT	R-5235/06	n. t.	0,0
	4	333	28. LT	R-5236/06	n. t.	n. t.
	4	334	28. LT	R-5237/06	n. t.	0,0
	4	335	28. LT	R-5238/06	n. t.	n. t.
	4	336	28. LT	R-5239/06	n. t.	n. t.
	4	337	28. LT	R-5240/06	n. t.	n. t.
	4	338	28. LT	R-5241/06	n. t.	n. t.
	4	339	28. LT	R-5242/06	n. t.	n. t.
	4	340	28. LT	R-5243/06	n. t.	n. t.
	5	341	28. LT	R-5244/06	n. t.	n. t.
	5	342	28. LT	R-5245/06	n. t.	n. t.
	5	343	28. LT	R-5246/06	n. t.	n. t.
	5	344	28. LT	R-5247/06	n. t.	n. t.
	5	345	28. LT	R-5248/06	n. t.	n. t.
	5	346	28. LT	R-5249/06	n. t.	6,2
	5	347	28. LT	R-5250/06	n. t.	n. t.
	5	348	28. LT	R-5251/06	n. t.	n. t.
	5	349	28. LT	R-5252/06	n. t.	n. t.
	5	401	28. LT	R-5253/06	n. t.	n. t.
	6	402	28. LT	R-5254/06	n. t.	n. t.
	6	403	28. LT	R-5255/06	n. t.	n. t.
	6	404	28. LT	R-5256/06	n. t.	n. t.
	6	405	28. LT	R-5257/06	n. t.	n. t.
	6	406	28. LT	R-5258/06	n. t.	n. t.
	6	407	28. LT	R-5259/06	n. t.	n. t.
	6	408	28. LT	R-5260/06	n. t.	n. t.
	6	409	28. LT	R-5261/06	n. t.	n. t.
	6	410	28. LT	R-5262/06	n. t.	n. t.
	6	411	28. LT	R-5263/06	n. t.	n. t.
	7	412-I	28. LT	R-5264/06	n. t.	n. t.
	7	412-II	28. LT	R-5265/06	n. t.	n. t.
	7	413	28. LT	R-5266/06	n. t.	n. t.
	7	414	28. LT	R-5267/06	n. t.	n. t.
	7	415	28. LT	R-5268/06	n. t.	n. t.
	7	416	28. LT	R-5269/06	n. t.	n. t.
	7	417	28. LT	R-5270/06	n. t.	n. t.
	7	418	28. LT	R-5271/06	n. t.	n. t.
	7	419	28. LT	R-5272/06	n. t.	n. t.
	7	420	28. LT	R-5273/06	n. t.	n. t.
	7	421	28. LT	R-5274/06	n. t.	n. t.
	1	301	37. LT	R-5340/06	n. t.	<b>279,3</b>
	1	302	37. LT	R-5324/06	n. t.	<b>650,9</b>

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite



Fortsetzung der **Tabelle 27**

<b>Tierversuch</b>	<b>Gruppe</b>	<b>Tier-Nr.</b>	<b>Alter</b>	<b>Serum-Nr.</b>	<b>ELISA<sub>rStx2e</sub> [Std. %]</b>	<b>Stx2e-nAk [Std<sub>NT</sub> %]</b>
	1	303	37. LT	R-5289/06	n. t.	<b>476,6</b>
	1	304	37. LT	R-5299/06	n. t.	<b>1412,3</b>
	1	305	37. LT	R-5295/06	n. t.	<b>318,6</b>
	1	306	37. LT	R-5334/06	n. t.	<b>820,9</b>
	1	307	37. LT	R-5317/06	n. t.	<b>744,5</b>
	1	308	37. LT	R-5283/06	n. t.	<b>878,8</b>
	1	309	37. LT	R-5279/06	n. t.	<b>3046,0</b>
	1	310	37. LT	R-5307/06	n. t.	<b>5259,7</b>
	2	311	37. LT	R-5290/06	n. t.	<b>34,2</b>
	2	312	37. LT	R-5329/06	n. t.	<b>116,3</b>
	2	313	37. LT	R-5291/06	n. t.	<b>66,4</b>
	2	314	37. LT	R-5313/06	n. t.	<b>115,7</b>
	2	315	37. LT	R-5306/06	n. t.	<b>0,9</b>
	2	316	37. LT	R-5301/06	n. t.	<b>108,6</b>
	2	317	37. LT	R-5282/06	n. t.	<b>63,3</b>
	2	318	37. LT	R-5322/06	n. t.	<b>271,1</b>
	2	319	37. LT	R-5308/06	n. t.	<b>4,1</b>
	2	320	37. LT	R-5304/06	n. t.	<b>0,2</b>
	3	321	37. LT	R-5342/06	n. t.	<b>1840,5</b>
	3	322	37. LT	R-5319/06	n. t.	<b>3825,1</b>
	3	323	37. LT	R-5314/06	n. t.	<b>7968,9</b>
	3	324	37. LT	R-5286/06	n. t.	<b>10964,4</b>
	3	325	37. LT	R-5277/06	n. t.	<b>4527,1</b>
	3	326	37. LT	R-5335/06	n. t.	<b>7033,6</b>
	3	327	37. LT	R-5297/06	n. t.	<b>9135,2</b>
	3	328	37. LT	R-5284/06	n. t.	<b>2684,2</b>
	3	329	37. LT	R-5280/06	n. t.	<b>12783,8</b>
	4	331	37. LT	R-5336/06	n. t.	<b>4705,0</b>
	4	332	37. LT	R-5337/06	n. t.	<b>40614,0</b>
	4	333	37. LT	R-5298/06	n. t.	<b>162,7</b>
	4	334	37. LT	R-5321/06	n. t.	<b>8131,2</b>
	4	335	37. LT	R-5300/06	n. t.	<b>2056,6</b>
	4	336	37. LT	R-5293/06	n. t.	<b>42,4</b>
	4	337	37. LT	R-5309/06	n. t.	<b>72,8</b>
	4	338	37. LT	R-5305/06	n. t.	<b>1778,8</b>
	4	339	37. LT	R-5315/06	n. t.	<b>2009,0</b>
	4	340	37. LT	R-5296/06	n. t.	<b>385,7</b>
	5	341	37. LT	R-5303/06	n. t.	<b>10,8</b>
	5	342	37. LT	R-5328/06	n. t.	<b>3044,7</b>
	5	343	37. LT	R-5338/06	n. t.	<b>27,3</b>
	5	344	37. LT	R-5326/06	n. t.	<b>75,6</b>
	5	345	37. LT	R-5318/06	n. t.	<b>456,3</b>
	5	346	37. LT	R-5341/06	n. t.	<b>11413,5</b>
	5	347	37. LT	R-5311/06	n. t.	<b>2664,2</b>
	5	348	37. LT	R-5331/06	n. t.	<b>862,1</b>
	5	349	37. LT	R-5312/06	n. t.	<b>119,2</b>
	5	401	37. LT	R-5333/06	n. t.	<b>1086,4</b>
	6	402	37. LT	R-5275/06	n. t.	<b>0,0</b>
	6	403	37. LT	R-5327/06	n. t.	<b>164,9</b>
	6	404	37. LT	R-5287/06	n. t.	<b>163,5</b>
	6	405	37. LT	R-5281/06	n. t.	<b>107,5</b>
	6	406	37. LT	R-5316/06	n. t.	<b>117,4</b>
	6	407	37. LT	R-5332/06	n. t.	<b>0,0</b>
	6	408	37. LT	R-5343/06	n. t.	<b>129,1</b>
	6	409	37. LT	R-5325/06	n. t.	<b>314,5</b>
	6	410	37. LT	R-5310/06	n. t.	<b>68,2</b>
	6	411	37. LT	R-5323/06	n. t.	<b>925,7</b>

Fortsetzung der **Tabelle 27** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 27**

Tierversuch	Gruppe	Tier-Nr.	Alter	Serum-Nr.	ELISA <sub>rStx2e</sub> [Std. %]	Stx2e-nAk [Std <sub>NT</sub> %]
	7	412	37. LT	R-5320/06	n. t.	
	7	413	37. LT	R-5278/06	n. t.	
	7	414	37. LT	R-5288/06	n. t.	0,0
	7	415	37. LT	R-5285/06	n. t.	
	7	416	37. LT	R-5292/06	n. t.	
	7	417	37. LT	R-5339/06	n. t.	
	7	418	37. LT	R-5276/06	n. t.	
	7	419	37. LT	R-5294/06	n. t.	0,0
	7	420	37. LT	R-5302/06	n. t.	
	7	421	37. LT	R-5330/06	n. t.	

**Erläuterungen:** **fett** = Serumproben mit Stx2e-nAk  $\geq 10$  Std<sub>NT</sub> %; **LT** = Lebenstag; **n. t.** = nicht getestet; **Stx2e-nAk** = quantitativer Nachweis von Stx2e-neutralisierenden Antikörpern.

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Sein umfangreiches Wissen, seine konstruktive Kritik und die vielen Anregungen und Diskussionen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und an meiner beruflichen Weiterentwicklung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Stefanie Barth für ihre intensive fachliche Betreuung und ihre stete Hilfsbereitschaft sowohl in beruflichen als auch in privaten Belangen.

Den Mitarbeitern der IDT Biologika GmbH, vor allem Herrn Prof. Dr. H.-J. Selbitz, Herrn Dr. V. Florian und Herrn O. Lüder, danke ich für die finanzielle Unterstützung, die Durchführung der Ferkelversuche, die Bereitstellung der Serumproben und die konstruktiven Fachgespräche.

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Bauerfeind. Steffi, Anja, Ines, Alex, Simone und Abdybek haben mir zu jeder Zeit hilfsbereit und mit einem offenen Ohr zur Seite gestanden.

Ein großes Dankeschön geht an meine Co-Doktoranden/Innen, mit denen ich viel Lachen und eine schöne Zeit verbringen konnte. Der bestehende Zusammenhalt untereinander und die herzliche Atmosphäre haben meine Zeit im Institut sehr bereichert.

Gabi Köpf möchte ich für ihre tollen Einfälle und Tipps im Labor danken, und dass ich mich jederzeit auf sie verlassen konnte und kann.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle übrigen Mitarbeiter/Innen des Instituts für das angenehme Arbeitsklima.

Meinem Mann Norman danke ich für seine seelische Unterstützung, und dass er immer an mich geglaubt hat. Ein herzlicher Dank geht auch an Heidi und Ernst, sowie Silja, Jana, Iva und Fe, die mich immer unterstützt haben.

Een ganz ganz groussën Merci geet un meng Elterën, meng Bomi an meng Schwëster, oui déi ëch dat alles nët errécht hätt. Merci, dass dir ëmmer vir mëch do sitt. Miu.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christiane Hoffmann



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5752-2



9 783835 193575 2