

5.3 Detektion von bioterroristisch relevanten Toxinen am Beispiel Rizin

Brigitte G. Dorner

Zusammenfassung

Zu den giftigsten bekannten Pflanzentoxinen gehört Rizin, das in den Samen des Wunderbaums *Ricinus communis* enthalten ist. Obwohl die Toxizität des Rizins etwa tausendfach geringer ist als die des Botulinumtoxins, zählt Rizin zu den im Zusammenhang mit B-Kampfstoffen am häufigsten genannten Toxinen. Dies liegt zum einen am ubiquitären Vorkommen der Pflanze und deren großtechnischer Nutzung zur Herstellung von Rizinusöl. Zum anderen ist die Präparation des Toxins aus den Pflanzensamen technisch relativ einfach. Außerdem gibt es im Falle einer Intoxikation bislang noch keine wirksamen Gegenmittel. Angriffe auf Einzelpersonen mittels Rizins wurden bereits verübt (Ermordung des bulgarischen Dissidenten Markov, 1978). Vor diesem Hintergrund stellt die Verwendung von Rizin als mögliche bioterroristische Waffe im Rahmen von Anschlägen auf kleinere bis mittlere Personengruppen kein unrealistisches Szenario dar, zumal bereits 2003 Hinweise auf Experimente zur Nutzung von Rizin im Umfeld einer islamistischen Gruppe in London gefunden wurden. Daher besteht der dringende Bedarf, schnelle, verlässliche und hochsensitive Detektionsmethoden zu etablieren, die nicht nur im stationären Laborbereich, sondern auch bei der Vor-Ort-Detektion angewendet werden können.

Im vorliegenden Beitrag wird eine Übersicht über klassische immunologische Methoden für den Laborbereich gegeben (ELISA, Western Blot sowie Anreicherungsverfahren) und aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Vor-Ort-Detektion (elektrischer Biochip, *Hand-Held-Testkits*) vorgestellt.

Das Pflanzentoxin Rizin ist in den Samen des „Wunderbaums“ *Ricinus communis* enthalten, seine halbmaximale letale Dosis liegt bei $LD_{50} = 3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Franz, 1997). Es besteht aus einer rezeptorbindenden Untereinheit (B-Kette) und einer katalytischen Untereinheit (A-Kette), die jeweils ca. 31 kDa umfassen und über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden sind (Olsnes & Kozlov, 2001). Die B-Kette, ein Lektin, vermittelt die Bindung des Rizins an Galactose und andere

Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche, die anschließende Internalisierung und den retrograden Transport des Toxins durch den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum, wo die A-Kette ins Zytosol freigesetzt wird (Sandvig & van, 2002). Dort spaltet die A-Kette sehr selektiv einen einzelnen Adeninrest aus einer exponierten Schleife der zellulären 28S rRNA ab, was zum Abbruch der Proteinbiosynthese und damit letztlich zum Zelltod führt (Audi, Belson, Patel, Schier & Osterloh, 2005). Die Samen von *R. communis* enthalten neben Rizin ein weiteres toxisches Lektin, das *R. communis*-Agglutinin, das zu ca. 90 Prozent sequenzidentisch zum Rizin ist und aus zwei nicht kovalent verbundenen A-B-Dimeren besteht (Lin & Li, 1980). Die Toxizität des Agglutinins ist um einen Faktor 40-100 geringer als die des Rizins (Lin & Liu, 1986; Zhan & Zhou, 2003). Eine zusätzliche Komplexität resultiert aus der Tatsache, dass aus verschiedenen *R. communis*-Kultivaren verschiedene Isolektine isoliert wurden, die als Rizin D und Rizin E bezeichnet werden und die sich in ihrer B-Kette unterscheiden: die B-Kette des Rizin E bildet ein Hybrid aus der B-Kette des Rizin D und der B-Kette des Agglutinins (Araki & Funatsu, 1987).

Die Ausgangssituation nach den Anschlägen 2001 in den USA stellte sich so dar, dass es keine standardisierten, kommerziell erhältlichen Diagnostika zur Detektion von Rizin – insbesondere aus Lebensmitteln – gab. Vom Standpunkt der Diagnostik ist die Detektion von Toxinen anspruchsvoll, denn Toxine sind auch in Abwesenheit des produzierenden Organismus (und seiner DNA) toxisch. Dies bedeutet, dass die Detektion der Toxine nicht – wie bei vermehrungsfähigen Pathogenen wie Viren und Bakterien – auf dem Nachweis der DNA beruhen kann, sondern dass das Protein selbst nachgewiesen werden muss. Grundsätzlich gibt es hier die Möglichkeit, die Präsenz des Proteins über immunologische oder proteinbiochemische Methoden zu detektieren oder alternativ die funktionelle Aktivität des Toxins zu messen.

In der Vergangenheit wurden verschiedene immunologische Detektionsmethoden beschrieben, die zum Nachweis von Rizin geeignet sind. Um hier für das Gebiet der Bundesrepublik einen dauerhaften Zugang zu immunologischen Detektionsreagenzien sicher zu stellen, wurden in unserer Arbeitsgruppe am RKI polyklonale Antikörper (pAK, aus Huhn und Kaninchen) sowie diverse monoklonale Antikörper (mAK, aus Maus) mit Spezifität für Rizin generiert. Unsere Hybridome sind in der Lage, sowohl das native als auch das denaturierte Rizin bzw. Agglutinin spezifisch zu binden. Mit diesen Reagenzien haben wir

folgende Detektionsverfahren für Rizin etabliert, die im stationären Laborbereich angewendet werden können:

- Zytotoxizitäts-Assay
- Sandwich-ELISA
- Western Blot
- Immunomagnetische Anreicherungsverfahren

Beim Zytotoxizitäts-Assay werden adhärenente Vero-Zellen mit Rizin in unterschiedlichen Konzentrationen für 24-48 Stunden inkubiert, bis der zytopathische Effekt des Toxins mikroskopisch sichtbar wird. Das Ausmaß der Zellschädigung kann durch eine Lebend-/Tod-Färbung photometrisch quantifiziert werden, wobei eine Sensitivität von 1 ng/ml Rizin in Puffer oder flüssigen Lebensmitteln wie Milch oder Coca Cola erreicht wird (Tab. 28). Eine ähnliche Zellschädigung wie durch Rizin wird auch durch andere A-B-Toxine wie Abrin oder Shigatoxin induziert, d.h. die Spezifität des Tests muss durch Blockade mit spezifischen Antikörpern überprüft werden. Durch Vorinkubation der rizinhaltigen Probe mit unseren polyklonalen Antikörpern bzw. mit einzelnen monoklonalen Antikörpern sind wir in der Lage, die funktionelle Aktivität des Rizins spezifisch zu blockieren. Das Verfahren eignet sich aufgrund seines Zeitaufwands nicht als schnelle Untersuchungsmethode, ist aber wertvoll zur Verdachtsbestätigung, zumal hier tatsächlich die biologische Aktivität des Toxins *in vitro* bestimmt wird.

Mit Hilfe unserer eigenen mAK und pAK wurden in unserem Labor Sandwich-ELISA-Verfahren etabliert, die zur Detektion des Rizins bzw. Agglutinins aus Puffer oder flüssigen Lebensmitteln geeignet sind. Die Sensitivität der ELISA-Verfahren ist mit 0,01 ng/ml in Puffer und Milch exzellent (Tab. 28). Ein klassischer Western Blot ist hier je nach Probenmatrix im Vergleich deutlich weniger sensitiv, erlaubt aber aufgrund der Größenfraktionierung der Probe die Unterscheidung der beiden toxischen Lektine Rizin und Agglutinin (Tab. 28). Neben den genannten klassischen immunologischen Verfahren haben wir ein Bead-basiertes Verfahren zur Anreicherung des Rizins aus Lebensmitteln etabliert: Bei diesem Verfahren werden magnetische Partikel verwendet, die kovalent mit Antikörpern gegen Rizin gekoppelt werden. Nach Anreicherung des Toxins aus komplexen Lebensmittelproben wird das Toxin entweder direkt auf den Magnetpartikeln immunologisch detektiert (Bead-basierter ELISA) oder abgelöst und im Western Blot dargestellt. Mit diesem Verfahren wird eine

Detektionsgrenze von 1 ng/ml aus Puffer oder Milch erreicht, das Verfahren ist darüber hinaus schnell und daher zur laborgestützten Standarddiagnostik geeignet. Alle hier beschriebenen Labormethoden haben den Vorteil, dass sie in jedem immunologischen bzw. biochemischen Labor ohne spezielle Ausrüstung durchgeführt werden können. Sie setzen allerdings eine gewisse Grund-erfahrung in experimenteller Arbeit voraus und können nicht ohne weiteres im Feld von ungeschulten Personengruppen eingesetzt werden. Gegenwärtig konzentrieren sich weltweit die Arbeiten auf die Entwicklung von Schnelltests zur Vor-Ort-Detektion von bioterroristisch-relevanten Toxinen wie Rizin, die auch von ungeschulten Personen eingesetzt werden können. In diesem Zusammenhang hat unser Kooperationspartner M. Avondet (Labor Spiez, Schweiz) die auf dem kommerziellen Markt erhältlichen Lateral-Flow-Assays zur Rizin-Detektion evaluiert (z. B. Fa. Tetracore/Alexeter). Diese sehr einfach durchzuführenden Tests beruhen auf dem Prinzip der Immunochromatographie und liefern innerhalb von 20 min. Ergebnisse (Tab. 28). Die Sensitivität der Lateral-Flow-Assays erwies sich als schlechter im Vergleich zu den stationären Labormethoden und es zeigte sich außerdem eine gewisse Fehleranfälligkeit bei der Messung von verschiedenen rizinhaltigen Probenmaterialien (falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse).

Parallel zu den technisch einfachen Lateral-Flow-Assays laufen weltweit intensive Forschungsarbeiten zur Entwicklung von Systemen zur Vor-Ort-Detektion von Toxinen auf der Basis von miniaturisierten und automatisierten Sandwich-ELISA-Immunoassays, die zum Teil auch multiplexfähig sind, d. h. hier wird es in Zukunft möglich sein, mehrere Toxine simultan aus einer Probe zu messen (z. B. Fa. GARM Systems/Jenoptik, Jena; Fa. eBiochip Systems, Itzehoe). In einer Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Siliziumtechnologie (Itzehoe) entwickeln wir einen portablen, elektrischen Biosensor zur Toxindetektion. Es handelt sich hierbei um einen elektrischen Biochip, auf dem zurzeit parallel acht verschiedene Sandwich-ELISA durchgeführt und gemessen werden können. Das Verfahren ist sehr schnell (20 min) und funktioniert gegenwärtig zur parallelen Detektion von Rizin und Staphylokokken Enterotoxin B (Tab. 28). Zur Weiterentwicklung dieser und ähnlich viel versprechender Plattformen ist es notwendig, hochspezifische und sensitive mAK und pAK für weitere bioterroristisch relevante Toxine (Botulinumtoxine A, B, E, F, Shigatoxine, Abrin etc.) zu entwickeln und diese in die entsprechenden Plattformen zu implementieren. Zukünftige Arbeiten werden sich darauf konzentrieren, die automatisierten Vor-Ort-Detektionssysteme für die Detektion einer breiten

Palette von Toxinen weiter zu optimieren, vergleichend zu testen und anhand geeigneter Realproben (Patientenproben, Lebensmittelproben, Umweltproben) zu validieren.

Methode	Detektionslimit		Zeit
	PBS	Milch	
Stationäre Methoden:			
Zytotoxizitäts-Assay	1 ng/ml	1 ng/ml	24-48 h
ELISA	0,01 ng/ml	0,01 ng/ml	3-4 h
Western Blot	3 ng/ml	30 ng/ml	6 h
Bead-ELISA	1 ng/ml	1 ng/ml	2 h
Vor-Ort-Detektion:			
Lateral-Flow-Assay	10 ng/ml	50 ng/ml	15 min
Elektrischer Biochip	1 ng/ml	Nicht getestet	20 min

Tab. 28: Vergleich unterschiedlicher Detektionsmethoden für Rizin. In der Tabelle sind die Detektionslimits für Rizin aus physiologischem Puffer (PBS) und Milch gegenüber gestellt, parallel dazu ist der Zeitbedarf für den experimentellen Nachweis gezeigt.

Literaturhinweise

ARAKI, T. & FUNATSU, G. (1987). The complete amino acid sequence of the B-chain of ricin E isolated from small-grain castor bean seeds. Ricin E is a gene recombination product of ricin D and Ricinus communis agglutinin. *Biochim.Biophys. Acta.*, 911(2), 191-200.

AUDI, J., BELSON, M., PATEL, M., SCHIER, J. & OSTERLOH, J. (2005). Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA.*, 294(18), 2342-2351.

FRANZ, D. R. (1997). Defense against toxin weapons. In R.Zajtchuk & R. F. Ballamy (Eds.), *Textbook of military medicine* (pp. 603-620).

LIN, J. Y. & LIU, S. Y. (1986). Studies on the antitumor lectins isolated from the seeds of *Ricinus communis* (castor bean). *Toxicon.*, 24(8), 757-765.

LIN, T. T. & LI, S. L. (1980). Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*. *Eur.J.Biochem.*, 105(3), 453-459.

OLSNES, S. & KOZLOV, J. V. (2001). Ricin. *Toxicon*, 39, 1723-1728.

SANDVIG, K. & VAN, D. B. (2002). Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.*, 529(1), 49-53.

ZHAN, J. & ZHOU, P. (2003). A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. *Toxicology.*, 186(1-2), 119-123.