

Zusammenfassung

Die Botulinum Neurotoxine (BoNT) verursachen durch Hemmung der Signalübertragung an Motoneuronen das durch flache Paralyse und andere neurologische Symptome gekennzeichnete schwere Krankheitsbild Botulismus. Die Toxine werden von BoNT-produzierenden Bakterien (*Clostridium botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii* und *C. argentinense*) zusammen mit nicht-toxischen Akzessorproteinen freigesetzt, deren Rolle in Schutz und Transport des Toxins nach oraler Aufnahme diskutiert wird. Hauptursache humaner Botulismusfälle ist BoNT vom Serotyp A. BoNT/A ist mit einem in allen Subtypen vorkommenden nicht-toxischen nicht-Hämagglutinin (NTNH) sowie mit drei verschiedenen HA-Proteinen (HA70, HA17, HA33) assoziiert. Diese Hämagglutinine kommen nur in bestimmten Sero- und Subtypen von BoNT vor. Zusammen bilden die fünf Proteine aus Serotyp A (BoNT, NTNH und HA-Proteine) einen 14-mer Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von 760 kDa (L-PTC).

In dieser Studie wurden vierzehn hoch-affine monoklonale Antikörper (mAK) zum Nachweis aller nicht-toxischen Komponenten des BoNT/A-Proteinkomplexes generiert. Diese wurden zusammen mit gegen BoNT gerichteten mAK in Sandwich-ELISAs sowie in ein Multiplex-Nachweissystem implementiert, das die simultane Detektion von BoNT und all seinen Akzessorproteinen in einem einzigen Ansatz erlaubt. Diese neuen, hochsensitiven Nachweissysteme wurden genutzt, um Rolle und Verbleib von BoNT und seinen Komplexproteinen in der Passage vom Darm in den Blutkreislauf zu untersuchen.

Mithilfe dieser Detektionssysteme wurde *in vitro* ein deutlicher Unterschied in der Translokation der verschiedenen Komplexformen von BoNT/A durch Enterozytenschichten bestätigt. Das Holotoxin und der mittlere Vorläufertoxinkomplex (M-PTC, Toxin und NTNH) folgten eher einer passiven, größenabhängigen transzellulären Aufnahme. Die zusätzlich im großen Vorläufertoxinkomplex (L-PTC) enthaltenen HA-Proteine hingegen erhöhten massiv die Passage durch Zerstörung der Zellschichtintegrität und durch Öffnung parazellulärer Wege, die zu einer erhöhten Passage des BoNT führten. Mithilfe eines *in vitro*-Modells für die Kohlenhydratbindung konnten gegen HA-Proteine gerichtete mAK identifiziert werden, die die Bindung des L-PTC an Glycoproteine verhinderten sowie die *in vitro* Translokation durch Zellschichten sterisch oder durch spezifische Blockade der Kohlenhydratbindung hemmten.

Hier wurden zum ersten Mal in einem *in vivo*-Mausmodell nicht nur der Weg des Toxins selber, sondern auch der akzessorischen Komplexproteine durch den gastrointestinalen Trakt verfolgt und das Auftreten aller Komplexproteine im Blut beobachtet, limitiert durch die Durchdringung der Mucusschicht und damit Erreichen der Darmbarriere. Basierend auf diesen Ergebnissen dienen die stabil verknüpften HA-NTNH-Proteine nach oraler Aufnahme als Transportvehikel für das Toxin und setzen es im Blutkreislauf frei, wo es sein finales Angriffsziel erreicht.

Abstract

The botulinum neurotoxins (BoNTs) cause the severe neurological disease botulism characterized by flaccid paralysis and other neurological symptoms by inhibition of nerve signal transmission of motoneurons. The toxins are released from BoNT producing bacteria (*Clostridium botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii*, and *C. argentinense*) together with several non-toxic accessory proteins, which are discussed to be of pivotal role in protection and delivery of the toxin to the motoneurons after oral uptake. A main cause of human botulism is BoNT serotype A, which is associated with a non-toxic non-hemagglutinin (NTNH) present in all BoNT subtypes, but also three different HA proteins (HA70, HA17, HA33), which are only present in specific BoNT sero- and subtypes. Together, the five different proteins of serotype A (BoNT, NTNH and HA proteins) make up a large 14-mer protein complex of 760 kDa (L-PTC).

In this study, a unique panel of fourteen highly affine monoclonal antibodies (mAbs) was generated for the detection of all non-toxic components of the BoNT/A protein complex. This panel was combined with anti-BoNT mAbs into several sandwich ELISA assays as well as a multiplex assay enabling the simultaneous detection of BoNT and all of its accessory proteins in a single measurement. These highly sensitive novel assays were used to investigate the role and fate of BoNT and its complex proteins in the passage through the intestinal barrier into the blood stream.

With the help of these detection assays, a clear variation for the translocation of different complex forms of BoNT/A through enterocytes was confirmed *in vitro*. The holotoxin and the medium progenitor toxin complex (M-PTC, consisting of the toxin and the NTNH) followed a rather passive, size-dependent transcellular passage. In contrast, the HA proteins additionally present in the large progenitor toxin complex (L-PTC) massively enhanced the passage by disrupting the monolayer integrity and opening paracellular ways for BoNT resulting in an increased flux. With an *in vitro* carbohydrate binding model, anti-HA mAbs inhibiting the binding of L-PTC to glycoproteins were identified, which also clearly inhibited translocation through cell monolayers either by sterical hindrance or by specific blockage of the carbohydrate binding.

In this study, not only the toxin, but for the first time also the non-toxic complex proteins NTNH and HAs were traced in an *in vivo* mouse model during their distribution throughout the gastrointestinal tract and the arrival of all complex proteins in the blood has been observed, which seems to be limited by the invasion of the mucus layer and the reaching of the intestinal barrier. Based on the experiments performed in this work, the stably connected NTNH-HA proteins serve as a delivery system for the toxin after oral uptake and once in the blood stream, release the toxin, which then reaches its final target.