

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch  
- Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer -

---

**Herstellung und Charakterisierung rekombinanter  
Einzelkomponenten des Nhe-Enterotoxinkomplexes  
von *Bacillus cereus***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
**Stephanie Gruber**  
aus München

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ammer

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

*Für Monika und Alfred*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>3</b>
2.1.1	Historischer Überblick	3
2.1.2	Taxonomische Einordnung	3
2.1.3	Extraintestinale Erkrankungen	4
2.1.4	Gastrointestinale Erkrankungen	4
<b>2.2</b>	<b><i>Bacillus-cereus</i>-Toxine</b>	<b>5</b>
2.2.1	Hämolysin BL (Hbl)	6
2.2.3	Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe)	8
2.2.4	Cytotoxin K (CytK)	9
2.2.4	Cereulid	10
<b>2.3</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	<b>11</b>
<b>2.4</b>	<b>Wirkungsweise bakterieller Exotoxine</b>	<b>12</b>
2.4.1	Intrazellulär wirkende Exotoxine	13
2.4.2	Membranschädigende Exotoxine	14
<b>2.5</b>	<b>Herstellung rekombinanter Proteine in bakteriellen Expressionssystemen</b>	<b>16</b>
2.5.1	Prinzip des Klonierens	16
2.5.2	Aufbau eines Plasmid-Vektors	17
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>19</b>
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	19
3.1.2	Bakterienstämme und -isolate	21
3.1.3	Zellen und Zelllinien	22
3.1.4	PCR-Primer	22

3.1.5	Nährmedien	23
3.1.6	Lösungen und Puffer	24
3.1.7	Immunreagenzien	26
3.1.8	Enzyme	27
3.1.9	Vektoren	27
3.1.10	Verbrauchsmaterialien	27
3.1.11	Geräte	28
3.1.12	Software und Hompages	29
3.1.13	Sonstiges	29
<b>3.2</b>	<b>Methodik</b>	<b>30</b>
3.2.1	Anzucht von <i>Bacillus cereus</i> in Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe-Bouillon (CGY)	30
3.2.2	DNA-Extraktion aus <i>Bacillus cereus</i>	30
3.2.3	Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit	30
3.2.4	Primer für Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	32
3.2.8	Herstellung kompetenter <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	32
3.2.9	Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Vektoren	33
3.2.10	Ligation von PCR-Produkten und Vektoren	33
3.2.11	Transformation von <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	34
3.2.12	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>Escherichia-coli</i> -Zellen	34
3.2.13	Anlegen von Glycerinkulturen	34
3.2.14	DNA-Sequenzierung	35
3.2.15	Proteinexpression	35
3.2.16	Zellaufschluss	35
3.2.17	Dialyseverfahren	36
3.2.18	Enterokinase-Verdau	36
3.2.19	Immunaффinitätschromatographie	37
3.2.20	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.2.21	Enzymimmuntest (EIA)	38
3.2.21.1	Indirekter Enzymimmuntest	38
3.2.21.2	Sandwich-Enzymimmuntest	39
3.2.22	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot	39
3.2.23	Zytotoxizitätstest mit Vero-Zellen	40

3.2.24	Kopplung monoklonaler Antikörper an Alexa Fluoreszenzfarbstoff	41
3.2.25	Immunfluoreszenz	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1	Nhe-A	42
4.1.1	Klonierung von <i>nheA</i>	42
4.1.2	Expression von <i>nheA</i>	44
4.1.3	Funktionelle Tests mit NheA	45
4.2	Nhe-B	46
4.2.1	Klonierung von <i>nheB</i>	46
4.2.1.1	Klonierung von <i>nheB</i> -Konstrukten mit potenziellen Prodomänen	46
4.2.1.2	Klonierung von N-terminalen Deletionsmutanten von <i>nheB</i>	50
4.2.2	Expression von <i>nheB</i>	51
4.2.3	Funktionelle Tests mit NheB	53
4.3	Nhe-C	57
4.3.1	Klonierung von <i>nheC</i>	57
4.3.2	Expression von <i>nheC</i>	58
4.3.3	Funktionelle Tests mit NheC	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
	<b>Summary</b>	
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>84</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A. (bi)dest.	Aqua (bi)destillata, (zweifach) destilliertes Wasser
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BamHI	Restriktionsendonuklease
bp	Basenpaare
BHI	Brain Heart Infusion, Hirn-Herz-Bouillon
BL21 DE3	<i>Escherichia-coli</i> -Expressionszelllinie
BL21 DE3 (LysS)	<i>Escherichia-coli</i> -Expressionszelllinie
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten
BSA	Bovine serum albumin, bovines Serumalbumin
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CaCo-2	Zelllinie aus Colonadenokarzinom Zellen
<i>ces</i>	Gene der Peptidsynthase <i>Ces</i>
CGY	Caseinhydrolysate-glucose-yeast, Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe
CHO	Zelllinie aus Ovarienzellen chinesischer Hamster
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CNBr	Cyanogenbromid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CytK	Cytotoxin K
<i>cytK1</i>	Gen des Cytotoxin K1
DAPI	DNA-Fluoreszenzfarbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	double stranded, doppelsträngig
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EIA	Enzyme immunoassay, Enzymimmuntest
EK	Enterokinase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
Hbl	Hämolysin BL
<i>hbl</i>	Gene des Hämolysin BL
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEp-2	Zelllinie aus humanen Larynxkarzinomzellen
HIS	Histidin
HlyE	Hämolysin E
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HSA	Humanes Serumalbumin
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
IU	International Unit, Internationale Einheit
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny broth
LMG	<i>Escherichia coli</i> -Expressionszelllinie
log	Logarithmus
mAk	Monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal essential medium, Erhaltungsmedium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHI	Stammsammlung, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nhe	Non-haemolytic Enterotoxin
<i>nhe</i>	Gene des Non-haemolytic Enterotoxin
NVH	Norwegian School of Veterinary Science, Norwegische Sammlung von Mikroorganismen
OD	Optical density, optische Dichte
ori	Origin of Replication, Replikationsursprung
pBAD	Vektorsystem
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Ped-2E9	Zelllinie aus murinen Lymphozyten



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PEG	Polyethylenglycol
PeIB	pectate lyase B, Pectatlyase B
pET	plasmid expression by T7-RNA-polymerase, Plasmidexpression durch T7-RNA-Polymerase
pH	pondus Hydrogenii
PlcR	Phospholipase C Regulator
upm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOC-Medium	SOB (Super Optimal Broth) mit Glukose-Zusatz
TMB	Tetramethylbenzidin
TOP10	<i>Escherichia-coli</i> -Zelllinie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
Vero	Zelllinie aus Affennierenzellen
WHO	World health organization
WST	Water-soluble tetrazolium salt, wasserlösliches Tetrazoliumsals
XhoI	Restriktionsendonuklease

Abkürzungen nach dem Internationalen Einheitssystem (SI-Einheiten) sind nicht aufgeführt.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Aufbau des <i>hbl</i> Operons nach GRANUM (2001)	6
<b>Abbildung 2.</b> Aufbau des <i>nhe</i> Operons nach GRANUM (2001)	8
<b>Abbildung 3.</b> Chemische Strukturen von Valinomycin (links) und Cereulid (rechts) nach SARIS et al. (2009)	10
<b>Abbildung 4.</b> Computer-generierte Strukturmodelle nach FAGERLUND et al. (2008)	15
<b>Abbildung 5.</b> Aufbau des Plasmids pET-26b (+)	18
<b>Abbildung 6.</b> Agarose-Gel des PCR-Produkts ( <i>nheA</i> )	43
<b>Abbildung 7.</b> Western Blot von NheA mit primärem mAK 1A8 nach Dialyse	44
<b>Abbildung 8.</b> N-terminale Aminosäuresequenz von NheB-Konstrukten	46
<b>Abbildung 9.</b> Agarose-Gel der PCR-Produkte ( <i>nheB</i> ) nach Restriktionsenzym-Verdau	48
<b>Abbildung 10.</b> Aminosäuresequenz von NheB ohne Leader-Sequenz	50
<b>Abbildung 11.</b> Western Blot von NheB mit primärem mAK 1E11 nach Dialyse und vor Enterokinase-Verdau	52
<b>Abbildung 12.</b> Western Blot von NheB mit primärem mAK 2B11 nach Dialyse und vor Enterokinase-Verdau	52
<b>Abbildung 13.</b> Western Blot von NheB mit primärem mAK 1E11 nach Dialyse	52
<b>Abbildung 14.</b> Immunfluoreszenzbilder mit blauer Kernfärbung (DAPI) und mit Alexa Fluor 488-markiertem mAk 1E11 gegen NheB (grün)	54
<b>Abbildung 15.</b> Immunfluoreszenzbilder mit blauer Kernfärbung (DAPI) und mit Alexa Fluor 488-markiertem mAk 1E11 gegen NheB (grün)	55
<b>Abbildung 16.</b> Agarose-Gel des PCR-Produkts ( <i>nheC</i> )	57
<b>Abbildung 17.</b> Western Blot-Analysen von NheC mit primärem Ak Kaninchen Antiserum	58

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> <i>Bacillus-cereus</i> -Toxine	6
<b>Tabelle 2.</b> Toxinprofile der verwendeten <i>Bacillus-cereus</i> -Stämme	21
<b>Tabelle 3.</b> Sequenzen der verwendeten PCR-Primer	22
<b>Tabelle 4.</b> Am Lehrstuhl entwickelte monoklonale Antikörper/Antisera	26
<b>Tabelle 5.</b> Mastermix PCR <i>nheA</i>	42
<b>Tabelle 6.</b> Amplifikationsbedingungen PCR <i>nheA</i>	43
<b>Tabelle 7.</b> Mastermix PCR für jeweiliges <i>nheB</i> -Konstrukt	47
<b>Tabelle 8.</b> Amplifikationsbedingungen PCR <i>nheB</i> -Konstrukte	47

### Anhang:

<b>Tabelle 1.</b> Mastermix PCR <i>nheC</i>	84
<b>Tabelle 2.</b> Amplifikationsbedingungen PCR <i>nheC</i>	85
<b>Tabelle 3.</b> Mastermix PCR <i>nheC</i>	85
<b>Tabelle 4.</b> Mastermix PCR <i>nheC</i>	85
<b>Tabelle 5.</b> Amplifikationsbedingungen PCR <i>nheC</i>	85

## 1 Einleitung

*Bacillus cereus* ist ein grampositives, fakultativ anaerobes, in der Umwelt weit verbreitetes Bakterium. Die Fähigkeit zur Sporenbildung verleiht dem Bakterium eine hohe Widerstandskraft gegen Umgebungseinflüsse, wie z. B. Feuchtigkeit, pH-Wert und Temperatur (KOTIRANTA et al., 2000). Somit ist *B. cereus* in der Lage die gängigen Pasteurisierungsverfahren zu überleben, was ihn zu einem Problemkeim der Lebensmittelindustrie macht (GRANUM & LUND, 1997; MCKILLIP, 2000).

Durch seine weite Verbreitung in der Umwelt und seine proteo- sowie lipolytischen Eigenschaften stellt er zum einen als Verderbserreger (z. B. Süßgerinnung von Milchprodukten) ein großes Problem dar (KOTIRANTA et al., 2000; BECKER, 2005), zum anderen kann *B. cereus* Lebensmittelvergiftungen mit zwei unterschiedlichen Verlaufsformen hervorrufen. Diese sind durch die Leitsymptome Erbrechen und Durchfall gekennzeichnet (SCHOENI & WONG, 2005). Die Diarrhö-Form wird auf die Produktion zweier extrazellulärer Proteinkomplexe (Nhe, Hbl) bzw. eines Einzelproteins (CytK1) zurückgeführt, während bei der emetischen Form ein zyklisches Peptid (Cereulid) ursächlich beteiligt ist (AGATA et al., 1995a).

Sowohl beim Menschen, als auch beim Tier wurde *B. cereus* als Krankheitserreger beschrieben. So kommen beim Menschen neben der gastrointestinalen Symptomatik zum einen lokale Erkrankungen (z. B. Arthritiden, Wundinfektionen, Keratitiden), zum anderen systemische Infektionen mit Septikämien, Endokarditiden und Meningitiden vor (DROBNIIEWSKI, 1993; KOTIRANTA et al., 2000; BECKER, 2005).

Beim Tier konnte *B. cereus* als Erreger von Mastitiden bei Rind, Ziege und Schaf nachgewiesen werden (BROWN & SCHERER, 1957; ROWAN et al., 2003). Einige Erkrankungen konnten auf kontaminierte Trockenstellpräparate zurückgeführt werden. Das klinische Bild dieser Erkrankung ist meistens durch eine akute Verlaufsform gekennzeichnet, jedoch wurde auch von subklinischen Infektionen berichtet (GEDEK, 1986; BECKER, 2005). Bei Katzen (NIKODEMUSZ, 1965) und Hunden konnte durch toxinbelastetes Futter eine Enteritis ausgelöst werden (NIKODEMUSZ, 1965; BECKER, 2005).

Über den Wirkmechanismus des Proteinkomplexes Nhe, der an der Diarrhö-Form einer *B. cereus*-Lebensmittelintoxikation ursächlich beteiligt ist, ist bisher nur wenig bekannt. Ziel dieser Studie war daher den Wirkmechanismus auf zellulärer Basis mittels rekombinanter Einzelkomponenten zu analysieren. Hierfür musste ein geeignetes Expressionssystem ge-

funden werden, um die biologische Aktivität der Einzelkomponenten untersuchen zu können. Ziel war es, die Bindung an die Zelle mittels Immunfluoreszenz-Studien zu untersuchen, die Bindungsstelle zu charakterisieren und das zytotoxische Potenzial der einzelnen Toxinkomponenten durch einen Zellkulturtest zu detektieren.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Allgemeines

#### 2.1.1 Historischer Überblick

Erste Hinweise auf eine durch *Bacillus cereus* hervorgerufene gastrointestinale Erkrankung sind in einer Fallstudie von LUBENAU aus dem Jahre 1906 zu finden, die eine Lebensmittelintoxikation mit 300 Erkrankten beschreibt. Der als ursächlich beschriebene Mikroorganismus wurde von ihm als „*Bacillus peptonificans*“ bezeichnet und lässt aufgrund seiner Eigenschaften (Kolonienmorphologie, Hämolyse, Sporenbildung, Glukoseabbau ohne Gasbildung, Eiweißabbau in Milch) den Schluss zu, dass es sich um das heute als *Bacillus cereus* bezeichnete Bakterium handelte (BECKER, 2005; ADAMS & MOSS, 2007). Die erste wissenschaftliche Beschreibung einer durch *B. cereus* hervorgerufenen und von Durchfall dominierten Lebensmittelinfektion erfolgte 1955 von HAUGE. Neben diesem als Diarrhö-Form bezeichneten Krankheitsverlauf trat Anfang der 70er Jahre in England ein Krankheitsbild mit dem Leitsymptom Erbrechen (emetische Form) auf, das auf den Verzehr von mit *B. cereus* kontaminierten Lebensmitteln (Reis) zurückzuführen war (PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE; 1972; 1973). Nach der Diskussion verschiedener ursächlicher Pathogenitätsfaktoren [z. B. Sphingomyelinasen, Phospholipasen, Cereolysin O (KREFT et al., 1983; KUPPE et al., 1989)] konnten einzelne *B. cereus*-Toxine bzw. Toxin-Komplexe ab Mitte der 90er Jahre charakterisiert werden (AGATA et al., 1995a; BEECHER et al., 1995a; LUND & GRANUM, 1996; LUND et al., 2000).

#### 2.1.2 Taxonomische Einordnung

Das ubiquitäre, fakultativ anaerobe, stäbchenförmige Bakterium *B. cereus* gehört zum Genus *Bacillus* (SMITH et al., 1946; SMITH et al., 1952; GORDON et al., 1973; GIBSON & GORDON, 1974; LOGAN & DE VOS, 2009b), welches heute zusammen mit weiteren Genera in die Familie der Endosporen bildenden, grampositiven Bacillaceae eingeordnet wird (LOGAN & DE VOS, 2009a). Innerhalb der Gattung *Bacillus* wird *B. cereus* herkömmlicherweise der morphologischen Gruppe 1A zugeordnet und bildet zusammen mit fünf weiteren Spezies (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*) die sogenannte „Cereus-Gruppe“.

### 2.1.3 Extraintestinale Erkrankungen

*B. cereus* ist als Lebensmittelverderbserreger bekannt, jedoch wurden auch viele Infektionen außerhalb des Magen-Darm-Traktes beschrieben. Dabei handelt es sich um systemische Infektionen wie Sepsis (GINSBURG et al., 2003; HILLIARD et al., 2003), Meningitis (TOKIEDA et al., 1999; GAUR et al., 2001), Endokarditis (STEEN et al., 1992) und Pneumonie (FRANKARD et al., 2004; KATSUYA et al., 2009), sowie lokale Wundinfektionen (DUBOUIX et al., 2005) und Endophthalmitiden (BEECHER et al., 1995a; BEECHER et al., 2000; CALLEGAN et al., 2007; MOYER et al., 2008). Unter den betroffenen Patienten finden sich vor allem immunsupprimierte und immuninkompetente Personen, Neugeborene, Drogenabhängige und Intensivpatienten mit Verweilkathetern (DROBNIOWSKI, 1993; KOTIRANTA et al., 2000). Sowohl bei lokalen als auch bei systemischen Infektionen kann es zu schweren Verläufen mit letalem Ausgang kommen. So wurden Todesfälle in Zusammenhang mit Meningoenzephalitis und Leberinsuffizienz publiziert (MARLEY et al., 1995).

### 2.1.4 Gastrointestinale Erkrankungen

Zum Vorkommen von *B. cereus* verursachten gastrointestinalen Erkrankungen liegen nur unzureichende Daten vor, was auf den im Regelfall milden und kurzen Verlauf dieser Erkrankung zurückzuführen ist. Auch besteht für den Nachweis des Erregers keine Meldepflicht nach Infektionsschutzgesetz § 7 (2000). Tendenziell ist jedoch während der letzten Jahre in den Industriestaaten ein Anstieg an durch *B. cereus* bedingten Erkrankungen zu verzeichnen (KOTIRANTA et al., 2000; EHLING-SCHULZ et al., 2004). Aufgrund des jeweiligen Leitsymptoms werden zwei Krankheitsformen unterschieden: Die emetische Form und die Diarrhö-Form.

Mit profusem Durchfall, Abdominalkrämpfen und weniger häufig Erbrechen stellt die Diarrhö-Form eine Lebensmittelinfektion mit einer Inkubationszeit von 8 - 16 Stunden und einer Erkrankungsdauer von 12 – 24 Stunden dar (GRANUM, 1994; KOTIRANTA et al., 2000). Sie wird durch hitzelabile und trypsinempfindliche Enterotoxine ausgelöst, die erst nach dem Verzehr von mit vegetativen Bakterienzellen oder Sporen kontaminierten Lebensmitteln im Dünndarm gebildet werden (ANDERSSON et al., 1998; CLAVEL et al., 2004). Mit der genannten Symptomatik ähnelt das Diarrhö-Syndrom einer *Clostridium-perfringens*-Intoxikation.

Um eine klassische Lebensmittelintoxikation handelt es sich bei der emetischen Form, als deren wichtigste Differentialdiagnose die *Staphylococcus-aureus*-Enterotoxinvergiftung gilt. Das emetische Syndrom wird durch ein gegen Hitze, Säure und proteolytische Enzyme resistentes Toxin ausgelöst (AGATA et al., 1995b), das im Lebensmittel präformiert vorliegt. Erste Krankheitssymptome, vor allem Übelkeit und Erbrechen, treten nach einer Inkubationsdauer von 0,5 - 5 Stunden auf. Nach 6 - 24 Stunden klingen sie meist wieder ab (KOTIRANTA et al., 2000; MÄRTLBAUER & BÜRK, 2005).

## **2.2 *Bacillus-cereus*-Toxine**

Die beiden Krankheitsbilder des gastrointestinalen Symptomkomplexes Diarrhö und Emesis können durch mehrere Toxine bzw. Toxinkomplexe hervorgerufen werden (J. L. SCHOENI & A. C. WONG, 2005; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Das Diarrhö-Syndrom wird durch die beiden Toxinkomplexe Hämolysin BL (Hbl) (BEECHER et al., 1995b) und Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe) (LUND & GRANUM, 1996), die jeweils aus drei Proteinkomponenten bestehen, verursacht. Des Weiteren kann diese Krankheitsform durch das Einzelprotein Cytotoxin K (CytK) ausgelöst werden (LUND et al., 2000). Für zwei weitere als Enterotoxine beschriebene Proteine, Enterotoxin T (AGATA et al., 1995a) und Enterotoxin FM (ASANO et al., 1997), ist eine Beteiligung am Krankheitsgeschehen nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht gesichert (LUND et al., 2000). Ein zyklisches Peptid, das sogenannte Cereulid (AGATA et al., 1995b; EHLING-SCHULZ et al., 2004), gilt als Verursacher der emetischen Form.



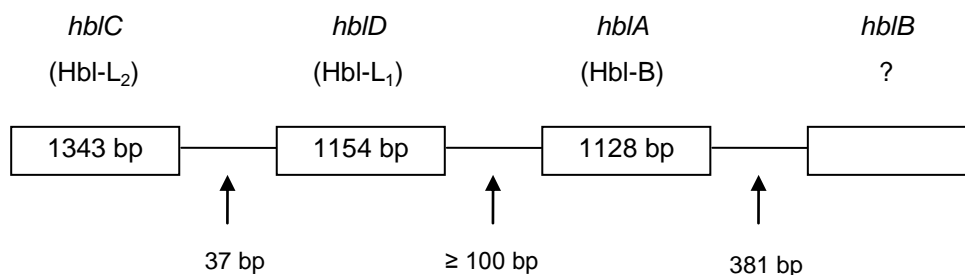
**Tabelle 1.** *Bacillus-cereus*-Toxine

Toxin bzw. Toxin-Komplex	Molekulargewicht (kDa) <sup>1</sup>	Referenz
Hbl (B, L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> )	38,0; 39,5; 43,0 37,8; 38,5; 43,2 38,1; 39,5; 44,8	THOMPSON et al. (1984) BEECHER et al. (1995b) BEECHER & WONG (2000)
Nhe (A, B, C)	45,0; 39,0; 105,0 41,0; 39,8; 36,5	LUND & GRANUM (1996) GRANUM et al. (1999)
Cytotoxin K	34,0	LUND et al. (2000)
Cereulid	1,2	AGATA et al. (1994)

<sup>1</sup>Die Molekulargewichtsangaben in den Publikationen von BEECHER & WONG (2000) und GRANUM et al. (1999) repräsentieren den aktuellen Forschungsstand.

### 2.2.1 Hämolyisin BL (Hbl)

Das Diarrhö-Syndrom wird unter anderem durch den Enterotoxin-Komplex Hämolyisin BL hervorgerufen, der aus den drei Einzelproteinen Hbl-L<sub>2</sub> (44,8 kDa), Hbl-L<sub>1</sub> (39,5 kDa) und Hbl-B (38,1 kDa) besteht (BEECHER & WONG, 2000). Der erstmals 1984 von THOMPSON et al. beschriebene Protein-Komplex besitzt hämolytische Eigenschaften (BEECHER & MACMILLAN, 1990; BEECHER & WONG, 2000) sowie zytotoxisches Potenzial im Zellkulturtest mit Vero-Zellen (LUND & GRANUM, 1997). Biologisch aktiv ist Hbl jedoch nur, wenn alle drei Komponenten vorhanden sind (BEECHER et al., 1995b). Die drei Einzelproteine werden durch die Gene *hbIC*, *hbID* bzw. *hbIA* kodiert, welche auf einem Operon liegen und in eine mRNA transkribiert werden (HEINRICHS et al., 1993; RYAN et al., 1997; LINDBÄCK et al., 1999). Wie viele andere Pathogenitätsfaktoren (z. B. CytK, Nhe) wird auch die Proteinexpression von Hbl durch den ursprünglich für die Phospholipase C (Plc) beschriebenen Regulator (PlcR) kontrolliert (AGAISSE et al., 1999).

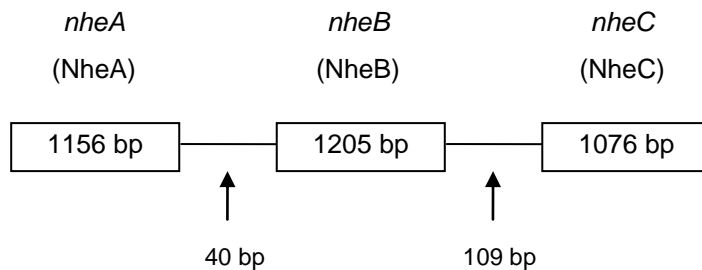


**Abbildung 1.** Aufbau des *hbl* Operons nach GRANUM (2001)

Zum Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene werden zwei Hypothesen diskutiert: Nach BEECHER & MACMILLAN (1991) bindet zuerst die B-Komponente an die Zelloberfläche und schleust die beiden L-Komponenten ein, welche eine Störung der metabolischen Aktivität der Zelle verursachen. Im Gegensatz hierzu wurde von BEECHER & WONG (1994a; 1997) ein Wirkmechanismus postuliert, demzufolge alle drei Komponenten unabhängig voneinander an die Zelle binden und zu einem sogenannten „membrane-attack-complex“ oligomerisieren. Dieser erhöht die Durchlässigkeit der Zellmembran, woraufhin es aufgrund des kolloidosmotischen Druckes zum Austritt von Zellmaterial und schließlich zum Zelltod kommt.

### 2.2.2 Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe)

In Zusammenhang mit einer Lebensmittelinfektion in Norwegen wurde das Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe) erstmals 1996 von LUND & GRANUM aus einem Hbl-negativen Stamm isoliert. Auch Nhe ist ein Enterotoxinkomplex, der aus den drei Untereinheiten NheA (41,0 kDa), NheB (39,8 kDa) und NheC (36,5 kDa) gebildet wird (GRANUM et al., 1999). Für die maximale zytotoxische Aktivität werden wie auch bei Hbl alle drei Komponenten benötigt (LINDBÄCK et al., 2004), deren Gene *nheA*, *nheB* und *nheC* ebenfalls auf einem Operon liegen (GRANUM et al., 1999) und durch PlcR kontrolliert werden.



**Abbildung 2.** Aufbau des *nhe* Operons nach GRANUM (2001)

Zwischen den Nhe- und Hbl-Komponenten existieren strukturelle Ähnlichkeiten, wobei die Sequenzhomologien zwischen Nhe-B und Hbl-L<sub>1</sub> sowie zwischen NheC und Hbl-B am ausgeprägtesten sind (LUND & GRANUM, 1997). Zum zellulären Wirkungsmechanismus wurden vor allem Studien an Vero-Zellen durchgeführt. So berichten LINDBÄCK et al. (2004) von einer maximalen biologischen Aktivität des Toxinkomplexes bei einem molaren Verhältnis der Einzelkomponenten NheA : NheB : NheC von 10 : 10 : 1. Nach FAGERLUND et al. (2008) führt Nhe durch seine porenbildenden Eigenschaften zu osmotischer Lyse von Epithelien. Die Komponente NheB weist sowohl strukturelle, als auch funktionelle Ähnlichkeiten zu Hämolsinen gramnegativer Bakterien (z. B. Cytolysin A) auf. Weil NheC für die maximale zytotoxische Aktivität von Nhe nur in geringen Mengen vorliegen muss, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei NheC um eine Art Katalysator handelt, der NheA und NheB zusammenbringt, nachdem NheB an der Zelle gebunden hat oder Konformationsänderungen hervorruft (LINDBÄCK et al., 2004; FAGERLUND et al., 2008). Im Gegensatz zu Hbl konnte für Nhe keine Hämolyse auf Rinderblutagar gezeigt werden (LUND & GRANUM, 1996), wohingegen in Suspensions-Assays eine hämolytische Aktivität gegenüber humanen und tieri-

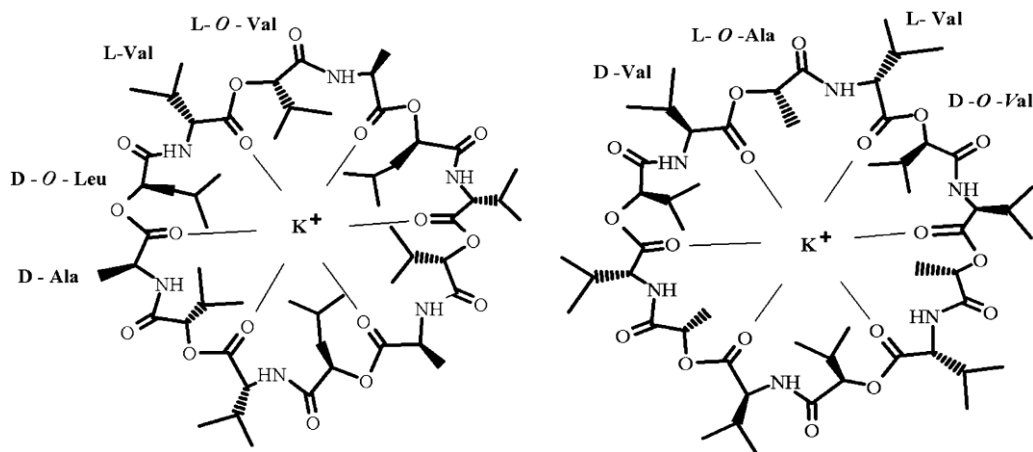
schen Erythrozyten festgestellt wurde (FAGERLUND et al., 2008). Die fehlende Hämolyse auf Rinderblutagar ist möglicherweise mit einer geringeren hämolytischen Wirkung von Nhe im Vergleich zu Hbl zu erklären (STENFORS ARNESEN et al., 2008).

### 2.2.3 Cytotoxin K (CytK)

Das Einzelprotein Cytotoxin K (CytK; 34 kD) wurde 2000 von LUND isoliert und sequenziert. Es stammt aus einem *B. cereus*-Stamm, der trotz fehlender Hbl- und Nhe-Produktion eine schwere Lebensmittelvergiftung mit blutigem Durchfall auslöste, an der drei Menschen starben (LUND et al., 2000). Die Aminosäuresequenz von CytK weist Homologien zu einigen porenbildenden Proteinen auf, darunter das  $\beta$ -Toxin von *Clostridium perfringens* und  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Hämolysin von *Staphylococcus aureus* (LUND et al., 2000). *In vitro*-Studien zeigten, dass CytK an künstlichen Lipidschichten innerhalb kurzer Zeit Kanäle bildet, hämolysierende sowie nekrotisierende Eigenschaften besitzt und im Zellkulturtest toxisch für CaCo-2-Zellen ist (LUND et al., 2000; HARDY et al., 2001). FAGERLUND et al. (2004) beschrieben eine Variante von CytK (CytK-2), die eine hohe Übereinstimmung (89 %) mit der Aminosäuresequenz des organären CytK (CytK-1) aufweist, jedoch ein deutlich geringeres toxisches Potenzial besitzt. Die Stämme, bei denen CytK-2 nachgewiesen wurde, exprimierten gleichzeitig Hbl und/oder Nhe (STENFORS & GRANUM, 2001). Bis heute konnte das Gen für CytK-1 nur bei drei Stämmen nachgewiesen werden, wohingegen CytK-2 produzierende Stämme weitaus häufiger isoliert werden (GUINEBRETIERE et al., 2006; FAGERLUND et al., 2007).

## 2.2.4 Cereulid

Die emetische Form einer gastrointestinalen Erkrankung durch *B. cereus* wird durch das hitze-, säure- und proteolyseresistente Toxin Cereulid (1,191 kD) hervorgerufen (AGATA et al., 1994; MÄRTLBAUER & BÜRK, 2005). Cereulid ist ein hydrophobes zyklisches Dodekadepsipeptid und besitzt große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Antibiotikum Valinomycin, einem Kalium-Ionophor (AGATA et al., 1994; EHLING-SCHULZ et al., 2004). *In vivo* besitzen sowohl Cereulid, als auch Valinomycin eine über 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und Vagusstimulation vermittelte emetische Wirkung.



**Abbildung 3.** Chemische Strukturen von Valinomycin (links) und Cereulid (rechts) nach SARIS et al. (2009)

Als selektives Kalium-Ionophor beeinflusst Cereulid das mitochondriale Membranpotenzial (MIKKOLA et al., 1999) und führt zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (TEPLOVA et al., 2006). Nach Cereulid-Exposition konnte bei *in-vitro*-Studien ein Anschwellen von Mitochondrien in HEp-2 Zellen, sowie ein Rückgang der Insulinproduktion in porcinen, pankreatischen Langerhans-Inseln beobachtet werden (SAKURAI et al., 1994; SHINAGAWA et al., 1995; TEPLOVA et al., 2006). Von PAANANEN et al. (2002) wurde für Cereulid eine immunsuppressive Wirkung durch Inhibierung humaner natürlicher Killerzellen beschrieben.

### 2.3 Nachweisverfahren

Heute haben *in-vitro*-Bioassays, vor allem Zellkulturtests, den Pathogenitätsnachweis mittels Tierversuch weitestgehend abgelöst. Gegenwärtig werden diese *in-vivo*-Verfahren nur noch zur Klärung spezifischer Fragestellungen eingesetzt. Zum Nachweis des zytotoxischen Potenzials von *B. cereus*-Diarrhö-Toxin wurden WST-Zellkulturtests unter Verwendung verschiedener Zelllinien, z. B. McCoy, CHO, Vero, Caco-2 und Ped-2E9 etabliert (JACKSON, 1993; BUCHANAN & SCHULTZ, 1994; SEIDEL et al., 1996; DIETRICH et al., 1997). Als besonders sensitiv gegenüber den Diarrhö-Enterotoxinen Nhe und HBL haben sich Vero-Zellen gezeigt (WONG et al., 1988). Mithilfe dieses Zytotoxizitätstests ist es möglich, die funktionelle Aktivität der Diarrhö-Enterotoxine auf zellulärer Ebene darzustellen.

Derzeit gibt es zwei kommerzielle immunochemische Testkits zum Nachweis von *B. cereus*-Enterotoxinen, die auf polyklonalen Antikörpern basieren (BDE VIA, TECRA und OXOID RPLA). Ein wesentliches Problem der beiden Testkits ist jedoch die eingeschränkte Spezifität, da die eingesetzten polyklonalen Antikörper auch mit anderen Exoproteinen von *B. cereus* reagieren (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM, 1996). Der erste auf monoklonalen Antikörpern basierende Schnelltest steht seit 2008 als Duopath-System (Merck) zum simultanen Nachweis jeweils einer Komponente der beiden Enterotoxin-Komplexe Hbl (Hbl-L<sub>2</sub>) und Nhe (NheB) zur Verfügung. Neben den beiden in diesen Tests eingesetzten Antikörpern wurden von DIETRICH et al. (1999, 2005) und MORAVEK et al. (2004, 2006) weitere monoklonale Antikörper gegen NheA, Hbl-L<sub>1</sub> und Hbl-L<sub>2</sub>, zudem ein polyklonales Antiserum gegen NheC entwickelt.

Daneben werden molekularbiologische Methoden, meist basierend auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. In den letzten Jahren haben in diesem Bereich vor allem Real-time-PCR und die Multiplex-PCR an Bedeutung gewonnen (GUINEBRETIERE et al., 2002; PRIHA et al., 2004; YANG et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; FRICKER et al., 2007; MESSELHÄUSSER et al., 2007; WEHRLE et al., 2009).

## 2.4 Wirkungsweise bakterieller Exotoxine

Bakterielle Exotoxine sind meist Proteine, die von den Erregern freigesetzt werden und beim Wirt Schäden hervorrufen können (MADIGAN & MARTINKO, 2009). Davon abzugrenzen sind Endotoxine, die als Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien vor allem beim Absterben der Bakterienzelle freigesetzt werden und als Entzündungsmediatoren unspezifische Krankheitssymptome hervorrufen (MIYAKE, 2004).

Proteine, die von der Bakterienzelle sezerniert werden, besitzen am aminoterminalen Ende der Polypeptidkette ein Signalpeptid, welches die Translokation des Proteins vom Cytoplasma ins umgebende Medium vermittelt. Während dieses Vorgangs wird die Signal- oder Leadersequenz von einer Peptidase abgespalten und die endgültige Proteinfaltung durch sogenannte Chaperone (lösliche Proteine) vollzogen (ALBERTS et al., 2005). Zwischen der Signalsequenz und dem eigentlichen Protein befinden sich besonders oft bei Sekretionsproteinen des Genus *Bacillus* Propeptide, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Eine Beteiligung der Propeptide an der Translokation sowie die Unterdrückung proteolytischer Enzymaktivität während der Sekretion werden diskutiert. Auch wird eine Interaktion mit Proteasen, eine Vermittlerfunktion in der Proteinfaltung und Enzymaktivierung in Betracht gezogen (SIMONEN & PALVA, 1993).

Bakterielle Exotoxine werden als lösliche Proteine sezerniert, die mit der Zielzelle interagieren. Dabei können zwei Wirkmechanismen unterschieden werden, die Permeabilisierung der Zellmembran (Porenbildung) und die Translokation ins Zytoplasma der Zielzelle (AB-Toxine) mit anschließender enzymatischer Schädigung (CABIAUX et al., 1997). Eine weitere Einteilung der Toxine beruht auf ihrer Interaktion mit der Zellmembran. Es lassen sich zwei Klassen porenbildender Toxine (PFTs) unterscheiden (PARKER & FEIL, 2005). Die erste Klasse, die  $\alpha$ -PFTs, bildet Poren durch eine  $\alpha$ -Helix-Konformation mit einer helicalen Haarnadelstruktur im Zentrum (z. B. Diphtherie-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae*). Die zweite Klasse, die  $\beta$ -PFTs, die aus sogenannten  $\beta$ -Sheets bestehen, bilden sogenannte  $\beta$ -Barrels aus (z. B.  $\alpha$ -Hämolyisin von *Staphylococcus aureus*) (CABIAUX et al., 1997; GOUAUX, 1997; GILBERT, 2002; GENY & POPOFF, 2006; MUELLER et al., 2009). Das Toxin muss, um an die Zielzelle zu gelangen, wasserlöslich sein, jedoch um in die Doppellipidschicht der Zelle einzudringen, hydrophobe Segmente besitzen. Daher weist die primäre Aminosäuresequenz in der Regel große hydrophile Bereiche auf, zugleich jedoch ein hydrophobes Segment, das lang genug ist, um die Zellmembran zu durchspannen (MENESTRINA et al., 2001). Die Bindung an die Zielzelle erfolgt entweder über einen spezifischen Rezeptor oder über

Sphingolipide und Cholesterin, die sich zu Mikrodomänen, sogenannten „Lipid Rafts“, formieren können (SIMONS & IKONEN, 1997; GILBERT, 2002; WILKOP et al., 2008).

#### 2.4.1 Intrazellulär wirkende Exotoxine

Intrazellulär agierende Exotoxine bestehen meist aus sogenannten A- und B-Untereinheiten, wobei die A-Untereinheit die katalytische Domäne und somit das toxische Prinzip repräsentiert (CABIAUX et al., 1997). Die B-Untereinheit ist als Bindungsdomäne für die Wirtsrezeptorerkennung, die Toxintranslokation und Toxinstabilität verantwortlich. Zunächst bindet die B-Domäne des Toxins an einen Zellmembranrezeptor. Daraufhin erfolgt eine rezeptorvermittelte Endozytose in ein Endosomen-Kompartiment, wo es zu einer Strukturveränderung in der Translokationsdomäne kommt, die das Freiwerden ins Cytosol ermöglicht (GENY & POPOFF, 2006).

Die unterschiedliche enzymatische Aktivität der A-Domäne dieser Toxine spiegelt sich in deren verschiedenen Wirkungsmechanismen wider. Vertreter dieser A-Domäne sind ADP-Ribosyltransferasen (z. B. Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae*), N-Glycosidasen (z. B. Verotoxin von *Escherichia coli*) und Metalloendoproteasen (Botulinum-Toxin von *Clostridium botulinum*). Die beiden Domänen werden bei diesem Toxin-Typ entweder in einem Protein vereint oder durch zwei separate Proteine (binäres Toxin) repräsentiert (GENY & POPOFF, 2006).

Ein weiterer Vertreter der AB-Toxine ist das Anthrax-Toxin von *Bacillus anthracis*. Dieses Toxin besteht wie Nhe von *B. cereus* aus drei Proteinen. Jedoch bestehen signifikante Unterschiede, weswegen Nhe nicht in diese Toxingruppe einzuordnen ist. Die drei Komponenten des Anthrax Toxins bilden zwei binäre Toxine, das Letal- und das Ödem-Toxin (KATAYAMA et al., 2010). Beide Toxine besitzen die selbe Bindungskomponente, das sogenannte Protektive Antigen (83 kDa) (MOAYERI & LEPPLA, 2009), welches an einen Zellmembranrezeptor (Tumor Endothelial Marker 8 oder Capillary Morphogenesis Gene 2) bindet und zu einer heptameren oder oktameren Ringstruktur oligomerisiert (SCOBIE & YOUNG, 2005; KINTZER et al., 2009). Sowohl der Ödemfaktor, eine Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase, als auch der Letalfaktor, eine Zink-abhängige Metalloprotease, können daraufhin an das Protektive Antigen binden. Der Rezeptor-Toxin-Komplex wird endozytiert, wobei der saure pH-Wert des Endosoms zur Porenbildung und zur partiellen Entfaltung von Ödem- und Letal-Faktor führt (ABRAMI et al., 2010). Die enzymatischen Kompartimente des



Toxins können durch die entstandenen Poren ausgeschleust werden und die Zelle schädigen. Eine funktionelle Aktivität ist sowohl für das Letal-Toxin als auch für das Ödem-Toxin unabhängig von einander nachweisbar (MOAYERI & LEPPLA, 2009).

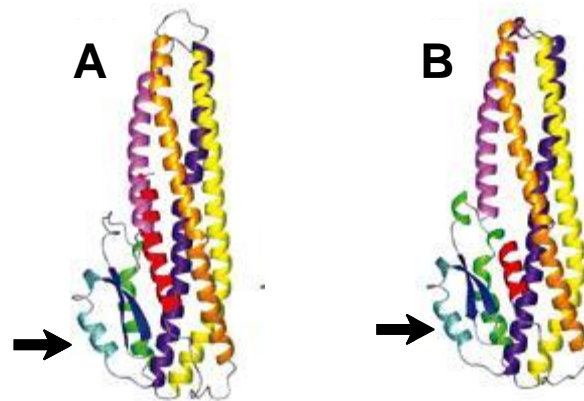
#### **2.4.2 Membranschädigende Exotoxine**

Ein weiterer Wirkmechanismus zur Schädigung der Zielzelle beruht auf der Zerstörung der Zellmembran. Spezifisch auf die Membran gerichtete Enzymaktivitäten (z. B. Hydrolyse von Phospholipiden) können zur Lyse der Zelle führen. Derartige Membranschäden werden beispielsweise von Phospholipasen hervorgerufen (z. B. von *C. perfringens*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*), wobei die Phosphatester der Phospholipide hydrolytisch gespalten werden (POPOFF, 2005). Zusätzlich ist als membranschädigender Mechanismus der Exotoxine die Fähigkeit der Porenbildung zu nennen. Dies führt je nach Porengröße zum Verlust oder Einstrom porengängiger Moleküle. Die Störung des intrazellulären Ionenmilieus und Lyse der Zelle bedingt durch den Ausgleich des kolloidosmotischen Druckes ist die Folge (CABIAUX et al., 1997).

Eine große Gruppe der porenformenden Toxine bilden die cholesterinbindenden Cytolysine, die von mehr als 20 Arten der Genera *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus* und *Arcanobacterium* gebildet werden (TWETEN, 2005). Die beiden Hauptcharakteristika dieser Toxingruppe sind der vergleichsweise große Porendurchmesser (300 – 450 Å) und die Cholesterin-vermittelte Bindung bzw. Porenbildung (TWETEN, 2005; GENY & POPOFF, 2006; FARRAND et al., 2010).

Unter den bisher beschriebenen bakteriellen Toxinen sind die zwei Toxin Komplexe Nhe und HBL in ihrer Zusammensetzung aus jeweils drei verschiedenen Proteinen einzigartig, weshalb bislang eine Klassifizierung unterblieb. Für HBL wird ein sogenannter „membrane-attack-complex“, der die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöht, postuliert (BEECHER & WONG, 1997). FAGERLUND et al. (2008) diskutierten basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten zwischen NheB und dem *E. coli* Cytolysin A (ClyA) ein gleichartiges Bindungs- und Porenbildungsverhalten. ClyA (34 kDa) erfährt nach posttranslationalen Modifikationen große Konformationsänderungen um eine  $\alpha$ -helikale Transmembranpore zu bilden. (WALLACE et al., 2000; MUELLER et al., 2009).

Die hämolytische Eigenschaft von ClyA wird auf Zelllyse durch osmotische Quellung zurückgeführt, was auch für NheB postuliert wurde (FAGERLUND et al., 2008). Die Röntgenstrukturanalyse der Proteine ClyA und HBL-B zeigt Übereinstimmungen in der Tertiärstruktur wie die Orientierung der vier  $\alpha$ -Helices und die Subdomäne der  $\beta$ -Haarnadelstruktur. Obwohl diese strukturelle Anordnung der vier  $\alpha$ -Helices bei Proteinen oft vorkommt, ist die Subdomäne mit der hydrophoben  $\beta$ -Haarnadelstruktur einzigartig (Pfeil in Abb. 4) (WALLACE et al., 2000; FAGERLUND et al., 2008). Die unterschiedliche Orientierung dieser Struktur bei ClyA und HBL-B lässt auf verschiedene Konformationen des hydrophoben Segments während der löslichen Phase schließen. Für Nhe liegen keine Röntgenstrukturanalysen vor, jedoch konnten mittels Computerprogrammen hypothetische Modelle beruhend auf Sequenzhomologien entworfen werden (Abb. 4: A, B).



**Abbildung 4.** Computer-generierte Strukturmodelle nach FAGERLUND et al. (2008)

(A) NheB Homologiemodell

(B) NheC Homologiemodell

Auf Grund dieser strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten von Nhe und HBL mit dem von einigen Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae* produzierten Cytolysin A (ClyA) wurde spekuliert, ob diese nicht eine neue Familie von porenbildenden Zytotoxinen darstellen (FAGERLUND et al., 2008).

## **2.5 Herstellung rekombinanter Proteine in bakteriellen Expressionssystemen**

In den letzten Jahren rückte die Herstellung und Verwendung rekombinanter Proteine vermehrt in den Fokus von Wissenschaft, Forschung und Industrie. Hierfür besonders attraktiv sind bakterielle Expressionssysteme wegen des geringen Kostenaufwandes, der hohen Produktivität und schnellen Verfügbarkeit (SCHMIDT, 2004).

### **2.5.1 Prinzip des Klonierens**

Rekombinante Proteine werden mittels verschiedener Klonierungsstrategien (ligationabhängig oder –unabhängig) hergestellt. Prinzipiell wird ein DNA-Fragment (Insert), welches das zu klonierende Gen enthält, in ein DNA-Molekül, den Vektor, eingefügt (BROWN, 2006). Dieser Vektor wird in eine Wirtszelle eingeschleust, in dieser vervielfältigt und an die folgenden Zellgenerationen weitergegeben. Aufgrund der Anforderungen verschiedener Zielzellen und den unterschiedlichen Insert-Größen sind diverse Vektorsysteme erhältlich. Das für die Produktion von rekombinanten Proteinen am besten etablierte Expressionssystem ist das *E. coli*-System mit einer Vielzahl an kommerziell erhältlichen Plasmid-Vektoren (TERPE, 2006).

## 2.5.2 Aufbau eines Plasmid-Vektors

Anfang der 70er Jahre wurden Plasmide zum ersten Mal als Klonierungsvektoren verwendet (COHEN et al., 1973; HERSHFIELD et al., 1974; COVEY et al., 1976). Mittlerweile gibt es sehr viele Plasmide, die perfekt auf ihren Verwendungszweck abgestimmt sind und daher typische Eigenschaften besitzen.

Jeder Plasmid-Vektor besitzt eine sogenannte Cloning Site, welche die Stelle im Vektor angibt, an der das Zielgen eingebaut wird (QUAIL, 2005). Eine Cloning Site besteht aus mindestens einer Erkennungssequenz für eine Endonuklease, wobei die meisten heutzutage gebräuchlichen Plasmid-Vektoren eine Multiple Cloning Site (MTS) mit Erkennungssequenzen für viele verschiedene Restriktionsendonukleasen besitzen.

Um eine autonome Replikation, also unabhängig von der zellulären DNA-Replikation, des Plasmids in der Bakterienzelle zu gewährleisten, muss es einen Replikationsursprung, die Origin of Replication (ori), aufweisen. Diese muss auf das Replikationssystem der Wirtszelle abgestimmt sein und reguliert auf diese Weise die in der Zelle vorliegende Plasmid-Anzahl (QUAIL, 2005).

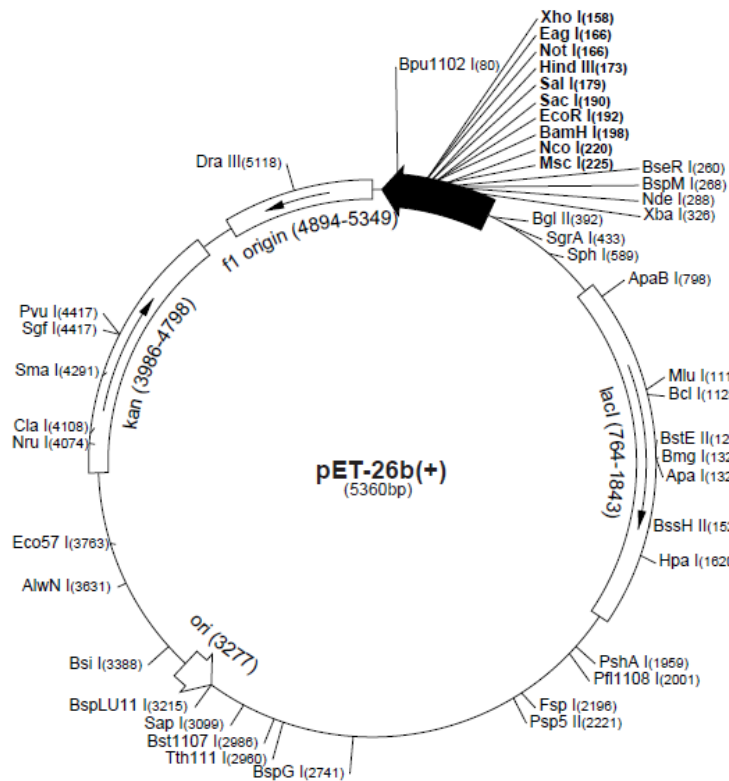
Wichtig für die Selektion der genetisch veränderten Zellen sind Marker-Gene, die beispielsweise für Antibiotikaresistenzen oder Luciferasen (Enzyme, die eine Lichtemissions-Reaktion katalysieren) kodieren (WEAVER & HEDRICK, 1996).

Ein weiteres elementares Merkmal ist das regulatorische Element des Plasmids, das Operon. Diese Einheit ist für die Kontrolle der Genexpression verantwortlich, wodurch diese zeitnah induziert werden kann.

Das L-Arabinose-Operon des pBAD-Vektors ist ein Beispiel für eine positive Regulation der Genaktivität (SCHLEIF, 2000). Eine DNA-Schleife, die in Abwesenheit von Arabinose durch das Homodimer AraC gebildet wird, verhindert das Anlagern der RNA-Polymerase an den pBAD-Promotor. Arabinose vermittelt durch Bindung an AraC dessen Monomer-Bildung und führt dadurch zum „Aufklappen“ der Schleife. Somit erfolgt die durch Arabinose induzierte Genexpression (BANEYX, 1999; SCHLEIF, 2000; CRONAN, 2006).

Das modifizierte *lac* Operon mit dem T7-RNA-Polymerase-System ist eines der meistgebrauchten Expressionssysteme (STUDIER & MOFFATT, 1986; TERPE, 2006). Die Genexpression wird in diesem System (z. B. pET-Vektoren) sowohl positiv durch Induktion

mit Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), als auch negativ durch Glukose reguliert (GROSSMAN et al., 1998; BANEYX, 1999).



**Abbildung 5.** Aufbau des Plasmids pET-26b (+) (Herstellerangaben, Novagen, 69862-3)

Plasmide eröffnen auch die Möglichkeit das gewünschte rekombinante Protein als Fusions-Protein zu exprimieren (BANEYX, 1999). Fusions-Proteine dienen der Aufreinigung des rekombinanten Proteins [z. B. Histidin-Tag (HIS-Tag)], beispielsweise durch Affinitätschromatographie. Desweiteren können Fusions-Proteine die Bildung von Einschlusskörperchen durch eine gesteigerte Löslichkeit (z. B. Thioredoxin) oder durch Sekretion (z. B. PelB,  $\beta$ -Laktamasen) vermindern.

### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Materialien**

##### **3.1.1 Chemikalien und Biochemika**

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, T-2885-5G)  
6-Aminocapronsäure (Sigma, A-2504)  
Aceton (Riedel de Haën, 32201)  
Agarose (Peqlab, 351020)  
Alexa Fluor 488 Succinimidyl-Ester (Invitrogen; A 20000)  
Alexa Fluor 555 Succinimidyl-Ester (Invitrogen; A 20009)  
Alkalische Phosphatase (Chemicon, AP 308A)  
Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich GmbH, A4514)  
Ampicillin (Sigma-Aldrich GmbH, A-9518)  
Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma, A 7030)  
Bromphenolblau (Merck, 8122)  
Casein (Sigma-Aldrich, C- 8654)  
Caseinhydrolysat (Fluka, 22090)  
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11 644 807 001)  
CellLytic Express (Sigma-Aldrich, C1990-10X25ML)  
CellLytic IB Inclusion Body Solubilization Reagent (Sigma-Aldrich, C5236-25ML)  
Citronensäure-Monohydrat (Fluka, 27490)  
CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, 71-7088-00)  
D (+)-Glukose Monohydrat (Riedel- de Haën, 16301)  
Di-Kaliumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, 04248)  
Di-Natriumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, 30427)  
D-Mannitol (Sigma-Aldrich, M4125-500G)  
DNA-Leiter Plus, 0,1 - 3 kbp (Peqlab, 25-2020)  
DNA-Seizer IV 0,023 - 8,1 kbp (Peqlab, 25-2080)  
DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506)  
dNTP Set hochkonzentriert, 100 µmol/dNTP (ABgene, AB-0315)  
D-Sorbitol (Sigma-Aldrich, S6021-1KG)  
Dulbecco's MEM Zellkulturmedium (Biochrom AG, F0435)  
EDTA (Sigma-Aldrich GmbH, E1644)  
Enterokinase (Sigma-Aldrich, E0632)

Essigsäure 5 % (Merck, 1.00063)  
Ethanol, absolut (Riedel de Haën, 32205)  
Ethidiumbromidlösung 1 % (Serva, 21251)  
Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, S 0115)  
Fibronectin (Sigma-Aldrich, F2006)  
Gel Extraction Kit (Peqlab, 12-2501-01)  
Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich GmbH, G2526-5ML)  
Glycerin ca. 87 % (Merck, 1.04094.1000)  
Glycin (Sigma-Aldrich, G8898-1KG)  
Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)  
High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, 1175477001)  
Hirn-Herz-Bouillon (Merck, 1.10493.0500)  
Imidazol 99 % (Sigma-Aldrich, I0125-100G)  
Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) (Sigma-Aldrich, I6758-5G)  
Kalilauge (Fluka, 35113)  
Kaliumdihydrogenphosphat (Riedel de Haën, 30407)  
Kalziumdichlorid (Sigma-Aldrich 21108)  
Kanamycin (Biochrom KG, A-9518)  
Kerosin (Fluka, 60710)  
L-(+)-Arabinose (Sigma-Aldrich, A3256-25G)  
L-Glutamin (Biochrom AG, K0282)  
LMW Calibration Kit for SDS Elektrophoresis (GE Healthcare, 17-0446-01)  
Magnesiumchlorid (Sigma-Aldrich GmbH, M8266-100G)  
Magnesiumsulfat (Fluka, 63138)  
MEM-EARLE Zellkulturmedium (Biochrom AG, FG0325)  
Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, M-6250)  
Methanol (Sigma-Aldrich, 34860)  
Natriumazid (Riedel de Haën, 13412)  
Natrium-Caseinat (Sigma-Aldrich, C8654-500G)  
Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, 31434)  
Natriumcitrat (Merck, 1.06448)  
Natriumdodecylsulfat (SERVA Electrophoresis GmbH, 20765)  
Natriumpyruvat (Biochrom AG, L 0473)  
Paraformaldehyd (Fluka, 76240)  
Polyethylenglycol (Fluka, 81300)  
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml (Biochrom AG, A2212)

Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab 12-6943)  
 Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich, P-7170-1L)  
 ProLong Gold antifade mit DAPI (Invitrogen, P36931)  
 Protease Inhibitor Cocktail Tablets mit EDTA (Roche, 04693124001)  
 Protease Inhibitor Cocktail Tablets ohne EDTA (Roche, 04693159001)  
 Proteinase K (Qiagen, 19131)  
 Salzsäure (Fluka, 35328)  
 Schwefelsäure (Fluka, 65541)  
 Standard I Nähragar (Merck, 107881)  
 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat (Thermo Scientific)  
 Thermoprime Plus DNA Polymerase mit 10 x Puffer und MgCl<sub>2</sub> (ABgene, AB-0301/B)  
 Trisacetat-EDTA-Puffer (Sigma-Aldrich, T4038-5x1L)  
 Tris-HCL  
 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 93443)  
 TRIZMA (Sigma-Aldrich GmbH, T3924)  
 Trizma Base (Sigma, T-1503-1KG)  
 Trizma hydrochloride (Sigma, T3253-1KG)  
 Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich)  
 Trypton (Fluka, 95039)  
 Tween 20 (Sigma-Aldrich, P-1379-500ml)  
 Urea 98 ≥ (Sigma-Aldrich, U5378-1KG)  
 Wasserstoffperoxid 35 % (Merck, 8600)

### 3.1.2 Bakterienstämme und -isolate

**Tabelle 2.** Toxinprofile der verwendeten *Bacillus-cereus*-Stämme

Spezies	Stämme	Toxinprofile						
		NheA	NheB	NheC	HBL-L <sub>1</sub>	HBL-L <sub>2</sub>	HBL-B	CytK
<i>B. cereus</i>	MHI 241 (NVH 0075/95)	+	+	+	-	-	-	-
	MHI 1308	+	+	+	+	+	+	-
	MHI 1672	+	+	-	-	-	-	-
	MHI 1761	-	+	+	-	-	-	-



### 3.1.3 Zellen und Zelllinien

*E. coli*:

One Shot TOP10 Chemically competent *E. coli* (Invitrogen, C4040-10)

BL 21 DE3

BL 21 DE 3 Lys S

LMG 194

Vero Zellen: African green monkey kidney cells (Bio Whittaker, Katalognummer: 76-108B)

### 3.1.4 PCR-Primer

Die Synthese der für diese Arbeit benötigten Primer wurde bei der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen in Auftrag gegeben.

**Tabelle 3.** Sequenzen der verwendeten PCR-Primer<sup>1</sup>

Zielgen	Primer	Primersequenz (5' → 3')
<i>nheA</i>	NheAfor1	caccgcgcaaaatgtaattgc
	NheArev1	atgtgcttcaacgtttgtaacgtaac
<i>nheB</i>	NheB_AESfor	tcttggatccgctgaaagtacagtgaacaag
	NheB_Xholrev	ggctactcgagttattatgcctttttcgtgtctacctaacttt
	NheB_HAVfor	tcttggatcccatgcggtagcaaaagcttat
	NheB_VAKfor	tcttggatccgtagcaaaagcttataatgactatg
	NheB-30	caccaaagatgcaatggaagaac
	NheB-60	caccaatgtatcgtctgttgatg
	NheB-92	cacccacagcttattcaacg
	NheB-121	caccgcaaaggatggagcaact
	NheB-151	caccgacttgaagaaattccg
	NheBflrev	ttatgctttttcgtatctactactttaatat
<i>nheC</i>	NheCfor1	caccgcagaacaaatgtacag
	NheCrev1	cttcgccacgccttcat
	NheCfor3	atgcagaaacgattataaaaaaaatg
	NheCrev4	ttacttcgccacgcctt
	NheC BamH1 for	ccttggattcgcagaacaaatgtacagg
	NheC Xho rev	ttactcgcagcttcgccacgccttcat
	NheC Xho1 rev	ggctactcgagttattacttcgccacgcctt

<sup>1</sup> PCR, Polymerasekettenreaktion

### 3.1.5 Nährmedien

#### Flüssige Nährmedien

Caseinhydrolysat-Bouillon mit 1 % Glukosezusatz (CGY) in Anlehnung an BEECHER & WONG (1994b): 2 % Caseinhydrolysat, 0,6 % Hefeextrakt, 0,2 % Ammoniumsulfat, 1,4 % Dikaliumhydrogenphosphat, 0,6 % Kaliumhydrogenphosphat, 0,1 % Natriumcitrat, 0,2 % Magnesiumsulfat; alle Angaben in g/v

Hirn-Herz-Bouillon (BHI; Merck, 10493)

Luria-Bertani (LB)-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Natriumchlorid, alle Angaben in g/v.

MEM-EARLE (1x) Zellkulturmedium mit Zusatz von 1 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Natriumpyruvat-Lösung (0,1 mol/l), 0,4 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)

RM-Medium: 1 mM Magnesiumchlorid und 2 % Caseinhydrolysat (w/v) in A. dest. lösen und autoklavieren.

SOC-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 0,01 mol NaCl, 0,0025 mol KCl, 0,01 mol MgCl<sub>2</sub>, 0,01 mol MgSO<sub>4</sub>, 0,02 mol Glukose

#### Feste Nährmedien

Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid, PB 5039 A)

Luria-Bertani (LB)-Platten mit Zusatz von 0,1 % Ampicillin, bzw. Kanamycin: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Natriumchlorid, 1,5 % Standard I Nähragar sowie 0,1 % Ampicillin nach dem Autoklavieren; alle Angaben in g/v.

### 3.1.6 Lösungen und Puffer

#### Enzymimmuntest (EIA)

Bicarbonatpuffer: 0,05 mol/l; pH 9,6

Casein-PBS-Lösung: 1 % bzw. 3 % (w/v) Natrium-Caseinat in PBS

Citratpuffer: 0,21 mol/l mit Zusatz von 3,13 mmol/l  $H_2O_2$ ; pH 3,95

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,013 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid; pH 7,3

Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB): 0,021 mol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 1 ml Aceton und 9 ml Methanol

Substrat-Chromogenlösung: 20 Teile Citratpuffer mit  $H_2O_2$ -Zusatz und 1 Teil TMB-Lösung

Schwefelsäure: 1 mol/l

Waschlösung: 0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % (v/v) Tween 20

#### Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bromphenolblaulösung: 0,3 %

SDS-Puffer: 0,03 mol/l Tris/HCl Puffer (pH 8,0) mit Zusatz von 0,03 mol/l EDTA und 7,5 % SDS

Eichproteine: LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis (GE Healthcare, 17-0446-01)

#### Immunoblot

Anodenpuffer I: 18,6 g Trizma Base in 100 ml Methanol und 400 ml A. dest

Anodenpuffer II: 1,51 g Trizma Base in 100 ml Methanol und 400 ml A. dest

Kathodenpuffer: 2,62 g 6-Aminocapronsäure in 100 ml Methanol und 400 ml A. dest.

Casein-PBS-Tween-Lösung: 3 % (w/v) Natrium-Caseinat in PBS mit Zusatz von 0,025 % (v/v) Tween 20

Waschlösung: PBS mit Zusatz von 0,025 % (v/v) Tween 20

### Immunaффinitätschromatographie

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,013 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid; pH 7,3

Glycin/HCl-Puffer: 0,1 mol/l ; pH 2,5

PBS mit Zusatz von 0,1 % Natriumazid

### Dialyse

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,013 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid; pH 7,3

Uredialysepuffer 1: 3 mol/l Urea, 0,02 mol/l Tris (pH 7,4)

Uredialysepuffer 2: 1 mol/l Urea, 0,02 mol/l Tris (pH 7,4)

Uredialysepuffer 3: 0,02 mol/l Tris (pH 7,4)

### Enterokinase-Verdau

10x-EK-Max-Reaction-Buffer: 3,025 g Trizma Base, 0,0735 g Kalziumdichlorid, 1 % (v/v)

Tween 20, 47,5 ml A. bidest mit Zusatz von 1 M HCL (pH 8,0)

Enterokinaseverdünnung: 1 U Enterokinase mit 1 ml A. bidest

### Immunfluoreszenz

BSA-PBS-Lösung: 1 % BSA (w/v) in PBS

Blockierungspuffer: 5 % (v/v) inaktiviertes Ziegenserum in 1 % BSA-PBS

Triton-X-PBS-Lösung: 0,5 % Triton-X-100 (v/v) in PBS

Kopplungspuffer: 0,1 mol/l PBS; pH 8,2

PEG

## Klonierung

Ligase-Puffer

TCM-Puffer (Transformation): 0,01 mol/l Tris/HCl (pH 7,5), 0,01 mol/l mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01 mol/l MgCl<sub>2</sub>

Reaction-Buffer 3 (Restriktionsverdau)

M9-Salze, 10fach konzentriert: 6 % Dinatriumhydrogenphosphat, 3 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 % Natriumchlorid, 1 % Ammoniumchlorid; alle Angaben in g/v.

### 3.1.7 Immunreagenzien

#### Polyklonale Antiseren

Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobuline-HRP (Dako, P 0161)

NheC-Antiserum (am Lehrstuhl entwickelt, siehe Tabelle 4)

Schwein-Anti-Kaninchen-Immunglobuline-HRP (Dako, P 0217)

#### Monoklonale Antikörper (mAk)

Die für diese Arbeit verwendeten mAks wurden am Lehrstuhl entwickelt (Details in Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Am Lehrstuhl entwickelte monoklonale Antikörper/Antiseren

Spezifität	Primärer Antikörper/Antiserum	Referenz
NheA	mAk 1A8	DIETRICH et al., 2005
NheB	mAk 2B11	DIETRICH et al., 2005
	mAk 1E11	DIETRICH et al., 2005
NheC	Kaninchen Antiserum	DIETRICH et al., 2005

### 3.1.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, *Calf intestine alkaline phosphatase*, Fermentas, Ebersberg)

Thermoprime Plus DNA-Polymerase (Thermo Scientific, Epsom, UK)

T<sub>4</sub>-DNA-Ligase

Restriktionsenzyme: *Bam*HI, XhoI

Enterokinase (Sigma-Aldrich, E0632)

Proteinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland)

### 3.1.9 Vektoren

pET-26b(+) Vector (Novagen, 69862-3)

pBAD202/D-TOPO pBAD202 Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen, K4202-01)

pCRT7/NT-TOPO (Invitrogen, K4201-01)

### 3.1.10 Verbrauchsmaterialien

#### Bacillus-cereus-Exoprotein-Produktion

Cryo-Tubes, 1,8 ml (Nunc GmbH, 375418)

Sterilfilter Millex GV, 0,22 µm (Millipore, SLGV033RS)

#### Zellkultur

Mikrotiterplatten, 96 Loch, steril, Flachboden (Nunc GmbH, 167008)

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm<sup>2</sup> (Nunc, 178905)

Lab-Tek Chamber Slides, 8 Kammern (Nunc, 177402)

### Gelelektrophorese und Immunoblot

Phastgel Probenauftragskämme 8/0,5 µl (GE Healthcare, 18-1617-01)

Phastgel Gradient 10 - 15 % (GE Healthcare, 17-0540-01)

Phast Gel SDS Pufferstreifen (GE Healthcare, 17-0516-01)

Immobilon-P Transfermembran, 0,45 µm (Millipore, IPVH304F0)

Filterpapier Electrode Paper (GE Healthcare, 80-1106-19)

### Sonstiges

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, 3810)

Cell Star PP test tubes, steril, 50 ml (Greiner bio-one, 227 261)

Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl (Brand)

Deckgläschen Gold Seal coverglass, 22 x 22 mm (Sciences Services GmbH, E63757-01)

Amicon Ultra Zentrifugalfilter, 4 ml, 30k (Millipore, UFC803024)

Amicon Ultra Zentrifugalfilter, 5 ml, 30k (Millipore, UFC903024)

Visking Dialyseschlauch Ø 16 mm (Serva Electrophoresis GmbH, 44110)

Mikrotiterplatten, 96 Loch (Nunc, 439454)

### **3.1.11 Geräte**

Accu-Jet, Pipettierhilfe (Brand)

Begasungsbrutschrank Typ B 5060-EC CO<sub>2</sub>, 37°C (Heraeus)

Biofuge pico (Heraeus)

BioPhotometer 8,5 mm (Eppendorf)

Brutschrank, 32 °C, 37 °C (Mettler)

Electrophoresis Power Supply, EPS 200 (Pharmacia Biotech)

Elektromodul mc6 (Waldner)

Elektrophoresekammer (Biometra)

Elektrophoresekammer (peqLab)

Flockeneisbereiter (AF 80, Scotsman)

Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence)

Heizplatte MR 3001 (Heidolph)

HeraSafe, Sterilbench (Heraeus)

Inverses Mikroskop (Zeiss)  
Kodak Image Station 200MM (Biostep)  
Laminar-Flow Gelaire BSB 4A (Flow Laboratories)  
Mikrotiterplatten-Lesegerät Sunrise Remote Control (Tecan)  
Milli-Q Biocel System (Millipore Corporation)  
Multifuge 1 S-R (Heraeus)  
Multiphor II Electrophoresis System and Electrophoresis Power Supply (Pharmacia Biottech)  
Phastsystem Separation and Control Unit (Pharmacia)  
pH-Messgerät 537 (Indolab)  
Photometer UV-1601 (Shimadzu Corporation)  
Schüttelwasserbad 1083 (GFL)  
Sterilwerkbank HERA SAFE KS-12 (Kendro)  
Taumelgerät, Polymax 1040 (Heidolph)  
ThermoCycler, PCR Express (Hybaid)

### **3.1.12 Software und Homepages**

Argus X1, Bio-Imaging-Control-Software (biostep GmbH Jahnsdorf)  
Bildanalyse-Software, BZ-Analyser für Fluoreszenzmikroskop (Keyence)  
ClustalW2 (European Bioinformatics Institute, EBI)  
KODAK 1D 3.6. software  
Molecular Toolkit (Colorado State University)  
NCBI/BLAST (National Center for Biotechnology Information)  
Ridasoft Win (r-Biopharm AG)

### **3.1.13 Sonstiges**

Dispenser mit 0,6 ml Spritzen (LKB Instrument)  
Variable Pipetten, 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl (Eppendorf)  
Variable Zwölfkanalpipette 30 - 300 µl (Eppendorf)  
Zählkammer nach Thoma (Brand)



## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Anzucht von *Bacillus cereus* in Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe-Bouillon

Diarrhö-Enterotoxine verschiedener *B. cereus*-Stämme wurden als Positivkontrollen in den Nachweisverfahren, sowie den Zytotoxizitätstests eingesetzt.

Zur Stimulation der Diarrhö-Enterotoxin-Produktion wurde eine Voranreicherung durchgeführt. Hierfür wurden 20 ml CGY-Medium mit einer Kolonie beimpft. Nach einer Inkubationsdauer von 17 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad, wurden 200 µl der Voranreicherung in 20 ml CGY-Bouillon überführt und für 6 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Keimmaterial für 20 min bei 1900 x g und 4 °C zentrifugiert, sterilfiltriert und nach Zusatz von EDTA (1 mmol/l) portioniert bei -20 °C eingefroren.

### 3.2.2 DNA-Extraktion aus *Bacillus cereus*

Die genomische DNA der Stämme und Isolate wurde unter Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll für gram-positive Bakterien aus BHI-Übernachtskulturen (200 µl) extrahiert. Die Proben wurden zunächst mittels Proteinase K aufgeschlossen. Anschließend wurde die im Lysat enthaltene DNA an eine Silika-Membran absorbiert. Kontaminanten und Enzyminhibitoren wurden durch zwei Waschschriffe entfernt und die DNA in Tris/HCl-Puffer (pH 9; 0,5 mM EDTA) eluiert. In die PCR wurden ca. 30 ng DNA/Stamm bzw. Isolat eingesetzt.

### 3.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die DNA-Konzentrationen wurden fotometrisch bei 260 nm (BioPhotometer Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegen Tris-HCl (pH 8,0) bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde durch eine zweite Messung bei 280 nm und anschließender Kalkulation des Verhältnisses ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) bewertet. Für DNA-Lösungen, die keine Proteinverunreinigungen aufweisen, liegt der Normbereich zwischen 1,8 und 1,9.

Alternativ zur fotometrischen Quantifizierung wurde die Konzentration von DNA-haltigen Lösungen mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz im Agarosegel ermittelt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität der unbekanntes Nukleinsäureprobe mit der eines Standards mit bekannter Konzentration in einem UV-Transilluminator verglichen und die Konzentration der Probe abgeschätzt.

### **3.2.4 Primer für Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Für die Klonierung wurden Primer verwendet, die Sequenzen der später benötigten Restriktionsendonukleasen enthielten, nachdem mittels Molecular Toolkit (University of Columbia) diese Schnittstellen innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz ausgeschlossen wurden. Alle in dieser Studie verwendeten Primer wurden von der Sigma-Aldrich Chemie AG, Taufkirchen, Deutschland synthetisiert. Primersequenzen und Zielgene sind in Tabelle 3 aufgeführt.

### **3.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation von DNA wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Für eine Standardreaktion wurden 100 ng DNA, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (ABgene, Epsom, UK), 5 µl MgCl<sub>2</sub> (125 pM), 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM), jeweils 2,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (jeweils 50 pM) und 0,5 µl DNA-Polymerase (2,5 U) mit Wasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. In jedem PCR-Durchgang wurde eine Negativkontrolle ohne DNA-Probe mitgeführt. Das Temperaturprofil jedes PCR-Programms wurde individuell angepasst (detaillierte Protokolle im Anhang) und in einem Thermocycler von Hybaid (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

### 3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese können lineare DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Zur Größen- und Mengenbestimmung der DNA-Fragmente wurden Größenstandards (0,1 - 3 kbp; 0,023 - 8,1 kbp, Peqlab) zusätzlich auf das Gel aufgetragen. Je kleiner das zu detektierende DNA-Fragment war, um so höher wurde die Agarosekonzentration im Gel gewählt (1 - 2 %). Jede Probe wurde mit dem entsprechenden Volumen des vierfach konzentrierten Gel-Ladungspuffers (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) supplementiert und in das Agarose-Gel pipettiert. Durch die Elektrophorese während 45 min bei 125 V in 1 x Tris-Acetat-EDTA Puffer sowie nachfolgender Ethidiumbromid-Färbung konnten die DNA-Fragmente mit UV-Transillumination sichtbar gemacht werden.

### 3.2.7 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Um PCR-Produkte und Vektoren für eine Ligation vorzubereiten und von eventuell vorhandenen Nebenprodukten, Restriktionsenzymen und Puffern zu befreien, wird eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender DNA-Extraktion durchgeführt.

Zur DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen wurde ein Gel Extracion Kit (Peqlab) laut Herstellerangaben verwendet. Dazu wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in Bindepuffer gelöst. Die Extraktion erfolgte durch die reversible Bindung der DNA an eine Silikamembran und anschließende Elution durch Niedrigsalzpuffer.

### 3.2.8 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Um die Effizienz der Transformation zu erhöhen werden die *E. coli*-Expressionszelllinien BL 21 DE3, BL 21 DE 3 LysS und LMG 194 mittels der  $\text{CaCl}_2$ -Methode kompetent gemacht.

1 ml aus einer Übernachtskultur oder 100  $\mu\text{l}$  aus einer Glycerinkultur der entsprechenden Zelllinie wurden in 100 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Erreichen der Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,2$ , wurde die Kultur 15 min, bei 4 °C und 1900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (eiskühlt, steril, 0,1 mol/l) resuspendiert.

Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der nächste Zentrifugationsschritt (15 min, 1900 x g, 4 °C). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 30 ml

CaCl<sub>2</sub>-Lösung [eisgekühlt, steril, 0,1 mol/l CaCl<sub>2</sub>, 20 % Glycerin (v/v)] aufgenommen. Mittels eines Dispensers wurde die Zellsuspension zu je 1 ml aliquotiert, 10 min auf Eis inkubiert und bei -80 °C eingefroren.

### **3.2.9 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Vektoren**

Sowohl der jeweilige Vektor, als auch das entsprechende PCR-Produkt wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI verdaut. Der Verdau des Vektors erfolgte in einem Reaktionsgefäß, das 20 µg Vektor, 2 µl BamHI (10 U/µl), 2 µl XhoI (10 U/µl), 2 µl Reactionbuffer 3 enthielt und mit destilliertem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt wurde. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 2 µl alkalische Phosphatase (1 : 10 verdünnt) hinzugefügt, um das 3'-DNA-Ende zu dephosphorylieren. Nur DNA mit einem phosphorylierten 5'-Ende dient in einer Ligase-Reaktion als Substrat. Durch eine Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors kann daher die Religation der Vektor-DNA vermindert werden. Der Ansatz verblieb eine weitere Stunde bei 37 °C. Die enzymatischen Reaktionen wurden durch Inkubation von 10 min bei 65 °C gestoppt. Das verdaute Plasmid wurde durch Gelelektrophorese [1 % Agarose (w/v)] aufgereinigt und aus dem Gel eluiert. 14 µl des PCR-Produkts, 2 µl BamHI (10 U/µl), 2 µl XhoI (10 U/µl) und 2 µl Reactionbuffer 3 bildeten den Restriktionsverdauansatz für das Insert. Nach der einstündigen Inkubationszeit bei 37 °C erfolgte das Inaktivieren der Enzyme 10 min lang bei 65 °C.

### **3.2.10 Ligation von PCR-Produkten und Vektoren**

Die Ligation erfolgte in einem Ansatz von 30 µl Gesamtvolumen. Dieser beinhaltete 50 - 150 ng Vektor-DNA, die fünf- bis zehnfache molare Konzentration an Insert-DNA, destilliertes Wasser, 2 µl Ligase-Puffer und 1 µl (1 Unit) T<sub>4</sub>-DNA-Ligase. Das Reaktionsgemisch verblieb 12 - 14 Stunden bei 15 °C im Wasserbad. Die Transformation wurde am nächsten Tag durchgeführt.

### 3.2.11 Transformation von *Escherichia coli*-Zellen

130 µl auf Eis aufgetaute, kompetente Zellen wurden 30 min mit 25 µl Ligationsansatz, 10 µl sterilem Wasser und 50 µl TCM-Puffer auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 1,5 min bei 42 °C. Nach weiteren 2 min auf Eis erfolgte eine Zugabe von 1 ml sterilem SOC-Medium und einer einstündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 200 upm auf dem Heizblock. Daraufhin wurde der Ansatz bei 3600 x g 3 min zentrifugiert und 900 µl des Überstands verworfen. Das im restlichen Überstand resuspendierte Zellpellet wurde auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikumzusatz ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht im Brutschrank bildeten sich Bakterienkolonien.

### 3.2.12 Plasmid-DNA-Isolierung aus *Escherichia coli*-Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen, die aus Einzelkolonien hervorgegangen sind, dient zum einen der abschließenden Qualitätskontrolle der Klonierung (Sequenzierung), zum anderen der Überführung der Plasmid-DNA in *E. coli*-Expressionszelllinien.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) laut Herstellerangaben. Hierzu wurden 20 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum versetzt. Das komplettierte Medium wurde mit *E. coli*, die das gewünschte Plasmid enthalten, beimpft und 12 – 16 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Aus 5 ml der Übernachtskultur konnte die gewünschte Plasmid-DNA gewonnen werden. Nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen ermöglichte die reversible Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamembran das Entfernen von Enzyminhibitoren durch diverse Waschschriffe. Nach dem Trocknen der Membran wurde die saubere Plasmid-DNA durch einen Elutionspuffer gewonnen.

### 3.2.13 Anlegen von Glycerinkulturen

Glycerinkulturen ermöglichen die Konservierung von Bakterienzellen.

Zum Anlegen einer Glycerinkultur wurden 5 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz mit 500 µl der entsprechenden Kultur beimpft und 16 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 500 µl der Übernachtskultur in 800 µl Glycerin (ca. 87 %) überführt und bei –80 °C eingefroren.

### 3.2.14 DNA-Sequenzierung

Durch die DNA-Sequenzierung erfolgt die Bestätigung der korrekten Basensequenz des Inserts sowie der gewünschten Orientierung im Plasmid und dient somit der Qualitätskontrolle der Klonierung.

Die Sequenzierung des Zielgens auf dem gewonnenen Plasmid (siehe 3.2.12) wurde unter Angabe der passenden Primer bei der Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg durchgeführt. Daraufhin erfolgte mittels der Software Clustal W2 (LARKIN et al., 2007) ein Vergleich der Basenfolgen von der erhaltenen Sequenz mit der bekannten *B. cereus*-Enterotoxin-Gensequenz aus GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI).

### 3.2.15 Proteinexpression

Die Proteinexpression der durch Transformation entstandenen rekombinanten *E. coli*-Kulturen lässt sich gezielt (in der logarithmischen Phase des Bakterienwachstums) induzieren. Dies erfolgt durch die Zugabe eines Induktors wie Arabinose oder IPTG.

Für die Proteinexpression wurden 10 µl aus einer Glycerinkultur in 19 ml RM-Medium mit Zusatz von 1 ml 10-fach konzentrierten M9-Salzen, 200 µl Glukose [20 % (w/v)] und 20 µl Antibiotikum über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml aus der Übernachtskultur in frisches RM-Medium mit 10-fach konzentrierten M9-Salzen und Antibiotikum, jedoch ohne Zusatz von Glukose, überführt und bis zum Erreichen einer fotometrischen Dichte von 0,5 - 0,6 (OD<sub>600</sub>) im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Dichte erfolgte die Induktion mit 220 µl Arabinose (20 %) oder IPTG (200 mM). In der darauf folgenden Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad exprimierten die Bakterien das gewünschte Protein.

### 3.2.16 Zellaufschluss

Um die Proteinfraction, die nicht ins Medium ausgeschleust wird, gewinnen zu können, muss ein Zellaufschluss erfolgen.

Nach der Proteinexpression wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 1900 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 7 ml PBS mit CellLytic Express und Protease Inhibitor resuspendiert.

Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 20 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C und ein weiterer Zentrifugationsschritt (1900 x *g*, 10 min. bei 4 °C). Der dabei entstandene Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in einen Dialyseschlauch gefüllt.

### **3.2.17 Dialyseverfahren**

Durch das Dialyseverfahren werden Detergentien (z. B. CellLytic Express), die zum Zellaufschluss benötigt werden entfernt. Außerdem liegt das exprimierte rekombinante Protein schließlich in dem gewählten Dialysepuffer vor und kann somit in die weiteren Versuche eingesetzt werden.

#### Dialyse gegen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

Für das Dialyseverfahren gegen PBS wurde der gewonnene Überstand in einen Visking Dialyseschlauch mit einem Durchmesser von 16 mm überführt und über 3 Tage bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Alle 12 Stunden erfolgte ein Pufferwechsel. Nach der 3-tägigen Dialyse wurde das Volumen bestimmt. Das erhaltene Dialysat wurde bei 4 °C gelagert.

#### Dialyse gegen Puffer mit Ureazusatz

Bei dieser dreitägigen Dialyseform bei 4 °C erfolgte der Pufferwechsel alle 24 Stunden. Durch die abnehmende Ureakonzentration in den Pufferlösungen erfolgte nach der Entfaltung der Tertiärstruktur des Proteins eine Rückführung in die Originalkonformation. Dadurch konnten Proteinefehlfaltungen des *E. coli*-Bakteriums korrigiert werden.

### **3.2.18 Enterokinase-Verdau**

Das rekombinante Protein NheA und die Deletionsmutanten von NheB wurden als Fusionsproteine exprimiert. Die Kombination mit Thioredoxin erhöht die Löslichkeit des Expressionsproduktes, erleichtert somit die Ausschleusung aus der Bakterienzelle und verringert die Bildung von Einschlusskörperchen. Als Fusionsproteine mit Thioredoxin sind die rekombinanten Konstrukte jedoch unter Umständen nicht funktionell aktiv.

Deshalb muss für Tests zur biologischen Aktivität der Thioredoxin-Teil des Fusionsproteins durch eine Enterokinase entfernt werden.

Für den Enterokinase-Verdau wurden 10 µl Enterokinase (0,1 U) mit 30 µl 10x-EK-Max-Reaction-Buffer, 60 µl A. bidest. und 200 µl des Dialysats für 1 Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

### **3.2.19 Immunaффinitätschromatographie (IAC)**

Zur Herstellung der Immunaффinitäts-Säule (IAS), die am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch vorhanden ist, wurde der gegen die Enterotoxinkomplex-Komponente NheB gerichtete monoklonale Antikörper (mAk) 1E11 (siehe 3.1.7) wie bei STRICH (1999) beschrieben, an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt (10 mg mAk/g Gel).

Zur sequentiellen Entfernung von Toxinkomponenten aus Kulturüberständen des *B. cereus* - Stammes MHI 241 wurde die IAC-Säule zunächst mit 10 ml PBS (steril) gespült, um den Konservierungspuffer (PBS mit Zusatz von 0,01 % Natriumazid) zu entfernen. Die 1 : 2 mit PBS verdünnten, toxinhaltigen *B. cereus*-Kulturüberstände wurden daraufhin langsam (Durchflussrate 1 ml/min) über die Säulen gegeben, so dass die jeweiligen Toxinkomponenten an die kovalent gekoppelten Antikörper binden konnten. Der so gewonnene Proben-durchlauf (*B. cereus*-Kulturüberstand frei von NheB) wurde für Zytotoxizitätstests, sowie für EIA- und Western Blot-Analysen verwendet. Nach dem erneuten Waschen mit PBS (steril), um ungebundene Toxinkomponenten aus dem Gel zu entfernen, wurden die an die Antikörper gebundenen Toxinkomponenten mit 10 ml Glycin/HCl-Puffer (pH 2,5) eluiert. Das Eluat wurde mit Bicarbonatpuffer (20 ml zu 10 ml Eluat) neutralisiert und aufkonzentriert. Nach dem Eluieren wurde die Säule mit 10 ml PBS und Konservierungspuffer gespült und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **3.2.20 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Konzentrationsbestimmung der rekombinanten Proteine wurde der EIA herangezogen. Mit Hilfe einer Positivkontrolle, deren Konzentration bekannt war, konnte eine semiquantitative Schätzung der Probe erfolgen.



### 3.2.21 Enzymimmuntest (EIA)

Zur Untersuchung der Protein-Komponenten von Nhe in zellfreien Kulturüberständen und Toxinpräparationen konnten komponentenspezifische Antikörper eingesetzt werden (DIETRICH et al., 2005). Bei den verwendeten Enzymimmuntest-Varianten (indirekter EIA und Sandwich-EIA) ist das im Mikrotiterplatten-Lesegerät erhaltene Messsignal direkt proportional zur Toxin-Konzentration in der Probe. Zur Berechnung des in der Probe nachweisbaren Antigentiters wurde die Verdünnungsstufe herangezogen, deren Extinktion im Bereich von 1,0 lag. Der Titer wurde definiert als Produkt dieser Extinktion und der entsprechenden reziproken Verdünnung.

#### 3.2.21.1 Indirekter Enzymimmuntest

Indirekte EIAs wurden zur Detektion der Toxine NheA, NheB und NheC verwendet. Mikrotiterplatten wurden mit seriellen Verdünnungsreihen [Ausgangsverdünnung 1 : 5 (NheC) bzw. 1 : 100 (NheA, NheB)] beschichtet (100 µl/Kavität) und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden danach mit 3 % Casein/PBS blockiert (150 µl/Kavität; 45 min, RT, feuchte Kammer), gefolgt von einem Waschschrift und der Zugabe der in PBS verdünnten Antikörper [1A8 1 µg/ml; 1E11 1 µg/ml; Kaninchen Antiserum 24 1 : 500 (v/v); 100 µl/Kavität; 1 h, RT, feuchte Kammer]. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das in 1 % Casein/PBS verdünnte Konjugat aufgetragen (1 : 3000 (v/v), 1 h, RT, feuchte Kammer), wieder gewaschen, die Substrat/Chromogenlösung (500 µl TMB/10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dazugegeben (100 µl/Kavität; 20 min, RT) und die Reaktion danach mit 1 molarer Schwefelsäure gestoppt. Die fotometrische Messung der Extinktion erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm.

### 3.2.21.2 Sandwich-Enzymimmunttest

Zum Nachweis von NheB stand außerdem ein Sandwich-EIA mit dem mAk 2B11 zur Verfügung, wobei der spezifische in Bicarbonatpuffer verdünnte monoklonaler Antikörper im Überschuss an eine feste Phase gebunden wurde (5 µg/ml, 100 µl/Kavität; 24 h, RT, feuchte Kammer). Nach Absättigung mit 3 % Casein/PBS (150 µl/Kavität; 45 min, RT, feuchte Kammer) und Zugabe serieller Verdünnungsreihen des Kulturüberstands mit einer Ausgangsverdünnung von 1 : 100 in 0,5 % Tween/PBS (100 µl/Kavität; 1 h, RT, feuchte Kammer), wurde der entstandene Antigen-Antikörperkomplex mit enzymmarkiertem Nachweis-Antikörper überschichtet (1 : 4000 (v/v), 1 h, RT, feuchte Kammer), Substrat hinzugegeben (20 min, RT), mit Schwefelsäure abgestoppt und das Ergebnis im Mikrotiterplatten-Lesegerät fotometrisch bestimmt.

### 3.2.22 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot

Die elektrophoretische Auftrennung der *B. cereus*-Exoproteine erfolgte mit SDS-PAGE unter Verwendung des PhastSystems von GE Healthcare.

Hierfür wurden 20 µl der Proben mit 10 µl SDS-Puffer und 1,5 µl Bromphenolblau versetzt und für 10 min bei 99 °C im Heizblock erhitzt. Danach wurden 0,5 µl des Probenansatzes auf Polyacrylamidgele (Gradient 10 – 15 %) aufgetragen und die Proteine bei 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 65 Vh aufgetrennt. Nach elektrophoretischem Transfer (600 V, 17 mA, 30 W, 1 h) der aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon-P-Membran und orientierender Anfärbung der Eichproteinbanden mit Ponceau-Rot, wurde die Transfermembran über Nacht bei 4 °C in 3 % Casein-PBS mit 0,025 % Tween inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Zur Darstellung der toxinspezifischen Banden wurde die Membran mit den Antikörpern [1A8 1 µg/ml; 1E11 1 µg/ml; Kaninchen Antiserum 24 1 : 500 (v/v)] für 60 Minuten inkubiert. Danach wurde die Membran mit einer Waschlösung (PBS mit Zusatz von 0,025 % Tween) gewaschen. Im Anschluss wurden peroxidasemarkierte Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Peroxidase 1:3000; Schwein-Anti-Kaninchen-Ig-Peroxidase 1:2000) zugegeben und eine Stunde inkubiert. Alle Antikörper wurden in 3 % (g/v) Casein-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween verdünnt. Danach wurde die Membran mit Waschlösung gewaschen, dann mit Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat, Thermo Scientific) laut Herstelleranweisung versetzt und das entstandene Signal für drei Minuten mittels Imager erfasst.

### 3.2.23 Zytotoxizitätstest mit Vero-Zellen

Mit einem auf Vero-Zellen basierenden Zytotoxizitätstest (DIETRICH et al., 1999) wurde die funktionelle Aktivität der sterilfiltrierten, rekombinanten Toxinpräparationen getestet.

In 40 ml modifiziertem MEM-Medium [unter Zusatz von 1 % (v/v) fetalem Kälberserum, 1 % (v/v) Natriumpyruvat (100 mmol/l) und 0,2 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 IU/ml)] bei 37 °C wurden Vero-Zellen in 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Nach Ausbildung eines dichten Zellrasens wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und während 10 min bei 37 °C in 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit modifiziertem MEM-Medium inhibiert und die Zellsuspension bei 135 x g für 7 min zentrifugiert. Zur Berechnung des benötigten Suspensionsvolumens wurde das erhaltene Pellet in 5 ml MEM-Medium resuspendiert und die Zellzahl mikroskopisch mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

In einer 96-Well Zellkulturplatte wurde eine log-2 Verdünnungsreihe mit sterilfiltriertem *B. cereus*-Kulturüberstand und MEM-EARLE Medium angelegt. Nach Befüllung der Mikrotiterplatte mit Medium (100 µl/Kavität) unter Freilassen der äußeren Reihen A und H zur Vermeidung von Randeffekten, wurden die Proben (Ausgangsverdünnung 1 : 10) im Doppelsatz aufgetragen. In die Reihen 11 und 12 wurde keine Probe gegeben, wodurch sie als Zellkontrolle verwendet werden konnten. Nach Zugabe der Zellsuspension (10<sup>4</sup> Vero-Zellen/100 µl/Kavität) folgte eine Inkubationsdauer von 24 h (37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre), woraufhin nach optischer Kontrolle das Testreagenz WST-1 (10 µl/Kavität; 1 h, 37 °C, 7 %, CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) zugegeben wurde. Tetrazoliumsalz (WST) wird durch mitochondriale Enzyme stoffwechsel-aktiver Zellen zu Formazan reduziert, was durch einen Farbumschlag von rosa nach orange sichtbar wird. Die Messung der Farbintensität erfolgte fotometrisch bei 450 nm. Als Zytotoxizitätstiter wurde die Verdünnungsstufe der Kulturüberstände definiert, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität um 50 % führte.

### 3.2.24 Kopplung monoklonaler Antikörper an Alexa Fluoreszenz-Farbstoff

Der zur Kopplung vorgesehene, affinitätschromatographisch gereinigte und in PEG auf eine Konzentration von 2 mg/ml aufkonzentrierte Antikörper (1E11) wurden über Nacht gegen 0,1 mol/l PBS (pH 8,2) dialysiert. Danach wurden die in DMSO gelösten Alexa Fluor-Succinimidyl-Ester (10 mg/ml) in einer Konzentration von 100 µg Farbstoff pro 1 mg Antikörper zugegeben und im Dunkeln unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nicht gekoppeltes Fluorochrom wurde dann durch Verdünnen des Ansatzes mit 10 ml PBS (pH 7,3) und Zentrifugieren in Amicon Ultra-Zentrifugationseinheiten (Ausschlussgewicht 30 kDa) bei 3000 x g für 30 Minuten bei 4 °C entfernt. Dieser Waschschrift wurde danach nochmals wiederholt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration und der Kopplungsrate, wurden die gekoppelten Antikörper mit 0,1 % Natriumazid konserviert, mit 1 % BSA stabilisiert und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

### 3.2.25 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz diente zum Nachweis von zellgebundenem NheB. Dazu wurde in sogenannten „Chamber Slides“ 150 µl Zellsuspension ( $6 \times 10^5$  Zellen/Kammer) simultan mit in Zellkulturmedium verdünnten *B. cereus*-Kulturüberständen (Endverdünnung 1 : 20 – 1 : 40; 150 µl/well) oder gereinigtem NheB (Endkonzentration 4 - 5 µg/ml; 150 µl/well) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen des gesamten Mediums wurde das Slide mit PBS gewaschen und danach die Zellen mit eiskaltem reinem Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Überschüssiges Methanol wurde durch Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellmembranen durch Zugabe von PBS mit Zusatz von 0,5 % (v/v) Triton-X-100 (300 µl/Kavität) permeabilisiert (10 min). Nach einem weiteren Waschschrift wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von Blockierungspuffer (300 µl/Kammer; 45 min) abgesättigt. Danach erfolgte die Zugabe (0,1 ml) der in 1 % BSA-PBS verdünnten markierten mAks (2 - 4 µg pro Kavität). Nach 1 h Inkubationszeit wurde das Slide gewaschen und nach Abnehmen der Kammern in PBS gebadet und luftgetrocknet. Abschließend erfolgte das Eindecken und die gleichzeitige Kernfärbung mittels ProLong Gold antifade mit DAPI. Die Objektträger wurden über Nacht zur vollständigen Trocknung dunkel bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie mit dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 NheA

#### 4.1.1 Klonierung von *nheA*

##### Polymerasekettenreaktion

Aus einer BHI-Übernachtskultur wurde die genomische DNA des *Bacillus-cereus*-Stammes MHI 1308 mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Diese genomische DNA diente als Template für die PCR zur Amplifikation von *nheA* ohne Leader-Domäne, welche mit den Oligonukleotidprimern „NheAfor1“ und „NheArev1“ (siehe Tabellen 3 und 5) durchgeführt wurde (Amplifikationsbedingungen siehe Tabelle 6). Die Leader-Sequenz eines Proteins ist für dessen Ausschleusung aus der Bakterienzelle verantwortlich. Da *E. coli* als Expressionszelle gewählt wurde, ist die *B. cereus*-Leader-Sequenz überflüssig.

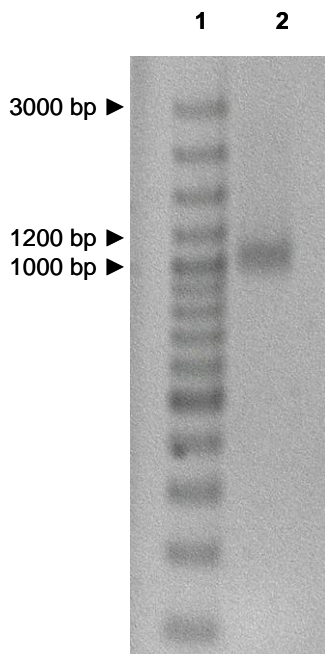
**Tabelle 5.** Mastermix PCR *nheA*

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,0
dNTPs (10 mM)	1,0
NheAfor1 (10 $\mu$ M)	2,5
NheArev1 (10 $\mu$ M)	2,5
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5
A. bidest.	32
DNA	1,5
Gesamtvolumen	50,0

**Tabelle 6.** Amplifikationsbedingungen PCR *nheA*

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95	5 min
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	95	20 sec
2.2 Annealing	58	20 sec
2.3 Elongation	72	1 min 20 sec
Wiederholung: 35 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	20 min
4. Kühlung	4	bis zur Entnahme

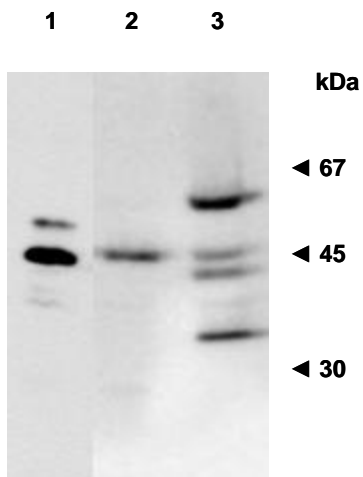
Unter Verwendung der oben genannten Primer und Amplifikationsbedingungen konnte ein PCR-Produkt generiert werden (siehe Abbildung 6), welches durch Ligation in den pBAD 202-Vektor eingeführt wurde. Anschließend wurden *E. coli*-TOP10-Zellen mit dem ligierten Plasmid erfolgreich transformiert. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA wurde das eingebaute NheA-Gen mittels Sequenzierung auf seine Korrektheit hin überprüft. Das Plasmid wurde anschließend in die Expressionszelllinie LMG194 überführt.



**Abbildung 6.** Agarose-Gel des PCR-Produkts (*nheA*); Bahn 1, 3000 bp-DNA-Leiter; Bahn 2, PCR-Produkt (*nheA*)

#### 4.1.2 Expression von *nheA*

Nach der gezielten Induktion der Proteinexpression, dem Zellaufschluss und einem anschließenden Dialyse-Schritt (gegen PBS) wurde das gewonnene Protein mittels eines am Lehrstuhl entwickelten indirekten EIAs detektiert. Der durchschnittliche Titer, der mithilfe des Referenzstammes MHI 241 ermittelt werden konnte, belief sich auf 1 : 4025. Im Western Blot konnte das korrekte Molekulargewicht des erzeugten Proteins nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7). Hierbei ist zu beachten, dass das rekombinante NheA als Fusionsprotein mit einem Thioredoxin-Anhang am N-terminalen Ende erzeugt wird. Das detektierte Molekulargewicht lag dadurch 14 kDa über dem des Wildtyp-Proteins. Mittels eines Enterokinase-Verdau wurde der Thioredoxin-Anhang entfernt und NheA konnte mit seiner natürlichen Größe (41 kDa) nachgewiesen werden.



**Abbildung 7.** Western Blot von NheA mit primärem mAK 1A8 nach Dialyse; Bahn 1, Positivkontrolle Kulturüberstand MHI 241; Bahn 2, NheA-Dialysat nach Enterokinase-Verdau; Bahn 3, NheA-Dialysat unverdaut;

#### **4.1.3 Funktionelle Tests mit NheA**

Die funktionelle Aktivität des mit Enterokinase verdauten Proteins wurden in einem am Lehrstuhl etablierten und validierten Zytotoxizitätstest, der auf Vero-Zellen basiert, nachgewiesen. Mittels eines Mutantenstammes (MHI 1761), welcher NheB und NheC aber kein NheA exprimiert und somit atoxisch ist, konnte durch Supplementierung von rekombinantem NheA ein durchschnittlicher Zytotoxizitätstiter von 1 : 332 erzielt werden. Rekombinantes NheA allein zeigte sich atoxisch auf Vero-Zellen.



## 4.2 NheB

### 4.2.1 Klonierung von nheB

#### 4.2.1.1 Klonierung von *nheB*-Konstrukten mit potenziellen Prodomänen

##### NheB-Konstrukte mit potenziellen Prodomänen

Aufgrund der erfolgreichen Klonierung und Expression des funktionell aktiven NheA wurde für NheB dasselbe Expressionssystem gewählt. Nach Klonierung, Proteinexpression und –sequenzierung konnte jedoch keine funktionelle Aktivität im Zytotoxizitätstest nachgewiesen werden. Sekretierte Proteine von *Bacillus* Spezies verfügen nicht nur über eine Leader-Sequenz, die für das Ausschleusen des Proteins aus der Bakterienzelle verantwortlich ist, sondern auch über eine Prodomäne, welche einen Einfluss auf die korrekte Proteinfaltung hat. Erschwerend kommt hinzu, dass wohl typische Sequenzen potenzieller Prodomänen in *Bacillus* bekannt sind, nicht aber die Prosequenz des in diesem Fall benötigten NheB. Daher wurde eine dreigliedrige Strategie mit den in der Abbildung 8 gezeigten, rekombinanten Proteinen verfolgt. Zudem wurde für die Klonierung ein anderes Vektorsystem mit dem Ziel, die Sekretion der rekombinanten Proteine aus *E. coli* zu verbessern, verwendet.

1	MTKKPYKVMALSALMAVFAAGNIMPAHTYA	AESTVKQAPVHAVAKAYNDYEEYSLGPEGL
2		AESTVKQAPVHAVAKAYNDYEEYSLGPEGL
3		HAVAKAYNDYEEYSLGPEGL
4		VAKAYNDYEEYSLGPEGL

**Abbildung 8.** N-terminale Aminosäuresequenz von NheB-Konstrukten. (1) NheB mit Leader-Sequenz (blau); (2 - 4) N-Termini mit möglichen Prodomänen der rekombinanten NheB-Konstrukte (AES, HAV, VAK);

Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifizierung der *nheB*-Konstrukte wurde ebenfalls als Template die genomische DNA des Stammes MHI 1308 verwendet. Eine PCR wurde jeweils mit den Forward-Primern „NheB\_AESfor“, „NheB\_HAVfor“ und „NheB\_VAKfor“ (siehe Tabellen 3 und 7) durchgeführt, in die jeweilig die Basensequenz für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI eingefügt wurde (Amplifikationsbedingungen siehe Tabelle 8). In jeder PCR wurde der Reverse-Primer „NheB\_Xholrev“ verwendet, in den wiederum die Basensequenz für die Restriktionsendonuklease *Xho*I und ein zusätzliches Stopkodon eingebracht wurde. Somit beliefen sich die Größen der Amplifikate auf 1139 Basenpaare (bp) für *nheB*-AES, 1109 bp für *nheB*-HAV und 1103 bp für *nheB*-VAK.

**Tabelle 7.** Mastermix PCR für jeweiliges *nheB*-Konstrukt (AES, HAV oder VAK)

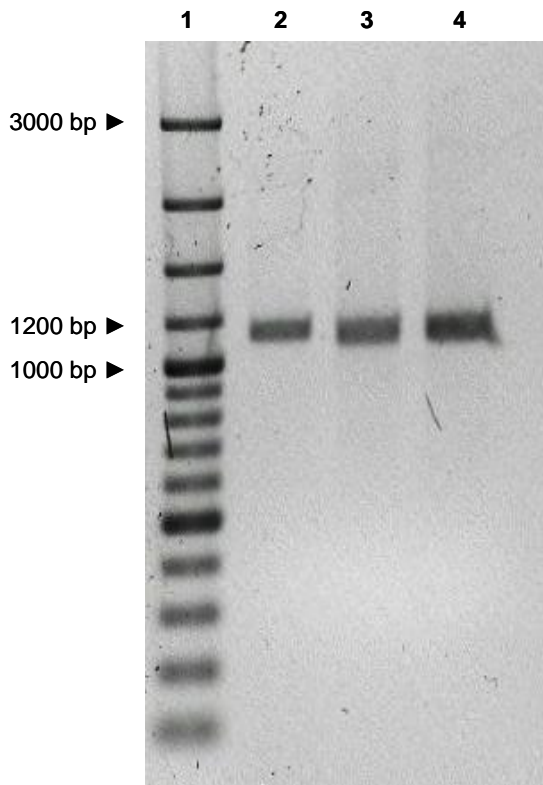
Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,0
dNTPs (10 mM)	1,0
NheB_AESfor, NheB_HAVfor oder NheBVAKfor (10 $\mu$ M)	2,5
NheB_Xholrev (10 $\mu$ M)	2,5
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5
A. bidest.	28,5
DNA	5
Gesamtvolumen	50,0

**Tabelle 8.** Amplifikationsbedingungen PCR *nheB*-Konstrukte (AES, HAV oder VAK)

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95	7 min
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	95	15 sec
2.2 Annealing	61	20 sec
2.3 Elongation	72	1 min 10 sec
Wiederholung: 35 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	20 min
4. Kühlung	4	bis zur Entnahme

Restriktionsverdau der PCR-Produkte und des Vektors pET 26b

Nach der PCR erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate und deren Elution aus dem Agarose-Gel. Um die PCR-Produkte und den Vektor pET 26b für die Ligation vorzubereiten, mussten diese mittels Restriktionsendonukleasen (*Bam*HI und *Xho*I) verdaut werden (siehe 3.2.9). Der verdaute und dephosphorierte Vektor sowie die verdauten PCR-Produkte wurden nochmals über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und eluiert, um die Enzyme zu deaktivieren. Zur Abschätzung der molaren Konzentrationen wurden jeweils 7 µl in einem Kontroll-Agarose-Gel eingesetzt (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9.** Agarose-Gel der PCR-Produkte (*nheB*) nach Restriktionsenzym-Verdau; Bahn 1, 3000 bp-DNA-Leiter; Bahn 2, NheB-AES-Konstrukt (1139 bp); Bahn 3, NheB-HAV-Konstrukt (1109 bp); Bahn4; NheB-VAK-Konstrukt (1103 bp)

### Ligation und Transformation

Nach dem Restriktionsverdau erfolgt die Ligation der aufgereinigten PCR-Produkte und des Vektors. Anschließend wurden die kompetenten *E. coli*-Zellen TOP10 mit dem jeweiligen Ligationsansatz transformiert (siehe 3.2.11). Aus den transformierten Zellen konnten die Plasmide isoliert und sequenziert werden. Nach Bestätigung der korrekten Basensequenz und der fotometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Plasmide zur Transformation der *E. coli*-Expressionszelle BL 21 DE3 verwendet. Das jeweilige Plasmid konnte aus den gewachsenen Kolonien isoliert und die korrekte Basensequenz durch eine Kontroll-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese bestätigt werden.

#### 4.2.1.2 Klonierung von N-terminalen Deletionsmutanten von *nheB*

##### N-terminale Deletionsmutanten von NheB zur Eingrenzung der Bindungsstelle

Im Rahmen einer früheren Dissertation am Lehrstuhl konnte mithilfe nativen NheB gezeigt werden, dass das Protein in der Lage ist, an Vero-Zellen und andere Zelllinien zu binden (Bock, 2010).

Ebens so ist eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen NheB und ClyA bekannt (FAGERLUND et al., 2008), dessen Amino-Terminus eine wichtige Rolle in der Membraninteraktion spielt (MUELLER et al., 2009). Daher wurde versucht mittels N-terminaler Deletionsmutanten, die Bindungsdomäne von NheB an die Zielzellen näher einzugrenzen. Dazu wurden fünf rekombiante NheB-Proteine erzeugt, denen am N-Terminus jeweils eine bestimmte Anzahl von Aminosäuren fehlt (N1 - N5). Die Abbildung 10 zeigt die Sequenzen der Deletionsmutanten.

	N1
1	AESTVKQAPVHAVAKAYNDYEEYSLGPEGL <b>KD</b> AMERTGSNALVMDLYALTI IKQGNVNF
	N2
	N3
61	<b>NV</b> STVDAALKGKVIQHQDTARGNAKQWLDV <b>LPQL</b> ISTNQNI INYN <b>TKFQ</b> NYD <b>TLVAAV</b>
	N4
	N5
121	<b>DAKD</b> KATLTKGLTRLSSSINENKAQVDQ <b>LVEDLK</b> KFRNKMTSDTQ <b>NFKGDANQITSILAS</b>
181	QDAGIPLLQ <b>NQITTYNEAIS</b> KYN <b>AIIGSSVATALGPIAIIGGAVVIATGAGTPLGVALI</b>
241	AGGAAAVGGGTAGIVLAKKELD <b>NAQAEIQKITGQITTAQLEVAGLTNIKTQTEYLTNTID</b>
301	<b>TAIT</b> ALQ <b>NISNQWYTMGSKYNSLLQNVDSISPNDLVFIKEDLNIAKDSWKNIKDYA</b> EKIY
361	<b>AEDIKVVDTKKA</b>

**Abbildung 10.** Aminosäuresequenz von NheB ohne Leader-Sequenz; N-Termini (rot) der Deletionsmutanten N1 – N5; Aminosäuren-Anzahl von Beginn bis Ende der Sequenz: N1 (31 – 372), N2 (61 – 372), N3 (93 – 372), N4 (122 – 372), N5 (152 – 372)

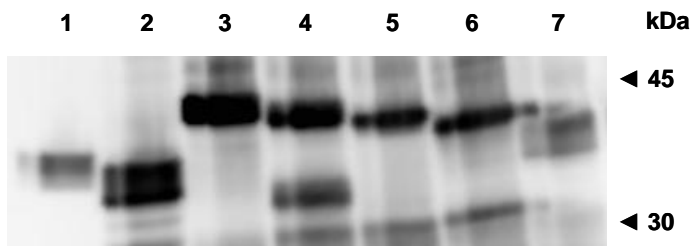
### PCR, Ligation und Transformation

Die am Lehrstuhl bereits vorhandenen N-terminalen Deletionsmutanten wurden mittels Oligonukleotidprimer, aufgeführt in Tabelle 3, generiert (Amplifikationsbedingungen siehe Tabelle 9). Für die Klonierung wurde das Vektorsystem pBAD 202, das eine Ampicillinresistenz besitzt und die Expressionszelllinie LMG 194 gewählt.

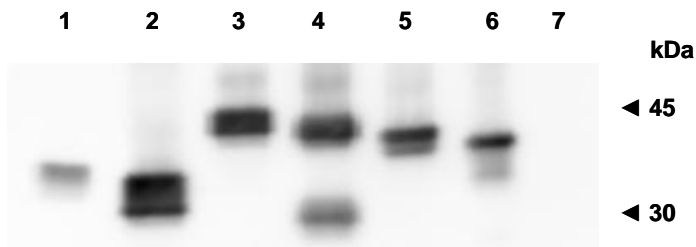
#### **4.2.2 Expression von *nheB***

Die Proteinexpression erfolgte beim pBAD-Vektorsystem mit L-(+)-Arabinose wohingegen der pET 26b-Vektor mit IPTG induziert wurde. Nach dem Zellaufschluss erfolgte, wie bei NheA, die Dialyse gegen PBS.

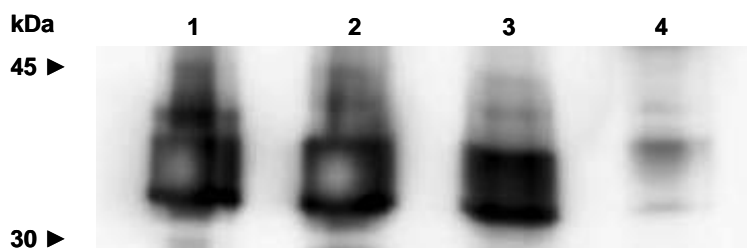
Die verschiedenen rekombinanten NheB-Konstrukte und –Deletionsmutanten konnten im indirekten EIA durch den am Lehrstuhl entwickelten mAk 1E11 und dem polyklonalen Antiserum Kaninchen-Anti-Maus-HRP nachgewiesen werden. Die Titer beliefen sich auf 1 : 15.000 bis 1 : 30.000. Der zellfreie Kulturüberstand des *B. cereus*-Stammes MHI 241 (siehe Tabelle 2) diene als Positivkontrolle. Durch den ebenfalls am Lehrstuhl entwickelten mAk 2B11 konnten im direkten EIA alle bis auf die Deletionsmutante N5 der rekombinanten NheB-Konstrukte und -Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Die fehlende Reaktion mit N5 ist auf die Deletion der Antikörperbindungsstelle bei dieser Deletionsmutante zurückzuführen (bisher unveröffentlichte Daten). Mit den gleichen Antikörpern wurden die rekombinanten Proteine auf ihre Größe hin im Western Blot überprüft (siehe Abbildungen 11, 12 und 13). Zu beachten ist, dass vor dem Enterokinase-Verdau die Größe des jeweiligen rekombinanten Proteins 14 kDa mehr betrug, was auf den Thioredoxin-Anhang zurückzuführen ist. Die NheB-Konstrukte zeigen eine deutliche Überexpression im Vergleich zur Positivkontrolle MHI 241 (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 11.** Western Blot von NheB mit primärem mAK 1E11 nach Dialyse und vor Enterokinase-Verdau; Bahn 1, Positivkontrolle Kulturüberstand MHI 241; Bahn 2, NheB-VAK-Konstrukt ; Bahn 3, NheB N1; Bahn 4, NheB N2; Bahn 5, NheB N3; Bahn 6, NheB N4; Bahn 7, NheB N5



**Abbildung 12.** Western Blot von NheB mit primärem mAK 2B11 nach Dialyse und vor Enterokinase-Verdau; Bahn 1, Positivkontrolle Kulturüberstand MHI 241; Bahn 2, NheB-VAK-Konstrukt ; Bahn 3, NheB N1; Bahn 4, NheB N2; Bahn 5, NheB N3; Bahn 6, NheB N4; Bahn 7, NheB N5;



**Abbildung 13.** Western Blot von NheB mit primärem mAK 1E11 nach Dialyse; Bahn 1, NheB-AES-Konstrukt; Bahn 2; NheB-HAV-Konstrukt, Bahn 3, NheB-VAK-Konstrukt; Bahn 4; Positivkontrolle Kulturüberstand MHI 241

### 4.2.3 Funktionelle Tests mit NheB

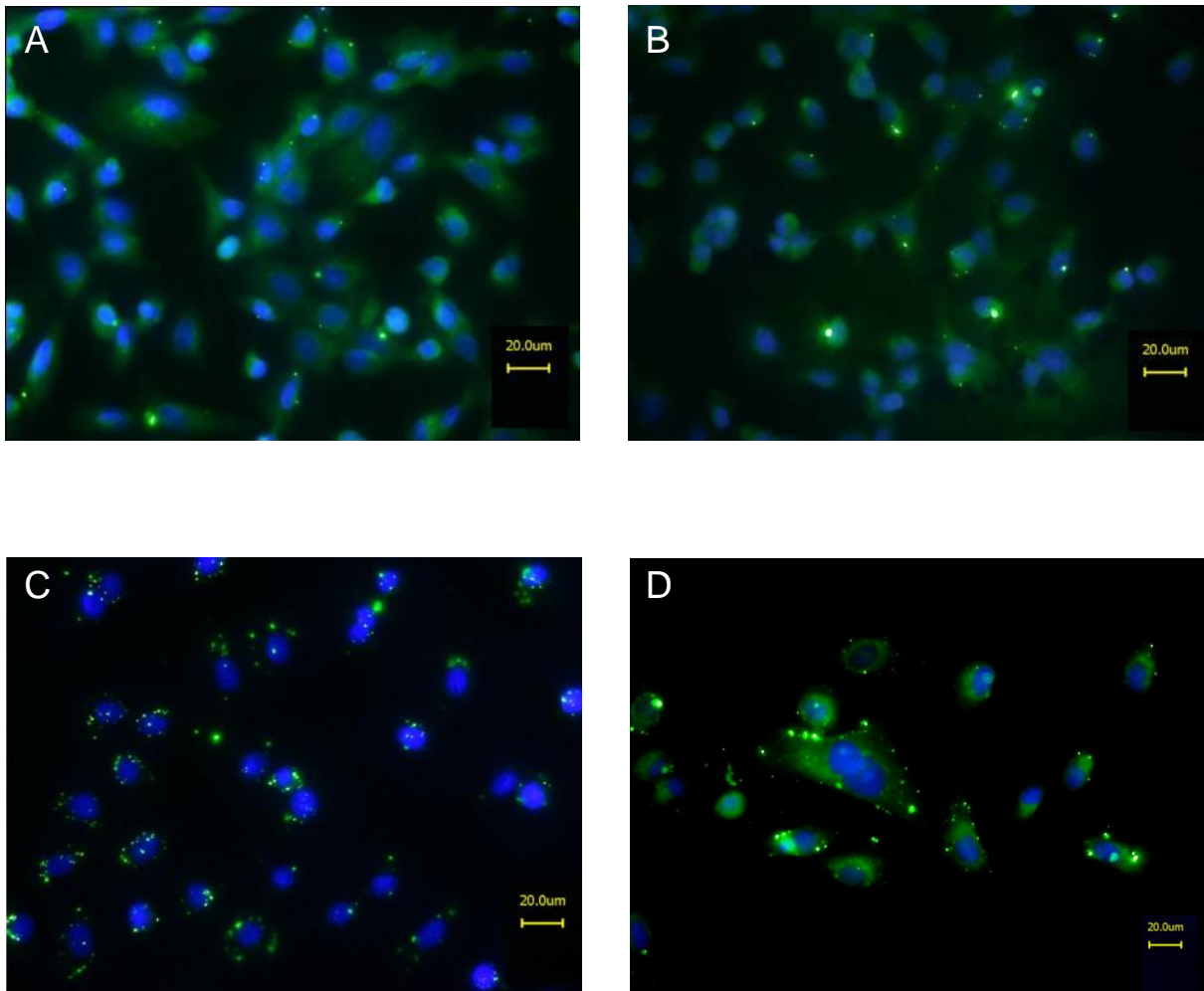
#### Immunfluoreszenz

Da die Bindung nativen NheB an die Zelle bereits im Rahmen einer Dissertation gezeigt wurde (BOCK, 2009), sollte auch für das rekombinante NheB die Bindung an die Zelle demonstriert werden. Dazu wurden die rekombinanten NheB-Dialysate mittels 1E11-IAS aufgereinigt (siehe 3.2.19). Das Eluat über Amicon Filter aufkonzentriert, mit Enterokinase verdaut (nur Deletionsmutanten aus pBAD-Vektorsystem), sterilfiltriert und anhand der EIA-Ergebnisse in annähernd gleichen Verhältnissen eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der Kulturüberstand der *B. cereus*-Mutante MHI 1761, die nur NheB und –C, aber kein NheA exprimiert (siehe Tabelle 2). So konnte die Atoxizität gewährleistet werden. Die Proben wurden über Nacht auf die NheB-sensitiven Vero-Zellen gegeben und am nächsten Tag mit dem gegen NheB gerichteten, markierten mAK 1E11 beprobt (Alexa Fluor 488, grüne Fluoreszenz). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Als Negativkontrolle wurde ein *E. coli*-Dialysat (aus Expressionszelllinien ohne Plasmid) verwendet (siehe 3.2.25).

#### NheB-Konstrukte mit potenziellen Prodomänen

Anhand der EIA-Ergebnisse des rekombinanten NheB konnte mit Bezug auf den Referenzstamm MHI 241 die Proteinkonzentration der Proben geschätzt werden. Demzufolge wurden Vero-Zellen im Chamber-Slide mit jeweils 6 µg pro Kavität inkubiert. Die in Abbildung 14 dargestellten Immunfluoreszenzbilder zeigen die Kerne der Vero-Zellen in blau und das an die Zelle gebundene NheB (grüne „Spots“). Durch diese Studie wurde gezeigt, dass der markierte mAk 1E11 alle drei Konstrukte (AES, HAV, VAK) an der Zelle detektiert.



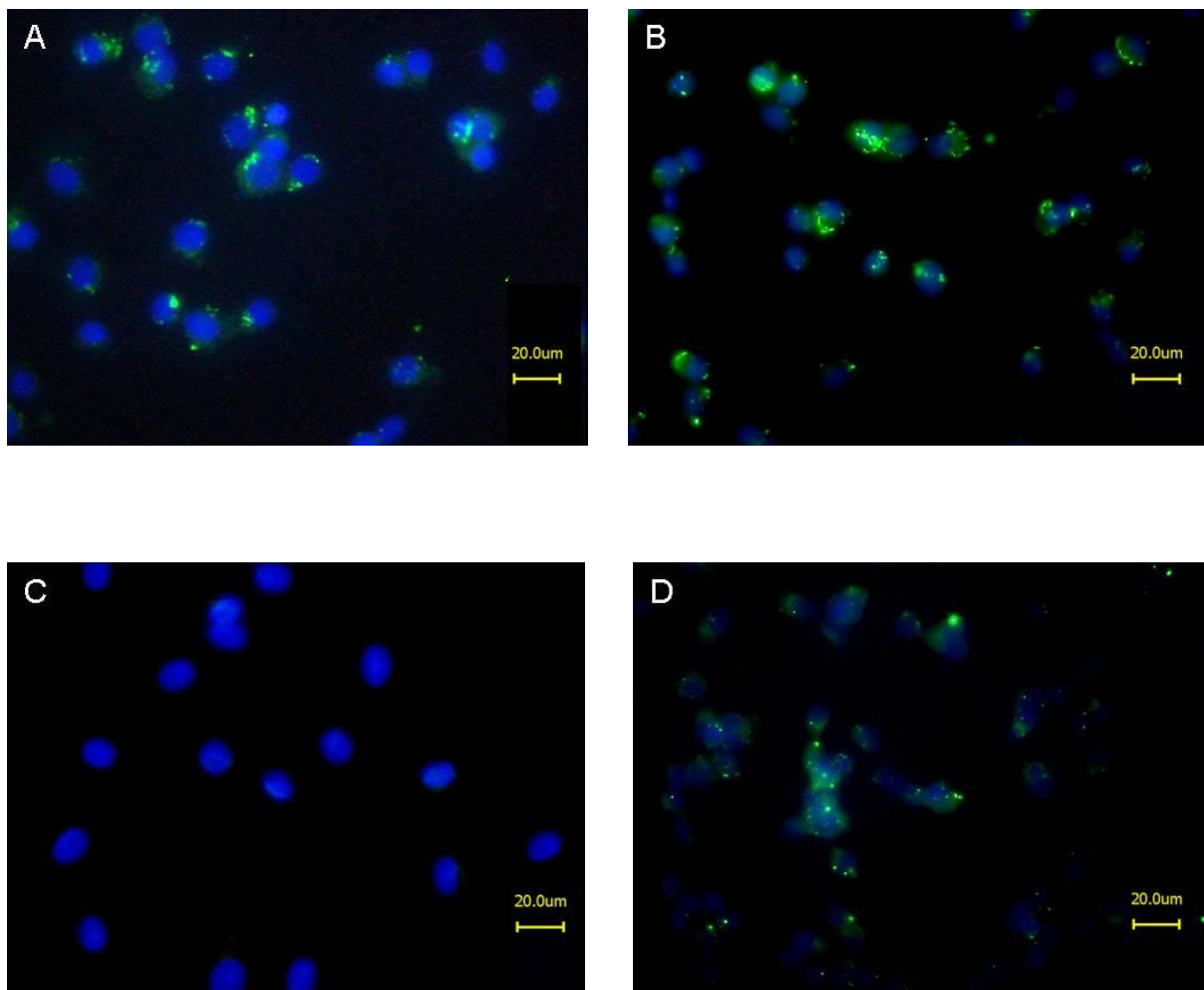


**Abbildung 14.** Immunfluoreszenzbilder mit blauer Kernfärbung (DAPI) und mit Alexa Fluor 488-markiertem mAk 1E11 gegen NheB (grün); Bild A, NheB-AES-Konstrukt; Bild B, NheB-HAV-Konstrukt, Bild C, NheB-VAK-Konstrukt; Bild D, Positivkontrolle mit Kulturüberstand des Stammes MHI 1761;

N-terminale Deletionsmutanten von *nheB*

Durch eine Immunfluoreszenz-Studie wurde versucht die Bindungsdomäne von NheB an die Zielzelle näher einzugrenzen. Hierfür wurde die Bindung der jeweiligen N-terminalen Deletionsmutante an Vero-Zellen untersucht (siehe Abbildung 15).

In dieser Studie konnte für N1 – N4 eine schwache Bindung von NheB an die Zelloberfläche nachgewiesen werden, wohingegen N5 nicht mehr durch den markierten mAk 1E11 zu detektieren war. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Aminosäuresequenz zwischen Position 122 und 151 an der Bindungsstelle beteiligt ist und, dass die Bindung von NheB an die Zielzelle von einem intakten N-Terminus des Proteins abhängig ist.



**Abbildung 15.** Immunfluoreszenzbilder mit blauer Kernfärbung (DAPI) und mit Alexa Fluor 488-markiertem mAk 1E11 gegen NheB (grün); Bild A, NheB N1; Bild B, NheB N4; Bild C, NheB N5; Bild D, Positivkontrolle mit Kulturüberstand des Stammes MHI 1761;

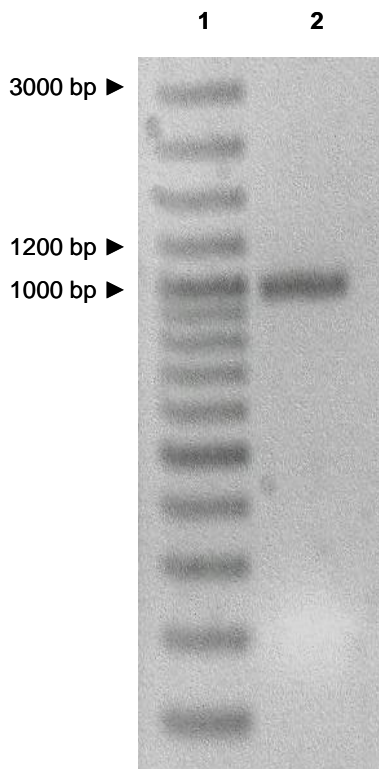
### Zytotoxizitätstest

Da bisher kein *B. cereus*-Stamm isoliert wurde, der nur NheA und –C exprimiert, musste für die Zytotoxizitätstests ein NheB-freier Kulturüberstand (NheA und –C vorhanden) mittels subtraktiver Immunaffinitätschromatographie (siehe 3.2.19) generiert werden. Dabei wurde ein NheB-freier Probendurchlauf gewonnen. Dieser wurde durch einen EIA auf seine Komponenten (NheA und –C) hin überprüft und die Entfernung von NheB verifiziert. Dieser NheB-freie Probendurchlauf konnte für Komplettierungsversuche mit dem rekombinanten NheB im Zytotoxizitätstest eingesetzt werden. Als Positivkontrolle diente der Kulturüberstand des Stammes MHI 241. Als Negativkontrollen wurden alle NheB-Konstrukte und -Deletionsmutanten einzeln sowie der Probendurchlauf im Zytotoxizitätstest eingesetzt. Ebenso wurden der Dialysepuffer (PBS) und ein *E. coli*-Dialysat (aus Expressionszelllinien ohne Plasmid) getestet. Jede der NheB-Deletionsmutanten und –Konstrukte wurden in Kombination mit dem Probendurchlauf der 1E11-IAC in verschiedenen molaren Verhältnissen eingesetzt. Es erfolgten diverse Tests mit Variationen der Inkubationszeit und Reihenfolge der Beprobung (Vorinkubation mit NheB). Bislang konnte jedoch bei keinem Versuchsaufbau eine Zytotoxizität nachgewiesen werden.

### 4.3 NheC

#### 4.3.1 Klonierung von *nheC*

Die Sequenz von *nheC* wurde mittels einer sogenannten nested PCR amplifiziert, um die Effizienz der PCR zu erhöhen. Bei diesem PCR-Verfahren werden zwei PCRs nacheinander durchgeführt, wobei das Amplifikat der ersten Reaktion bei der zweiten Reaktion als Matrize dient. In der darauffolgenden zweiten PCR wird ein zweites Primerpaar verwendet, das an Sequenzbereiche innerhalb dieser Matrize bindet und somit ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert. Die erste PCR wurde mit dem Oligonukleotidprimerpaar NheCfor3 und NheCrev4 (siehe Anhang: Tabellen 1 und 2), die zweite mit dem Primerpaar NheCfor1 und NheCrev1 (siehe Anhang: Tabellen 2 und 3; Abbildung 16) oder dem Primerpaar NheC\_BamHI\_for und NheC\_Xho\_rev bzw. NheC\_XhoI\_rev (siehe Anhang: Tabellen 4 und 5) durchgeführt (siehe Tabelle 3). Als Vektoren kamen sowohl pBAD 202 als auch pET26b zum Einsatz.

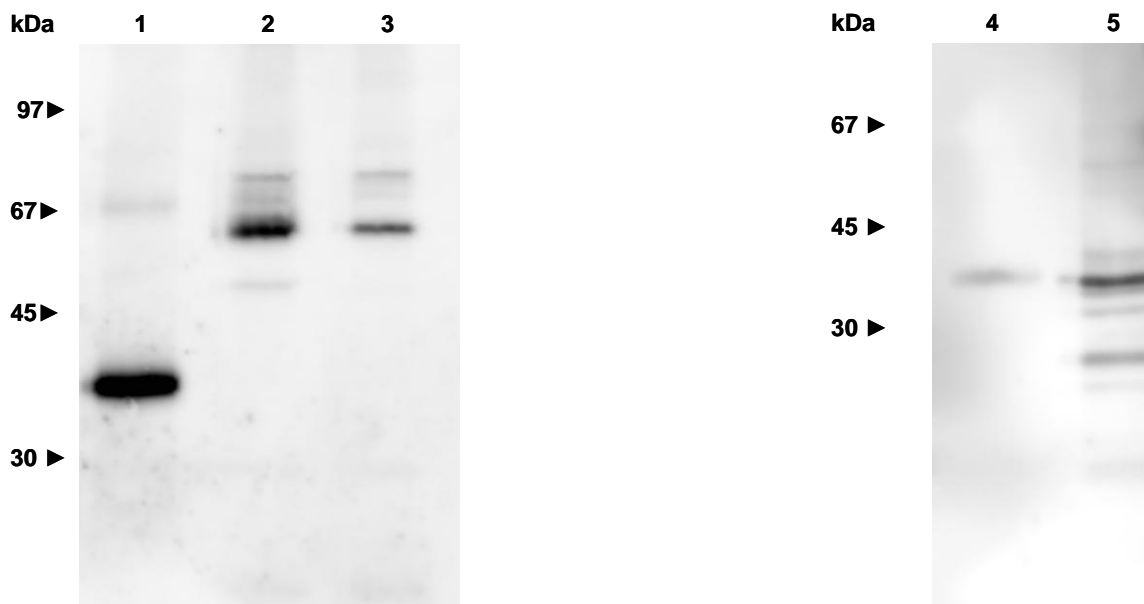


**Abbildung 16.** Agarose-Gel des PCR-Produkts (*nheC*); Bahn 1, 3000 bp-DNA-Leiter; Bahn 2, PCR-Produkt von *nheC*

### 4.3.2 Expression von *nheC*

Die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte wie bereits für NheA und NheB beschrieben. Die EIA-Titer der verschiedenen Dialysate betragen im Mittel zwischen 1 : 300 und 1 : 450. Bei der Untersuchung der rekombinanten Fusionsproteine mittels Western-Blot zeigte sich, dass NheC in beiden verwendeten Vektoren nur als Dimer isoliert werden konnte. Da nicht davon ausgegangen werden konnte, eine funktionelle Aktivität im Sinne einer Zytotoxizität dieser Dimeren zu erhalten wurde versucht mittels Urea-Zusatz und Dialyse gegen absteigende Harnstoff-Konzentrationen NheC in der monomeren Form zu isolieren. Bei den Konstrukten, die über einen C-terminalen HIS-Tag bzw. keinen HIS-Tag verfügten gelang dies nicht wie Abbildung 17 zeigt. Für das so erzeugte NheC konnte auch keine Zytotoxizität auf Vero-Zellen nachgewiesen werden.

Dankenswerter Weise wurde von Prof. Granum (Oslo) ein Plasmid zu Verfügung gestellt, das NheC mit einem N-terminalen HIS-Tag enthielt und aus dem, unter Urea-Dialyse die monomere Form des Proteins aufgereinigt werden konnte.



**Abbildung 17.** Western Blot-Analysen von NheC mit primärem Ak Kaninchen Antiserum; Bahn 1: Positivkontrolle MHI 241; Bahn 2, NheC ohne HIS-Tag nach PBS-Dialyse; Bahn 3, NheC ohne HIS-Tag nach Urea-Dialyse; Bahn 4, Positivkontrolle MHI 241; Bahn 5, NheC mit N-terminalem HIS-Tag nach Urea-Dialyse;

### 4.3.3 Funktionelle Tests mit NheC

Alle rekombinanten NheC-Konstrukte wurden im Zytotoxizitätstest mit Vero-Zellen eingesetzt (siehe 3.2.23). Der *B. cereus*-Stamm MHI 1672 (siehe Tabelle 2), welcher nur NheA und -B exprimiert, wurde für diesen Test ausgewählt. Dazu wurde in drei verschiedenen Auftrags-schemata, jeweils im simultanen Ansatz, das zytotoxische Potenzial der rekombinanten Proteine getestet. Nach dem ersten Auftragsschema wurde der zellfreie Kulturüberstand des MHI 1672 mit dem jeweiligen rekombinanten NheC-Konstrukt 1 : 2 gemischt, dieser Ansatz 1 : 10 verdünnt in die erste Kavität eingesetzt und eine log-2-Verdünnungsreihe angelegt. Nach den anderen beiden Schemata wurde das NheC-Dialysat 1 : 10 verdünnt in die erste Kavität eingesetzt und wiederum eine log-2-Verdünnungsreihe angelegt. Anschließend wurde der Kulturüberstand des Stammes MHI 1672 in jede Kavität entweder 1 : 50 oder 1 : 100 verdünnt zugegeben.

Bei diesen Tests konnte gezeigt werden, dass funktionell aktives, rekombinantes NheC in höheren Konzentrationen hemmend wirkt und somit keine Zytotoxizität nachgewiesen werden kann. Ab einer Dialysat-Verdünnungsstufe von 1 : 40 bzw. 1 : 80 konnte bei höheren Verdünnungsstufen toxische Effekte dargestellt werden.

Alle rekombinanten NheC-Konstrukte wurden im Zytotoxizitätstest eingesetzt, wodurch sich zeigte, dass nur das rekombinante NheC aus dem pCRT7/NT-TOPO-Vektor und der Expressionszelllinie BL21 DE3 LysS mit N-terminalem HIS-Tag nach Urea-Dialyse funktionell aktiv war. Wurde das Konstrukt nach dem Zellaufschluss gegen PBS dialysiert konnte, wie bei allen anderen Konstrukten, keine Zytotoxizität beobachtet werden.

## 5 Diskussion

In den letzten Jahren hat *Bacillus cereus* durch seine Eigenschaft als sporenbildendes Bakterium und seiner damit einhergehenden hohen Widerstandskraft gegen diverse Umwelteinflüsse sowie Desinfektionsmaßnahmen als Verursacher lebensmittelassoziierter Erkrankungen an Bedeutung gewonnen (KOTIRANTA et al., 2000; EHLING-SCHULZ et al., 2004). Besonders die durch die Enterotoxinkomplexe HBL und Nhe hervorgerufenen Durchfallerkrankungen fanden in der Literatur Erwähnung (BEECHER et al., 1995b; LUND & GRANUM, 1996; KOTIRANTA et al., 2000). Unter den bisher beschriebenen bakteriellen Toxinen sind HBL und Nhe in ihrer Zusammensetzung aus jeweils drei Einzelkomponenten, die nur in der jeweiligen Dreierkonstellation ihr volles zytotoxisches Potenzial entfalten können, einzigartig. Zum Wirkmechanismus der beiden Enterotoxinkomplexe HBL und Nhe ist bisher wenig bekannt, obgleich für HBL ein „membrane-attack-complex“ (BEECHER & WONG, 1997) postuliert wurde und neuere Erkenntnisse darauf schließen lassen, dass Nhe osmotische Zelllyse durch Porenbildung hervorzurufen vermag (FAGERLUND et al., 2008). Es ist jedoch weiterhin unklar wie die einzelnen Toxinkomponenten miteinander interagieren und ob sie an einen spezifischen Rezeptor binden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels rekombinant hergestellter *B. cereus*-Enterotoxine des Nhe-Komplexes eine Grundlage für Studien zur funktionellen Aktivität und zu dessen Wirkmechanismus geschaffen werden. Um Untersuchungen zur funktionellen Aktivität durchführen zu können, wurden die einzelnen Proteine des Nhe-Komplexes in Reinform benötigt. Die Klonierung der Einzelkomponenten erschien als Mittel der Wahl, da die Isolierung der einzelnen Toxinkomponenten durch chromatographische Methoden mit erheblichen Problemen verbunden ist. Neben dem beträchtlichen Arbeits- und Zeitaufwand ist die Reproduzierbarkeit der beschriebenen chromatographischen Verfahren für *B. cereus*-Enterotoxine limitiert, die Reinigung resultiert oft in einem beträchtlichen Verlust der Toxinaktivität und die erhaltenen Toxinpräparationen sind oft instabil (LUND & GRANUM, 1996).

Zur Klonierung wurde zunächst das pBAD-System für die Herstellung des rekombinanten NheA in einer *E. coli*-Expressionszelllinie gewählt. In diesem System wird das rekombinante Protein als Fusionsprotein mit einem Thioredoxin-Anhang exprimiert, wodurch eine bessere Löslichkeit des Proteins erreicht und die Bildung von Einschlusskörperchen reduziert wird (MERGULHAO et al., 2005). Durch eine enzymatische Reaktion wurde der Thioredoxin-Anhang abgespalten und das rekombinante Protein konnte zur Überprüfung der biologischen Aktivität in Zellkulturtests eingesetzt werden. Für NheA konnte auf diese Weise eine zytotoxische Wirkung gezeigt werden.

Im Rahmen einer früheren Dissertation wurde die Bindung von nativem NheB an Vero-Zellen gezeigt (BOCK, 2009). Dieses als Bindekomponente des Nhe-Komplexes beschriebene Protein (LINDBÄCK et al., 2004) sollte in dieser Studie näher untersucht werden. Dies geschah basierend auf den neuesten Erkenntnissen bzgl. der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zwischen NheB und ClyA von *E. coli* (FAGERLUND et al., 2008). ClyA ist ein  $\alpha$ -Poren-bildendes Toxin, das während der Porenbildung große Strukturveränderungen erfährt. MÜLLER et al. publizierten 2009 ein Modell, demzufolge der amino-terminale Teil des Proteins ( $\alpha$ A-Helix) eine wichtige Rolle in der Membraninteraktion und Porenbildung spielt. So konvertiert die ClyA-Struktur während der Einlagerung in die Membran der Zielzelle von einem Vierer- zu einem Dreier-Helix-Bündel, wobei die  $\alpha$ A-Helix eine große Translokation vollzieht, was als Voraussetzung zur Protomerbildung gilt. Ausgehend von diesem Modell, in dem der N-terminale Teil des Proteins eine essenzielle Rolle spielt, wurden fünf N-terminale Deletionsmutanten (N1 – N5) von NheB konstruiert, denen jeweils eine bestimmte Anzahl an Aminosäuren fehlt. Durch eine Immunfluoreszenzstudie mit dem markierten monoklonalen Antikörper 1E11 gegen NheB konnte eine Bindung an Vero-Zellen für N1 – N4 gezeigt werden. Für N5, also NheB mit einer Deletion von 151 N-terminalen Aminosäuren, konnte keine Bindung mit dem markierten Antikörper 1E11 mehr nachgewiesen werden, obwohl dieser Antikörper im EIA und Western Blot mit der Deletionsmutante N5 reagiert. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass auch bei NheB (in Anlehnung an ClyA) der N-Terminus des Proteins eine wichtige Rolle bei der Bindung an die Zelle spielt.



Die Einzelkomponenten des Nhe-Enterotoxinkomplexes werden von *B. cereus* sezerniert und stellen klassische Exoproteine dar. Diese werden initial als Präproteine mit einem amino-terminalen Anhang, dem Signal-Peptid, synthetisiert. Diese Aminosäurenverlängerung unterscheidet Exoproteine von den zytoplasmatischen Proteinen, da dieses Signal-Peptid, auch Leader-Sequenz genannt, für die Ausschleusung aus der Bakterienzelle verantwortlich ist (SIMONEN & PALVA, 1993; YOON et al., 2009). Generell verbleiben Exoproteine, solange sie sich in der Zelle befinden, in einem ungefalteten Zustand, da die fertig ausgebildete Tertiärstruktur eine Translokation verhindert. Chaperone, kleine lösliche Proteine, beeinflussen die Faltung von Exoproteinen und unterstützen deren Translokation. Während des Translokations-Prozesses wird die Leader-Sequenz von einer spezifischen Protease, einer Signal-Peptidase, abgespalten. Die Leader-Sequenzen von *Bacillus* Spezies variieren in ihrer Länge zwischen 18 und 35 Aminosäuren, besitzen jedoch keine Konsensussequenz. Trotzdem besitzen sie typische strukturelle Gemeinsamkeiten, wie einen positiv geladenen N-Terminus gefolgt von einem hydrophoben Sequenzbereich und einer polaren C-Region mit einer Signal-Peptidasen-Erkennungssequenz (VON HEIJNE, 1985). Die Abspaltung der Leader-Sequenz erfolgt nach einem C-terminalen Alanin. Neben dem Signal-Peptid besitzen Exoproteine von *Bacillus* Spezies oft ein Propeptid. Dies ist eine Aminosäuren-Sequenz, die sich zwischen Leader-Sequenz und dem eigentlichen Protein befindet. Für dieses Propeptid werden verschiedene Funktionen diskutiert, wie beispielsweise dessen Rolle während des Translokations-Prozesses, die Unterdrückung von Enzymaktivitäten während der Sekretion, Verankerung des Proteins in der Zellmembran, Beeinflussung der Faltung des Proteins sowie die Aktivierung von Proteasen (SIMONEN & PALVA, 1993).

Weil als Expressionszelllinie für die rekombinanten Proteine, die im Verlauf dieser Studie hergestellt wurden, *E. coli* gewählt wurde, konnten die Proteine ohne die *Bacillus*-Leader-Sequenz kloniert werden. Wegen der erfolgreichen Klonierung eines funktionell aktiven NheA wurde die gleiche Klonierungsstrategie für NheB verfolgt. Das auf diese Weise produzierte rekombinante NheB zeigte jedoch keine funktionelle Aktivität im Sinne einer Zytotoxizität. Daraufhin wurde das Vektorsystem gewechselt, um die Sekretion zu verbessern. Ferner wurden durch einen Sequenzvergleich mit typischen *Bacillus*-Prodomänen drei potenzielle Sequenzen als Start für das mature NheB identifiziert (Beginn der Aminosäure-Sequenz: AES, HAV bzw. VAK). Die drei entsprechenden NheB-Konstrukte wurden kloniert, um mögliche Erkennungssequenzen für Chaperone der *E. coli*-Expressionszelllinie zu schaffen und somit eine korrekt gefaltete Tertiärstruktur des NheB zu erhalten.

Es konnte für alle drei Konstrukte eine Bindung an Vero-Zellen demonstriert werden, wobei deutlich mehr NheB des VAK-Konstruktes an die Zellen gebunden hatte. Jedoch konnte kein zytotoxisches Potenzial im Zellkulturtest nachgewiesen werden, was eventuell auf mangelhafte bzw. fehlende posttranslationale Modifikationen, wie Acetylierung, Glycosilierung und Methylierung, von Seiten der *E. coli*-Expressionszelllinie zurückzuführen ist (CHOI et al., 2006; YOON et al., 2009).

Für die Herstellung des rekombinanten NheC wurden die beiden Vektorsysteme pBAD 202 und pET 26b eingesetzt. Hierbei wurde rekombinantes NheC mit C-terminalem HIS-Tag und ohne HIS-Tag generiert. Bei den Western Blot-Analysen zeigte sich jedoch, dass NheC in beiden Vektorsystemen nur als Dimer isoliert werden konnte, welches im Zellkulturtest keine funktionelle Aktivität zeigte. Verschiedene Dialyseprotokolle (z. B. gegen Puffer mit absteigender Urea-Konzentration) sowie Versuche mit CellLytic IB oder Mercaptoethanol waren nicht erfolgreich. Dankenswerterweise wurde von Prof. Granum (Oslo) ein Plasmid zur Verfügung gestellt, das NheC mit einem N-terminalen HIS-Tag enthielt und aus dem unter Urea-Dialyse die monomere Form des Proteins aufgereinigt werden konnte. Dieses zeigte volle biologische Aktivität. Interessant wäre ein Vergleich des rekombinanten NheC mit N-terminalen HIS-Tag und dem Konstrukt mit C-terminalen HIS-Tag, um zu untersuchen, ob ein freier C-Terminus für die funktionelle Aktivität ausschlaggebend ist. Da es jedoch nicht gelang, das Konstrukt mit dem C-terminalen HIS-Tag in der monomeren Form darzustellen, konnte diese Frage nicht beantwortet werden. Alternativ könnte die fehlende biologische Aktivität auf die unerwartet stabile Dimerbildung zurückzuführen sein.

Zur Untersuchung der funktionellen Aktivität der rekombinanten Proteine wurde ein auf Vero-Zellen basierender Zytotoxizitätstest gewählt. Orientierend an dem molaren Verhältnis der Enterotoxinkomponenten NheA : NheB : NheC gleich 10 : 10 : 1, wie es von LINDBÄCK et al. 2004 publiziert wurde, konnte eine funktionelle Aktivität der rekombinanten Proteine NheA und NheC im Sinne einer Zytotoxizität dargestellt werden. Bei höheren Konzentrationen des rekombinanten NheC konnte eine Hemmung der Zytotoxizität beobachtet werden. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung des rekombinant hergestellten NheB an Vero-Zellen mittels einer Immunfluoreszenzstudie demonstriert sowie dessen Bindungsstelle durch die Herstellung N-terminaler Deletionsmutanten näher charakterisiert. Die Erkenntnisse dieser Arbeit bilden einen guten Ausgangspunkt, um in weiteren Untersuchungen den Wirkungsmechanismus des Nhe-Enterotoxinkomplexes auf zellulärer Ebene näher zu untersuchen. Außerdem schafft die Herstellung der funktionell aktiven Proteine die Voraussetzung für weitere Versuche zum Bindungs- und Komplexbildungsverhalten der Einzelkomponenten.

## 6 Zusammenfassung

### **Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Einzelkomponenten des Nhe-Enterotoxinkomplexes von *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* verursacht Lebensmittelintoxikationen und -infektionen, die zunehmend häufiger registriert werden. Der Toxinkomplex Non-haemolytic Enterotoxin (Nhe) setzt sich aus den drei Proteinen NheA, NheB und NheC zusammen und gilt als eine mögliche Ursache für das Diarrhö-Syndrom von *B. cereus*. Durch welchen Wirkmechanismus der Toxinkomplex Zytotoxizität vermittelt, ist bisher nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Studie wurden deshalb die Proteine NheA, NheB und NheC kloniert und rekombinant exprimiert, um den Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Nach einer PCR und der darauffolgenden Einführung in pBAD- und pET-Expressionssysteme wurden die Proteine durch *E. coli*-Expressionszelllinien rekombinant hergestellt. Die rekombinanten Proteine wurden auf ihre funktionelle Aktivität im Sinne einer Zytotoxizität im Zellkulturtest überprüft. Durch einen markierten monoklonalen Antikörper konnte die Bindung von NheB an Vero-Zellen durch eine Immunfluoreszenzstudie gezeigt werden.

Durch die Herstellung N-terminaler Deletionsmutanten konnte die Bindungsstelle von NheB näher eingegrenzt werden. Es zeigte sich in einer Immunfluoreszenzstudie, dass die Deletion von 151 Aminosäuren am N-Terminus mit einem Verlust der Bindung an Vero-Zellen einhergeht. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bindung NheB an Vero-Zellen von einem intakten amino-Terminus abhängig ist.

Um eine funktionelle Aktivität des rekombinanten NheB zu erhalten, wurden drei NheB-Konstrukte mit jeweils verschiedenen möglichen Prodomänen erzeugt. Im Zellkulturtest konnte keine Zytotoxizität detektiert werden, was vermutlich auf mangelhafte bzw. fehlende posttranslationale Proteinmodifikationen zurückzuführen ist. In einer Immunfluoreszenzstudie zeigte sich hingegen für jedes Konstrukt eine Bindung an die Zelle.

Für NheA und NheC konnte eine funktionelle Aktivität im Sinne einer Zytotoxizität im Zellkulturtest gezeigt werden, wobei NheC in höheren Konzentrationen zu einer Hemmung der zytotoxischen Effekte führte.

## Summary

### **Production and characterization of recombinant proteins of the *Bacillus cereus*-non haemolytic enterotoxin complex (Nhe)**

*Bacillus cereus* causes food intoxications and food infections which are counted among the major food associated diseases. The toxin complex non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is composed of the three proteins NheA, NheB and NheC and is a causative agent of the diarrhoeal syndrome of *B. cereus*. The mechanism by which this toxin complex leads to cytotoxicity remains unknown.

Therefore, this study deals with cloning and expression of the recombinant proteins NheA, NheB and NheC to analyze their mode of action on cellular basis. These proteins were generated by PCR, subsequently cloned into pBAD and pET expression systems and recombinantly expressed in *E. coli*. Functional activity as cytotoxic effects of the recombinant proteins was analyzed in cell culture assays. Using a labelled monoclonal antibody binding of NheB to Vero cells was demonstrated by immunofluorescence microscopy.

NheB-constructs with N-terminally truncated deletions were produced in order to map the binding site of the protein. In immunofluorescence microscopy it could be shown that a deletion of 151 amino acids resulted in a complete loss of binding to Vero cells. These data demonstrate that the binding of NheB to Vero cells depends on an intact amino-terminal part of the protein.

In order to gain functional activity of recombinant NheB three NheB-constructs with different possible prodomains were established. No cytotoxic effects were detected in Vero cell-assays probably due to incomplete or missing posttranslational protein modification. An immunofluorescence study, however, revealed binding of each construct to cells.

For NheA and NheC functional activity such as cytotoxicity was demonstrated in cell assays, whereas NheC in higher concentration lead to a loss of cytotoxic effect.

## 7 Literaturverzeichnis

**ABRAMI, L., KUNZ, B. & VAN DER GOOT, F. G. (2010):**

Anthrax toxin triggers the activation of src-like kinases to mediate its own uptake  
Proc Natl Acad Sci U S A 107, 1420 - 1424.

**ADAMS, M. R. & MOSS, M. O. (2007):**

Food Microbiology  
Royal Society of Chemistry, Great Britain, 188

**AGAISSE, H., GOMINET, M., OKSTAD, O. A., KOLSTO, A. B. & LERECLUS, D. (1999):**

PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*  
Mol Microbiol 32, 1043 - 1053.

**AGATA, N., MORI, M., OHTA, M., SUWAN, S., OHTANI, I. & ISOBE, M. (1994):**

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells  
Fems Microbiol Lett 121, 31 - 34.

**AGATA, N., OHTA, M., ARAKAWA, Y. & MORI, M. (1995a):**

The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein  
Microbiology 141 ( Pt 4), 983 - 988.

**AGATA, N., OHTA, M., MORI, M. & ISOBE, M. (1995b):**

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*  
Fems Microbiol Lett 129, 17 - 20.

**ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (2005):**

Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie  
3, Wiley-VCH, Weinheim

**ANDERSSON, A., GRANUM, P. E. & RONNER, U. (1998):**

The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism

Int J Food Microbiol 39, 93 - 99.

**ASANO, S. I., NUKUMIZU, Y., BANDO, H., IIZUKA, T. & YAMAMOTO, T. (1997):**

Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*

Appl Environ Microbiol 63, 1054 - 1057.

**BANEYX, F. (1999):**

Recombinant protein expression in *Escherichia coli*

Curr Opin Biotech 10, 411 - 421.

**BECKER, H. (2005):**

Einleitung und Allgemeines. In: *Bacillus cereus*

BECKER, B. , Behrs Verlag, Hamburg, pp. 7 - 13

**BEECHER, D. J. & MACMILLAN, J. D. (1990):**

A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*

Infect Immun 58, 2220 - 2227.

**BEECHER, D. J. & MACMILLAN, J. D. (1991):**

Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*

Infect Immun 59, 1778 - 1784.

**BEECHER, D. J. & WONG, A. C. (1994a):**

Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*

Infect Immun 62, 980 - 986.

**BEECHER, D. J. & WONG, A. C. (1994b):**

Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits

Appl Environ Microbiol 60, 4614 - 4616.

**BEECHER, D. J., PULIDO, J. S., BARNEY, N. P. & WONG, A. C. (1995a):**

Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL

Infect Immun 63, 632 - 639.

**BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L. & WONG, A. C. (1995b):**

Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*

Infect Immun 63, 4423 - 4428.

**BEECHER, D. J. & WONG, A. C. (1997):**

Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon

J Biol Chem 272, 233 - 239.

**BEECHER, D. J., OLSEN, T. W., SOMERS, E. B. & WONG, A. C. (2000):**

Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis

Infect Immun 68, 5269 - 5276.

**BEECHER, D. J. & WONG, A. C. (2000):**

Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate

Microbiology 146 ( Pt 6), 1371 - 1380.

**BOCK, S. (2009):**

Zellspezifische Wirkung von *Bacillus-cereus*-Zytotoxinen

Diss med vet, Ludwig-Maximilians-Universität München.

**BROWN, R. W. & SCHERER, R. K. (1957):**

A report on two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*

Cornell Vet 47, 226 - 240.

**BROWN, T. A. (2006):**

Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction

5th, Blackwell Science Ltd, Oxford.

**BUCHANAN, R. L. & SCHULTZ, F. J. (1994):**

Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin

Lett Appl Microbiol 19, 353 - 356.

**CABIAUX, V., WOLFF, C. & RUYSSCHAERT, J.-M. (1997):**

Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence

Int J Biol Macromol 21, 285 - 298.

**CALLEGAN, M. C., GILMORE, M. S., GREGORY, M., RAMADAN, R. T., WISKUR, B. J., MOYER, A. L., HUNT, J. J. & NOVOSAD, B. D. (2007):**

Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host-pathogen interactions

Prog Retin Eye Res 26, 189 - 203.

**CHOI, J. H., KEUM, K. C. & LEE, S. Y. (2006):**

Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*

Chem Eng Sci 61, 876 - 885.

**CLAVEL, T., CARLIN, F., LAIRON, D., NGUYEN-THE, C. & SCHMITT, P. (2004):**

Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach

J Appl Microbiol 97, 214 - 219.

**COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER H. W. & HELLING, R. B. (1973):**

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *in vitro*

Proc Nat Acad Sci USA 70, 3240 - 3244.

**COVEY, C., RICHARDSON, D. & CARBON, J. (1976):**

A method for the deletion of restriction sites in bacterial plasmid deoxyribonucleic acid

MGG Molecular & General Genetics 145, 155 - 158.

**CRONAN, J. E. (2006):**

A family of arabinose-inducible *Escherichia coli* expression vectors having pBR322 copy control

Plasmid 55, 152 - 157.



**DIETRICH, R., MAUERSBERGER, K. & MÄRTLBAUER, E. (1997):**

Use of the MTT test for the detection of *B. cereus* enterotoxin

Arch Lebensmittelhyg 48, 77 - 81.

**DIETRICH, R., FELLA, C., STRICH, S. & MÄRTLBAUER, E. (1999):**

Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*

Appl Environ Microbiol 65, 4470 - 4474.

**DIETRICH, R., MORAVEK, M., BURK, C., GRANUM, P. E. & MARTLBAUER, E. (2005):**

Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex

Appl Environ Microbiol 71, 8214 - 8220.

**DROBNIEWSKI, F. A. (1993):**

*Bacillus cereus* and related species

Clin Microbiol Rev 6, 324 - 338.

**DUBOUIX, A., BONNET, E., ALVAREZ, M., BENSAFI, H., ARCHAMBAUD, M., CHAMINADE, B., CHABANON, G. & MARTY, N. (2005):**

*Bacillus cereus* infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices

J Infect 50, 22 - 30.

**EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. & SCHERER, S. (2004):**

*Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness

Mol Nutr Food Res 48, 479-487.

**EHLING-SCHULZ, M., GUINEBRETIERE, M. H., MONTHAN, A., BERGE, O., FRICKER, M. & SVENSSON, B. (2006):**

Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*

Fems Microbiol Lett 260, 232 - 240.

**FAGERLUND, A., WEEN, O., LUND, T., HARDY, S. P. & GRANUM, P. E. (2004):**

Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*

Microbiology 150, 2689 - 2697.

**FAGERLUND, A., BRILLARD, J., FURST, R., GUINEBRETIERE, M. H. & GRANUM, P. E. (2007):**

Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group  
BMC Microbiol 7, 43.

**FAGERLUND, A., LINDBACK, T., STORSET, A. K., GRANUM, P. E. & HARDY, S. P. (2008):**

*Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia  
Microbiology 154, 693 - 704.

**FARRAND, A. J., LACHAPELLE, S., HOTZE, E. M., JOHNSON, A. E. & TWETEN, R. K. (2010):**

Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface  
Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 4341 – 4346.

**FRANKARD, J., LI, R., TACCONE, F., STRUELENS, M. J., JACOBS, F. & KENTOS, A. (2004):**

*Bacillus cereus* pneumonia in a patient with acute lymphoblastic leukemia  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23, 725 - 728.

**FRICKER, M., MESSELHAUSSER, U., BUSCH, U., SCHERER, S. & EHLING-SCHULZ, M. (2007):**

Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks  
Appl Environ Microbiol 73, 1892 - 1898.

**GAUR, A. H., PATRICK, C. C., MCCULLERS, J. A., FLYNN, P. M., PEARSON, T. A., RAZZOUK, B. I., THOMPSON, S. J. & SHENEP, J. L. (2001):**

*Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children  
Clin Infect Dis 32, 1456 - 1462.

**GEDEK, W. (1986):**

*Bacillus-cereus*-Mastitiden beim Rind als Folge einer Arzneimittelkontamination. 1. Merkmale der Isolate

Tierärztliche Umschau 41, 526 - 530.

**GENY, B. & POPOFF, M. R. (2006):**

Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells

Biol Cell 98, 667 - 678.

**GIBSON, T. & GORDON, R. E. (1974):**

*Bacillus*.

Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed

Williams & Wilkins, Baltimore, 529 - 550.

**GILBERT, R. J. C. (2002):**

Pore-forming toxins

Cell Mol Life Sci 59, 832 - 844.

**GINSBURG, A. S., SALAZAR, L. G., TRUE, L. D. & DISIS, M. L. (2003):**

Fatal *Bacillus cereus* sepsis following resolving neutropenic enterocolitis during the treatment of acute leukemia

Am J Hematol 72, 204 - 208.

**GORDON, R. E., HAYNES, W. C. & PANG, C. H. N. (1973):**

The genus *Bacillus*

United States Department of Agriculture, Agric Handb, 427.

**GOUAUX, E. (1997):**

Channel-forming toxins: tales of transformation

Current Opinion in Structural Biology 7, 566 - 573.

**GRANUM, P. E. (1994):**

*Bacillus cereus* and its toxins

Soc Appl Bacteriol Symp Ser 23, 61 - 66.

**GRANUM, P. E. & LUND, T. (1997):**

*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins

Fems Microbiol Lett 157, 223 - 228.

**GRANUM, P. E., O'SULLIVAN, K. & LUND, T. (1999):**

The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*

Fems Microbiol Lett 177, 225 - 229.

**GRANUM, P. E. (2001):**

*Bacillus cereus* Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers

ASM Press, Washington DC, 373 - 381

**GROSSMAN, T. H., KAWASAKI, E. S., PUNREDDY, S. R. & OSBURNE, M. S. (1998):**

Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability

Gene 209, 95 - 103.

**GUINEBRETIERE, M. H., BROUSSOLLE, V. & NGUYEN-THE, C. (2002):**

Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains

J Clin Microbiol 40, 3053 - 3056.

**GUINEBRETIERE, M. H., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E. & NGUYEN-THE, C. (2006):**

Rapid discrimination of cytK-1 and cytK-2 genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system

Fems Microbiol Lett 259, 74 - 80.

**HARDY, S. P., LUND, T. & GRANUM, P. E. (2001):**

CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia

Fems Microbiol Lett 197, 47 - 51.

**HAUGE, S. (1950):**

Food poisoning caused by aerobic spore-forming *bacilli*

J Appl Bact 18, 591 - 595.

**HEINRICHS, J. H., BEECHER, D. J., MACMILLAN, J. D. & ZILINSKAS, B. A. (1993):**

Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*

J Bacteriol 175, 6760 - 6766.

**HERSHFIELD, V., BOYER, H. W., YANOFSKY, C., LOVETT, M. A. & HELINSKI, D. R. (1974):**

Plasmid ColE1 as a Molecular Vehicle for Cloning and Amplification of DNA

Proc Natl Acad Sci U S A 71, 3455 - 3459.

**HILLIARD, N. J., SCHELONKA, R. L. & WAITES, K. B. (2003):**

*Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate

J Clin Microbiol 41, 3441 - 3444.

**INFEKTIONSSCHUTZGESETZ, IFSG (2000)**

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen vom 20. Juli 2000

**JACKSON, S. G. (1993):**

Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*

J Clin Microbiol 31, 972 - 974.

**KATAYAMA, H., WANG, J., TAMA, F., CHOLLET, L., GOGOL, E. P., COLLIER, R. J. & FISHER, M. T. (2010):**

Three-dimensional structure of the anthrax toxin pore inserted into lipid nanodiscs and lipid vesicles

Proceedings of the National Academy of Sciences,

<http://www.pnas.org/content/early/2010/02/01/1000100107.long>.

**KATSUYA, H., TAKATA, T., ISHIKAWA, T., SASAKI, H., ISHITSUKA, K., TAKAMATSU, Y. & TAMURA, K. (2009):**

A patient with acute myeloid leukemia who developed fatal pneumonia caused by carbapenem-resistant *Bacillus cereus*

J Infect Chemother 15, 39 - 41.

**KINTZER, A. F., THOREN, K. L., STERLING, H. J., DONG, K. C., FELD, G. K., TANG, I. I., ZHANG, T. T., WILLIAMS, E. R., BERGER, J. M. & KRANTZ, B. A. (2009):**

The Protective Antigen Component of Anthrax Toxin Forms Functional Octameric Complexes

J Mol Biol 392, 614 - 629.

**KOTIRANTA, A., LOUNATMAA, K. & HAAPASALO, M. (2000):**

Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections

Microbes Infect 2, 189 - 198.

**KREFT, J., BERGER, H., HARTLEIN, M., MULLER, B., WEIDINGER, G. & GOEBEL, W. (1983):**

Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of the hemolysin (cereolysin) determinant from *Bacillus cereus*

J Bacteriol 155, 681 - 689.

**KUPPE, A., EVANS, L. M., MCMILLEN, D. A. & GRIFFITH, O. H. (1989):**

Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases

J Bacteriol 171, 6077 - 6083.

**LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F. ♥, WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. (2007):**

Clustal W and Clustal X version 2.0

Bioinformatics 23, 2947 - 2948.

**LINDBÄCK, T., OKSTAD, O. A., RISHOVD, A. L. & KOLSTO, A. B. (1999):**

Insertional inactivation of hblC encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes

Microbiology 145, 3139 - 3146.

**LINDBÄCK, T., FAGERLUND, A., RODLAND, M. S. & GRANUM, P. E. (2004):**

Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin

Microbiology 150, 3959 - 3967.

**LOGAN, N. A. & DE VOS, P. (2009a):**

Family I. *Bacillaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology  
DE VOS, P., GARRITY, G. M., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H.  
& WHITMAN, W. B., 2<sup>nd</sup>, 3, The *Firmicutes*, Springer, Dordrecht-Heidelberg-London-New  
York, pp. 20

**LOGAN, N. A. & DE VOS, P. (2009b):**

Genus I. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systemic Bacteriology  
DE VOS, P., GARRITY, G. M., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H.  
& WHITMAN, W. B., 2<sup>nd</sup>, 3, The *Firmicutes*, Springer, Dordrecht-Heidelberg-London-New  
York, pp. 21 - 128

**LUBENAU (1906):**

*Bacillus peptonificans* als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie  
Zbl Bakt I Abt Orig 40, 433 - 437.

**LUND, T. & GRANUM, P. E. (1996):**

Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after  
a foodborne outbreak  
Fems Microbiol Lett 141, 151 - 156.

**LUND, T. & GRANUM, P. E. (1997):**

Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three  
different strains of *Bacillus cereus*  
Microbiology 143, 3329 - 3336.

**LUND, T., DE BUYSER, M. L. & GRANUM, P. E. (2000):**

A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis  
Mol Microbiol 38, 254 - 261.

**MADIGAN, M. T. & MARTINKO, J. M. (2009):**

Brock Mikrobiologie  
11, Pearson Education, München u. a., 816 - 820

**MARLEY, E. F., SAINI, N. K., VENKATRAMAN, C. & ORENSTEIN, J. M. (1995):**

Fatal *Bacillus cereus* meningoencephalitis in an adult with acute myelogenous leukemia  
South Med J 88, 969 - 972.

**MÄRTLBAUER, E. & BÜRK, C. (2005):**

Pathogenitätsmechanismen. In: *Bacillus cereus*  
BECKER, B., Behrs Verlag, Hamburg, pp. 35 - 44

**MCKILLIP, J. L. (2000):**

Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review  
Antonie Van Leeuwenhoek 77, 393 - 399.

**MENESTRINA, G., DALLA SERRA, M. & PREVOST, G. (2001):**

Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family  
Toxicon 39, 1661 - 1672.

**MERGULHAO, F. J. M., SUMMERS, D. K. & MONTEIRO, G. A. (2005):**

Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*  
Biotechnol Adv 23, 177 - 202.

**MESSELHÄUSSER, U., FRICKER, M., EHLING-SCHULZ, M., ZIEGLER, H., ELMER-ENGLHARD, D., KLEIH, W. & BUSCH, U. (2007):**

Real-time-PCR-System for detection of *Bacillus cereus* (emetic type) in the food  
J Verbrauch Lebensm 2, 190 - 193.

**MIKKOLA, R., SARIS, N. E., GRIGORIEV, P. A., ANDERSSON, M. A. & SALKINOJA-SALONEN, M. S. (1999):**

Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*  
Eur J Biochem 263, 112 - 117.

**MIYAKE, K. (2004):**

Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2  
Trends Microbiol 12, 186 - 192.



**MOAYERI, M. & LEPPLA, S. H. (2009):**

Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin  
Molecular Aspects of Medicine 30, 439 - 455.

**MORAVEK, M., WEGSCHEIDER, M., SCHULZ, A., DIETRICH, R., BURK, C. & MÄRTL-BAUER, E. (2004):**

Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*  
Fems Microbiol Lett 238, 107 - 113.

**MORAVEK, M., DIETRICH, R., BUERK, C., BROUSSOLLE, V., GUINEBRETIERE, M. H., GRANUM, P. E., NGUYEN-THE, C. & MARTLBAUER, E. (2006):**

Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses  
Fems Microbiol Lett 257, 293 - 298.

**MOYER, A. L., RAMADAN, R. T., THURMAN, J., BURROUGHS, A. & CALLEGAN, M. C. (2008):**

*Bacillus cereus* induces permeability of an in vitro blood-retina barrier  
Infect Immun 76, 1358 - 1367.

**MUELLER, M., GRAUSCHOPF, U., MAIER, T., GLOCKSHUBER, R. & BAN, N. (2009):**

The structure of a cytolytic [agr]-helical toxin pore reveals its assembly mechanism  
Nature 459, 726-730.

**NIKODEMUSZ, I. (1965):**

Reproducibility of food poisoning in cats caused by *bacillus cereus*  
Zentralbl Bakteriol [Orig] 196, 81 - 87.

**PAANANEN, A., MIKKOLA, R., SARENEVA, T., MATIKAINEN, S., HESS, M., ANDERSSON, M., JULKUNEN, I., SALKINOJA-SALONEN, M. S. & TIMONEN, T. (2002):**

Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*  
Clin Exp Immunol 129, 420 - 428.

**PARKER, M. W. & FEIL, S. C. (2005):**

Pore-forming protein toxins: from structure to function  
Progress in Biophysics and Molecular Biology 88, 91 - 142.

**POPOFF, M. R. (2005):**

Bacterial Exotoxins  
Contributions to Microbiology, 28 - 54.

**PRIHA, O., HALLAMAA, K., SAARELA, M. & RAASKA, L. (2004):**

Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR  
J Ind Microbiol Biotechnol 31, 161 - 169.

**PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, PHLS (1972)**

Food poisoning associated with *Bacillus cereus*  
Br. Med. J., 1, 189

**PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, PHLS (1973)**

*Bacillus cereus* food poisoning  
Br. Med. J. , 3, 647

**QUAIL, M. A. (2005):**

DNA Cloning  
Encyclopedia of Life Sciences, doi: 10.1038/npg.els.0005344.

**ROWAN, N. J., CALDOW, G., GEMMELL, C. G. & HUNTER, I. S. (2003):**

Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *bacillus* species associated with nongastrointestinal infections  
Appl Environ Microbiol 69, 2372 - 2376.

**RYAN, P. A., MACMILLAN, J. D. & ZILINSKAS, B. A. (1997):**

Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*  
J Bacteriol 179, 2551 - 2556.

**SAKURAI, N., KOIKE, K. A., IRIE, Y. & HAYASHI, H. (1994):**

The rice culture filtrate of *Bacillus cereus* isolated from emetic-type food poisoning causes mitochondrial swelling in a HEP-2 cell

Microbiol Immunol 38, 337 - 343.

**SARIS, N. E. L., ANDERSSON, M. A., MIKKOLA, R., ANDERSSON, L. C., TEPLOVA, V. V., GRIGORIEV, P. A. & SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2009):**

Microbial toxin's effect on mitochondrial survival by increasing K<sup>+</sup> uptake

Toxicology and Industrial Health, (2009) doi: 10.1177/0748233709103405.

**SCHLEIF, R. (2000):**

Regulation of the -arabinose operon of *Escherichia coli*

Trends Genet 16, 559 - 565.

**SCHMIDT, F. R. (2004):**

Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry

Appl Microbiol Biotechnol 65, 363 - 372.

**SCHOENI, J. L. & WONG, A. C. L. (2005):**

*Bacillus cereus* food poisoning and its toxins

J Food Protect 68, 636 - 648.

**SCOBIE, H. M. & YOUNG, J. A. T. (2005):**

Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen

Current Opinion in Microbiology 8, 106 - 112.

**SEIDEL, K. E., PFISTERER, C., HORMANSDORFER, S. & BAUER, J. (1996):**

The detection of toxinogenic *Bacillus cereus* strains

Zentralbl Veterinarmed B 43, 421 - 428.

**SHINAGAWA, K., KONUMA, H., SEKITA, H. & SUGII, S. (1995):**

Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEP-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*

Fems Microbiol Lett. 130(1): 87 - 90.

**SIMONEN, M. & PALVA, I. (1993):**

Protein secretion in *Bacillus* species  
Microbiol Mol Biol Rev 57, 109 - 137.

**SIMONS, K. & IKONEN, E. (1997):**

Functional rafts in cell membranes  
Nature 387, 569 - 572.

**SMITH, N. R., GORDON, R. E. & CLARK, F. E. (1946):**

Aerobic mesophilic sporeforming bacteria  
United States Department of Agriculture, Misc Pub, 559.

**SMITH, N. R., GORDON, R. E. & CLARK, F. E. (1952):**

Aerobic sporeforming bacteria  
United States Department of Agriculture, Agric Monogr, 16.

**STEEN, M. K., BRUNO-MURTHA, L. A., CHAUX, G., LAZAR, H., BERNARD, S. & SULIS, C. (1992):**

*Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review  
Clin Infect Dis 14, 945 - 946.

**STENFORS ARNESEN, L. P., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. E. (2008):**

From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins  
Fems Microbiol Rev 32, 579-606.

**STENFORS, L. P. & GRANUM, P. E. (2001):**

Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihen-*  
*stephanensis*  
Fems Microbiol Lett 197, 223 - 228.

**STRICH, S. (1999):**

Untersuchungen zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung von *Bacillus cereus*-  
Exoproteinen  
Diss med vet, Ludwig-Maximilians-Universität München.

**STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. (1986):**

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes

J Mol Biol 189, 113 - 130.

**TEPLOVA, V. V., MIKKOLA, R., TONSHIN, A. A., SARIS, N. E. & SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2006):**

The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration

Toxicol Appl Pharmacol 210, 39 - 46.

**TERPE, K. (2006):**

Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems

Appl Microbiol Biotechnol 72, 211 - 222.

**THOMPSON, N. E., KETTERHAGEN, M. J., BERGDOLL, M. S. & SCHANTZ, E. J. (1984):**

Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*

Infect Immun 43, 887 - 894.

**TOKIEDA, K., MORIKAWA, Y., MAEYAMA, K., MORI, K. & IKEDA, K. (1999):**

Clinical manifestations of *Bacillus cereus* meningitis in newborn infants

J Paediatr Child Health 35, 582 - 584.

**TWETEN, R. K. (2005):**

Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins

Infect Immun 73, 6199 - 6209.

**VON HEIJNE, G. (1985):**

Signal sequences : The limits of variation

J Mol Biol 184, 99 - 105.

**WALLACE, A. J., STILLMAN, T. J., ATKINS, A., JAMIESON, S. J., BULLOUGH, P. A., GREEN, J. & ARTYMIUK, P. J. (2000):**

*E-coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy  
Cell 100, 265 - 276.

**WEAVER, R. F. & HEDRICK, P. W. (1996):**

Genetics  
3rd, McGraw, Hill Book Company Koga.

**WEHRLE, E., DIDIER, A., MORAVEK, M., DIETRICH, R. & MARTLBAUER, E. (2009):**

Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I  
Mol Cell Probes. (2009), doi:10.1016/j.mcp.2009.11.004

**WILKOP, T., XU, D. K. & CHENG, Q. (2008):**

Electrochemical characterization of pore formation by bacterial protein toxins on hybrid supported membranes  
Langmuir 24, 5615 - 5621.

**WONG, H. C., CHANG, M. H. & FAN, J. Y. (1988):**

Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products  
Appl Environ Microbiol 54, 699 - 702.

**YANG, I. C., SHIH, D. Y., HUANG, T. P., HUANG, Y. P., WANG, J. Y. & PAN, T. M. (2005):**

Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group  
J Food Prot 68, 2123 - 2130.

**YOON, S. H., KIM, S. K. & KIM, J. F. (2010):**

Secretory Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*  
Recent Pat Biotechnol. 4, 23 - 29.

## 8 Anhang

**Tabelle 1.** Mastermix PCR *nheC*

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,0
dNTPs (10 mM)	1,0
NheCfor3 (10 $\mu$ M)	2
NheCrev4 (10 $\mu$ M)	2
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5
A. bidest.	33,5
DNA	1
Gesamtvolumen	50,0

**Tabelle 2.** Amplifikationsbedingungen PCR *nheC*

Reaktionsschritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95	5 min
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	95	10 sec
2.2 Annealing	60	15 sec
2.3 Elongation	72	1 min 20 sec
Wiederholung: 35 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	20 min
4. Kühlung	4	bis zur Entnahme

**Tabelle 3.** Mastermix PCR *nheC*

Reagenz	Menge [µl]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,0
dNTPs (10 mM)	1,0
NheCfor1 (10 µM)	2
NheCrev1 (10 µM)	2
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5
A. bidest.	32,5
DNA	2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50,0</b>

**Tabelle 4.** Mastermix PCR *nheC*

Reagenz	Menge [µl]
10 x Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0
dNTPs (10 mM)	1,0
NheC_BamHI_for (10 µM)	2
NheC_XhoI_rev bzw. NheC_Xho_rev (10 µM)	2
Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5
A. bidest.	33,5
DNA	2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50,0</b>

**Tabelle 5.** Amplifikationsbedingungen PCR *nheC*

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95	5 min
2. Amplifikation: 2.1 Denaturierung	95	10 sec
2.2 Annealing	56	20 sec
2.3 Elongation	72	1 min 10 sec
Wiederholung: 40 x Schritte 2.1 – 2.3		
3. Stabilisierung	72	20 min
4. Kühlung	4	bis zur Entnahme



## Danksagung

*„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren,  
wo es vorher nur eines gegeben hat.“*

*-Thorstein Bunde Veblen-*

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer bedanken, nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für seine humorvolle Art und seinen unermüdlichen Einsatz (sogar während seiner Urlaubszeit) im Zeichen der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt meiner unerschütterlichen Betreuerin Dr. Andrea Didier, der nie die Ideen ausgingen, die immer mit aufbauenden Worten zu motivieren wusste und mit deren Hilfe und ohne überflüssigen „Schnulli“ wir diese Arbeit doch „gewuppt“ bekommen haben. Herrn Prof. Granum aus Oslo sei für die Bereitstellung des NheC-Plasmids gedankt. Ich möchte mich außerdem bei Dr. Maximilian Moravek, Dr. Richard Dietrich und Dr. Heinz Becker für die Ideen und Anregungen, den Beistand in jeder *Kursiv*-Lage, die humorvolle Art (mit der sie unsere Doktoranden-Scherze ertrugen), die Schoki und vor allem den Gartenzwerg bedanken. Ein großes Dankeschön geht an meine Mitstreiterin und Doktorandenkollegin Tina Padalak, die für jeden Spaß zu haben ist, die mir Mut gemacht und mir ein Grinsen abgerungen hat, auch wenn mir gar nicht danach war – Tina, danke dafür! Bruni, Franzi, Gabi, Susi und Maja sei nicht nur für die labortechnische Unterstützung sondern auch für die negativ-geprüften leckeren Eissorten gedankt! An alle (auch ehemaligen) Doktoranden geht ein herzliches Dankeschön für die lustige Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Hat sehr viel Spaß mit euch gemacht!

Nicht zu vergessen sei Dr. rer. nat. tech. Dr. med. vet. Eva Zeiler ☺, die nicht nur für mein leibliches (danke für den stets gefüllten Kühlschrank), sondern auch für mein sportliches Wohl gesorgt hat. Für Bergtouren und Snowboard-Wochenenden sei nicht nur Eva, sondern auch Oliver Labsch, Dominik Pommerening und Thomas Aichner gedankt. Auf dass noch viele solcher Aktionen folgen mögen! Dem Biologen und Bruder meines Vertrauens, Sebastian Gruber, möchte ich für seine kompetente fachliche sowie feierliche Unterstützung danken. Sandra Stelzer danke ich nicht nur für Punkt-und-Komma-Hilfen, sondern auch für die Telefonate zu jeder Tages- und Nachtzeit. Danke für diese Freundschaft!

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Vielen lieben Dank für Eure Unterstützung und Euer unerschütterliches Vertrauen, das Essen, den Wein, den Weihnachtsausflug in die große Stadt (danke Mama) und die wöchentlichen Stellenanzeigen aus der ZEIT (danke Papa). Ohne Euch wären dieses Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen.

DANKE!