

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 -

**Expression und Charakterisierung rekombinanter Einzelkomponenten des
HBL-Enterotoxinkomplexes von *Bacillus cereus***

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

von
Tina Padalak
aus Straubing

München 2010

Gedruckt mit der 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

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Allgemeines	3
2.1.1	Historischer Überblick	3
2.1.2	Taxonomische Einordnung	4
2.2	Erkrankungen durch <i>Bacillus cereus</i>	4
2.2.1	Extraintestinale Erkrankungen	4
2.2.2	Gastrointestinale Erkrankungen	5
2.3	<i>Bacillus cereus</i>- Toxine	6
2.3.1	Emetisches Toxin (Cereulid)	6
2.3.2	Cytotoxin K (CytK)	7
2.3.3	Non-hemolytic Enterotoxin (Nhe)	7
2.3.4	Haemolysin BL (HBL)	8
2.4	Regulation der Toxin-Expression	10
2.5	Nachweisverfahren für <i>Bacillus cereus</i>-Toxine	11
2.5.1	Immunchemische Methoden	11
2.5.2	Zellkulturtest	12
2.5.3	Weitere Nachweisverfahren	13
2.6	Wirkungsmechanismen bakterieller Toxine	13
2.6.1	Allgemeines	13
2.6.2	α -porenformende Toxine (α -PFT)	14
2.6.3	β -porenformende Toxine (β -PFT)	14
2.6.4	AB-Toxine	15

2.6.5	Typ III-Sekretions-System (T3S-System)	15
2.7	Herstellung rekombinanter Proteine	16
2.7.1	Allgemeines	16
2.7.2	Ligation	16
2.7.3	Expression	18
3	Eigene Untersuchungen	20
3.1	Materialien	20
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	20
3.1.2	Bakterienstämme bzw. -isolate	22
3.1.3	Zellen und Zelllinien	23
3.1.4	PCR-Primer	23
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	29
3.1.12	Sonstiges	29
3.2	Methodik	30
3.2.1	Methoden zur Vorbereitung der Klonierung	30
3.2.1.1	Anzucht von <i>B. cereus</i> in Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe-Bouillon	30
3.2.1.2	DNA-Extraktion aus <i>B. cereus</i>	30
3.2.1.3	Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit	30
3.2.1.4	PCR-Primer	31
3.2.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.1.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	32
3.2.2	Klonierung und Expression rekombinanter <i>B. cereus</i> -Toxine	33

3.2.2.1	Ligation von PCR-Produkten und pBAD-Vektor	33
3.2.2.2	Transformation von One Shot TOP 10 mit dem Ligationsansatz	33
3.2.2.3	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen	33
3.2.2.4	Herstellung kompetenter LMG 194 Zellen	34
3.2.2.5	Transformation von LMG 194 mit Plasmid-DNA	34
3.2.2.6	DNA-Sequenzierung	35
3.2.2.7	Proteinexpression	35
3.2.2.8	Zellaufschluss	36
3.2.2.9	Dialyseverfahren	36
3.2.2.10	Anlegen von Glycerinkulturen	36
3.2.3	Weiterführende Methoden zur Charakterisierung rekombinanter Proteine und deren Funktionalität	37
3.2.3.1	Enterokinase-Verdau	37
3.2.3.2	Immunaффinitätschromatographie (IAC)	37
3.2.3.3	indirekter Enzymimmuntest (EIA)	38
3.2.3.4	Gelelektrophorese und Immunoblot	38
3.2.3.5	Zytotoxizitätstest	39
3.2.3.6	Kopplung der monoklonalen Antikörper an Alexa Fluoreszenzfarbstoffe	40
3.2.3.7	Immunfluoreszenz	40
3.2.3.8	Hämolyseverhalten der Toxine auf Schafblut-Agarplatten	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Klonierung	42
4.2	Expression	44
4.3	Biologische Aktivität der rekombinanten Proteine	46
4.3.1	HBL-B	46
4.3.1.1	Hämolyseverhalten auf Schafblut-Agarplatten	46
4.3.1.2	Immunfluoreszenz	52
4.3.1.3	Zytotoxizitätstest	53
4.3.2	HBL-L ₁	53
4.3.2.1	Hämolyseverhalten auf Schafblut-Agarplatten	53
4.3.2.2	Immunfluoreszenz	55

4.3.2.3	Zytotoxizitätstest	56
4.3.3	HBL-L ₂	56
4.3.3.1	Immunfluoreszenz	56
4.3.3.2	Zytotoxizitätstest	57
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung	66
	Summary	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang	89

Abkürzungsverzeichnis

A. (bi)dest.	Aqua (bi)destillata, (zweifach) destilliertes Wasser
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BHI	Brain Heart Infusion, Hirn-Herz-Bouillon
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CaCo-2	Zelllinie aus Colonadenokarzinom Zellen
CGY	Caseinhydrolysat-Glucose-Yeast
CHO	Zelllinie aus Ovarienzellen chinesischer Hamster
CNBr	Cyanogenbromid
CytK	Cytotoxin K
DAPI	DNA-Fluoreszenzfarbstoff
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA	Desoxyribonuclei acid; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	double stranded, doppelsträngig
DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
EK	Enterokinase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetal calf serum
g	Erdschwerebeschleunigung
HBL	Haemolysin-BL
<i>hbl</i>	Gene des Haemolysin BL
HEp-2	Zelllinie aus humanen Larynxkarzinomzellen
HIS	Histidin
HlyE	Haemolysin E
HRP	Horseradish peroxidase
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IAS	Immunaффinitätschromatographie-Säule

kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LMG 194	<i>E. coli</i> -Expressionszelllinie
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal essential medium, Erhaltungsmedium
MHI	Milchhygieneinstitut
MLT	Mouse lethality test, Mäuse-Lethalitätstest
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium Bromid
Nhe	Non-hemolytic enterotoxin
<i>nhe</i>	Gene des Non-hemolytic enterotoxin
NVH	Norwegian School of Veterinary Science, Norwegische Sammlung von Mikroorganismen
OD	Optical density, optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Ped-2E9	Zelllinie aus murinen Lymphozyten
PEG	Polyethylenglycol
pH	pondus Hydrogenii
PlcR	Phospholipase C Regulator
RIL	Rabbit ileal loop test
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOC-Medium	SOB (Super Optimal Broth) mit Glukose-Zusatz
spp.	species pluralis
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
Vero	Zelllinie aus Affennierenzellen
VPR	Vascular permeability reaction
WST	Water soluble tetrazolium

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

1 Einleitung

Das ubiquitäre, grampositive und fakultativ anaerobe Bakterium *Bacillus cereus*, besitzt als Sporenbildner eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber diversen Umweltbedingungen. Durch das Vorkommen von psychrotrophen Stämmen und durch die Fähigkeit zur Sporenbildung ist *B. cereus* ein wichtiger Verderbserreger von Milch und Milchprodukten (z. B. die Süßgerinnung). *B. cereus* kann aber auch regelmäßig aus verschiedensten Lebensmitteln wie z. B. Nudeln, Reis, Gemüse und Fleisch isoliert werden. Vor Schädigungen durch übliche Reinigungs- und Desinfektionsmittel schützt sich *B. cereus* durch die Ausbildung von Biofilmen (RYU & BEUCHAT, 2005; FAILLE *et al.*, 2007; WIJMAN *et al.*, 2007).

Durch die Produktion verschiedener extrazellulärer Toxine steht *B. cereus* im Zusammenhang mit einer in den letzten Jahren deutlichen Zunahme lebensmittelassoziierter Erkrankungen (KOTIRANTA *et al.*, 2000; DGE, 2004, 2008). Die durch *B. cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen zeigen gastrointestinale Verlaufsformen, wobei sich im klinischen Bild eine Diarrhoe-Form und eine emetische Form unterscheiden lassen (SCHOENI & WONG, 2005; STENFORS ARNESEN *et al.*, 2008). Die emetische Verlaufsform wird von dem hitzestabilen, zyklischen Peptid Cereulid verursacht (AGATA *et al.*, 1995). Als Ursache für die Diarrhoe-Form, werden nach bisherigen Erkenntnissen, die aus jeweils drei Komponenten bestehenden Protein-Komplexe Haemolysin-BL (BEECHER *et al.*, 1995b) und Non-hemolytic enterotoxin (LUND & GRANUM, 1996) sowie das Einzelprotein Cytotoxin K (LUND *et al.*, 2000) angesehen. Des Weiteren verursacht *B. cereus* eine Reihe verschiedener, zum Teil schwer verlaufender, extraintestinaler Erkrankungen (DROBNIEWSKI, 1993; KOTIRANTA *et al.*, 2000). Auch beim Tier sind Erkrankungen (z. B. Mastitiden, Dermatitis) durch *B. cereus* beschrieben.

Bisherige Studien zur Wirkungsweise des HBL-Enterotoxins von *B. cereus* wurden mittels chromatographisch aufgereinigten Einzelkomponenten durchgeführt (BEECHER *et al.*, 1995b). Hierbei kann es zu Problemen bezüglich der Reinheit der Einzelproteine, Verlust der Toxinaktivität und zu instabilen Toxinpräparationen kommen (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM, 1996). Da auch bei rekombinanter Herstellung in früheren Studien (HEINRICHS *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 1997) Schwierigkeiten aufgetreten sind, war es Ziel dieser Arbeit, ein geeignetes Expressionssystem für die drei Enterotoxin-Komponenten des HBL-Komplexes zu etablieren und diese auf ihre biologische Aktivität zu überprüfen. Darüber hinaus sollte mittels Immunfluoreszenz die Bindung der Einzelkomponenten an Vero-Zellen überprüft werden.

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines

2.1.1 Historischer Überblick

Erste Hinweise auf *Bacillus cereus* als Erreger von gastrointestinalen Erkrankungen stammen aus einer Untersuchung von LUBENAU aus dem Jahre 1906. Ihm gelang es in einem Lebensmittelvergiftungsfall einen Keim nachzuweisen, bei dem es sich aufgrund seiner Eigenschaften (Koloniemorphologie, Hämolyse, Sporenbildung, Abbau von Milcheiweiß, Glukoseabbau) um *B. cereus* gehandelt haben könnte (LUBENAU, 1906). In den darauf folgenden Jahren wurden immer wieder aerobe Sporenbildner in Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen und den daraus resultierenden Magen-Darm-Erkrankungen gebracht (SEITZ, 1913; BREKENFELD, 1926; TRÜB & WUNDRAM, 1942). Die erste wissenschaftliche Beschreibung, einer durch *B. cereus* hervorgerufenen gastrointestinalen Erkrankung, erfolgte durch HAUGE im Jahre 1950. Hier konnte nach einer Lebensmittelvergiftung ein grampositives Stäbchen isoliert werden, welches die typischen Eigenschaften (Haemolysin- und Lecithinasebildung, geringe Beweglichkeit, Gelatineverflüssigung, Eiweißabbau in Milch, Nitratreduktion, Stärkeabbau und rasche Vermehrung) von *B. cereus* aufwies. Die Symptome (Bauchschmerzen, profuse wässrige Durchfälle, Übelkeit) ließen sich mit einem bei dem Ausbruch isolierten Stamm in dem von HAUGE durchgeführten Selbstversuch reproduzieren (HAUGE, 1955). Zu Beginn der 70er Jahre traten in England dokumentierte Intoxikationsfälle auf, die mit *B. cereus* in Zusammenhang standen und als Leitsymptom Erbrechen zeigten (PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, 1972; PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, 1973; MORTIMER & MCCANN, 1974).

2.1.2 Taxonomische Einordnung

Bacillus spp. lassen sich aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften in mehrere Gruppen einteilen (1A, 1B, 2 und 3). *B. cereus* gehört zur morphologischen Gruppe 1A der Gattung *Bacillus*. Mit Ausnahme von *B. megaterium* werden deren Vertreter oft auch zu der so genannten "Cereus-Gruppe" zusammengefasst. Hierzu gehören neben *B. cereus* die Spezies *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* und *B. weihenstephanensis*. Die Spezies dieser genetisch eng verwandten Gruppe können nach (GRANUM, 2007) anhand der in Tabelle 1 aufgeführten Merkmale differenziert werden.

Tabelle 1. Speziesdifferenzierung innerhalb der Cereus-Gruppe nach GRANUM (2007)

Spezies	Kolonie-Morphologie	Hämolyse	Beweglichkeit	Penicillin-Empfindlichkeit	Parasporale Kristalle
<i>B. cereus</i>	weiß	+	+	-	-
<i>B. anthracis</i>	weiß	-	-	+	-
<i>B. thuringiensis</i>	weiß/grau	-	+	-	+
<i>B. mycoides</i>	rhizoid	(+)	-	-	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	Abgrenzung zu <i>B. cereus</i> : Wachstum bei < 7 °C, nicht bei 43 °C; Identifizierung mit PCR (rRNA, Cold-shock-Protein-A-Gen- <i>cspA</i> ; LECHNER <i>et al.</i> , 1998)				
<i>B. pseudomycoides</i>	Abgrenzung zu <i>B. mycoides</i> nur anhand des Fettsäuremusters und der 16S rRNA-Sequenz				

2.2 Erkrankungen durch *Bacillus cereus*

2.2.1 Extraintestinale Erkrankungen

Neben den gastrointestinalen Symptomen sind in der Literatur auch zahlreiche Fälle beschrieben, bei denen *B. cereus* als Auslöser für systemische Infektionen wie Septikämien (GINSBURG *et al.*, 2003; HILLIARD *et al.*, 2003), Pneumonien (FRANKARD *et al.*, 2004; KATSUYA *et al.*, 2009), Endokarditiden (STEEN *et al.*, 1992) und Infektionen des ZNS (TOKIEDA *et al.*, 1999; GAUR *et al.*, 2001) angesehen wird. Des Weiteren sind lokale Manifestationen wie Wundinfektionen (DUBOUIX *et al.*, 2005), Arthritiden und zu den wegen ihren schnellen Verlaufs gefürchteten Endophthalmitiden (BEECHER *et al.*, 1995a; BEECHER *et al.*, 2000; MOYER *et al.*, 2008) beschrieben. Sowohl bei den systemischen als auch bei den lokalen Infektionen kommt es, vor allem bei Säuglingen und immun-

supprimierten Personen, häufig zu schweren Verlaufsformen z. T. mit tödlichem Ausgang (PATRICK *et al.*, 1989; DROBNIEWSKI, 1993).

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die Pathogenitätsmechanismen, die diesen Erkrankungen zugrunde liegen, bzw. ist die mögliche Rolle, die von *B. cereus* produzierten Exotoxine oder Enzyme dabei spielen, noch ungeklärt. Einen ersten Hinweis auf die Beteiligung von Enterotoxinen an extraintestinalen Erkrankungen konnte durch den Nachweis von Haemolysin-BL in Fällen von Endophthalmitiden durch BEECHER *et al.* (2000) erbracht werden. Auch sind Fälle dokumentiert, bei denen Patienten mit einer Sepsis zusätzlich eine gastrointestinale Symptomatik zeigten (KOBAYASHI *et al.*, 2005; KIYOMIZU *et al.*, 2008).

Nicht nur beim Menschen treten durch *B. cereus* induzierte extraintestinale Erkrankungen auf. So wurden im Jahre 1957 unabhängig voneinander durch TERPLAN und durch BROWN und SCHERER über von *B. cereus* hervorgerufene Euterentzündungen beim Rind berichtet. Auch gab es nach Anwendung kontaminierter Trockenstellpräparate dokumentierte Fälle von akuten Mastitiden, die mit schweren Störungen des Allgemeinbefindens einhergingen (EWALD *et al.*, 1985; GEDEK, 1986). Bei kleinen Wiederkäuern, Rindern und Pferden konnte bei Aborten ebenfalls eine Beteiligung von *B. cereus* nachgewiesen werden (RANGANATHA *et al.*, 1981; SCHUH & WEINSTOCK, 1985; ROWAN *et al.*, 2003).

2.2.2 Gastrointestinale Erkrankungen

Anhand der Symptomatik kann man die durch *B. cereus* hervorgerufenen gastrointestinalen Erkrankungen in eine emetische und in eine Diarrhoe-Form unterteilen. Die vorherrschenden Symptome der emetischen Form (Übelkeit und Erbrechen), die nach einer Inkubationszeit von 0,5 – 6 Stunden auftreten, klingen in der Regel nach einer Erkrankungsdauer von 6 – 24 Stunden meist ohne Schäden wieder ab (KRAMER & GILBERT, 1989; STENFORS ARNESEN *et al.*, 2008). Allerdings kann es speziell bei Kindern und Jugendlichen zu schweren Leberinsuffizienzen und zu Todesfällen kommen (MAHLER *et al.*, 1997; DIERICK *et al.*, 2005). Auslöser dieser Form ist das gegen Hitze, Säure und proteolytische Enzyme resistente zyklische Peptid Cereulid (AGATA *et al.*, 1995), welches im Lebensmittel in der Regel präformiert vorliegt. Das Krankheitsbild tritt oft nach dem Verzehr von kontaminierten stärkehaltigen Lebensmitteln wie z. B. Reis und Nudeln auf (SCHOENI &

WONG, 2005; GRANUM, 2007) und gleicht einer Intoxikation durch *Staphylococcus aureus*- Enterotoxine.

Das klinische Bild der Diarrhoe-Form mit profusen, wässrigen Durchfällen, Bauchschmerzen, Enddarmkrämpfen und mäßiger Übelkeit stellt sich nach einer Inkubationszeit von 8 – 16 Stunden ein und hält in der Regel etwa 12 Stunden an (KRAMER & GILBERT, 1989). Das Krankheitsbild ähnelt einer *Clostridium perfringens*-Infektion. Als Auslöser der Diarrhoe-Form werden hitzelabile, trypsinempfindliche Enterotoxine beschrieben, welche nach Aufnahme von mit Sporen oder vegetativen Bakterienzellen kontaminierten Lebensmitteln, im Dünndarm gebildet werden (CLAVEL *et al.*, 2004; STENFORS ARNESEN *et al.*, 2008). Zu diesen Enterotoxinen gehören Haemolysin-BL (BEECHER *et al.*, 1995b), Non-hemolytic enterotoxin (LUND & GRANUM, 1996) und Cytotoxin K (LUND *et al.*, 2000).

Auch bei Hunden und Katzen konnte ein Auftreten von gastrointestinalen Symptomen nach dem Verzehr von mit *B. cereus* kontaminiertem Futter beobachtet werden (NIKODEMUSZ, 1965; NIKODEMUSZ, 1967). Bei Katzen kam es nach länger andauernder Fütterung zu Todesfällen (NIKODEMUSZ & GONDA, 1966).

2.3 *Bacillus cereus*-Toxine

2.3.1 Emetisches Toxin (Cereulid)

Das für die emetische Verlaufsform verantwortliche Cereulid ist ein aus drei identischen Tetrapeptid-Fragmenten bestehendes zyklisches Dodekadepsipeptid mit einem Molekulargewicht von 1,191 kDa. Aufgrund sich abwechselnder Ester- und Peptidbindungen der Aminosäuren D-Leucin, D-Alanin und L-Valin besitzt es stark hydrophobe Eigenschaften (AGATA *et al.*, 1994). Es ist resistent gegen Hitze, Säure sowie proteolytische Enzyme, kann somit auch in erhitzten Nahrungsmitteln vorkommen und ist äußerst widerstandsfähig gegenüber im Magen gebildeter Säure und Enzymen (EHLING SCHULZ *et al.*, 2004). Die Synthese des Cereulids erfolgt über eine nicht-ribosomale Peptidsynthese (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2005). Es besitzt eine ähnliche Struktur wie das Makrolid-Antibiotikum

Valinomycin und fungiert wie dieses als Kalium-Ionophor mit der Eigenschaft das Membranpotential der Mitochondrien zu beeinträchtigen (MIKKOLA *et al.*, 1999).

2.3.2 Cytotoxin K (CytK)

Im Jahre 1998 konnte bei einer Lebensmittelerkrankung in einem französischen Altenheim, bei der es zu blutiger Diarrhoe und drei Todesfällen kam, erstmals das Exoprotein Cytotoxin K (33,8 kDa) isoliert werden (LUND *et al.*, 2000). Das Enterotoxin Cyt K welches nekrotische, zytotoxische und hämolytische Eigenschaften zeigt, besitzt große Ähnlichkeit mit porenbildenden Toxinen: α -Haemolysin (gleiche Größe, Homologie der AS-Sequenz von 30 %) und β -Haemolysin von *S. aureus*, β -Toxin von *C. perfringens* (LUND *et al.*, 2000; FAGERLUND *et al.*, 2004).

An künstlichen Doppellipidschichten konnte gezeigt werden, dass CytK über porenbildende Eigenschaften verfügt und für Vero- und CaCo-2-Zellen hochtoxisch ist (LUND *et al.*, 2000; HARDY *et al.*, 2001). Bei weiteren Studien wurde eine genetische Variante des originären CytK entdeckt, welche eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 89 % zeigte. Demnach wurde das bei dem 1998 erstmals isolierten Stamm NVH 391/98 nachgewiesene Cytotoxin K als CytK-1 und die 2004 entdeckte Variante als CytK-2 bezeichnet (FAGERLUND *et al.*, 2004). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind nur insgesamt drei Stämme mit CytK-1 beschrieben worden (FAGERLUND *et al.*, 2007). Für CytK-2 konnte bisher nur eine geringe biologische Aktivität nachgewiesen werden (FAGERLUND *et al.*, 2004). Aufgrund der geringen Verbreitung der wesentlich höher zelltoxischen CytK-1 Variante, ist CytK vermutlich nur von geringer epidemiologischer Bedeutung.

2.3.3 Non-hemolytic enterotoxin (Nhe)

Im Zusammenhang mit einer Lebensmittelinfektion in Norwegen im Jahre 1995 wurde der *B. cereus*-Stamm NVH 0075/95 isoliert. Bei ihm konnte von LUND und GRANUM erstmals der aus drei Proteinen (NheA, NheB und NheC) bestehende Enterotoxinkomplex Nhe nachgewiesen und charakterisiert werden (LUND & GRANUM, 1996). Die Gene (*nheA*, *nheB* und *nheC*) der drei Protein-Komponenten NheA (41 kDa), NheB (39,8 kDa) und NheC

(36,5 kDa) sind auf einem Operon (Abb. 1) kodiert (GRANUM *et al.*, 1999), die Expression wird durch den Phospholipase C-Regulator (PlcR) kontrolliert (AGAISSE *et al.*, 1999). In molekularbiologischen Studien konnte bei den untersuchten *B. cereus*-Isolaten eine Häufigkeit der Gene *nheA*, *nheB* und *nheC* von mehr als 90 % ermittelt werden (IN'T VELD *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2005; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2006; NGAMWONGSATIT *et al.*, 2008; WEHRLE *et al.*, 2009).

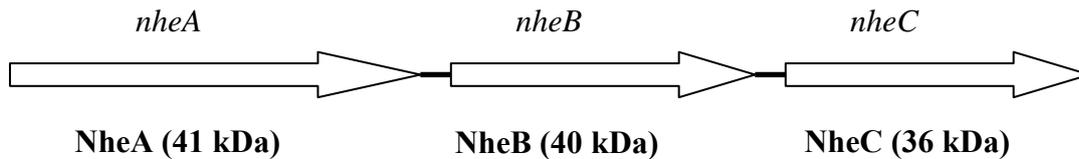


Abbildung 1. Aufbau des *nhe* Operons nach GRANUM (2007)

Nach erfolgten Gen-Sequenzierungen konnten bei den Nhe-Komponenten sowohl untereinander, wie auch zu den HBL-Komponenten Homologien beschrieben werden, wobei die Ähnlichkeit zwischen den beiden Enterotoxinkomplexen bei NheA und HBL-L₂, NheB und HBL-L₁ bzw. NheC und HBL-B am größten sind (GRANUM *et al.*, 1999). Mithilfe von Zellkultur-Assays konnten FAGERLUND *et al.* (2008) zeigen, dass Nhe die Fähigkeit zur Bildung transmembraner Poren besitzt, wodurch es zum osmotisch bedingten Anschwellen der Zellen und schließlich zur Lysis der Plasmamembran kommt.

Die maximale biologische Aktivität wird nur erreicht, wenn alle drei Komponenten in einem bestimmten Mengenverhältnis (NheA : NheB : NheC von 10:10:1) vorliegen (LINDBÄCK *et al.*, 2004). Für Nhe wie auch für HBL konnte bisher noch kein spezifischer Zellrezeptor identifiziert werden und es liegt die Vermutung nahe, dass Nhe sich auch ohne einen solchen an die Zelloberfläche binden kann (FAGERLUND *et al.*, 2008; STENFORS ARNESEN *et al.*, 2008).

2.3.4 Haemolysin BL (HBL)

Die erste Erwähnung von Haemolysin-BL stammt aus dem Jahre 1990. Damals beschrieben BEECHER und MACMILLAN (1990) einen Enterotoxinkomplex bei dem aus einer postoperativen Wundinfektion isolierten *B. cereus*-Stamm F 837/76 (TURNBULL *et al.*,

1979). Die drei Proteinkomponenten des Enterotoxins wurden kurze Zeit später als HBL-B (38,1 kDa), HBL-L₁ (39,5 kDa) und HBL-L₂ (44,8 kDa) bezeichnet (BEECHER & MACMILLAN, 1991). Sie werden durch die Gene *hblC*, *hblD* und *hblA* kodiert, welche wie die des Nhe auf einem Operon liegen (Abb. 2) und in eine mRNA transkribiert werden (HEINRICHS *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 1997; LINDBÄCK *et al.*, 1999).

Die Expression von HBL wird, ebenso wie die einiger weiterer Exoproteine von *B. cereus*, durch den PlcR positiv beeinflusst (AGAISSE *et al.*, 1999; GOHAR *et al.*, 2002). Bei den HBL-Komponenten verschiedener Stämme konnte gezeigt werden, dass vom *hbl*-Operon zwei unterschiedliche Varianten (*hblCDA* und *hblCDAB*) vorkommen können (STENFORS ARNESEN *et al.*, 2008). Bei der häufiger auftretenden Form befindet sich unterhalb *hblCDA* ein weiteres Gen (*hblB*) welches eine hohe Sequenzhomologie mit *hblA* aufweist, aber vermutlich ein Pseudogen darstellt, da es nicht in einer nachweisbaren Menge exprimiert wird (HEINRICHS *et al.*, 1993; GRANUM & LUND, 1997; RYAN *et al.*, 1997; STENFORS ARNESEN *et al.*, 2008).

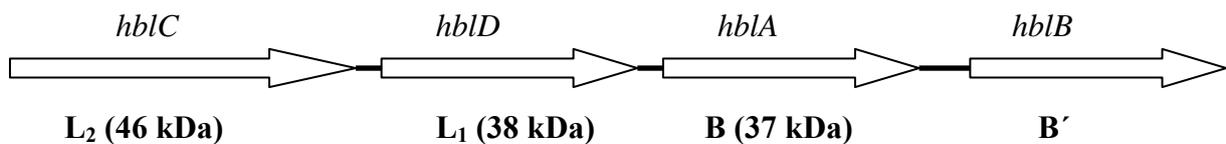


Abbildung 2. Aufbau des *hbl* Operons nach GRANUM (2007)

Es wurden auch Sequenzhomologien zu den Nhe-Komponenten beschrieben (siehe 2.3.3 Nhe). Die Häufigkeit des Vorkommens der *hbl*-Gene liegt zwischen 43 – 83 % (IN'T VELD *et al.*, 2001; GUINEBRETIERE *et al.*, 2002; THAENTHANEE *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2006; NGAMWONGSATIT *et al.*, 2008). Für eine maximale biologische Aktivität ist, wie beim Nhe, das Vorhandensein aller drei Komponenten erforderlich. Im Gegensatz zum Nhe, bei dem das Verhältnis 10:10:1 als erforderlich gilt, wird beim HBL von einem Mengenverhältnis der drei Komponenten von 1:1:1 ausgegangen (BEECHER *et al.*, 1995b; DIETRICH *et al.*, 1999).

In Tierversuchen konnte die biologische Wirkung des HBL mit Hilfe von RIL (rabbit ileal loop test), VPR (vascular permeability reaction) und MLT (mouse lethality test) gezeigt werden. Weitere biologische Eigenschaften des HBL-Toxins sind die Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen (LUND & GRANUM, 1997) sowie die ringförmige diskontinuierliche Hämolyse

auf Schafblut-Agar (BEECHER & MACMILLAN, 1990; BEECHER & MACMILLAN, 1991), die vermutlich im Zusammenhang mit zwei von *B. cereus* gebildeten Enzymen (Sphingomyelinase und Phospholipase C) steht (BEECHER & WONG, 2000). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass nicht bei allen *hbl*- bzw. HBL- positiv getesteten Stämmen eine diskontinuierliche Hämolyse auf Schafblut-Agar auftritt (IN'T VELD *et al.*, 2001).

Hinsichtlich des Wirkungsmechanismus des HBL-Toxins gibt es zwei verschiedene Hypothesen, welche durch die Arbeitsgruppe um BEECHER erstellt wurden. Laut der ersten Hypothese soll zuerst die B-Komponente an die Zelloberfläche binden, dann eine Einschleusung der beiden lytischen Komponenten L₁ und L₂ bewirken und danach den Metabolismus der Zelle stören (BEECHER & MACMILLAN, 1991). Gemäß der zweiten Hypothese von BEECHER binden die HBL-Komponenten unabhängig voneinander an die Zelloberfläche, formen einen sogenannten „membrane attack complex“ und bilden transmembranäre Poren, wodurch es durch kolloidosmotische Mechanismen schließlich zum Austreten von Zellbestandteilen bis hin zum Zelltod kommt (BEECHER & WONG, 1997).

2.4 Regulation der Toxin-Expression

Die Expression des emetischen Toxins (Cereulid) und der Diarrhoe-Toxine (HBL, Nhe, CytK) werden in Abhängigkeit der Wachstumszyklen und der Umgebung durch eine Anzahl an interagierenden Regulatoren gesteuert (GOHAR *et al.*, 2008; LÜCKING *et al.*, 2009).

Eine Besonderheit der *Cereus*-Gruppe ist der spezifische pleiotrope Phospholipase C Regulator (PlcR), der die Transkription der Toxin-Gene *hbl*, *nhe* und *cytK* kontrolliert. Der PlcR-Regulator wird zu Beginn der stationären Wachstumsphase maximal exprimiert. Seine Bindung an die zu kontrollierenden Gene erfolgt oberhalb von diesen an spezifische DNA-Sequenzen, so genannte PlcR-Boxen. PlcR ist Teil eines Quorum-Sensing-Systems, welches *B. cereus* ermöglicht, die Expression der Virulenz-Gene in Abhängigkeit von der Keimdichte zu regulieren. Die PlcR-Transkription wird selbstständig gesteuert und kann durch den *B. cereus* Sporulationsfaktor SpoOA unterdrückt werden (AGAISSE *et al.*, 1999; GOHAR *et al.*, 2002; GOHAR *et al.*, 2008).

Die Cereulid-Expression dagegen ist PlcR-unabhängig und setzt die Aktivität des Sporulationsfaktors SpoOA voraus. Die Unterdrückung erfolgt durch den Transkriptionsfaktor AbrB. Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Signalwege liegen jedoch bisher noch nicht vor (LÜCKING *et al.*, 2009; DOMMEL *et al.*, 2010).

Die Menge der exprimierten Toxine wird durch verschiedene Umgebungsfaktoren wie z. B. Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- und CO₂-Konzentrationen sowie das Nährstoffangebot beeinflusst (SUTHERLAND & LIMOND, 1993; AGATA *et al.*, 1999; FINLAY *et al.*, 2000; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2004; JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 2004; GAILLARD *et al.*, 2005; KRAUSE, 2007; APETROAIE-CONSTANTIN *et al.*, 2008).

2.5 Nachweisverfahren für *Bacillus cereus*-Enterotoxine

Im Hinblick auf die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit soll bei der Beschreibung der Nachweisverfahren schwerpunktmäßig auf immunochemische Methoden und Zellkulturtests eingegangen werden.

2.5.1 Immunochemische Methoden

Zum spezifischen Nachweis von *B. cereus*-Enterotoxinen sind derzeit zwei immunochemische Testkits, die mit polyklonalen Antisera arbeiten, kommerziell erhältlich. Zum Nachweis der HBL-L₂-Komponente gibt es den BCET-RPLA Toxin Assay (Oxoid) wobei es sich um einen Latexagglutinationstest handelt (BEECHER & WONG, 1994a). Mit dem TECRA-BDE, einem Sandwich-ELISA, kann die NheA-Komponente des Nhe nachgewiesen werden (LUND & GRANUM, 1996). Die Spezifität der beiden Tests ist, da die verwendeten polyklonalen Antisera auch mit weiteren *B. cereus*-Exoproteinen reagieren, begrenzt (BEECHER & WONG, 1994a; LUND & GRANUM, 1996).

Seit 2008 steht mit dem Duopath-System (Merck) ein Schnelltest zur Verfügung, der auf monoklonalen Antikörper basierend, gleichzeitig die Enterotoxin-Komplexe HBL (Nachweis von HBL-L₂) und Nhe (Nachweis von NheB) nachweist. Zusätzlich zu den hier verwendeten monoklonalen Antikörpern wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch weitere monoklonale Antikörper gegen HBL-L₁, HBL-B und NheA sowie ein polyklonales

Antiserum gegen NheC entwickelt (DIETRICH *et al.*, 1999; MORAVEK *et al.*, 2004; DIETRICH *et al.*, 2005; MORAVEK *et al.*, 2006).

2.5.2 Zellkulturtests

Um die zytotoxische Aktivität von *B. cereus* zu testen, werden heute Zellkulturtests angewendet. Hierbei werden Zellen mit sterilfiltrierten Kulturüberständen von *B. cereus* oder gereinigten Enterotoxinen inkubiert. Um die Vitalität der Zellen zu beurteilen werden diese mikroskopisch beurteilt. Hierbei können zytopathische Effekte wie z. B. die Abkuglung der Zellen eines Monolayers beurteilt werden. Für den Test eignen sich verschiedene tierische (CHO, Mc Coy, Vero, Ped-2E9) und humane Zelllinien (CaCo-2, HEp-2, HeLa, HEL, APRE-19). In der letzten Zeit haben die für *B. cereus*-Toxine besonders empfindlichen Vero-Zellen (WONG *et al.*, 1988) sowie die zur Beurteilung der Enteropathogenität von *B. cereus* Stämmen gut geeignete CaCo-2 Zelllinie (Colonkarzinomzellen), die im besonderen Maße empfindlich gegenüber CytK zu sein scheint (HARDY *et al.*, 2001), immer mehr an Bedeutung gewonnen (FAGERLUND *et al.*, 2004; LINDBÄCK *et al.*, 2004; DIETRICH *et al.*, 2005; MORAVEK *et al.*, 2006; FAGERLUND *et al.*, 2008).

Durch Messung stoffwechselphysiologischer Parameter wie z. B. im Kristallviolett-Test, MTT- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) bzw. WST- (Water-soluble tetrazolium salt) Test, Laktatdehydrogenase-Test bzw. Alkalische-Phosphatase-Test oder durch Bestimmung der Proteinsynthesehemmung können ebenfalls Aussagen zur zytotoxischen Aktivität gemacht werden. Eine objektive Beurteilung metabolischer Aktivitäten der Zellen erfolgt durch den MTT- bzw. WST-Test. Hierbei werden durch mitochondriale Enzyme Tetrazoliumsalze zu Formazankristallen reduziert, und der dabei entstehende Farbumschlag kann kolorimetrisch im Spektralphotometer (ELISA-Reader) gemessen werden (MOSMANN, 1983; FERRARI *et al.*, 1990). Der WST-Test besitzt im Vergleich zum MTT-Test eine kürzere Inkubationszeit und ist einfacher in der Anwendung (DIETRICH *et al.*, 1999).

Als Nachweis für das emetische Toxin ist ein auf HEp-2 Zellen basierender Zellkulturtest beschrieben (HUGHES *et al.*, 1988; MIKAMI *et al.*, 1994; FINLAY *et al.*, 1999).

2.5.3 Weitere Nachweisverfahren

Um die Pathogenität von *B. cereus*-Isolaten zu testen wurden früher verschiedene Tiermodelle angewendet, die heute nur noch für spezielle Fragestellungen eingesetzt werden. Hierzu gehören der Darmschlingen-Ligationstest RIL (rabbit ileal loop test; SPIRA & GOEPFERT, 1972), der MLT (mouse lethality test), der Hautreaktionstest beim Meerschweinchen (GLATZ & GOEPPERT, 1973) sowie die VPR (vascular permeability reaction) beim Kaninchen. Für den Nachweis des emetischen Toxins wird ein Affenfütterungstest beschrieben (MELLING *et al.*, 1976).

Als molekularbiologisches Nachweisverfahren ist in den letzten Jahren vor allem die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis der verschiedenen Toxin-Gene entwickelt worden. Beschrieben werden in diesem Zusammenhang multiplex PCRs und Real-time PCRs (YANG *et al.*, 2005; EHLING-SCHULZ *et al.*, 2006; FRICKER *et al.*, 2007; WEHRLE *et al.*, 2009; WEHRLE *et al.*, 2010)

2.6 Wirkungsmechanismen bakterieller Toxine

2.6.1 Allgemeines

Bakterielle Toxine wirken auf unterschiedlichste Weise auf ihre Zielzellen. Bekannt sind einerseits spezifische Wechselwirkungen mit Hemmung von intrazellulären Prozessen (z. B. Proteinbiosynthese) oder andererseits Beeinträchtigungen der Zellmembran durch Porenbildung. Die gebildeten Poren dienen entweder dazu, Pathogenitätsfaktoren in die Zelle einzuschleusen, oder es kommt zu massiven Störungen des intrazellulären Milieus, die letztendlich zum Zelltod führen (TILLEY & SAIBIL, 2006). Nachdem für CytK, HBL und Nhe von *B. cereus* porenbildende Eigenschaften nachgewiesen bzw. postuliert werden (BEECHER & WONG, 1997; HARDY *et al.*, 2001; FAGERLUND *et al.*, 2008) soll im Folgenden ein Überblick über porenbildende bakterielle Toxine gegeben werden:

2.6.2 α -porenbildende Toxine (α -PFT)

Diese Gruppe bakterieller Toxine durchbricht die Doppellipidschicht der Zellmembran in Form einer transmembranen α -Helix. Dabei dringt eine so genannte "hairpin"-Struktur, die stark hydrophobe Eigenschaften besitzt, in die Zellmembran ein (GENY & POPOFF, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2008). Durch lokale Mechanismen (z. B. pH-Wert-Absenkung) kommt es zur teilweisen Umfaltung der Proteine und dadurch zur spontanen Einlagerung in die Doppellipidschicht und somit zur Porenbildung. Allerdings ist dieser Vorgang noch nicht in allen Einzelheiten erforscht (GONZALEZ *et al.*, 2008). MUELLER *et al.* (2009) konnten mit ihrer Studie zum Cytolysin A (ClyA; auch als HlyE bezeichnet) von *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* wesentlich zum Verständnis der komplexen Struktur und Funktion von α -PFTs beitragen. Nachdem Röntgenkristallstrukturanalysen von HBL-B eine ähnliche Struktur wie ClyA ergeben haben, liegt die Vermutung nahe, dass HBL-B auch porenbildende Eigenschaften besitzt (MADEGOWDA *et al.*, 2008). Als weitere Beispiele für α -PFTs sind zu nennen: Colicin von *E. coli*, Cry5B von *B. thuringiensis* oder δ -Haemolysin von *S. aureus* (GENY & POPOFF, 2006; TILLEY & SAIBIL, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2008).

2.6.3 β -porenbildende Toxine (β -PFT)

Im Gegensatz zu den α -PFTs ist der Porenbildungsprozeß bei den β -PFTs weitgehend erforscht. Nach der Bindung von frei löslichen Einzelproteinen an Rezeptoren der Zelloberfläche entstehen aus mehreren nebeneinander liegenden Monomeren größere Oligomere, die ein so genanntes " β -barrel" bilden. Die Porenbildung erfolgt durch die Einlagerung des β -barrels in die Zellmembran (GENY & POPOFF, 2006). Eine weitere Unterteilung der β -PFTs wird anhand der Porengröße vorgenommen. Die Fähigkeit zur Bildung von kleinen Poren wird z. B. für Aerolysin von *Aeromonas hydrophila*, α -Toxin von *Clostridium septicum* bzw. *S. aureus* und ϵ -Toxin (ETX) von *C. perfringens* beschrieben (BALLARD *et al.*, 1995; COLE *et al.*, 2004; GURCEL *et al.*, 2005). Größere Poren werden durch cholesterinabhängige Cytolisine (CDC) von *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Listeria* spp. oder *Bacillus* spp. gebildet (TWETEN *et al.*, 2001).

2.6.4 AB-Toxine

Diese Art von Toxinen wird ebenfalls der Gruppe der porenbildenden Toxine zugeordnet. Beispiele für bekannte AB-Toxine sind das Diphtherie-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae* sowie das Anthrax-Toxin von *B. anthracis*, welche jeweils mit ihren B-Untereinheiten viele Eigenschaften der β -PFTs besitzen. Das Anthrax-Toxin besteht aus drei unabhängigen Polypeptidketten: dem protektiven Antigen (PA), dem Lethalfaktor (LF) und dem Ödemfaktor (edema factor, EF). An der Zelloberfläche binden lösliche PA-Monomere an einen Rezeptor und werden proteolytisch durch eine Furin-Protein-Konvertase aktiviert (GORDON *et al.*, 1995). Als aktivierte PA-Monomere erfolgt eine Bindung an Rezeptoren die sich in den Lipid-Rafts befinden. Es kommt zur Bildung von Heptameren und damit zur Ausbildung von so genannten Pro-Poren. An jedes PA-Heptamer kann sich nun entweder LF und/oder EF binden und diese Komplexe werden durch Clathrin-vermittelte Endozytose intrazellulär eingeschleust. Durch die Absenkung des pH-Wertes in den Endosomen kommt es zur Bildung von funktionellen Poren, wodurch nun EF und LF in das Zytosol gelangen können. Die Porenbildung entsteht durch die Einlagerung der von den PA-Heptameren gebildeten Pro-Pore in die Endosomenmembran (COLLIER & YOUNG, 2003; GENY & POPOFF, 2006).

2.6.5 Typ III-Sekretions-System (T3S-System)

Das T3S-System erlaubt es extrazellulär lokalisierten gramnegativen Bakterien, mithilfe einer nadelähnlichen Struktur und eines Translokatorproteins bakterielle Effektorproteine in das Zytoplasma der Zielzelle zu transportieren (CORNELIS, 2006). Diese Effektorproteine interferieren mit einer Vielzahl von zellulären Prozessen und induzieren z. B. morphologische Änderungen des Zytoskeletts oder modulieren die Wirtsabwehr. Ein solches T3S-System wurde bei *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. und *Pseudomonas* spp. beschrieben (GENY & POPOFF, 2006).

2.7 Herstellung rekombinanter Proteine

2.7.1 Allgemeines

Rekombinant hergestellte Proteine sind Eiweiße, die mit Hilfe von gentechnisch veränderten Mikroorganismen hergestellt werden. Im Jahre 1973 wurde von COHEN und BOYER das erste genetisch veränderte Bakterium erzeugt, indem ein Plasmid mit DNA in *E. coli* eingeschleust wurde (COHEN *et al.*, 1973). Seit dem Beginn der Entwicklung der Gentechnik wurde eine Vielzahl von bakteriellen Organismen, Schimmelpilzen, verschiedene Hefearten oder Säugetierzellen für die Herstellung von Fremdproteinen genutzt. Ein für die gentechnische Produktion von Proteinen genutztes System sollte schnelles, möglichst kostengünstiges Wachstum ermöglichen, die rekombinanten Proteine effizient produzieren und diese wenn möglich ins Medium sezernieren.

Beispiele für rekombinant hergestellte Proteine sind Insulin, Interferon und Erythropoetin (CHAN *et al.*, 1981; LEE-HUANG, 1984; FIESCHKO & RITCH, 1986). Der Herstellungsprozess rekombinanter Proteine beinhaltet mehrere Einzelschritte. Als erstes wird die DNA des Spenderorganismus isoliert und gereinigt. Bei der Ligation kommt es zum Einbau des gewünschten Amplikons in ein geeignetes Vektorsystem (Plasmid), welches dann in eine Wirtszelle eingeschleust wird. Nach einem Selektionsschritt erhält man Wirtsorganismen, die genetisch identisch sind (Klone) und das gewünschte Protein exprimieren.

2.7.2 Ligation

Unter Ligation versteht man den gezielten Einbau eines DNA-Fragments in einen Vektor, der die massenhafte Vermehrung der gewünschten DNA ermöglicht. Diese autonome Replikation wird über eine Sequenz, die den Replikationsstart (ori = origin of replication) kodiert, gewährleistet. Weitere wichtige genetische Elemente, die ein Expressionsplasmid/vektor enthalten sollte sind: Antibiotika-Resistenz (z. B. Kanamycin, Ampicillin) zur Selektion der transformierten Bakterienzellen, sowie Transkriptions- bzw. Translations-Start- und Endmarken (SORENSEN & MORTENSEN, 2005). Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pBAD 202/TOPO verfügt zusätzlich über:

- araBAD promoter (P_{BAD})
- Kodonsequenz für N-terminale Thioredoxin-Domäne zur Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins in *E. coli*-Zellen
- Kodonsequenz für C-terminalen Polyhistidin-Tag zur Detektion und Aufreinigung des gewünschten Proteins
- Kodonsequenz für ein C-terminales V5 Epitop zur Detektion des gewünschten Proteins
- Enterokinase-Schnittstelle zur enzymatischen Abspaltung der Thioredoxin-Sequenz

Für die Ligation stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Bei der klassischen Methode werden PCR-Produkt und Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut, die jeweils komplementäre Überhänge erstellen. Diese können mithilfe einer Ligase kovalent verbunden werden.

Eine Alternative stellt die TA-Klonierung dar. Bei dieser Vorgehensweise nutzt man die Fähigkeit der Taq-Polymerase ein zusätzliches Adenin an die 3'-Enden der Amplikons anzuhängen. Dieses ist komplementär zu einem linearen Plasmid, welches über einen Thymidin-Überhang verfügt (MARCHUK *et al.*, 1991). Eine Ligase stellt eine kovalente Bindung zwischen dem Adenin und dem Thymidin-Überhang her. Nachteil dieses System ist, dass ein gerichteter Einbau der Ziel-DNA nicht möglich ist. Die Orientierung muss in einem späteren Schritt kontrolliert werden, damit eine korrekte Transkription und Translation erfolgen kann.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete TOPO Cloning Kit (Invitrogen) verwendet anstelle der Ligase einen mit Topoisomerase I versehenen Vektor. Die Topoisomerase I, welche aus dem *Vaccinia* Virus stammt, ist reversibel an den Vektor gebunden (SHUMAN, 1991; SHUMAN, 1994). Am komplementären Strang des Vektors befindet sich ein GTGG-Überhang. Für die PCR wurde ein Vorwärts-Primer mit einem CACC-Anhang versehen, wodurch ein PCR-Produkt erzeugt wurde, das am 5'-Ende komplementär zur Vektorsequenz ist. Das PCR-Produkt kann nun in den offenen Vektor verbracht werden, welcher sich nach dem Einbau wieder schließt (CHENG & SHUMAN, 2000). An den 3'-Enden verfügen die Amplikons über sogenannte glatte Enden (blunt-end). Der GTGG-Überhang des Vektors, der

CACC-Anhang am PCR-Produkt sowie die glatten Enden ermöglichen einen gerichteten Einbau in den Vektor (Abb. 3).

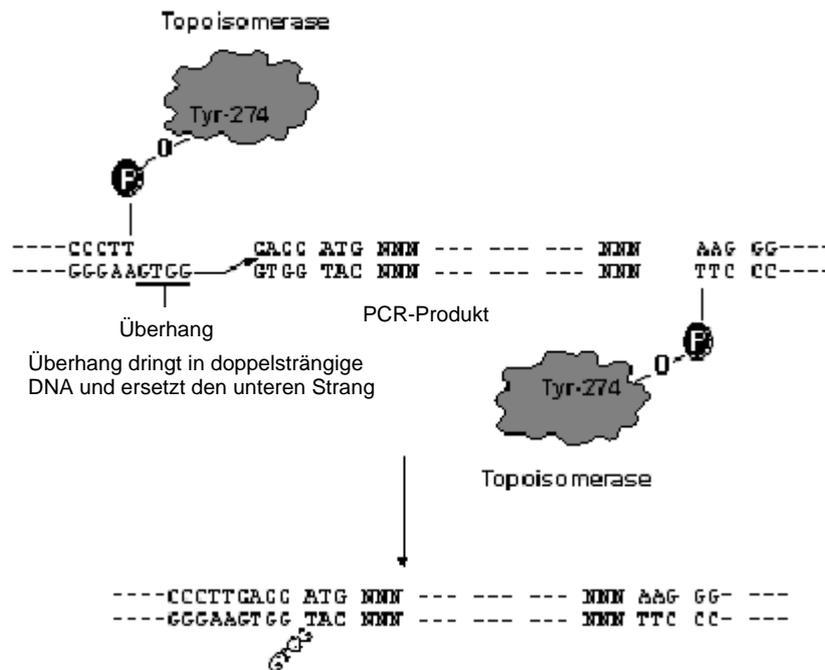


Abbildung 3. Mechanismus der gerichteten TOPO Klonierung (Invitrogen Benutzerhandbuch)

2.7.3 Expression

Nach erfolgreicher Ligation und Transformation in die Wirtszelle kann das gewünschte Protein exprimiert werden. Hierfür stehen verschiedene Expressionssysteme zur Verfügung. Für die Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* werden häufig das pET-Expressionssystem und das pBAD-Expressionssystem verwendet.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten pBAD-Expressionssystem verfügt das Plasmid über ein Arabinose-Operon bestehend aus zwei Promotoren ($araP_c$ und $araP_{BAD}$), zwei Operatoren ($araO_1$ und $araO_2$), einem Induktor ($araI$) und drei Strukturgenen ($araA$, $araB$ und $araD$). Das ara -Operon wird durch das Regulatorprotein ($araC$) des $araC$ -Gens (OGDEN *et al.*, 1980; SCHLEIF, 1992) kontrolliert. In Abwesenheit von Arabinose bildet das Dimer $araC$ zusammen mit den beiden Operatoren $araO_1$ und $araO_2$ eine "DNA-loop", und eine Transkription der beiden Promotoren (P_c und P_{BAD}) wird somit unterdrückt. Bei Zugabe von Arabinose bindet sich diese an $araC$ und es entsteht nun eine Verbindung zwischen $araO_1$ und dem Induktor $araI$. Diese Konformationsänderung (Abb. 4) bewirkt eine Transkription des Promotors $araP_{BAD}$ und letztendlich die Expression des gewünschten Proteins

(SORENSEN & MORTENSEN, 2005). Dieses System ist sehr gut geeignet für potentiell toxische Expressionsprodukte (KUHN & WICKNER, 1985; CARSON *et al.*, 1991; GUZMAN *et al.*, 1992), da zunächst eine ausreichende Bakteriendichte erzeugt werden kann, ohne dass eine Expression des potentiell toxischen Proteins erfolgt. Wird die Expression induziert, ist die *E. coli*-Dichte hoch genug, so dass ausreichende Proteinmengen exprimiert werden, und ein eventuelles Absterben der *E. coli*-Zellen keinen negativen Einfluss hat.

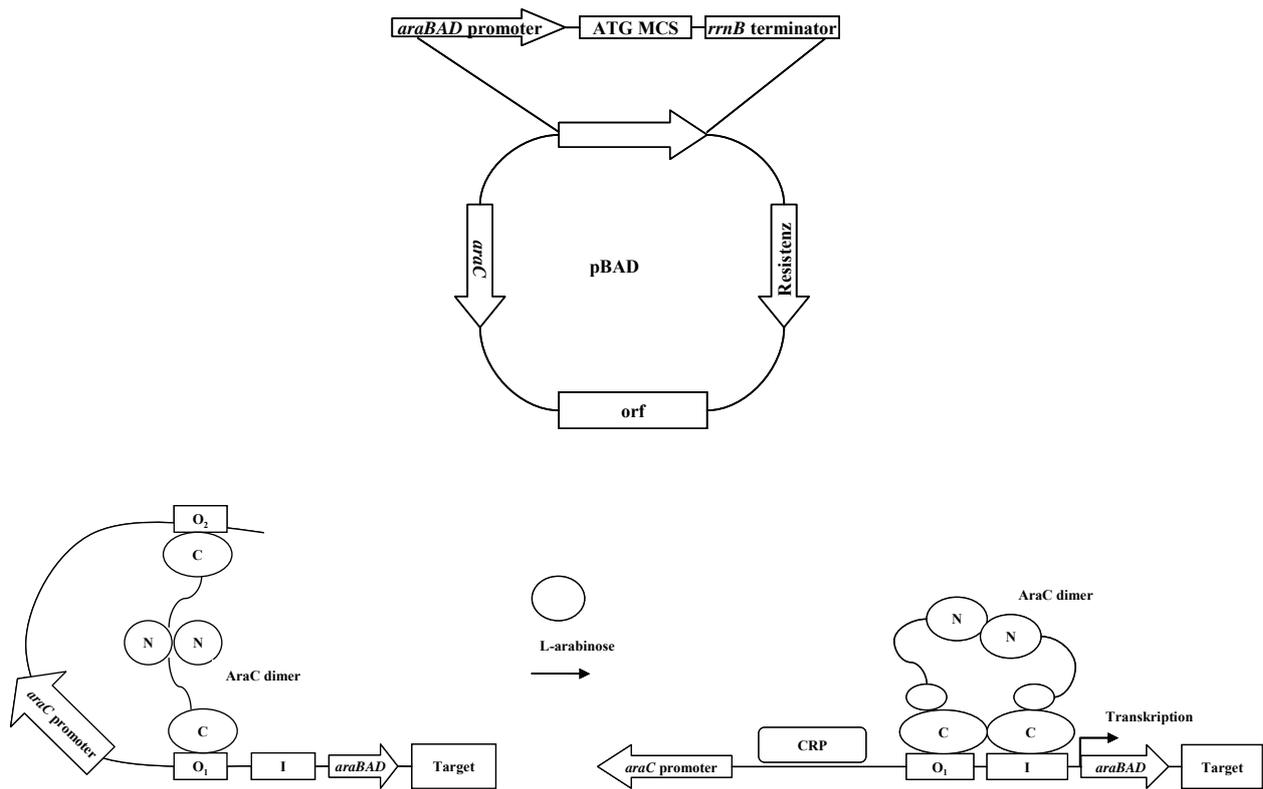


Abbildung 4. pBAD-Expressionssystem nach GUZMAN *et al.* (1995)

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, T2885)
Aceton (Riedel de Haën, 32201)
Agarose (Peqlab, 351020)
Alexa Fluor 488 Succinimidyl-Ester (Invitrogen; A20000)
Alexa Fluor 555 Succinimidyl-Ester (Invitrogen; A20009)
Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich, A4514)
Ampicillin (Sigma-Aldrich, A9518)
Bovines Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, A7030)
Bromphenolblau (Merck, 8122)
Casein (Sigma-Aldrich, C8654)
Caseinhydrolysat (Fluka, 22090)
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11 644 807 001)
CellYtic Express (Sigma-Aldrich, C1990)
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)
DNA-Leiter Plus, 0,1-3 kbp (Peqlab, 25-2020)
DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506)
dNTP Set hochkonzentriert, 100 µmol/dNTP (ABgene, AB-0315)
D-Sorbitol (Sigma-Aldrich, S6021)
Dulbecco's MEM Zellkulturmedium (Biochrom AG, F0435)
EDTA (Sigma-Aldrich, E1644)

Enterokinase (Sigma-Aldrich, E0632)
Essigsäure 100 % (Merck, 1.00063)
Ethanol, absolut (Riedel de Haën, 32205)
Ethidiumbromidlösung 1 % (Serva, 21251)
Fetales Kälberserum (FCS; Biochrom AG, S0115)
Fibronectin (Sigma-Aldrich, F2006)
Gel Extraction Kit (Peqlab, 12-2501-01)
Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich, G2526)
Glycerin ca. 87 % (Merck, 1.04094.1000)
Glycin (Sigma-Aldrich, G8898)
Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)
High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, 1175477001)
Hirn-Herz-Bouillon (Merck, 1.10493.0500)
Imidazol 99 % (Sigma-Aldrich, I0125)
Kalilauge (Fluka, 35113)
Kaliumdihydrogenphosphat (Riedel de Haën, 30407)
Kalziumdichlorid (Sigma-Aldrich, 21108)
Kanamycin (Biochrom AG, A9518)
Kerosin (Fluka, 60710)
L-(+)-Arabinose (Sigma-Aldrich, A3256)
L-Glutamin (Biochrom AG, K0282)
LMW Calibration Kit for SDS Elektrophoresis (GE Healthcare, 17-0446-01)
Magnesiumchlorid (Sigma-Aldrich, M8266)
Magnesiumsulfat (Fluka, 63138)
MEM-EARLE Zellkulturmedium (Biochrom AG, FG0325)
Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, M6250)
Methanol (Sigma-Aldrich, 34860)
Natriumazid (Riedel de Haën, 13412)
Natrium-Caseinat (Sigma-Aldrich, C8654)
Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, 31434)
Natriumcitrat (Merck, 1.06448)
Natriumdodecylsulfat (SERVA Electrophoresis GmbH, 20765)
Natriumphosphat (Sigma-Aldrich, S1001)
Natriumpyruvat (Biochrom AG, L0473)

Paraformaldehyd (Fluka, 76240)
PEG (Fluka, 81300)
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml (Biochrom AG, A2212)
Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, 12-6943)
Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich, P7170)
ProLong Gold antifade mit DAPI (Invitrogen, P36931)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets mit EDTA (Roche, 04693124001)
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 MgCl₂ (ABgene, AB-0301/B)
Trisacetat-EDTA-Puffer (Sigma-Aldrich, T4038)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 93443)
Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503)
Trizma hydrochloride (Sigma-Aldrich, T3253)
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, T3924)
Trypton (Fluka, 95039)
Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)
Wasserstoffperoxid 35 % (Merck, 8600)

3.1.2 Bakterienstämme bzw. -isolate

B. cereus:

DSM 4384 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
(MHI 163 Stammsammlung Institut)

DSM 31 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
(MHI 1308 Stammsammlung Institut)

(*B. cereus* ATCC 14579; American Type Culture Collection, Manassas VA)

E. coli:

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

LMG 194

3.1.3 Zellen und Zelllinien

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

3.1.4 PCR-Primer

Die Synthese der benötigten Primer wurde bei der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen in Auftrag gegeben (Details in Tabelle 2).

Tabelle 2. Charakteristika der verwendeten PCR-Primer

Zielgen	Primer	Primersequenz (5' → 3')	Amplikongröße (bp)
<i>hblA</i>	HblBfor2	CACCATAAAAAAATCCCTTATAAATTAC	
	HblBrev2	CTATTTTTGTGGAGTAACAGTTTC	1125
<i>hblD</i>	LH1for	CACCAAAAAATTTCCATTCAAAGT	
	LH1rev	AAACTCCTGTTTAAAAGCAATATC	1219
<i>hblC</i>	L2for1	CACCAAAACTAAAATAATTACAGG	
	L2rev2	TGAATTCCTAAAAAACGCAA	1344

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 (mit 0,2 % Glukosezusatz): 1 mM Magnesiumchlorid und 2 % Caseinhydrolysat in A. dest. lösen, nach dem Autoklavieren Zusatz von 0,2 % Glucose und 10-fach konzentrierten M9-Salzen: 6 % Di-Natriumhydrogenphosphat, 3 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 % Natriumchlorid, 1 % Ammoniumchlorid; alle Angaben in g/v.

SOC-Medium: 0,5 % (g/v) Hefeextrakt, 2 % (g/v) Trypton, 0,01 mol NaCl, 0,0025 mol KCl, 0,01 mol MgCl₂, 0,01 mol MgSO₄, 0,02 mol Glukose

Feste Nährmedien

Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid, PB 5039 A)

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

LBMS-Platten mit Zusatz von 0,1 % Kanamycin: LB-Medium mit Zusatz von 9,1 % Mannitol und 9,1 % Sorbitol, 1,5 % Standard I Nähragar sowie 0,1 % Kanamycin 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 % (g/v) Natrium-Caseinat in PBS

Citratpuffer: 0,21 mol/l mit Zusatz von 3,13 mmol/l H₂O₂; 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 H₂O₂ 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 % (g/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

PBS

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

PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Natriumazid

Tris/HCl-Puffer: 2 mol/l; pH 8,0

Dialyse

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

Enterokinase-Verdau

10 X 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 auf pH 8,0 einstellen

Enterokinaseverdünnung: 10 U Enterokinase mit 1 ml A. bidest.

Immunfluoreszenz

BSA-PBS-Lösung: 1 % BSA (g/v) in PBS

Blockierungspuffer: 5 % (v/v) inaktiviertes Ziegen Serum 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

3.1.7 Immunreagenzien

Polyklonale Antiseren

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

Monoklonale Antikörper (mAk)

Zum Nachweis der *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten standen folgende monoklonale Antikörper (mAk) zur Verfügung (Tab. 3), die alle im Laufe der letzten Jahre am Lehrstuhl hergestellt worden sind (DIETRICH *et al.*, 1999; DIETRICH *et al.*, 2005):

Tabelle 3. Verwendete monoklonale Antikörper

Toxinkomplex	Exoprotein bzw. Antigen	Monoklonaler Antikörper	Konzentration für Enzymimmuntest	Konzentration für Western-Blot	Konzentration für Immunfluoreszenz
HBL	B	HT-L1 II 1B8	2 µg / ml	5 µg / ml	5 µg / Well
	L ₁	HT-L1 II MAK 1E9	1 µg / ml	5 µg / ml	4 µg / Well
	L ₂	45 I 8B12 bzw. 45 II 1A12	2 µg / ml (8B12)	10 µg / ml (1A12)	2 µg / Well (8B12)
Nhe	NheB	45 kD III 1E11	1 µg / ml	2 µg / ml	3 µg / Well

3.1.8 Enzyme

Proteinase K (Quiagen, 19131)

Thermoprime Plus DNA-Polymerase (ABgene, AB-0301/B)

Enterokinase (Sigma-Aldrich, E0632)

3.1.9 Vektoren

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

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

B. 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, 167008)

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm² (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)

Phastgel SDS Pufferstreifen (GE Healthcare, 17-0516-01)

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

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

Sonstige

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)
Pasteur-Pipetten, Glas, 150 mm (Roth, 4518)
Deckgläschen Gold Seal coverglass, 22 x 22 mm (Sciences Services GmbH, E63757-01)
Amicon Ultra Zentrifugalfilter, 4 ml, 30k (Millipore, UFC803024)
Amicon Ultra Zentrifugalfilter, 15 ml, 30k (Millipore, UFC903024)
Visking Dialyseschlauch Ø 16 mm (Serva Electrophoresis GmbH, 44110)
Mikrotiterplatten, 96 Loch (Nunc, 439454)
Spritzen

3.1.11 Geräte

Accu-Jet, Pipettierhilfe (Brand)
Begasungsbrutschrank Typ B 5060-EC CO₂, 37 °C (Heraeus)
Biofuge pico (Heraeus)
BioPhotometer 8,5 mm (Eppendorf)
Brutschrank (Mettler)
Electrophoresis Power Supply, EPS 200 (Pharmacia Biotech)
Elektrophoresekammer (Biometra)
Elektrophoresekammer (peqLab)
Flockeneisbereiter (AF 80, Scotsman)
Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence)
Heizplatte MR 3001 (Heidolph)
Inverses Mikroskop (Zeiss)
Kodak Image Station 200MM (Biostep)
Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise Remote Control (Tecan)
Multifuge 1 S-R (Heraeus)
Multiphor II Electrophoresis System and Electrophoresis Power Supply (Pharmacia Biotech)
Phastsystem Separation and Control Unit (Pharmacia)
pH-Messgerät 537 (Indolab)

Spektralfotometer UV-1602 (Shimadzu Corporation)
Schüttelwasserbad, GFL 1083 (Ges. für Labortechnik)
Sterilwerkbank HERA SAFE KS-12 (Kendro)
Taumelschüttler, Polymax 1040 (Heidolph)
ThermoCycler, PCR Express (Hybaid)
Waage (Sartorius Excellence)

3.1.12 Software

Argus X1, Bio-Imaging-Control-Software (biostep GmbH)
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 Methoden zur Vorbereitung der Klonierung

3.2.1.1 Anzucht von *B. cereus* in Caseinhydrolysat-Glukose-Hefe-Bouillon

Zur optimalen Expression der Diarrhoe-Enterotoxine von *B. cereus* wurde für weitere Versuche (Immunaффinitätschromatographie, indirekter Enzymimmuntest) eine Voranreicherung angesetzt. Hierfür wurden 20 ml CGY-Medium (mit 1 % v/v Glukosezusatz) mit einer Kolonie beimpft. Nach einer Inkubationsdauer von 17 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad wurden 200 µl der Voranreicherung in 20 ml frisches CGY-Medium 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. Der Überstand wurde sterilfiltriert und nach Zusatz von EDTA (1 mM) portioniert bei -20 °C eingefroren.

3.2.1.2 DNA-Extraktion aus *B. cereus*

Die genomische DNA der Stämme wurde unter Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll für grampositive Bakterien aus BHI-Übernachtskulturen (200 µl) extrahiert. Die Proben wurden zunächst mittels Proteinase K, ein Enzym welches Peptidbindungen angreift und somit eine Freisetzung von Nukleinsäuren bewirkt, aufgeschlossen. Anschließend wurde die im Lysat enthaltene DNA an eine Silika-Membran absorbiert. Kontaminanten und Enzyminhibitoren wurden durch zwei Waschschrirte entfernt und die DNA in Tris/HCl-Puffer (pH 9,0; 0,5 mM EDTA) eluiert. Für die PCR wurden ca. 30 ng DNA/Stamm bzw. Isolat verwendet.

3.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die DNA-Konzentrationen errechnen sich aus der optischen Dichte (OD), die fotometrisch bei 260 nm (BioPhotometer Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegen Tris-HCL pH 8,0 bestimmt wurde (Formel siehe unten). Eine Extinktion von 1,0 entspricht 50 µg/ml

doppelsträngiger DNA (dsDNA). Die Reinheit der DNA-Präparation wurde durch eine zweite Messung bei 280 nm und anschließender Berechnung des Verhältnisses (OD_{260}/OD_{280}) bewertet.

Für DNA-Lösungen, die kaum Proteinverunreinigungen aufweisen, liegt der Normbereich zwischen 1,8 und 2,0.

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.

Formel: $c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F$

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor: 50 für dsDNA

3.2.1.4 PCR-Primer

Alle für diese Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie AG (Taufkirchen, Deutschland) synthetisiert. Primersequenzen sowie die Größe der entsprechenden Amplifikationsprodukte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

3.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente zu amplifizieren. Für eine Standardreaktion wurden 30-50 ng DNA, 5 μl 10 x Reaktionspuffer (ABgene, Epsom, UK), 3 μl MgCl_2 (25 mM), 2 μl dNTP (200 nM), jeweils 2,5 μl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (jeweils 10 μM) und 0,5 μl DNA-Polymerase (5 U/ μl) mit A. bidest. auf 50 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle ohne DNA-Probe mitgeführt. Das Temperaturprofil des PCR-Programms wurde individuell angepasst und in einem Thermocycler von Hybaid (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt (Details in Tabelle 4).

Tabelle 4. Temperaturen und Zeiten

	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1. Initiale Denaturierung	95 °C	7 min	
2. Denaturierung	95 °C	15 s	40 Zyklen
Annealing	56 °C bei HBL-L ₂ 57 °C	15 s	
Elongation	72 °C	1 min 10 s	
3. Stabilisierung	72 °C	20 min	
4. Kühlung	4 °C		

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten, der Größen- und Mengenabschätzung von DNA sowie zur präparativen Isolierung erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung. Für die Größen- und Mengenbestimmung der DNA-Fragmente wurden Größenstandards (0,1-3 kbp Peqlab) zusätzlich auf das Gel aufgetragen. Jede Probe wurde mit dem entsprechenden Volumen eines vierfach konzentrierten Gel-Ladepuffers (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) supplementiert und dann in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung für 45 min bei 125 V in Tris-Acetat-EDTA-Puffer und durch die anschließende Ethidiumbromid-Färbung konnten die DNA-Fragmente mit UV-Transillumination sichtbar gemacht werden.

3.2.1.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Als Vorbereitung für die Klonierung wurden die PCR-Produkte nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel eluiert. Dazu wurde ein Gel Extraction Kit (Peqlab) laut Herstellerprotokoll verwendet. Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht lokalisiert, ausgeschnitten und in einem Bindepuffer gelöst. Die Extraktion erfolgte durch die reversible Bindung der DNA an eine Silika-Membran und anschließende Elution durch einen Niedrigsalzpuffer.

3.2.2 Klonierung und Expression rekombinanter *B. cereus*-Toxine

3.2.2.1 Ligation von PCR-Produkten und pBAD-Vektor

Das bei der DNA-Extraktion gewonnene Eluat (enthält die gewünschten PCR-Produkte) wurde dann mit dem pBAD Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte mit dem pBAD Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen) laut Herstellerprotokoll. Hierbei wurde die Insert-DNA mit Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 2:1 gemischt. Nach Zugabe von A. dest. und einer im Kit enthaltenen Salzlösung wurde das Reaktionsgemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde die Transformation in One Shot TOP 10 (kompetente *E. coli*-Zellen) durchgeführt.

3.2.2.2 Transformation von One Shot TOP 10 mit dem Ligationsansatz

Die kompetenten *E. coli*-Zellen One Shot TOP 10 zeichnen sich durch eine Deletion der Gene von Endonukleasen und Rekombinasen aus, wodurch ein unspezifischer Abbau des transformierten Plasmids vermindert wird.

Für die Transformation wurden 6 µl des Ligationsansatzes vorsichtig mit den TOP 10 Zellen gemischt und dann für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 30 s bei 42 °C. Nach einer Zugabe von 250 µl sterilem SOC-Medium und einer einstündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 200 upm auf dem Heizblock wurde der Ansatz auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikumzusatz (Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Einzelkolonien, die hierbei entstanden, wurden zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

3.2.2.3 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*-Zellen

Eine Isolierung von Plasmid-DNA dient zum einen der Überprüfung der erfolgten Klonierung durch eine anschließende Sequenzierung und zum anderen ermöglicht sie eine Überführung in die Expressionszelllinie, in der die Proteinexpression erfolgt.

Die Isolierung der Plasmid-DNA (aus One Shot TOP 10 und später LMG 194) erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) laut Herstellerangaben. Hierzu wurden 20 ml

LB-Medium mit 0,4 mg Antibiotikum Kanamycin versetzt. Das komplettierte Medium wurde mit *E. coli* One Shot TOP 10 bzw. LMG 194, die das gewünschte Plasmid enthielten und somit über eine Kanamycinresistenz verfügten und auf der LB-Agar-Platte herangewachsen sind, beimpft und 12–16 Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Aus 10 ml der Übernachtskultur konnte die gewünschte Plasmid-DNA gewonnen werden. Eine alkalische Lyse der Bakterienzellen ermöglicht die reversible Bindung der Plasmid-DNA an eine Silika-Membran und das Entfernen von Enzyminhibitoren durch diverse Waschschriffe. Nach dem Trocknen der Membran wurde die saubere Plasmid-DNA durch einen Elutionspuffer gewonnen. Die Extinktion der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde fotometrisch (dsDNA) bestimmt.

3.2.2.4 Herstellung kompetenter LMG 194 Zellen

Zum Einschleusen der Plasmide mussten zunächst kompetente LMG 194 Zellen hergestellt werden. Dies erfolgte mit Hilfe der CaCl₂-Methode.

Dafür wurden 1 ml aus einer Übernachtskultur oder 100 µl aus einer Glycerinkultur der Zelllinie in 100 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Erreichen der optischen Zelldichte von 0,2 (OD₆₀₀) wurde die Kultur 15 min, bei 4 °C und 1900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml CaCl₂-Lösung (eisgekühlt, steril, 0,1 mol/l) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, erfolgte der nächste Zentrifugationsschritt (15 min, 1900 x g, 4 °C). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 30 ml CaCl₂-Lösung (eisgekühlt, steril, 0,1 mol/l CaCl₂, 20 % Glycerin v/v) aufgenommen. Mit Hilfe eines Dispensers wurde die Zellsuspension zu je 1 ml aliquotiert und anschließend bei -80 °C eingefroren.

3.2.2.5 Transformation von LMG 194 mit Plasmid-DNA

Hierfür wurden 130 µl auf Eis aufgetaute, kompetente LMG 194 Zellen 30 min mit 5 µl Plasmid-DNA (aus Minipräp siehe 3.2.2.3), 10 µl sterilem Wasser und 50 µl TCM-Puffer auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 30 s bei 42 °C. Dann wurden dem Ansatz 1 ml LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 200 upm auf dem Heizblock inkubiert. Im Anschluß wurde der Ansatz bei 3600 x g für 2 min zentrifugiert und 800 µl des

Überstands verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und dann auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikumzusatz (Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Aus den entstandenen Einzelkolonien wurde die in 3.2.2.3 beschriebene Isolierung von Plasmid-DNA durchgeführt.

3.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Durch DNA-Sequenzierung wird die korrekte Nucleinsäure-Sequenz überprüft um evt. Mutationen, die zu Translationsfehlern führen, auszuschließen.

Die Sequenzierung der gewonnenen Plasmid-DNA (siehe 3.2.2.3) wurde außer Haus durchgeführt (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Die Sequenzhomologie wurde mit einem Computerprogramm für Sequenzalignment (Clustal W2) verglichen.

3.2.2.7 Proteinexpression

Die in dieser Arbeit verwendeten LMG 194 Zellen zeichnen sich durch eine induzierbare Proteinexpression mittels Arabinose aus. Dies hat den Vorteil, dass die Zellen zunächst in die logarithmische Wachstumsphase gelangen, ohne dass eine Expression erfolgt. Eventuell toxische Proteine wirken sich somit nicht negativ auf das Bakterienwachstum aus. Erst bei Erreichen einer ausreichenden Zellzahl erfolgt nach Induktion eine Proteinexpression. Somit können ausreichende Proteinmengen erzeugt werden.

Für die Proteinexpression wurden 10 µl aus der Glycerinkultur in 19 ml RM-Medium mit Zusatz von 1 ml M 9-Salzen, 0,2 % µl Glucose und 0,4 mg Kanamycin über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml aus der Übernachtskultur in ein frisches RM-Medium mit M 9-Salzen und Kanamycin, jedoch ohne Zusatz von Glucose, überführt und bis zu einer fotometrischen Dichte von 0,5 – 0,6 (OD₆₀₀) im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Dichte, wurden der Kultur 0,2 % Arabinose hinzugegeben und für weitere 4 Stunden im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.8 Zellaufschluß

Da bei der Proteinexpression der Großteil des Proteins im *E. coli* verbleibt, wird mittels Detergenzien ein Zellaufschluss durchgeführt.

Nach der 4-stündigen Inkubation wurde die Bakteriensuspension für 10 min. bei 1900 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 7 ml in PBS gelöstem CelLytic Express resuspendiert. Dies wurde dann nach Zugabe einer ¾ Tablette Protease Inhibitor mit EDTA für ca. 20 min. im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1900 x g, 10 min. bei 4 °C) und der dabei entstandene Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in einen Dialyseschlauch gefüllt.

3.2.2.9 Dialyseverfahren

Die beim Zellaufschluß benötigten Detergentien können insbesondere im Zellkultur-Test toxische Eigenschaften haben und müssen daher in einem mehrtägigen Dialyseverfahren entfernt werden.

Hierfür wurde der gewonnene Überstand in einen Visking Dialyseschlauch Ø 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 und das erhaltene Dialysat wurde bei 4 °C gelagert. Das rekombinante Protein liegt nun in einem für weitere Versuche geeigneten Puffer vor.

3.2.2.10 Anlegen von Glycerinkulturen

Durch die Herstellung von Glycerinkulturen wird eine Langzeitlagerung der Bakterienzellen ermöglicht.

Zum Anlegen einer Glycerinkultur wurden 500 µl der einzufrierenden Kultur in 5 ml LB-Medium mit 0,1 mg Kanamycin beimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µl der Übernachtskultur in 800 µl Glycerin (ca. 87 %) überführt und bei -80 °C eingefroren.

3.2.3 Weiterführende Methoden zur Charakterisierung rekombinanter Proteine und deren Funktionalität

3.2.3.1 Enterokinase-Verdau

Um die Löslichkeit der rekombinanten Proteine in den *E. coli* Zellen zu verbessern, wurden diese mit einer Thioredoxin-Sequenz versehen. Da aber unter Umständen die rekombinanten Proteine in dieser Form biologisch nicht aktiv sind, muss der Thioredoxinanhang im Anschluss an die Proteinextraktion mittels Enterokinase entfernt werden.

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

3.2.3.2 Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Für die Immunaффinitäts-Säulen (IAS), welche für die Immunaффinitätschromatographie verwendet wurden und bereits am Institut zur Verfügung standen, wurden die gegen die Enterotoxinkomplex-Komponenten NheB, und HBL-L₂ gerichteten monoklonalen Antikörper (mAk) 1E11 und 1A12 (siehe 3.1.7) wie bei STRICH (1999) beschrieben an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare) gekoppelt (10 mg mAk/g Gel).

Zur sequentiellen Entfernung von Toxinkomponenten aus Kulturüberständen des *B. cereus* Stammes DSM 4384 wurden die IAC-Säulen 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 dann langsam (Durchflußrate 1 ml/min) über die Säulen gegeben, so dass die jeweiligen Toxinkomponenten an die kovalent gekoppelten Antikörper binden konnten. Die so gewonnenen Probendurchläufe (*B. cereus* Kulturüberstände frei von NheB bzw. NheB und HBL-L₂) wurden für Zytotoxizitätstests, sowie für EIA- und Westernblot-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 Tris/HCl-Puffer (2 mol/l, pH 8,0) neutralisiert (ca. 250 µl zu 10 ml Eluat), aufkonzentriert und zur Bestimmung der

Proteinkonzentration die Absorption bei 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Nach dem Eluieren wurden die Säulen mit 10 ml PBS und Konservierungspuffer gespült und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.3.3 Indirekter Enzymimmuntest (EIA)

Zum semiquantitativen Nachweis der *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten HBL-B bzw. HBL-L₁ sowie HBL-L₂ in Kulturüberständen und Toxinpräparationen wurden indirekte Enzymimmuntests durchgeführt.

Dazu wurden Mikrotiterplatten mit seriellen Verdünnungsreihen der 1:5 in Bicarbonatpuffer verdünnten Proben (100 µl/Kavität) beschichtet. Nach Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer, wurden freie Bindungsstellen mit 3 % Casein/PBS (150 µl/Kavität) für 45 min blockiert. Danach wurden die Platten mit Waschlösung gewaschen und mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen HBL-B (mAk 1B8; 2 µg/ml) bzw. gegen HBL-L₁ (mAk 1E9; 1 µg/ml) oder HBL-L₂ (mAk 8B12; 2 µg/ml) versetzt (100 µl/Kavität) und für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde für eine Stunde Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Peroxidase (1:3000 in 1 % Casein/PBS; 100 µl/Kavität) zugegeben. Im Anschluß an den letzten Waschschrift wurde die Substrat/Chromogen-Lösung auf die Platten gegeben (100 µl/Kavität) und die einsetzende Farbreaktion nach 20 Minuten mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt (100 µl/Kavität). Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm fotometrisch in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA-Reader Sunrise). Zur Berechnung des Antigentiters wurde diejenige Verdünnungsstufe herangezogen deren Extinktion dem Wert 1,0 am nächsten kam. Der Titer ergab sich aus der Multiplikation dieser Extinktion mit der dazugehörigen reziproken Verdünnung.

3.2.3.4 Gelelektrophorese und Immunoblot

Die elektrophoretische Auftrennung der *B. cereus* Exoproteine erfolgte mit SDS-PAGE unter Verwendung des PhastSystems (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 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 monoklonalen Antikörpern (1E9 5 µg/ml; 1A12 10 µg/ml; 1B8 5 µg/ml jeweils in 3 % Casein-PBS mit 0,025 % Tween) für 60 Minuten inkubiert. Danach wurde die Membran mit einer Waschlösung (PBS mit Zusatz von 0,025 % Tween) gewaschen. Im Anschluß wurden peroxidase markierte Sekundäntikörper (Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Peroxidase; 1:3000 verdünnt in 3 % Casein-PBS mit 0,025 % Tween) zugegeben und wiederum für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran noch mal mit Waschlösung gewaschen und dann mit Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat, Thermo Scientific) laut Herstelleranweisung versetzt und das entstehende Signal für drei Minuten mittels Imager erfasst.

3.2.3.5 Zytotoxizitätstest

Zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität der Kulturüberstände bzw. Enterotoxinkomplex-Komponenten wurde der von FELLA (1999) entwickelte, auf Vero-Zellen basierende WST-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Für den simultanen Ansatz wurde eine 96-Loch Platte mit Zellkulturmedium beschickt (100 µl/Kavität) und in den Spalten 1 - 10 eine log-2 Verdünnungsreihe der Proben angelegt (Doppelansatz). Die Spalten 11 und 12 der Platte wurden für die toxfreien Kontrollansätze (Negativkontrolle) verwendet. Die Reihen A und H wurden zur Vermeidung von Randeffekten nicht belegt. Danach wurden 100 µl Zellsuspension zugefügt. Die optimale Zellzahl für jede Zelllinie wurde zuvor in Vorversuchen bestimmt und betrug 1×10^4 Zellen/Kavität. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C in 7 % CO₂-Atmosphäre wurde die Zellschädigung zunächst mikroskopisch beurteilt, bevor die Vitalität der Zellen über ihre Stoffwechselaktivität bestimmt wurde. Dazu wurden pro Vertiefung 100 µl Medium

abgenommen und danach 10 µl WST-1 Reagenz zugegeben. Das Tetrazoliumsalz im WST wird durch metabolisch aktive Zellen zum Farbstoff Formazan reduziert und dessen Intensität kann fotometrisch bei 450 nm gemessen werden. Als Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe der Präparationen definiert, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer 50 % Reduktion der Stoffwechselaktivität der Zellen führte.

3.2.3.6 Kopplung der monoklonalen Antikörper an Alexa Fluoreszenz-Farbstoffe

Die zur Kopplung vorgesehenen, immunaffinitätschromatographisch gereinigten und in PEG auf eine Konzentration von 2 mg/ml aufkonzentrierten Antikörper (1B8, 1E9 bzw. 8B12) 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.

3.2.3.7 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz diente zum Nachweis von zellgebundenem Komponenten des HBL-komplexes. Dazu wurde in sog. „Chamber Slides“ 150 µl Zellsuspension (6×10^5 Zellen/Kammer) simultan mit in Zellkulturmedium verdünnten HBL-Komponenten (Endkonzentration 1:50 oder 1:100; 150 µl/well) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen des gesamten Mediums wurde der 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

(100 µl) der in 1 % BSA-PBS verdünnten fluoreszenzmarkierten mAks (je nach Ak 2 - 5 µg/Kavität; Tab. 3). Nach 1 h Inkubationszeit wurde der 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 betrachtet wurden.

3.2.3.8 Hämolyseverhalten der Toxine auf Schafblut-Agarplatten

Um das Hämolyseverhalten und somit die Funktionalität der rekombinanten HBL-Komponenten zu testen wurden diese auf Columbia Agar mit Schafblut verbracht. Mit einer Biopsie-Stanze (Ø 3 mm) wurden Kavitäten allein oder in einem definierten Abstand zueinander ausgestochen. Als Proben wurden sterilfiltrierte Bakterienkulturüberstände und verschiedene Kombinationen der rekombinanten HBL-Komponenten eingesetzt. Die Probenmenge variierte je nach Kombination der einzelnen Proben zwischen 3,5 µl und 7 µl pro Kavität. Die Blutplatten wurden dann für ca. 4 h im Brutschrank bei 32 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hämolyse-Phänomene makroskopisch beurteilt und fotografisch dokumentiert.

4 Ergebnisse

Am Beginn der Arbeit stand die rekombinante Herstellung aller drei Protein-Komponenten (B, L₁ und L₂) des *B. cereus*-Enterotoxins HBL mit dem gleichen Expressionssystem. Aus diesem Grund wird der Abschnitt der Klonierung und der Expression für alle drei Komponenten hier zusammen erläutert.

4.1 Klonierung

Für die Gewinnung der DNA wurde aus BHI-Übernachtskulturen des *B. cereus*-Stammes DSM 31 mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) die genomische DNA isoliert und gereinigt. Diese diente als Matrix für die PCR zur Amplifikation und wurde mit spezifischen Primern für die Komponenten HBL-B, L₁ und L₂ (siehe 3.1.4; Tabelle 1) versehen. Nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese konnten die einzelnen Amplifikate anhand ihrer Größe (*hblA* 1125 bp; *hblD* 1219 bp; *hblC* 1344 bp) identifiziert und aus dem Agarosegel eluiert werden (Abb. 5).

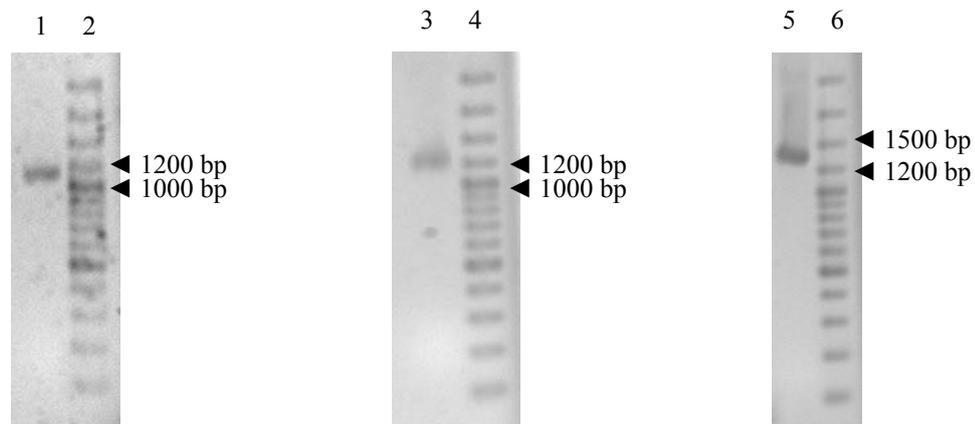


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate vor Einbau ins Vektorsystem

- (1) *hblA* (HBL-B)
- (2) 100 bp DNA-Leiter
- (3) *hblD* (HBL-L₁)
- (4) 100 bp DNA-Leiter
- (5) *hblC* (HBL-L₂)
- (6) 100 bp DNA-Leiter

Zum Einbau der einzelnen Eluate/PCR-Produkte in den linearisierten Vektor pBAD 202/D-TOPO wurden diese in einem molaren Verhältnis von 2:1 inkubiert. Nach Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen One Shot TOP 10 und Überimpfung auf LB-Nähragarplatten (mit Zusatz von Kanamycin) erfolgte nach Anreicherung in LB-Medium (mit Zusatz von Kanamycin) die Isolierung der Plasmid-DNA (siehe 3.2.2.3). Die anschließenden Sequenzierungen bestätigten die gewünschte Orientierung sowie die korrekten Basensequenzen der Inserts (siehe Anhang).

Die isolierte Plasmid-DNA wurde in die Expressionszelllinie LMG 194 verbracht und nach Inkubation auf Selektivnährböden und einer Kultivierung erfolgte eine erneute Isolierung der Plasmid-DNA mit anschließender quantitativen Bestimmung der DNA bei 260 nm. Für die Konzentrationen ergaben sich folgende Mittelwerte: HBL-B 84 µg/ml; HBL-L₁ 53 µg/ml und HBL-L₂ 69 µg/ml. Um die Größe der in den Vektor eingebauten PCR-Produkte zu überprüfen, erfolgte jeweils für *hblA*, *hblC* und *hblD* eine Kontroll-PCR mit Gelelektrophorese. Die im Agarosegel sichtbaren Banden zeigten die erwarteten Größen und bestätigten somit die erfolgreiche Klonierung (Abb. 6).

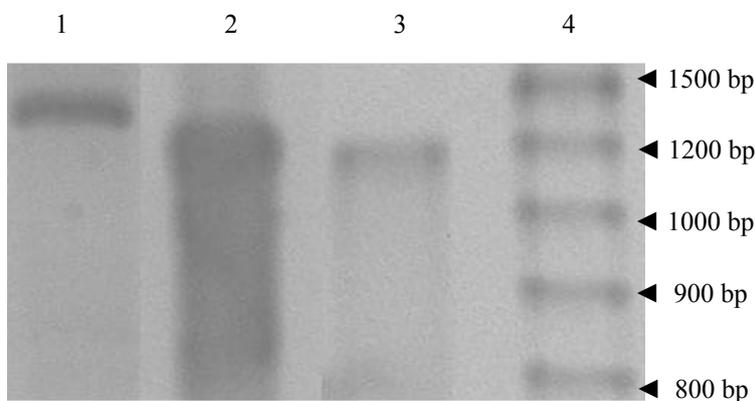


Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftrennung nach Transformation der Expressionszelllinie LMG 194

- (1) *hblC* (HBL-L₂)
- (2) *hblD* (HBL-L₁)
- (3) *hblA* (HBL-B)
- (4) 100 bp DNA-Leiter

4.2 Expression

Für die Proteinexpression erfolgte eine Inkubation der jeweiligen Klone in RM-Medium über Nacht mit anschließender Induktion durch Arabinose sowie Zellaufschluß mit CelLytic und abschließender Dialyse gegen PBS. Um die Expression und die richtige Größe der Proteine nachzuweisen, standen immunologische Methoden zur Verfügung. Dazu wurden mittels Westernblot die Molekulargewichte der exprimierten Produkte mit dem HBL-Referenzstamm DSM 4384 verglichen. Hierfür wurden die mit SDS-PAGE aufgetrennten Dialysate, wie unter 3.2.3.4 beschrieben, im Immunoblot mit den monoklonalen Antikörpern 1B8 (HBL-B), 1E9 (HBL-L₁) und 1A12 (HBL-L₂; Tabelle 3) beprobt. Da zur besseren Löslichkeit der rekombinanten Proteine diese mit einem Thioredoxin-Anhang (14 kDa) exprimiert wurden, zeigten die Dialysate nach Detektion mit dem jeweils spezifischen monoklonalen Antikörper Banden auf der erwarteten Höhe (Molekulargewicht plus 14 kDa) und ließen somit auf eine erfolgreiche und komplette Expression der Einzelkomponenten schließen (Abb. 7).

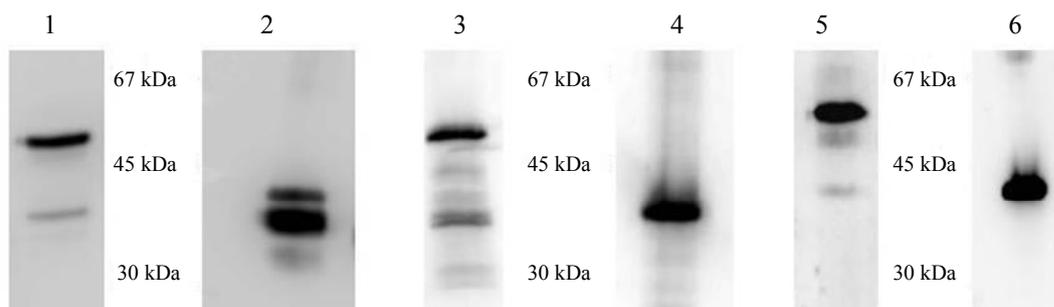


Abbildung 7: Western-Blot der einzelnen Dialysate mit Positivkontrolle

- (1) HBL-B Dialysat
- (2) HBL-L₁ Dialysat
- (3) HBL-L₂ Dialysat
- (4; 5; 6) Positivkontrolle (HBL-Referenzstamm DSM 4384)

Zur quantitativen und qualitativen Bewertung der Dialysate wurden diese im indirekten Enzymimmuntest (EIA) getestet. Hierfür wurden die Dialysate der drei Protein-Komponenten jeweils mit Bicarbonatpuffer 1:50 gemischt, in 96-Well Mikrotiterplatten seriell verdünnt und wie in 3.2.3.3 beschrieben weiter entwickelt. Im Mittel konnten anhand der EIA-Titer der einzelnen Dialysate Konzentrationen von HBL-B 25 µg/ml, HBL-L₁ 23 µg/ml und HBL-L₂ 13 µg/ml gemessen werden.

Für die anschließenden funktionellen Tests der exprimierten Proteine (Zellkultur-Test, Immunfluoreszenz, Blutplatten) ist die Entfernung des N-terminalen Thioredoxin-Anhanges

wichtig, da eine biologische Aktivität der rekombinanten Proteine unter Umständen nicht gewährleistet ist. Dieser wurde durch die Enterokinase spezifisch entfernt. Hierzu wurden die Dialysate wie unter 3.2.3.1 beschrieben mit Enterokinase versehen und anschließend für 1, 2, 3 und 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Abspaltung des Thioredoxin-Anhanges wurde im Anschluss des Enterokinase-Verdau im Western-Blot mit monoklonalen Ak (Tab. 3) überprüft. Hier konnte gezeigt werden, dass bereits nach 1 h der meiste Teil des Thioredoxins durch Enterokinase abgespalten wurde und sich die Proteinbanden auf der Höhe der originären Komponenten des Referenzstammes befanden (Abb. 8).

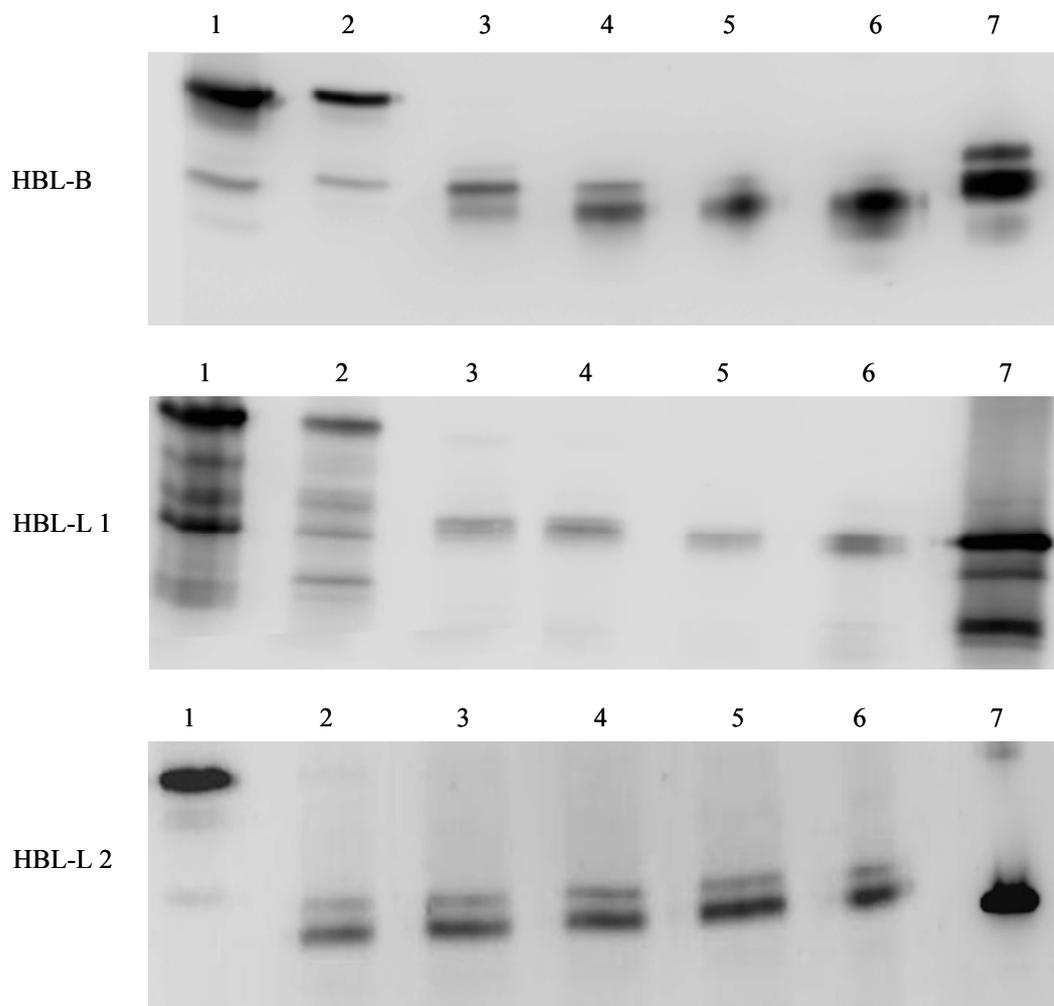


Abbildung 8: Western-Blot der einzelnen Enterokinase verdauten Dialysate mit Zeitkinetik

- (1) Dialysat
- (2) Enterokinase-Verdau nach 0 h
- (3) Enterokinase-Verdau nach 1 h
- (4) Enterokinase-Verdau nach 2 h
- (5) Enterokinase-Verdau nach 3 h
- (6) Enterokinase-Verdau nach 4 h
- (7) Positivkontrolle (HBL-Referenzstamm DSM 4384)

4.3 Biologische Aktivität der rekombinanten Proteine

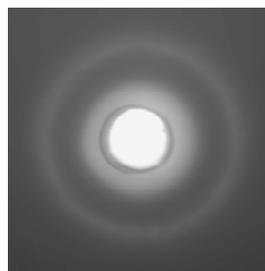
Um die drei rekombinant hergestellten Enterotoxin-Komponenten auf ihre biologische Aktivität zu testen, wurden verschiedene Methoden angewendet. Um die Wirkung der drei Komponenten auf Zellen zu untersuchen stand ein etablierter und validierter Vero-Zellkulturtest zur Verfügung. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens an die Zelloberfläche wurde in der Immunfluoreszenz ebenfalls mit Vero-Zellen durchgeführt. Das Hämolyseverhalten wurde mittels Schafblut-Agarplatten untersucht. Die Ergebnisse der funktionellen Tests werden für alle drei Protein-Komponenten getrennt beschrieben.

4.3.1 HBL-B

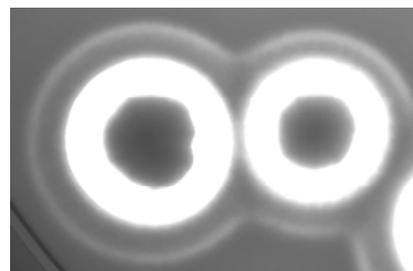
Nach der erfolgreichen Klonierung und Überprüfung mithilfe von Sequenzierung, indirekter Enzymimmuntest und Western-Blot wurde der Thioredoxin-Anhang von der HBL-B Komponente mittels Enterokinase abgespalten (HBL-B/Ek).

4.3.1.1 Hämolyseverhalten auf Schafblut-Agarplatten

Wie von BEECHER und MACMILLAN (1990) beschrieben, tritt bei HBL-positiven *B. cereus*-Stämmen das Phänomen der diskontinuierlichen Hämolyse auf. Hierbei zeigt sich auf Columbia Agar mit Schafblut ein direkt um die Bakterien-Kolonie verlaufender hämolytischer Ring der von einer ahämolytischen Zone umgeben wird. Die ahämolytische Zone ist nach außen hin wieder von einem hämolytischen Ring begrenzt. Das gleiche Bild zeigte sich auch wenn sterilfiltrierte Bakterienkulturüberstände des HBL-Referenzstamm DSM 4384 verwendet wurden (Abb. 9).



Referenzstamm DSM 4384



Diskontinuierliche Hämolyse
einer Bakterienkolonie

Abbildung 9: Diskontinuierliche Hämolyse durch Kulturüberstand des Referenzstammes DSM 4384 und *B. cereus* Kolonien

Das Auftreten der diskontinuierlichen Hämolyse sollte mit den rekombinanten Proteinen reproduziert werden. Dafür wurden mit einer Biopsie-Stanze (\varnothing 3 mm) Kavitäten im Abstand von 4 mm auf den Schafblut-Platten ausgestanzt. In die Kavitäten wurden zum einen sterilfiltrierte Bakterienkulturüberstände des DSM 4384 und zum anderen HBL-B/Ek pipettiert. Um einen Einfluß des HBL-B spezifischen gereinigten monoklonalen Antikörper (mAk) 1B8 auf die diskontinuierliche Hämolyse zu untersuchen, wurde dieser mit dem Kulturüberstand des DSM 4384 und dem Dialysat HBL-B/Ek inkubiert. Für die Versuche wurden pro Kavität 7 μ l bzw. bei Verwendung von Antikörper und Dialysat oder Kulturüberstand in einer Kavität, 3,5 μ l Probe appliziert.

Als erstes wurde der Einfluss HBL-B/Ek gegen DSM 4384 dargestellt. Hierzu wurden zwei Kavitäten im Abstand von 4 mm ausgestanzt und mit jeweils 7 μ l Probe versehen. Nach der Inkubation zeigte sich im Bereich des äußeren Hämolyseringes des HBL-Referenzstammes eine Verstärkung der Hämolyse (Abb. 10). Die verstärkte Hämolysezone trat nur in dem Bereich auf, die der Kavität mit HBL-B/Ek gegenüber lag. Dieses Phänomen war reproduzierbar.

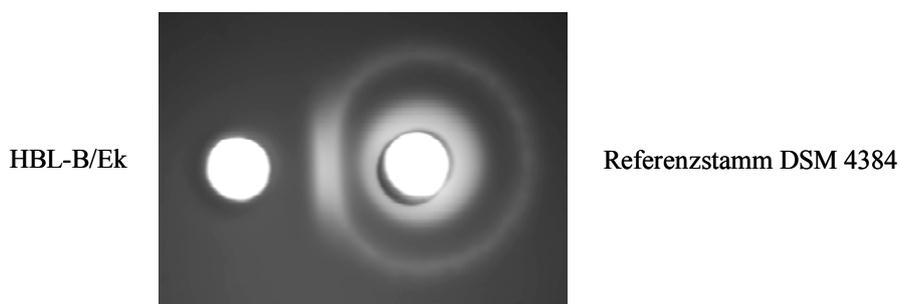


Abbildung 10: Hämolyseverhalten des HBL-B/Ek zusammen mit Kulturüberstand des Referenzstammes DSM 4384

Eine hemmende Eigenschaft des gereinigten mAk 1B8 (Konzentration 1 μ g/ml) zeigte sich, als der Referenzstamm zusammen mit dem Antikörper (jeweils 3,5 μ l) in eine Kavität gegeben wurde. Hierbei verschwand der äußere Hämolysering (Abb. 11). Um zu bestätigen, dass das Verschwinden des Hämolyseringes allein auf die Zugabe des mAks 1B8 beruht, wurde eine Negativkontrolle (Referenzstamm mit mAk gegen Listerien) mitgeführt.

Eine weitere Wirkung des mAks zeigte sich, als in eine Kavität HBL-B/Ek mit dem mAk 1B8 (jeweils 3,5 μ l) gemischt wurde und im Abstand von 4 mm der Referenzstamm DSM 4384 inkubiert wurde. Die ohne Zugabe des mAks beobachtete Verstärkung der Hämolyse ist

deutlich abgeschwächt und es kommt im Bereich der gegenüberliegenden Diffusionszone des Referenzstammes zu einer Unterbrechung des äußeren Hämolyseringes (Abb. 11).

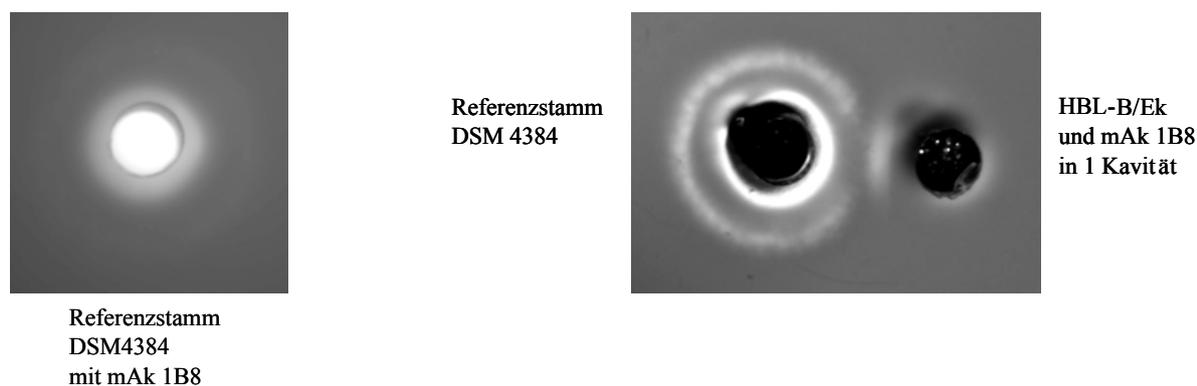


Abbildung 11: Nachweis einer hemmenden Eigenschaft des mAk 1B8

Um einen eventuellen Einfluss des Nhe-Enterotoxins auf das Hämolyseverhalten auszuschließen, wurde ein mittels Immunaffinitätschromatographie (mAk 1E11) gereinigter Referenzstamm, der somit kein NheB mehr enthält, verwendet. Dieser als Probendurchlauf 1 (PDL 1) bezeichnete Kulturüberstand wurde auf sein Hämolyseverhalten getestet. Es zeigte sich eine diskontinuierliche Hämolyse wie sie auch beim HBL-Referenzstamm zu sehen war. Bei der Kombination HBL-B/Ek und PDL 1 in zwei getrennten Kavitäten, trat wieder eine Verstärkung der äußeren Hämolysezone auf. Ebenso kam es wie mit dem DSM 4384 zum Verschwinden des äußeren Hämolyseringes bei gemeinsamer Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 1B8 (Abb. 12).

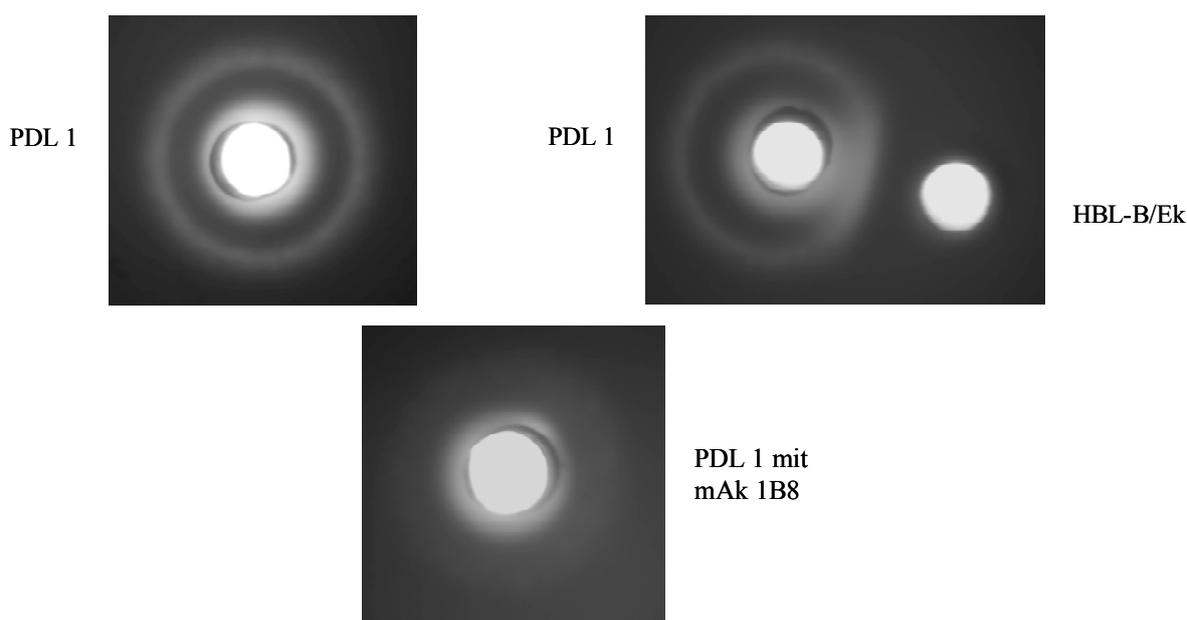


Abbildung 12: Hämolyseverhalten des Probendurchlaufes nach 1E11 Immunaffinitätschromatographie allein und in Kombination mit HBL-B/Ek und mAk 1B8

Bei einer Versuchsreihe, bei der HBL-B Dialysat ohne Enterokinase-Verdau im Vergleich mit HBL-B/Ek verwendet wurde, zeigte sich, dass es bei dem Enterokinase-verdauten Dialysat zu einer deutlicheren Ausprägung der verstärkten Hämolysezone kommt als bei der unverdauten Version (Abb. 13).

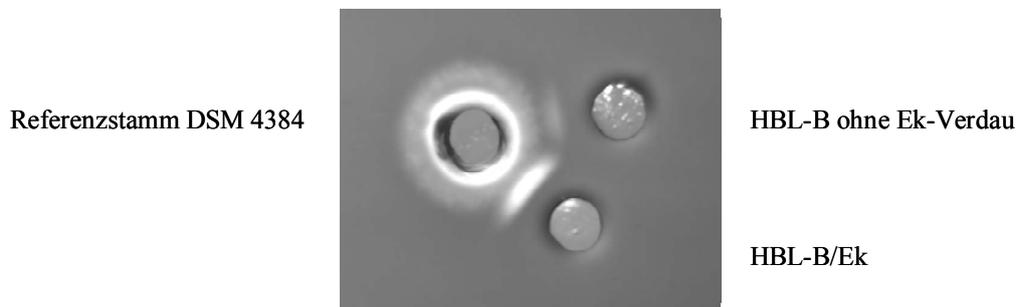
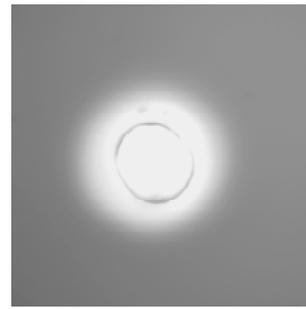


Abbildung 13: Referenzstamm DSM 4384 im Vergleich mit HBL-B/Ek und HBL-B ohne Enterokinase-Verdau

Um einen hemmenden Effekt der HBL-B-Komponente auf die Hämolyse von *B. cereus* wie von BEECHER & WONG (1997) beschrieben, zu untersuchen, wurde das HBL-B/Ek in unterschiedlichen Verdünnungen mit PBS erstellt und jeweils mit dem Referenzstamm in eine Kavität verbracht. Durch Zugabe von unverdünntem HBL-B/Ek zeigte der Referenzstamm keinen äußeren Hämolysering. Erst bei einer zunehmenden Verdünnung des Dialysates konnte dieser wieder beobachtet werden (Abb. 14).



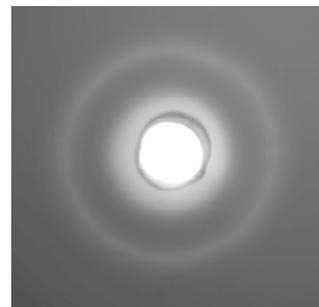
Referenzstamm DSM 4384
mit HBL-B/Ek unverdünnt



Referenzstamm DSM 4384
mit HBL-B/Ek 1:5 verdünnt



Referenzstamm DSM 4384
mit HBL-B/Ek 1:10 verdünnt



Referenzstamm DSM 4384
mit HBL-B/Ek 1:50 verdünnt

Abbildung 14: Hämolyseverhalten unterschiedlicher Verdünnungen des HBL-B/Ek zusammen mit dem Referenzstamm DSM 4384

Um einen Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit der beschriebenen Bindungskomponente HBL-B (BEECHER & WONG, 1997) und des Hämolyseverhaltens zu untersuchen, wurden immer zwei Kavitäten in einem Abstand von 4 mm ausgestanzt, wovon jeweils eine mit 7 μ l HBL-B/Ek versehen wurde. Die andere Kavität wurde zu unterschiedlichen Zeiten mit ebenfalls 7 μ l DSM 4384 beprobt. Das Ergebnis zeigte den erwarteten Verlauf. Je länger mit HBL-B/Ek vorinkubiert wurde, desto deutlicher konnte eine Annäherung des äußeren Hämolyseringes an den inneren Hämolysering und somit ein Verschwinden der ahämolytischen Zone festgestellt werden. Gleichzeitig konnte man eine Verstärkung der hämolytischen Bereiche beobachten (Abb. 15).

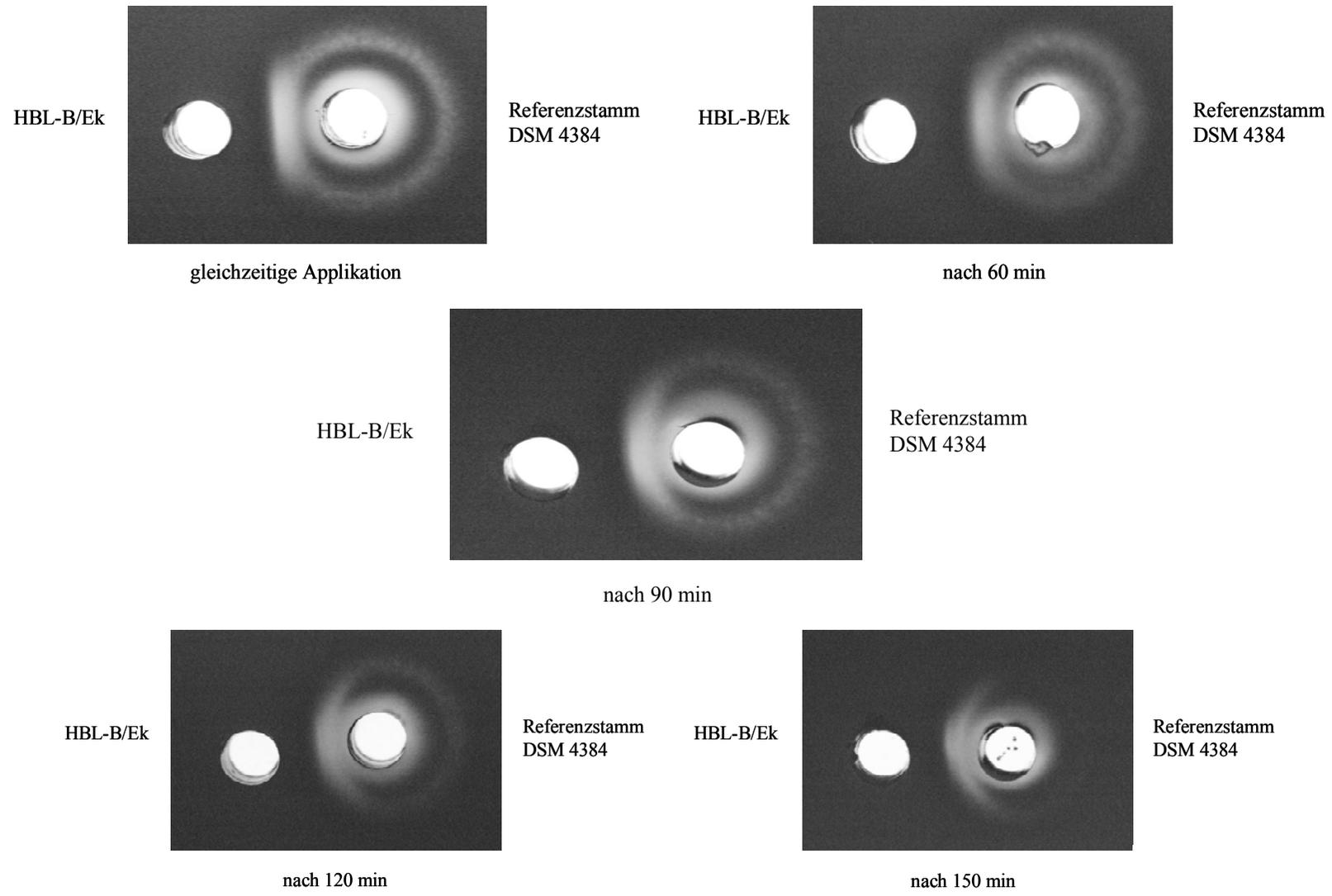


Abbildung 15: Inkubation mit HBL-B/Ek und zeitlich unterschiedliche Zugabe von DSM 4384

4.3.1.2 Immunfluoreszenz

Um das Bindungsverhalten des rekombinanten HBL-B Dialysates näher zu betrachten, wurde mit einem spezifischen, an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten, monoklonalen Antikörper (1B8) die Bindung der Toxinkomponente an die Zelloberfläche bzw. Zelle untersucht. Dazu wurden die HBL-sensitiven Vero-Zellen mit unterschiedlich verdünnten HBL-B/Ek für 24 h inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie in 3.2.3.7 beschrieben. Die Versuche wurden mit einem Alexa Fluor 488 (grüne Fluoreszenz) -gekoppelten Antikörper durchgeführt. Eine Zellkernfärbung erfolgte mit ProLong Gold antifade mit DAPI. Negativkontrollen mit denen gezeigt wurde, dass die Antikörper nicht unspezifisch an die Zelle binden, wurden mitgeführt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten rundliche, fluoreszierende Punkte (so genannte „Spots“) die sich im Bereich des Zellkerns anlagerten, dargestellt werden. Zum Teil waren diese „Spots“ zu kleineren Anhäufungen zusammengelagert und erzeugten somit ein stärkeres Signal (Abb. 16). Diese Bilder konnten in weiteren Versuchen reproduziert werden.

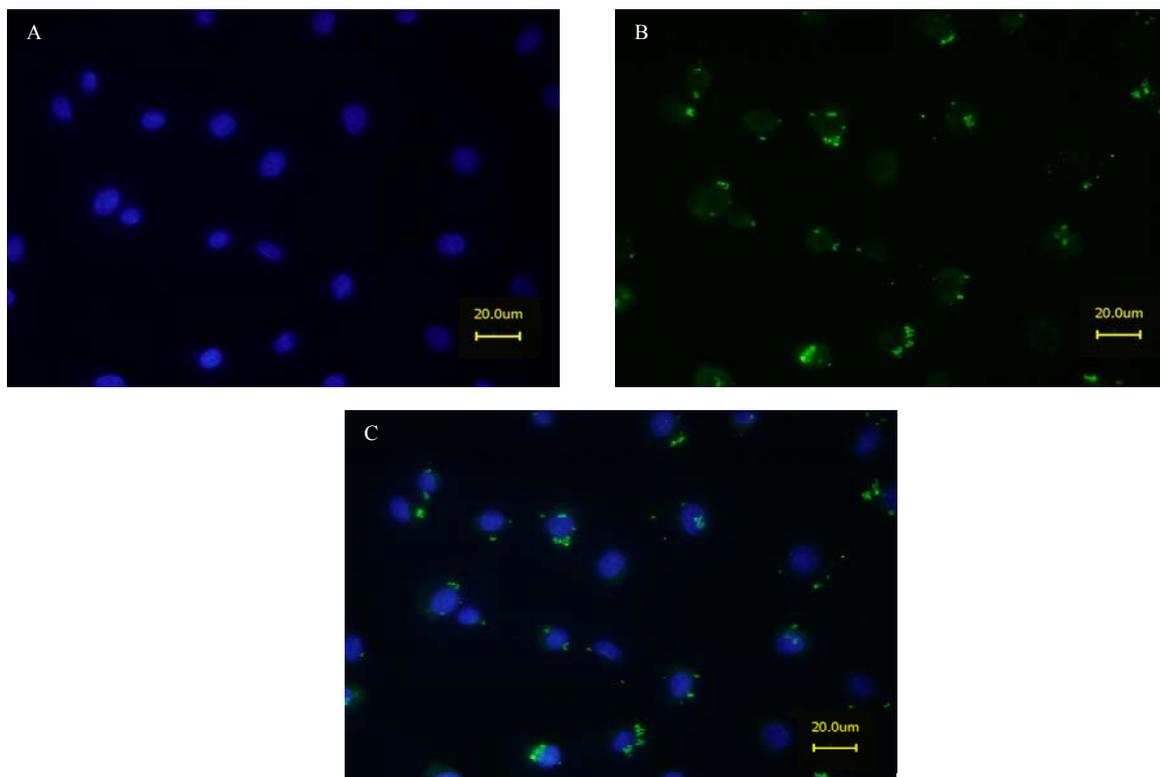


Abbildung 16: Nachweis der Bindung von HBL-B an Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz: Bild (A) Zellkernfärbung mit DAPI, Bild (B) Bindung von HBL-B/Ek mit mAk 1B8-F488 (grüne Fluoreszenz), Bild (C) Overlay von Bild A und B, x 30 Vergrößerung

4.3.1.3 Zytotoxizitätstest

Um einen Einfluss der rekombinanten HBL-B Komponente auf Vero-Zellen zu testen wurde ein Bakterienkulturüberstand benötigt, welcher nur noch die Komponenten HBL-L₁ und -L₂ enthält. Hierfür wurde dem Referenzstamm DSM 4384, der außer HBL auch Nhe exprimiert, zuerst eine der drei Nhe-Komponenten entfernt, um eine von Nhe ausgehende zytotoxische Wirkung auszuschließen. Hierfür wurde die Immunaффinitäts-Säule die mit dem mAk 1E11 gekoppelt ist (siehe 3.2.3.2) verwendet, um NheB aus dem Bakterienkulturüberstand zu entfernen. Der dabei gewonnene Probendurchlauf 1 (PDL 1) wurde nun über die 1B8 Immunaффinitäts-Säule gegeben, um nun auch noch die HBL-B-Komponente aus dem Referenzstamm DSM 4384 zu entfernen. Dieser wurde dann als Probendurchlauf 2 (PDL 2) bezeichnet. Da sich in einem nachgeschalteten indirekten Enzymimmuntest zeigte, dass neben der NheB und HBL-B-Komponente auch zusätzlich noch die HBL-L₁-Komponente über die Immunaффinitätschromatographie-Säulen entfernt wurde, musste für den Zytotoxizitätstest neben HBL-B/Ek noch die fehlende HBL-L₁-Komponente ergänzend hinzugefügt werden. Beide rekombinanten Proteine (HBL-B und L₁) wurden mit dem PDL 2 in einen Verhältnis von 1:1:1 gemischt, 1:20 in die 1. Kavität eingesetzt, seriell verdünnt und anschließend mit Vero-Zellen für 24 h bei 37 °C in 7 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Bei der Auswertung konnte kein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Auch eine Änderung der Mischungsverhältnisse der drei Komponenten (rekombinantes HBL-B, rekombinantes HBL-L₁ und PDL 2) konnte keine messbare Zytotoxizität erzeugen.

4.3.2 HBL-L₁

Die zweite Komponente des HBL-Enterotoxinkomplexes wurde für die Tests auf biologische Aktivität ebenfalls mit Enterokinase verdaut um einen eventuellen Einfluß des Thioredoxin-Anhangs auszuschließen (HBL-L₁/Ek).

4.3.2.1 Hämolyseverhalten auf Schafblut-Agarplatten

Um eine Beteiligung von HBL-L₁ an der Hämolyse näher zu untersuchen, wurde das HBL-L₁/Ek in eine Kavität verbracht und im Abstand von 4 mm eine zweite Kavität mit dem HBL-Referenzstamm DSM 4384 beprobt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 4 h bei 32 °C konnte

wie beim rekombinanten HBL-B eine Verstärkung des äußeren Hämolyseringes beobachtet werden. Diese trat ebenfalls in dem Bereich auf, wo sich die beiden Kavitäten gegenüberlagen, allerdings in einer schwächeren Ausprägung als es beim HBL-B (Abb. 17).

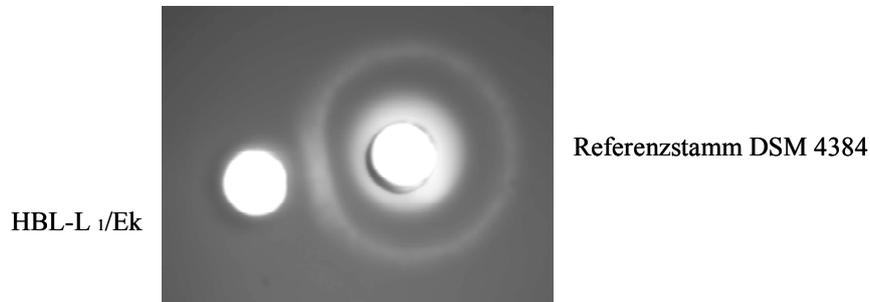


Abbildung 17: Hämolyseverhalten des HBL-L₁/Ek zusammen mit dem Referenzstamm DSM 4384

Die Versuche mit dem Immunaффinitätschromatographie gereinigten Referenzstamm (PDL 1) zeigten, dass sich auch hier eine leichte Verstärkung des äußeren Hämolyseringes durch HBL-L₁/Ek auslösen ließ (Abb. 18).

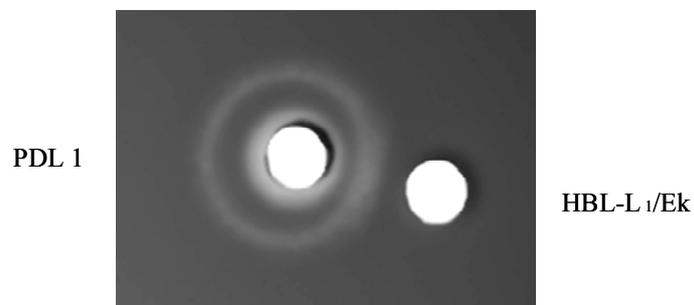


Abbildung 18: Hämolyseverhalten des Probendurchlaufes nach 1E11 Immunaффinitätschromatographie mit HBL-L₁/Ek

Um auch mit dem mAk 1E9 zu untersuchen, ob dieser einen hemmenden Effekt auf die diskontinuierliche Hämolyse hat, wurde dieser in einer Konzentration von 1 µg/ml zusammen mit dem Referenzstamm in einer Kavität inkubiert. Hier konnte kein Einfluß auf den äußeren Hämolysering gezeigt werden. Auch bei einer Inkubation des mAk 1E9 mit dem PDL 1 zeigte sich keine Auswirkung auf die diskontinuierliche Hämolyse des PDL 1.

4.3.2.2 Immunfluoreszenz

Da schon mit dem rekombinanten HBL-B eine Zellbindung demonstriert werden konnte, sollte auch die zweite HBL Komponente auf Interaktionen mit der Zelle getestet werden. Für die Immunfluoreszenz mit HBL-L₁ wurde der an Alexa Fluor 488 (grüne Fluoreszenz) gekoppelte mAk 1E9 verwendet. Der Ablauf des Versuches entsprach den, wie bereits bei HBL-B beschriebenen Vorgängen (siehe 4.3.1.2). Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte beobachtet werden, dass sich auch hier rundliche, fluoreszierende „Spots“ um den mit DAPI gefärbten Zellkern anlagerten. Bei genauerer Betrachtung war hier wie bei HBL-B erkennbar, dass sich die „Spots“ zu Gruppen zusammenlagern wodurch ein stärkeres Fluoreszenzsignal entsteht. Durch Einsatz geeigneter Negativkontrollen, konnte auch hier eine unspezifische Bindung des mAks an die Vero-Zellen ausgeschlossen werden (Abb. 19).

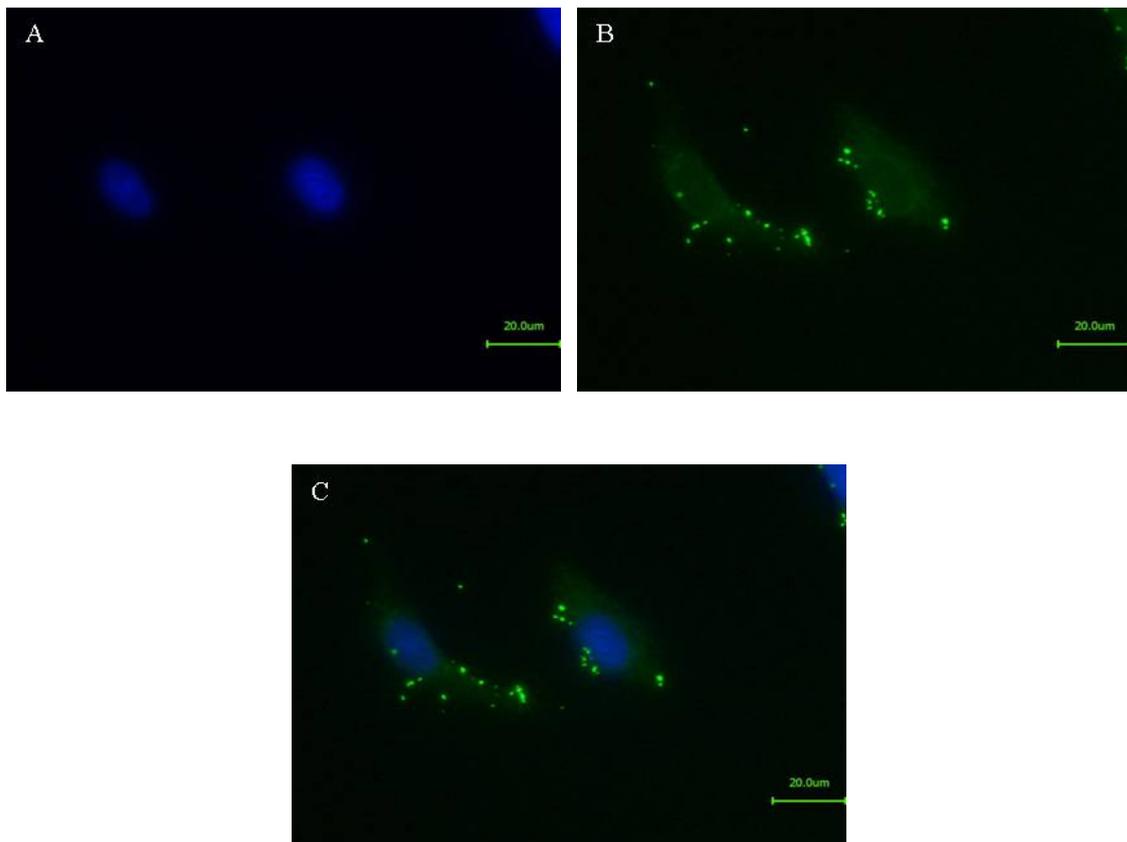


Abbildung 19: Nachweis der Bindung von HBL-L₁ an Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz: Bild (A) Zellkernfärbung mit DAPI, Bild (B) Bindung von HBL-L₁/Ek mit mAk 1E9-F488 (grüne Fluoreszenz), Bild (C) Overlay von Bild A und B, Vergrößerung x 60

4.3.2.3 Zytotoxizitätstest

Da das rekombinante HBL-L₁ Dialysat schon bei dem Zytotoxizitätstest für das HBL-B als ergänzende Komponente eingesetzt wurde, konnte somit gezeigt werden, dass auch hier bislang keine zytotoxische Aktivität gegenüber Vero-Zellen vorliegt (siehe 4.3.1.3).

4.3.3 HBL-L₂

Auch die dritte rekombinante Komponente des HBL-Enterotoxin-Komplexes wurde nach erfolgreicher Klonierung und Expression auf ihre Funktionalität getestet. Bevor mit dem HBL-L₂ Dialysat Testverfahren für biologische Aktivität begonnen wurden, musste, wie auch bei den beiden anderen Komponenten, der Thioredoxin-Anhang mittels Enterokinase entfernt werden (HBL-L₂/Ek).

4.3.3.1 Immunfluoreszenz

Nachdem schon für die beiden Enterotoxin-Komponenten HBL-B und -L₁ jeweils eine voneinander unabhängige Interaktion mit der Zelle nachgewiesen werden konnte, wurde die dritte Komponente mittels Alexa Fluor 555 (rote Fluoreszenz) -gekoppelten mAk 8B12 auf ihr Bindungsverhalten geprüft. Der Versuchsablauf verlief ebenfalls wie bei den beiden anderen Enterotoxin-Komponenten und wurde auch hier durch mitgeführte Negativkontrollen abgesichert. Hier konnte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop dargestellt werden, dass auch wie schon bei HBL-B und HBL-L₁ um den mit DAPI gefärbten Zellkern eine Anlagerung von „Spots“ zu sehen war (Abb. 20).

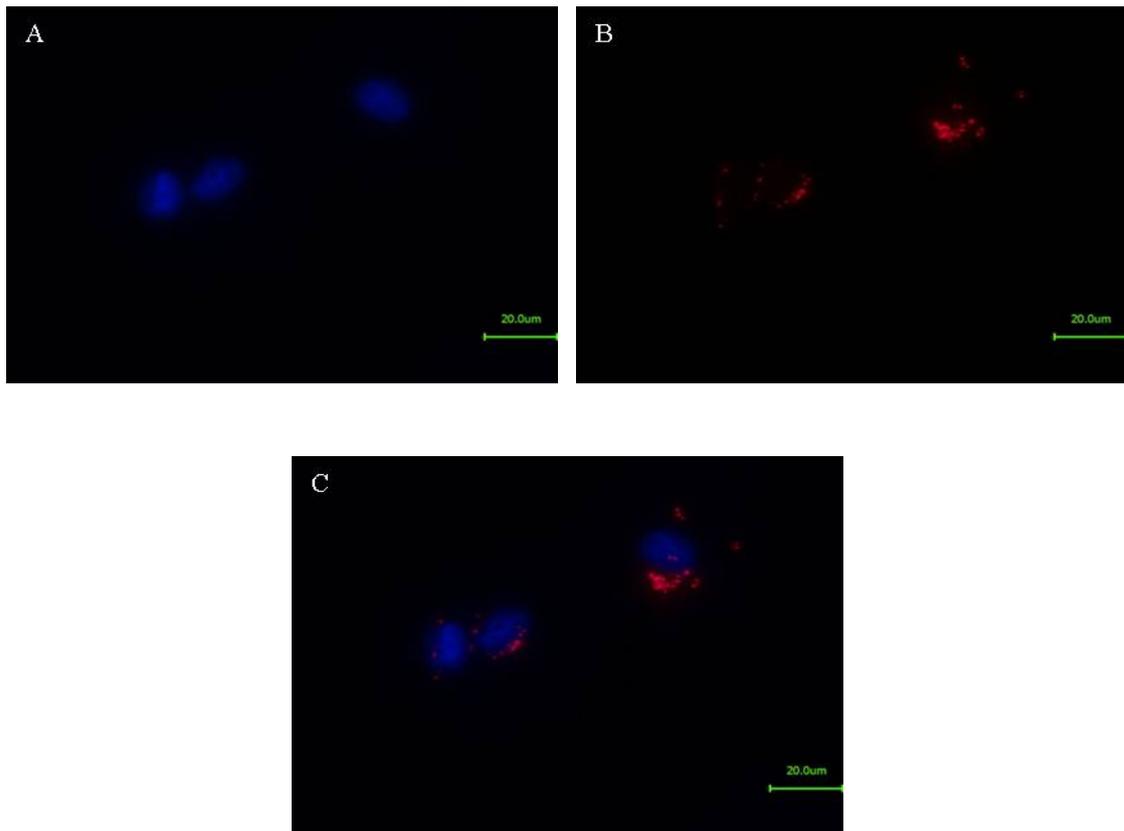


Abbildung 20: Nachweis der Bindung von HBL-L₂ an Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz: Bild (A) Zellkernfärbung mit DAPI, Bild (B) Bindung von HBL-L₂/Ek mit mAk 8B12-F555 (rote Fluoreszenz), Bild (C) Overlay von Bild A und B, Vergrößerung x 60

4.3.3.2 Zytotoxizitätstest

Um eine zytotoxische Aktivität des HBL-L₂ Dialysats zu beurteilen, wurde hierfür ein Bakterienkulturüberstand produziert, der nur noch HBL-B und -L₁ enthält. Dazu wurde mittels Immunaffinitäts-Säule (mAk 1E11) NheB aus dem Bakterienkulturüberstand entfernt. Die HBL-L₂ Komponente wurde mittels der 1A12 Immunaffinitäts-Säule aus dem nach 1E11 gewonnenen Probendurchlauf 1 (PDL 1) entfernt und wurde dann als Probendurchlauf 2 (PDL 2) bezeichnet. Der PDL 1, der über eine toxische Aktivität verfügt, welche auf das HBL zurückzuführen ist, wurde zur Kontrolle im Zytotoxizitätstest eingesetzt. Anhand dieser Kontrolle sollte verglichen werden, ob das rekombinante HBL-L₂ in Kombination mit dem nach der 1A12 Affi-Säule gewonnenen PDL 2, annähernd auf diese reine HBL-Zytotoxizität (HBL-Zytotoxizitätstiter 1:120) kommt. Die Probendurchläufe 1 und 2 wurden im Anschluss in dem indirekten Enzymimmuntest auf die entfernten Toxinkomponenten (NheB und HBL-L₂) getestet, um eine vollständige Entfernung zu gewährleisten.

Für die zytotoxische Wirkung des rekombinanten HBL-L₂/Ek mit dem PDL 2 kamen für HBL sensitive Vero-Zellen zum Einsatz. Die messbare Zytotoxizität für den Kulturüberstand des DSM 4384 belief sich im Mittelwert auf einen Titer von 1:357. Nach Entfernen der NheB Komponente, wurde der PDL 1 in der Verdünnung 1:20 eingesetzt. Für den PDL 1 konnte für die Zytotoxizität ein Mittelwert von 1:120 gemessen werden. Nach Entfernen der L₂-Komponente (PDL 2 nach 1A12 Affi-Säule) sank die messbare Zytotoxizität auf einen Mittelwert von 1:40. Der PDL 2 wurde in einer Verdünnung von 1:60 verwendet um die vorhandene Restzytotoxizität auszuschließen. Das HBL-L₂/Ek wurde 1:10 verwendet und dann zusammen mit dem PDL 2 in einer seriellen Verdünnungsreihe eingesetzt. Die hierbei erzielten Zytotoxizitätstiter lagen bei der gleichzeitigen Inkubation von PDL 2 und HBL-L₂ im Mittelwert bei 1:108. In weiteren Versuchsanordnungen wurde untersucht, ob auch hier ein Einfluss durch eine längere Vorinkubation mit einer der drei HBL-Komponenten (wie es bei HBL-B auf Schafblut-Platten gezeigt werden konnte) dargestellt werden konnte. Dafür wurde zunächst der HBL-B und -L₁ enthaltende PDL 2 mit den Vero-Zellen über Nacht vorinkubiert und am nächsten Tag die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen. Nach Zugabe des rekombinanten HBL-L₂/Ek wurde nach erneuter 2-stündiger Inkubation eine Lysis der Zellen beobachtet und die Zytotoxizitätstiter waren zum Teil doppelt so hoch wie bei der simultanen Inkubation.

5 Diskussion

In den letzten Jahren hat *B. cereus* als Auslöser von Lebensmittelinfektionen und –intoxikationen zunehmend an Bedeutung gewonnen (KOTIRANTA *et al.*, 2000; EHLINGSCHULZ *et al.*, 2004). Während bei der emetischen Form das auslösende Agens eindeutig identifiziert werden konnte (AGATA *et al.*, 1994), sind bei der Diarrhoe-Form mehrere Enterotoxine (Nhe, HBL und CytK-1) als kausale Ursache beschrieben (BEECHER *et al.*, 1995b; LUND & GRANUM, 1996; LUND *et al.*, 2000). Da bis zum heutigen Zeitpunkt nur drei *B. cereus* Stämme mit dem Gen für das CytK-1 beschrieben worden sind, kommt dem Enterotoxin CytK vermutlich nur eine geringe epidemiologische Bedeutung zu (FAGERLUND *et al.*, 2007). Die beiden anderen Komponenten scheinen eine tragende Rolle als auslösende Faktoren für die Diarrhoe-Form darzustellen.

Über die Wirkungsmechanismen der drei Enterotoxine auf zellulärer Ebene ist bislang wenig bekannt. Da bisher für die Enterotoxine CytK, Nhe und HBL noch kein spezifischer Zellrezeptor für die Bindung an die Oberfläche der Zielzelle identifiziert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass diese auch ohne Rezeptor binden können. Es konnte aber gezeigt werden, dass alle drei Zytotoxine in der Lage sind, Poren in den Zellmembranen zu bilden und somit eine Lyse der Zelle initiieren (BEECHER & WONG, 1997; HARDY *et al.*, 2001; FAGERLUND *et al.*, 2008).

MORAVEK *et al.* (2006) beobachteten bei *in vitro* Versuchen, dass die Quantität der Nhe-Expression den maßgeblichen Faktor für die Zytotoxizität eines *B. cereus* Isolates darstellt. Damit wurde für Nhe ein höheres enteropathogenes Potential als für HBL postuliert. Allerdings konnte KRAUSE (2007) zeigen, dass unter anaeroben und somit simulierten gastro-intestinalen Bedingungen HBL-produzierende Stämme eine höhere Zytotoxizität als reine Nhe-Produzenten aufwiesen. Daraus resultiert, dass *in vivo* dem HBL-Enterotoxinkomplex eine größere Bedeutung am enteropathogenen Geschehen zukommen könnte. Aufgrund dieser Vermutung war es Ziel der vorliegenden Arbeit weitere Untersuchungen mit HBL durchzuführen, um möglicherweise eine Aussage über den Wirkungsmechanismus erstellen zu können. Die Isolierung der Toxinkomponenten aus *B. cereus* Überständen mittels klassisch chromatographischer Verfahren geht aber mit einem

nicht unerheblichen Arbeitsaufwand einher und es kommt zu einem beträchtlichen Verlust der Toxinaktivität sowie zu instabilen Toxinpräparationen (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM, 1996). Durch die bekannten Sequenzhomologien zwischen Nhe und HBL besitzen die jeweiligen Einzelkomponenten teilweise ein sehr ähnliches chromatographisches Bindungsverhalten und eine Reinheit der gewonnenen Komponenten ist nicht zu gewährleisten. Des Weiteren ist eine Vielzahl hämolysierender Proteine bei *B. cereus* bekannt (Hämolysine, Phospholipase C, Sphingomyelinase; TOMITA *et al.*, 1991; BEECHER & WONG, 2000), die ebenfalls für die Entstehung einer Hämolyse verantwortlich sein könnten. Dass bereits geringe Verunreinigungen mit anderen Proteinen Auswirkungen auf die biologische Aktivität haben, wurde von HEINRICHS *et al.*, (1993) in Hämolyseversuchen gezeigt.

Um diese bekannten Problemen bei der chromatographischen Aufreinigung der drei HBL-Komponenten zu vermeiden, wurde die rekombinante Herstellung gewählt, wobei auch hier in früheren Studien (HEINRICHS *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 1997) Schwierigkeiten aufgetreten sind. Das Hauptproblem von RYAN *et al.* bei der rekombinanten Produktion der beiden lytischen HBL-Komponenten (HBL-L₁ und -L₂) bestand in der Toxizität der Einzelproteine für *E. coli*. RYAN *et al.* war es nicht gelungen die HBL-Komponenten in größeren Mengen in einem *E. coli*-Expressionssystem zu produzieren, da es durch die vermehrte Expression der beiden Toxin-Komponenten zu einem Absterben der Wirtszellen kam. Für die vorliegende Arbeit wurde deshalb ein Vektorsystem verwendet, welches die rekombinanten Proteine mit einer Thioredoxin-Domäne versieht. Diese Domäne bewirkt eine bessere Löslichkeit der Produkte und soll somit die Bildung von Einschlusskörperchen verhindern. Vor einer Verwendung der rekombinanten Komponenten für funktionelle Tests ist die Abspaltung der Thioredoxin-Domäne essentiell, da ein Funktionalitätsverlust ohne Abspaltung der Domäne beobachtet werden konnte (Abb. 13). Dieser Funktionalitätsverlust lässt sich vermutlich auf eine Veränderung der Tertiärstruktur durch die 14 kDa große Thioredoxin-Domäne zurückführen. Durch die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems wird zunächst eine ausreichende Bakteriendichte erzeugt, ohne dass eine Expression des potentiell toxischen Proteins erfolgt. Wird die Expression induziert, ist die *E. coli*-Dichte hoch genug, so dass ausreichende Proteinmengen exprimiert werden und ein eventuelles Absterben der *E. coli*-Zellen keinen negativen Einfluss auf die Proteinausbeute hat.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, die drei HBL-Komponenten rekombinant herzustellen. Deshalb konnten weitere Versuche durchgeführt werden um die biologische Aktivität der drei HBL-Komponenten (B, L₁ und L₂) zu überprüfen.

In früheren Hämolyseversuchen von BEECHER und WONG (1997) mit gewaschenen Erythrozyten und chromatographisch gereinigten HBL-Komponenten konnte eine Hemmung der Erythrozyten-Lysis durch HBL-B bedingten Überschuss gezeigt werden. Erst durch Verdünnung der HBL-B Komponente konnte wieder eine Hämolyse erzeugt werden. Diese Beobachtungen von BEECHER konnten mit dem rekombinanten HBL-B und dem Referenzstamm DSM 4384 auf Schafblut-Agarplatten ebenfalls dargestellt werden. Hierbei wurde deutlich, dass der hemmende Einfluss von HBL-B auf den äußeren Hämolysering erst ab einer Verdünnung von 1:10 nachlässt und in der nächsten Verdünnungsstufe der Hämolysering wieder erkennbar wird. Erklären lässt sich diese Hemmung durch eine Interaktion von HBL-B mit HBL-L₁. Laut BEECHER und WONG (1997) besitzen beide Komponenten eine antagonistische Wirkung, wenn eine bestimmte Menge der jeweiligen Komponente überschritten wird.

Des Weiteren wurde ein Einfluss vom Zeitpunkt der Bindung von HBL an die Erythrozyten und der Stärke der Hämolyse untersucht. Dabei konnte durch Vorinkubation mit HBL-B und zeitlich versetzter Zugabe des Referenzstammes ein so genannter „Priming-Effekt“ erzielt werden. Die mit Zunahme der Vorinkubationsdauer stärker werdende Hämolyse, sowie die Annäherung des äußeren Hämolyseringes an den Inneren zeigen, dass HBL-B die Erythrozyten sensibilisiert und sie so empfindlicher für die beiden fehlenden Komponenten (HBL-L₁ und -L₂) macht. Dadurch erfolgt eine schnellere und stärkere Hämolyse durch die beiden lytischen Komponenten HBL-L₁ und -L₂. Auch BEECHER und WONG (1997) beschrieben einen so genannten „Priming-Effekt“. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang des Hämolyse-Verlaufs mit dem Zeitpunkt der Inkubation gibt. Je länger die Vorinkubation der Erythrozyten mit HBL-B dauerte, bevor die beiden anderen Komponenten (HBL-L₁ und -L₂) hinzugefügt wurden, desto schneller und stärker verlief die Hämolyse. Dieser „Priming-Effekt“ lässt sich auch in der Versuchsreihe darstellen, wenn HBL-B gegenüber dem Referenzstamm inkubiert wird. Hierbei zeigt sich eine verstärkte Hämolyse die im Bereich der näher mit HBL-B inkubierten Kavität liegt (Abb. 10). Die HBL-B und -L₁- Komponenten aus der Referenzstamm DSM 4384 verdünnen sich durch die nach außen verlaufende Diffusionsstrecke soweit, dass eine gegenseitige Hemmung nicht

mehr zum Tragen kommt. An dem Punkt, an dem die drei Komponenten in einem richtigen Verhältnis vorliegen, findet die Hämolyse statt. Es entsteht der äußere Hämolysering. Das HBL-B aus der gegenüberliegenden Kavität diffundiert ohne von HBL-L₁ gehemmt zu werden in Richtung der Kavität mit dem Referenzstamm zu und kann sich ungehindert an die Erythrozyten binden und diese „primen“. Da die beiden Komponenten (L₁ und L₂) des Referenzstammes noch in die Richtung der mit HBL-B versehenen Kavität diffundieren, treffen sie dort auf die mit HBL-B „geprimten“ Erythrozyten und verursachen dann dort nochmals eine Hämolyse. Dies führt dann zu einer optisch erkennbaren Verstärkung der Hämolysezone, da es zum einen durch die „geprimten“ Erythrozyten zu einer verstärkten Hämolyse und zum anderen zur Ausprägung von zwei nebeneinander liegenden Hämolysebereichen kommt (BEECHER & WONG, 1997).

Im Gegensatz zu BEECHER und WONG wurde bei gleichem Versuchsaufbau, aber unter Verwendung von HBL-L₁ statt HBL-B, ebenfalls eine Verstärkung der äußeren Hämolyse beobachtet. Auch hier dürfte die HBL-L₁-Komponente aus der dem Referenzstamm gegenüberliegenden Kavität auf bereits „geprimte“ Erythrozyten treffen und dadurch eine Verstärkung der Hämolyse bewirken. Die von BEECHER und WONG beschriebene Hemmung des äußeren Hämolyseringes durch HBL-L₁ könnte durch NheB verunreinigte Präparationen, die mittels Säulenchromatographie gewonnen wurden, erklärt werden. WEGSCHEIDER (2004) hat eine hemmende Wirkung von NheB auf die diskontinuierliche Hämolyse beobachtet und die bekannten Sequenzhomologien von HBL-L₁ und NheB und eine damit verbundene Konkurrenz um Bindungsstellen an den Erythrozyten als Ursache postuliert.

Eine Bindung der drei rekombinanten Proteine an die Zelle konnte mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden. Durch Inkubation der Vero-Zellen mit dem jeweiligen rekombinanten Dialysat (HBL-B, -L₁ bzw. -L₂) des HBL-Enterotoxin-Komplexes über Nacht konnten unter dem Immunfluoreszenzmikroskop deutliche Bindungen der einzelnen Komponenten gezeigt werden. Diese voneinander unabhängige Bindung deutet darauf hin, dass die von BEECHER und WONG (1997) postulierte Wirkung auf die Zelle durch Entstehung eines sogenannten „membrane attack complex“ mit Bildung transmembranärer Poren und anschließendem Zelltod, wahrscheinlich ist.

Für weitere Tests der biologischen Aktivität der rekombinanten Protein-Komponenten sollten Aussagen zur zytotoxischen Aktivität mittels Vero-Zellen, da diese als sehr sensitiv für HBL gelten (WONG *et al.*, 1988), gemacht werden. Mittels der Immunaффinitätschromatographie wurden selektiv die Toxinkomponenten NheB, HBL-L₂ bzw. HBL-B aus Kulturüberständen des *B. cereus* Referenzstammes DSM 4384 mit toxinspezifischen monoklonalen Antikörpern sequentiell entfernt. Durch die Entfernung der NheB-Komponente zeigt sich ein deutlich geringeres zytotoxisches Potential des Bakterienkulturüberstandes woraus sich auf eine Inaktivierung des Nhe-Komplexes schließen lässt. Eine Restaktivität des PDL 1 ist auf eine reine Zytotoxizität des HBL-Komplexes zurück zu führen. Durch die zusätzliche Entfernung der HBL-L₂-Komponente mittels Immunaффinitätschromatographie wurde ein nahezu atoxischer Kulturüberstand gewonnen, der Basis für folgende Versuche war.

Die gleichzeitige Inkubation von rekombinanten HBL-L₂ mit dem atoxischen Probendurchlauf 2 (enthält noch die Komponenten HBL-B und -L₁) zeigte anhand des erreichten Zytotoxizitätstiter (Mittelwert 1:108), der annähernd im Bereich der reinen HBL-Zytotoxizität liegt, dass eine biologische Aktivität des rekombinant hergestellten HBL-L₂ vorhanden ist. Durch die Vorinkubation des atoxischen PDL 2 über Nacht mit Vero-Zellen und Zugabe von rekombinanten HBL-L₂ am darauf folgenden Tag, zeigte sich ein doppelt so hoher Zytotoxizitätstiter als bei der simultanen Inkubation der Komponenten. Dieses Ergebnis könnte sich auf den schon weiter oben erwähnten „Priming-Effekt“ des im Probendurchlauf 2 enthaltenen HBL-B zurückführen lassen. HBL-B bindet an die Vero-Zellen und sensibilisiert diese für die Lysis durch HBL-L₂.

Für HBL-produzierende *B. cereus*-Stämme ist eine spezielle Form der Hämolyse, die als diskontinuierliche Hämolyse oder auch als paradoxes Zonenphänomen bezeichnet wird, beschrieben (BEECHER & MACMILLAN, 1990; BEECHER & WONG, 1997). Das Zustandekommen wird von BEECHER und WONG (1997) durch ein unterschiedliches Diffusionsverhalten auf Schafblut-Agarplatten und somit differierende Konzentrationen der einzelnen Komponenten an der Zellmembran der Erythrozyten erklärt. Nach einer Sensibilisierung der Erythrozyten durch die Bindung der HBL-B-Komponente werden die Erythrozyten durch die beiden Komponenten HBL-L₁ und -L₂ lysiert. Die ahämolytische Zone ist durch eine inhibitorisch hohe Konzentration der HBL-L₁-Komponente bedingt, bei der es zur einer Hemmung der HBL-B-Komponente und somit zu keiner Sensibilisierung der Erythrozyten kommt. Erst wenn die inhibitorische Wirkung der HBL-L₁-Komponente auf HBL-B nicht mehr zum Tragen kommt und alle drei Komponenten (HBL-B, -L₁ und -L₂) in

einem bestimmten Mengenverhältnis vorliegen, kommt es zur Ausbildung des äußeren Hämolyseringes.

Nachdem bislang kein reiner HBL-produzierender *B. cereus* Stamm beschrieben wurde, sondern immer eine gemeinsame Expression von HBL und Nhe stattfindet, sind aufgrund der bekannten Aminosäurehomologien zwischen den Einzelkomponenten synergistische bzw. antagonistische Wirkungen denkbar.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde aus dem Kulturüberstand des HBL-Referenzstammes DSM 4384 (HBL- und Nhe-Produzent) mittels Immunaффinitäts-Chromatographie (mAk 1E11) die NheB Komponente entfernt. Dieser Kulturüberstand ohne biologisch aktives Nhe wurde als Probendurchlauf 1 bezeichnet und zeigte noch immer eine diskontinuierliche Hämolyse. Eine direkte Beteiligung des HBL-Komplexes an der Bildung des paradoxen Zonenphänomens konnte durch einen weiteren Versuch bewiesen werden. Dabei wurde nach gemeinsamer Inkubation des Referenzstammes DSM 4384 mit dem HBL-B spezifischen monoklonalen Antikörper 1B8 auf Schafblut-Agarplatten ein Verschwinden des äußeren Hämolyseringes beobachtet. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass es zu der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zwischen mAk 1B8 und HBL-B kommt, der in seiner Diffusionsgeschwindigkeit verlangsamt ist bzw. nicht mehr diffundieren kann. Die beiden anderen HBL-Komponenten (L_1 und L_2) werden durch den Antikörper nicht beeinflusst und diffundieren im Schafblut-Agar weiter. Da aber für eine biologische Aktivität alle drei HBL-Komponenten in einem bestimmten Mengenverhältnis nötig sind (BEECHER *et al.*, 1995b; DIETRICH *et al.*, 1999), und in diesem Versuch eine Komponente nicht in der benötigten Menge vorhanden ist, konnte der äußere Hämolysering nicht beobachtet werden. Das Phänomen der durch den monoklonalen Antikörper 1B8 bedingten Hemmung des äußeren Hämolyseringes ließ sich auch mit dem PDL 1 zeigen. Hierbei spielen wohl dieselben Mechanismen eine Rolle wie bei Verwendung des Kulturüberstandes von DSM 4384.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, die Probleme der Toxizität der Einzelkomponenten (HBL- L_1 und L_2) für die Wirtszelle durch Auswahl eines geeigneten Expressionssystems zu lösen. Die Herstellung von HBL-B war wie auch schon von anderen Autoren beschrieben (HEINRICHS *et al.*, 1993; MADEGOWDA *et al.*, 2008) ohne Schwierigkeiten möglich. Durch die am Institut zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörper (DIETRICH *et al.*, 1999) konnte mittels Immunfluoreszenz eine

voneinander unabhängige Bindung der drei Einzelkomponenten an Vero-Zellen gezeigt werden. Des Weiteren wurde eine biologische Aktivität der Komponenten HBL-B und L₁ auf Schafblut-Agarplatten demonstriert. Für die Komponente HBL-L₂ konnte neben der Bindung zusätzlich Aktivität ein zytotoxischer Effekt auf Vero-Zellen gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene Herstellung und Charakterisierung der drei rekombinanten Einzelkomponenten des HBL-Enterotoxinkomplexes stellen einen wesentlichen Fortschritt dar und sind Voraussetzung für weitere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus dieses Enterotoxins auf zellulärer Ebene.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der rekombinanten Herstellung der drei Komponenten (HBL-B, -L₁ und -L₂) des Enterotoxins Haemolysin BL (HBL) von *Bacillus cereus*. Die Bindung der jeweiligen Einzelkomponenten an Epithelzellen wurde mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Des Weiteren wurde die biologische Aktivität der rekombinanten Proteine in Blutagardiffusions- und Zytotoxizitätstests überprüft.

Unter Verwendung eines speziellen Expressionssystems konnten die in früheren Studien beschriebenen Schwierigkeiten bezüglich der Toxizität der lytischen Einzelkomponenten (HBL-L₁ und HBL-L₂) und die Bildung von Einschlußkörperchen für *E. coli* umgangen werden. Die Herstellung von HBL-B war ohne Schwierigkeiten möglich. Im Mittel konnten anhand der EIA-Titer der einzelnen Dialysate Konzentrationen bei HBL-B von 25 µg/ml, bei HBL-L₁ von 23 µg/ml und bei HBL-L₂ von 13 µg/ml gemessen werden.

Durch den Einsatz von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten monoklonalen Antikörpern wurde die Bindung der drei rekombinanten Toxinkomponenten an Vero-Zellen demonstriert. Die jeweiligen Einzelproteine waren in der Lage, unabhängig voneinander an die Zellen zu binden. Des Weiteren konnte eine biologische Aktivität auf Schafblut-Agarplatten für die rekombinanten Komponenten HBL-B und -L₁ nachgewiesen werden. In einem Doppeldiffusionsansatz konnte eine Verstärkung der diskontinuierlichen Hämolyse durch die rekombinanten Proteine gezeigt werden. Für die rekombinant hergestellte Komponente HBL-L₂ konnte im Zytotoxizitätstest mit Vero-Zellen eine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte mit einem HBL-B-spezifischen monoklonalen Antikörper der äußere Hämolysering inhibiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass der äußere Hämolysering vornehmlich auf den HBL-Komplex zurückzuführen ist.

Summary

Expression and characterisation of recombinant components of the HBL-enterotoxin-complex produced by *Bacillus cereus*

Present thesis deals with the recombinant production of three components (HBL-B, -L₁ and -L₂) of the Hemolysin BL (HBL) enterotoxin from *B. cereus*. Binding of single components to epithelial cells was detected by immunofluorescence microscopy. In addition, the biological activity of the recombinant proteins was verified by blood agar diffusion and cytotoxicity assays.

Using a specific expression system, problems of former studies such as cytotoxic-effects of lytic single components (HBL-L₁, and HBL-L₂) and formation of inclusion bodies in *E. coli* were overcome. The production of HBL-B could be done without any difficulties. Based on EIA-titers of each dialysate mean values were calculated for HBL-B 25 µg/ml, for HBL-L₁ 23 µg/ml and for HBL-L₂ 13 µg/ml.

Using fluorescence-labelled monoclonal antibodies binding of all three recombinant toxin components on Vero cells was demonstrated. Each protein was able to bind independently to cells. Furthermore, biological activity of the recombinant components HBL-B and -L₁ on sheep blood agar plates could be detected. An increased discontinuous hemolysis by the recombinant proteins was shown. A cytotoxic activity of recombinant HBL-L₂ component was demonstrated on Vero cells. A supplementation of the specific monoclonal antibody 1B8, led to disappearance of the outer hemolysis zone. This indicates that the outer hemolysis zone is mainly caused by the HBL complex.

7 Literaturverzeichnis

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., MORI, M. & ISOBE, M. (1995)

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*

FEMS Microbiol Lett **129**, 17-20

AGATA, N., OHTA, M., MORI, M. & SHIBAYAMA, K. (1999)

Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids

Microbiol Immunol **43**, 15-18

APETROAIE-CONSTANTIN, C., SHAHEEN, R., ANDRUP, L., SMIDT, L., RITA, H. & SALKINOJA-SALONEN, M. (2008)

Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*

Int J Food Microbiol **127**, 60-67

BALLARD, J., CRABTREE, J., ROE, B. A. & TWETEN, R. K. (1995)

The primary structure of *Clostridium septicum* alpha-toxin exhibits similarity with that of *Aeromonas hydrophila* aerolysin

Infect Immun **63**, 340-344

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)

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. & WONG, A. C. (1994b)

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

Infect Immun **62**, 980-986

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. L. (2000)

Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*
Microbiology **146**, 3033-3039

BREKENFELD (1926)

Lebensmittelbakterien und Vergiftungen
Zentralbl Bakt I Abt Orig **99**, 353-385

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

A report on two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*
Cornell Vet **47**, 226-240

CARSON, M. J., BARONDESS, J. & BECKWITH, J. (1991)

The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations
J Bacteriol **173**, 2187-2195

CHAN, S. J., WEISS, J., KONRAD, M., WHITE, T., BAHL, C., YU, S. D., MARKS, D. & STEINER, D. F. (1981)

Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*
Proc Natl Acad Sci U S A **78**, 5401-5405

CHENG, C. & SHUMAN, S. (2000)

DNA strand transfer catalyzed by vaccinia topoisomerase: ligation of DNAs containing a 3' mononucleotide overhang
Nucleic Acids Res **28**, 1893-1898

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 Natl Acad Sci U S A **70**, 3240-3244

COLE, A. R., GIBERT, M., POPOFF, M., MOSS, D. S., TITBALL, R. W. & BASAK, A. K. (2004)

Clostridium perfringens epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin

Nat Struct Mol Biol **11**, 797-798

COLLIER, J. R. & YOUNG, J. A. T. (2003)

Anthrax Toxin

Annu Rev Cell Dev Biol **19**, 45-70

CORNELIS, G. R. (2006)

The type III secretion injectisome

Nat Rev Microbiol **4**, 811-825

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG; DGE (2004)

Mikrobiologische Aspekte der Ernährung

Ernährungsbericht 2004, Kapitel 3

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG; DGE (2008)

Mikrobiologische Aspekte der Ernährung

Ernährungsbericht 2008, Kapitel 5

DIERICK, K., VAN COILLIE, E., SWIECICKA, I., MEYFROIDT, G., DEVLIEGER, H., MEULEMANS, A., HOEDEMAEKERS, G., FOURIE, L., HEYNDRICKX, M. & MAHILLON, J. (2005)

Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning

J Clin Microbiol **43**, 4277-4279

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 Microb **65**, 4470-4474

DIETRICH, R., MORAVEK, M., BÜRK, C., GRANUM, P. E. & MÄRTLBAUER, E. (2005)

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

Appl Environ Microb **71**, 8214-8220

DOMMEL, M. K., FRENZEL, E., STRASSER, B., BLOCHINGER, C., SCHERER, S. & EHLING-SCHULZ, M. (2010)

Identification of the main promoter directing cereulide biosynthesis in emetic *Bacillus cereus* and its application for real-time monitoring of *ces* gene expression in foods

Appl Environ Microbiol **76**, 1232-1240

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., VUKOV, N., SCHULZ, A., SHAHEEN, R., ANDERSSON, M., MÄRTLBAUER, E. & SCHERER, S. (2005)

Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*

Appl Environ Microbiol **71**, 105-113

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

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

Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay

Fems Microbiol Lett **232**, 189-195

EWALD, C., HEER, A., HEIKING, L. & MOLL, G. (1985)

Mastitiden durch *Bacillus cereus* bei medikamentell trockengestellten Milchkühen

Prakt Tierarzt, 1025-1028

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., FÜRST, 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., LINDBÄCK, 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

FAILLE, C., TAUVERON, G., LE GENTIL-LELIEVRE, C. & SLOMIANNY, C. (2007)

Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines
J Food Prot **70**, 2346-2353

FERRARI, M., FORNASIERO, M. C. & ISETTA, A. M. (1990)

MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro
J Immunol Methods **131**, 165-172

FIESCHKO, J. & RITCH, T. (1986)

Production of human alpha-consensus interferon in recombinant *E. coli*
Chem Eng Commun **45**, 229-240

FINLAY, W. J., LOGAN, N. A. & SUTHERLAND, A. D. (2000)

Bacillus cereus produces most emetic toxin at lower temperatures
Lett Appl Microbiol **31**, 385-389

FINLAY, W. J., LOGAN, N. A. & SUTHERLAND, A. D. (1999)

Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin
Appl Environ Microbiol **65**, 1811-1812

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., MESSELHÄUSSER, 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 Microb **73**, 1892-1898

GAILLARD, S., LEGUERINEL, I., SAVY, N. & MAFART, P. (2005)

Quantifying the combined effects of the heating time, the temperature and the recovery medium pH on the regrowth lag time of *Bacillus cereus* spores after a heat treatment

Int J Food Microbiol **105**, 53-58

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

Tierärztl Umschau, 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

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

GLATZ, B. A. & GOEPPERT, J. M. (1973)

Extracellular factor synthesized by *Bacillus cereus* which evokes a dermal reaction in guinea pigs

Infect Immun **8**, 25-29

GOHAR, M., OKSTAD, O. A., GILOIS, N., SANCHIS, V., KOLSTO, A. B. & LERECLUS, D. (2002)

Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon

Proteomics **2**, 784-791

GOHAR, M., FAEGRI, K., PERCHAT, S., RAVNUM, S., OKSTAD, O. A., GOMINET, M., KOLSTO, A. B. & LERECLUS, D. (2008)

The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*

PLoS One **3**, e2793

GONZALEZ, M. R., BISCHOFBERGER, M., PERNOT, L., VAN DER GOOT, F. G. & FRÊCHE, B. (2008)

Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story?

Cell Mol Life Sci **65**, 493-507

GORDON, V. M., KLIMPEL, K. R., ARORA, N., HENDERSON, M. A. & LEPPLA, S. H. (1995)

Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases

Infect Immun **63**, 82-87

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. (2007)

Bacillus cereus

In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3rd Ed. (Doyle, M. P. & Beuchat L. R., eds) pp. 445 - 455

ASM Press, Washington, D.C.

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

GURCEL, L., IACOVACHE, I. & VAN DER GOOT, F. G. (2005)

Aerolysin and related *Aeromonas* toxins

In: The Source Book of Bacterial Protein Toxins (Alouf, J. E. and Popoff, M. R., eds) pp. 606-620

Elsevier Academic Press, London.

GUZMAN, L. M., BARONDESS, J. J. & BECKWITH, J. (1992)

FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*

J Bacteriol **174**, 7716-7728

GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J. & BECKWITH, J. (1995)

Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter

J Bacteriol **177**, 4121-4130

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)

Matforgiftninger fremkalt av *Bacillus cereus*

Nordisk Hyg Tidsskr **31**, 189-206

HAUGE, S. (1955)

Food poisoning caused by aerobic spore-forming *bacilli*

J Appl Bacteriol **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

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

Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate

J Clin Microbiol **41**, 3441-3444

HUGHES, S., BARTHOLOMEW, B., HARDY, J. C. & KRAMER, J. M. (1988)

Potential application of a Hep-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning

FEMS Microbiol Lett **52**, 7-11

IN'T VELD, P. H., RITMEESTER, W. S., DELFGOU-VAN ASCH, E. H., DUFRENNE, J. B., WERNARS, K., SMIT, E. & VAN LEUSDEN, F. M. (2001)

Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk

Int J Food Microbiol **64**, 63-70

JÄÄSKELÄINEN, E. L., HAGGBLOM, M. M., ANDERSSON, M. A. & SALKINOJA-SALONEN, M. S. (2004)

Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food

Int J Food Microbiol **96**, 75-83

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

KIYOMIZU, K., YAGI, T., YOSHIDA, H., MINAMI, R., TANIMURA, A., KARASUNO, T. & HIRAOKA, A. (2008)

Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia

J Infect Chemother **14**, 361-367

KOBAYASHI, K., KAMI, M., IKEDA, M., KISHI, Y., MURASHIGE, N., TANOSAKI, R., MORI, S. & TAKAUE, Y. (2005)

Fulminant septicemia caused by *Bacillus cereus* following reduced-intensity umbilical cord blood transplantation

Haematologica **90**, ECR06

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

Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections

Microbes Infect **2**, 189-198

KRAMER, J.M. & GILBERT, R. J. (1989):

Bacillus cereus and other *Bacillus* species

In: Foodborne Bacterial Pathogens (Doyle, M. P., ed) pp. 21 - 70

Marcel Dekker, New York

KRAUSE, N. (2007)

Produktion von *Bacillus cereus* Enterotoxinen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Diss. med. vet. München

KUHN, A. & WICKNER, W. (1985)

Isolation of mutants in M13 coat protein that affect its synthesis, processing and assembly into phage

J Biol Chem **260**, 5907-5913

LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K. P., PRÜSS, P. M., KAPLAN, T., WIESSNER-GUNKEL, E., STEWART, G. S. A. B. & SCHERER, S. (1998)

Bacillus weihenstephanensis sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group

Int J Syst Bact **48**, 1373-1382

LEE-HUANG, S. (1984)

Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*

Proc Natl Acad Sci U S A **81**, 2708-2712

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

LUBENAU (1906)

Bacillus peptonificans als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie

Zentralbl Bakt I Abt Orig **40**, 433-437

LÜCKING, G., DOMMEL, M. K., SCHERER, S., FOUET, A. & EHLING-SCHULZ, M. (2009)

Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR

Microbiology **155**, 922-931

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

MADEGOWDA, M., ESWARAMOORTHY, S., BURLEY, S. K. & SWAMINATHAN, S. (2008)

X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*

Proteins **71**, 534-540

MAHLER, H., PASI, A., KRAMER, J. M., SCHULTE, P., SCOGING, A. C., BAR, W. & KRAHENBUHL, S. (1997)

Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*

N Engl J Med **336**, 1142-1148

MARCHUK, D., DRUMM, M., SAULINO, A. & COLLINS, F. S. (1991)

Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products

Nucleic Acids Res **19**, 1154

MELLING, J., CAPEL, B. J., TURNBULL, P. C. & GILBERT, R. J. (1976)

Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*

J Clin Pathol **29**, 938-940

MIKAMI, T., HORIKAWA, T., MURAKAMI, T., MATSUMOTO, T., YAMAKAWA, A., MURAYAMA, S., KATAGIRI, S., SHINAGAWA, K. & SUZUKI, M. (1994)

An improved method for detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples

FEMS Microbiol Lett **119**, 53-57

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

MORAVEK, M., WEGSCHEIDER, M., SCHULZ, A., DIETRICH, R., BÜRK, C. & MÄRTLBAUER, 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. & MÄRTLBAUER, E. (2006)

Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses

FEMS Microbiol Lett **257**, 293-298

MORTIMER, P. R. & MCCANN, G. (1974)

Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice

Lancet **1**, 1043-1045

MOSMANN, T. (1983)

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays

J Immunol Methods **65**, 55-63

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 alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism
Nature **459**, 726-730

NGAMWONGSATIT, P., BUASRI, W., PIANARIYANON, P., PULSRIKAM, C., OHBA, M., ASSAVANIG, A. & PANBANGRED, W. (2008)

Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers
Int J Food Microbiol **121**, 352-356

NIKODEMUSZ, I. (1965)

Reproducibility of food poisoning in cats caused by *Bacillus cereus*
Zentralbl Bak I Abt Orig **196**, 81-87

NIKODEMUSZ, I. & GONDA, G. (1966)

The effect of long-term administration of foodstuffs contaminated by *Bacillus cereus* on cats
Zentralbl Bak I Abt Orig **199**, 64-67

NIKODEMUSZ, I. (1967)

Enteropathogenic activity of *Bacillus cereus* in dogs
Zentralbl Bak I Abt Orig **202**, 533-538

OGDEN, S., HAGGERTY, D., STONER, C. M., KOLODRUBETZ, D. & SCHLEIF, R. (1980)

The *Escherichia coli* L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation
Proc Natl Acad Sci U S A **77**, 3346-3350

PATRICK, C. C., LANGSTON, C. & BAKER, C. J. (1989)

Bacillus species infections in neonates

Rev Infect Dis **11**, 612-615

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, P. (1972)

Food poisoning associated with *Bacillus cereus*

Br Med J **1**, 189

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE, P. (1973)

Bacillus cereus food poisoning

Br Med J **3**, 647

RANGANATHA, H. G., SAKI, S. & KESHAVAMURTHY, B. S. (1981)

Bacillus cereus as a cause of abortion in a mare

Curr Sci **50**, 458

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

RYU, J. H. & BEUCHAT, L. R. (2005)

Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer

J Food Prot **68**, 2614-2622

SCHLEIF, R. (1992)

DNA looping

Annu Rev Biochem **61**, 199-223

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

Bacillus cereus food poisoning and its toxins

J Food Protect **68**, 636-648

SCHUH, J. & WEINSTOCK, D. (1985)

Bovine abortion caused by *Bacillus cereus*

J Am Vet Med Assoc **187**, 1047-1048

SEITZ, A. (1913)

Pathogener *Bacillus subtilis*

Zentralbl Bakt I Abt Orig **70**, 113-114

SHUMAN, S. (1991)

Site-specific DNA cleavage by vaccinia virus DNA topoisomerase I. Role of nucleotide sequence and DNA secondary structure

J Biol Chem **266**, 1796-1803

SHUMAN, S. (1994)

Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase

J Biol Chem **269**, 32678-32684

SORENSEN, H. P. & MORTENSEN, K. K. (2005)

Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*

J Biotechnol **115**, 113-128

SPIRA, W. M. & GOEPFERT, J. M. (1972)

Bacillus cereus-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops

Appl Microbiol **24**, 341-348

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

SUTHERLAND, A. D. & LIMOND, A. M. (1993)

Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*
J Dairy Res **60**, 575-580

TERPLAN, G. (1957)

Saprophyten als Mastitiserreger
Arch Lebensmittelhyg **8**, 37-38

THAENTHANE, S., WONG, A. C. L. & PANBANGRED, W. (2005)

Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates
Int J Food Microbiol **105**, 203-212

TILLEY, S. J. & SAIBIL, H. R. (2006)

The mechanism of pore formation by bacterial toxins
Curr Opin Struct Biol **16**, 230-236

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

TOMITA, M., TAGUCHI, R. & IKEZAWA, H. (1991)

Sphingomyelinase of *Bacillus cereus* as bacterial hemolysin
J Toxicol Toxin Rev **10**, 169-207

TRÜB, C. L. P. & WUNDRAM, G. (1942)

Die Gemeinschaftsverpflegung in ihrer Beziehung zu den unspezifischen bakteriellen Lebensmittelvergiftungen

Zentralbl Bakt I Abt Ref **143**, 241

TURNBULL, P. C., JORGENSEN, K., KRAMER, J. M., GILBERT, R. J. & PARRY, J. M. (1979)

Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins

J Clin Pathol **32**, 289-293

TWETEN, R. K., PARKER, M. W. & JOHNSON, A. E. (2001)

The cholesterol-dependent cytolysins

Curr Top Microbiol Immunol **257**, 15-33

WEGSCHEIDER, M. (2004)

Untersuchung zu *Bacillus cereus* Enterotoxin-Komplexen auf zellulärer Ebene

Diss. med. vet. München

WEHRLE, E., MORAVEK, M., DIETRICH, R., BÜRK, C., DIDIER, A. & MÄRTLBAUER, E. (2009)

Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*

J Microbiol Methods **78**, 265-270

WEHRLE, E., DIDIER, A., MORAVEK, M., DIETRICH, R. & MÄRTLBAUER, E. (2010)

Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I

Mol Cell Probes, accepted

WIJMAN, J. G., DE LEEUW, P. P., MOEZELAAR, R., ZWIETERING, M. H. & ABEE, T. (2007)

Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion
Appl Environ Microbiol **73**, 1481-1488

WONG, H. C., CHEN, Y. L. & CHEN, C. L. F. (1988)

Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk-products
J Food Protect **51**, 707-710

YANG, I. C., SHIH, D. Y. C., 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 Protect **68**, 2123-2130

8 Anhang

8.1 Ergebnisse der Sequenzierung nach Clustal W2 Alignment *B. cereus* 14579 als Referenzstamm

HBL-B

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
14579  -----ATGATAAAAAAAAAATCCCTTATAAAATTACTCGCTG
B      GATGACAGCTGGGAATTGATCCCTTCACCATAAAAAAAAAATCCCTTATAAAATTACTCGCTG
          *      *      *      *      *      *
Prim.cons. GATGACAGCTGGGAATTGATCCCTTCA22ATAAAAAAAAAATCCCTTATAAAATTACTCGCTG

          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
14579  TATCGACGCTATTAACTATTACAACGCTAATGTAGTTTCACCAGTAACAACCTTTTGCAA
B      TATCGACGCTATTAACTATTACAACGCTAATGTAGTTTCACCAGTAACAACCTTTTGCAA
          *      *      *      *      *      *
Prim.cons. TATCGACGCTATTAACTATTACAACGCTAATGTAGTTTCACCAGTAACAACCTTTTGCAA

          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
14579  GTGAAATTGAACAAACGAACAATGGAGATACGGTTGTTTCTGCAAATGAAGCGAGAATGA
B      GTGAAATTGAACAAACGAACAATGGAGATACGGCTCTTTCTGCAAATGAAGCGAGAATGA
          *      *      *      *      *      *
Prim.cons. GTGAAATTGAACAAACGAACAATGGAGATACGG2T2TTTCTGCAAATGAAGCGAGAATGA

          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
14579  AAGAGACCTTGCAAAAGGCTGGATTATTTGCAAAATCTATGAATGCCTATTCTTATATGT
B      AAGAGACCTTGCAAAAGGCTGGATTATTTGCAAAATCTATGAATGCCTATTCTTATATGT
          *      *      *      *      *      *
Prim.cons. AAGAGACCTTGCAAAAGGCTGGATTATTTGCAAAATCTATGAATGCCTATTCTTATATGT

          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
14579  TAATTAAGAATCCTGATGTGAATTTTGAGGGAATTACCATTAATGGATATGTAGATTTAC
B      TAATTAAGAATCCTGATGTGAATTTTGAGGGAATTACCATTAATGGATATGTAGATTTAC
          *      *      *      *      *      *
Prim.cons. TAATTAAGAATCCTGATGTGAATTTTGAGGGAATTACCATTAATGGATATGTAGATTTAC

          310     320     330     340     350     360
          |      |      |      |      |      |
14579  CTGGTAGAATCGTACAAGATCAAAAGAATGCAAGGGCACATGCTGTTACTTGGGATACGA
B      CTGGTAGAATCGTACAAGATCAAAAGAATGCAAGGGCACATGCTGTTACTTGGGATACGA
          *      *      *      *      *      *
Prim.cons. CTGGTAGAATCGTACAAGATCAAAAGAATGCAAGGGCACATGCTGTTACTTGGGATACGA

          370     380     390     400     410     420
          |      |      |      |      |      |
14579  AAGTAAAAAACAGCTTTTAGATACATTGAATGGTATTGTTGAATACGATACAACATTTG
B      AAGTAAAAAACAGCTTTTAGATACATTGAATGGTATTGTTGAATACGATACAACATTTG
          *      *      *      *      *      *
Prim.cons. AAGTAAAAAACAGCTTTTAGATACATTGAATGGTATTGTTGAATACGATACAACATTTG

```

ANHANG

	430	440	450	460	470	480
14579						
B	ACAATTATTATGAAACAATGGTAGAAGCGATTAATACAGGGGATGGAGAAA	ACTTTAAAAAG				
Prim.cons.	ACAATTATTATGAAACAATGGTAGAAGCGATTAATACAGGGGATGGAGAAA	ACT2TAAAAAG				
	490	500	510	520	530	540
14579						
B	AAGGGATTACAGATTTGCGAGGTGAAATTC AACAAAATCAAAAAGTATGCACAACA	ACTTAA				
Prim.cons.	AAGGGATTACAGATTTGCGAGGTGAAATTC AACAAAATCAAAAAGTATGCACAACA	ACTTAA				
	550	560	570	580	590	600
14579						
B	TAGAAGAATTA ACTAAATTAAGAGACTCTATTGGACATGATGTTAGAGCTTTT	GGAAGTA				
Prim.cons.	TAGAAGAATTA ACTAAATTAAGAGACTCTATTGGACATGATGTTAGAGCTTTT	GGAAGTA				
	610	620	630	640	650	660
14579						
B	ATAAAGAGCTCTTGCAGTCAATTTTAAAAAATCAAGGTGCAGATGTTGATGCCGAT	CAAA				
Prim.cons.	ATAAAGAGCTCTTGCAGTCAATTTTAAAAAATCAAGGTGCAGATGTTGATGCCGAT	CAAA				
	670	680	690	700	710	720
14579						
B	AGCGTCTAGAAGAAGTATTAGGATCAGTAAACTATTATAAAACAATTAGAATCTGAT	GGGT				
Prim.cons.	AGCGTCTAGAAGAAGTATTAGGATCAGTAAACTATTATAAAACAATTAGAATCTGAT	GGGT				
	730	740	750	760	770	780
14579						
B	TTAATGTAATGAAGGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGGCGGTATTATAGT	CGGAG				
Prim.cons.	TTAATGTAATGAAGGGTGCTATTTTGGGTCTACCAATAATTGGCGGTATTATAGT	CGGAG				
	790	800	810	820	830	840
14579						
B	TAGCAAGGGATAATTTAGGTAAGTTAGAGCCTTTATTAGCAGAATTACGTCAGACCGT	GG				
Prim.cons.	TAGCAAGGGATAATTTAGGTAAGTTAGAGCCTTTATTAGCAGAATTACGTCAGACCGT	GG				
	850	860	870	880	890	900
14579						
B	ATTATAAAGTAACCTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACAGTAATATTAATGAAAT	GC				
Prim.cons.	ATTATAAAGTAACCTTAAATCGTGTAGTTGGAGTTGCTTACAGTAATATTAATGAAAT	GC				
	910	920	930	940	950	960
14579						
B	ACAAGGCGCTTGATGATGCTATTAACGCTCTTACTTATATGTCCACGCAGTGGCAT	GATT				
Prim.cons.	ACAAGGCGCTTGATGATGCTATTAACGCTCTTACTTATATGTCCACGCAGTGGCAT	GATT				

ANHANG

```

          970      980      990      1000      1010      1020
          |        |        |        |        |        |
14579    TAGATTCTCAATATTCGGGCGTTCTAGGGCATATTGAGAATGCAGCTCAAAAAGCCGATC
B        TAGATTCTCAATATTCGGGCGTTCTAGGGCATATTGAGAATGCAGCTCAAAAAGCCGATC
          *****
Prim.cons. TAGATTCTCAATATTCGGGCGTTCTAGGGCATATTGAGAATGCAGCTCAAAAAGCCGATC

```

```

          1030     1040     1050     1060     1070     1080
          |       |       |       |       |       |
14579    AAAATAAATTTAAATTCTTAAAGCCTAATTTAAATGCAGCGAAAAGACAGTTGGAAAACAT
B        AAAATAAATTTAAATTCTTAAAGCCTAATTTAAATGCAGCGAAAAGACAGTTGGAAAACAT
          *****
Prim.cons. AAAATAAATTTAAATTCTTAAAGCCTAATTTAAATGCAGCGAAAAGACAGTTGGAAAACAT

```

```

          1090     1100     1110     1120     1130     1140
          |       |       |       |       |       |
14579    TACGAACAGATGCTGTTACATTTAAAAGAAGGAATAAAGGAATTAAAAGTGGAAACTGTTA
B        TACGAACAGATGCTGTTACATTTAAAAGAAGGAATAAAGGAATTAAAAGTGGAAACTGTTA
          *****
Prim.cons. TACGAACAGATGCTGTTACATTTAAAAGAAGGAATAAAGGAATTAAAAGTGGAAACTGTTA

```

```

          1150
          |
14579B    CTCCACAAAAATAG
B x1     CTCCACAAAAAAG
          *****
Prim.cons. CTCCACAAAAA2AG

```

ANHANG

HBL-L₁

	10	20	30	40	50	60
14579	-----ATGAAAAAATTTCCATTCAAAGTACTAACTTT					
L1	ACGATGACAGCTGGGAATTGATCCCTTCAACCAAAAAATTTCCATTCAAAGTACTAACTTT					
	* *****					
Prim.cons.	ACGATGACAGCTGGGAATTGATCCCTTCA22AAAAAATTTCCATTCAAAGTACTAACTTT					
	70	80	90	100	110	120
14579	AGCTACATTAGCAACTGTTATAACTGCTACTACCGGTAACACTATTCATGCATTTGCACA					
L1	AGCTACATTAGCAACTGTTATAACTGCTACTACCGGTAACACTATTCATGCATTTGCACA					

Prim.cons.	AGCTACATTAGCAACTGTTATAACTGCTACTACCGGTAACACTATTCATGCATTTGCACA					
	130	140	150	160	170	180
14579	AGAAACGACCGCTCAAGAACAAAAAGTAGGCAATTATGCATTAGGCCCGAAGGACTGAA					
L1	AGAAACGACCGCTCAAGAACAAAAAGTAGGCAATTATGCATTAGGCCCGAAGGACTGAA					

Prim.cons.	AGAAACGACCGCTCAAGAACAAAAAGTAGGCAATTATGCATTAGGCCCGAAGGACTGAA					
	190	200	210	220	230	240
14579	GAAAGCATTAGCTGAAACAGGGTCTCATATTCTAGTAATGGATTTATACGCAAAAAACAAT					
L1	GAAAGCATTAGCTGAAACAGGGTCTCATATTCTAGTAATGGATTTATACGCAAAAAACAAT					

Prim.cons.	GAAAGCATTAGCTGAAACAGGGTCTCATATTCTAGTAATGGATTTATACGCAAAAAACAAT					
	250	260	270	280	290	300
14579	GATTAAGCAACCAATGTAAATTTATCTAATATCGATTTAGGCTCAGAGGGGGGAGAGTT					
L1	GATTAAGCAACCAATGTAAATTTATCTAATATCGATTTAGGCTCAGAGGGGGGAGAGTT					

Prim.cons.	GATTAAGCAACCAATGTAAATTTATCTAATATCGATTTAGGCTCAGAGGGGGGAGAGTT					
	310	320	330	340	350	360
14579	GCTCAAAAATATTCACCTTAATCAAGAGCTGTCACGAATCAATGCGAATTAAGGTTAGAG					
L1	GCTCAAAAATATTCACCTTAATCAAGAGCTGTCACGAATCAATGCGAATTAAGGTTAGAG					

Prim.cons.	GCTCAAAAATATTCACCTTAATCAAGAGCTGTCACGAATCAATGCGAATTAAGGTTAGAG					
	370	380	390	400	410	420
14579	TACAGCGAAGCCACAGATTCAAAAAACTGCTCGTAATATTGTAAATTACGATGAACAATT					
L1	TACAGCGAAGCCACAGATTCAAAAAACTGCTCGTAATATTGTAAATTACGATGAACAATT					

Prim.cons.	TACAGCGAAGCCACAGATTCAAAAAACTGCTCGTAATATTGTAAATTACGATGAACAATT					
	430	440	450	460	470	480
14579	TCAAAATTATTACGACACATTAGTAGAAACTGTACAAAAGAAAGATAAGGCAGGTCTAAA					
L1	TCAAAATTATTACGACACATTAGTAGAAACTGTACAAAAGAAAGATAAGGCAGGTCTAAA					

Prim.cons.	TCAAAATTATTACGACACATTAGTAGAAACTGTACAAAAGAAAGATAAGGCAGGTCTAAA					

ANHANG

	490	500	510	520	530	540
14579						
L1	AGAGGGTATAAATGATTTAATTACTACAATCAATACAAATTCAAAAAGAAGTTACAGATGT					
Prim.cons.	AGAGGGTATAAATGATTTAATTACTACAATCAATACAAATTCAAAAAGAAGTTACAGATGT					
	550	560	570	580	590	600
14579						
L1	GATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAGGGAAACTATATCAAAATTCTACAGATTTTAAAAA					
Prim.cons.	GATTAAGATGCTACAAGACTTCAAAGGGAAACTATATCAAAATTCTACAGATTTTAAAAA					
	610	620	630	640	650	660
14579						
L1	TAATGTTGGTGGTCCAGATGGGAAAGGTGGATTAAGTCAATATTAGCAGGTCAACAGGC					
Prim.cons.	TAATGTTGGTGGTCCAGATGGGAAAGGTGGATTAAGTCAATATTAGCAGGTCAACAGGC					
	670	680	690	700	710	720
14579						
L1	AACGATTCCACAACCTTCAAGCTGAAATTGAGCAACTTCGTTCTACTCAGAAAAACATTT					
Prim.cons.	AACGATTCCACAACCTTCAAGCTGAAATTGAGCAACTTCGTTCTACTCAGAAAAACATTT					
	730	740	750	760	770	780
14579						
L1	AACGATTCCACAACCTTCAAGCTGAAATTGAGCAACTTCGTTCTACTCAGAAAAACATTT					
Prim.cons.	AACGATTCCACAACCTTCAAGCTGAAATTGAGCAACTTCGTTCTACTCAGAAAAACATTT					
	790	800	810	820	830	840
14579						
L1	TGATGATGTATTAGCATGGTCAATTGGTGGTGGATTGGGAGCAGCTATTTTAGTTATTGC					
Prim.cons.	TGATGATGTATTAGCATGGTCAATTGGTGGTGGATTGGGAGCAGCTATTTTAGTTATTGC					
	850	860	870	880	890	900
14579						
L1	AGCTATTGGAGGAGCGGTTCGTTATTGTTGTAAGTGGCGGTACAGCAACACCGGCTGTTGT					
Prim.cons.	AGCTATTGGAGGAGCGGTTCGTTATTGTTGTAAGTGGCGGTACAGCAACACCGGCTGTTGT					
	910	920	930	940	950	960
14579						
L1	TGGTGGACTCTCGGCTCTTGGTGCAGCTGGTATTGGTTTAGGAACAGCGCTGGTGTCCAC					
Prim.cons.	TGGTGGACTCTCGGCTCTTGGTGCAGCTGGTATTGGTTTAGGAACAGCGCTGGTGTCCAC					
	970	980	990	1000	1010	1020
14579						
L1	AGCATCTAAGCATATGGACTCCTATAATGAAATTTCTAACAAAAATCGGAGAATTAAGTAT					
Prim.cons.	AGCATCTAAGCATATGGACTCCTATAATGAAATTTCTAACAAAAATCGGAGAATTAAGTAT					

ANHANG

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
14579	GAAAGCAGATCGTGCTAATCAAGCAGTTCTTTTCGCTTACTAACGCGAAAAGAAAACATTGGC					
L1	GAAAGCAGATCGTGCTAATCAAGCAGTTCTTTTCGCTTACTAACGCGAAAAGAAAACATTGGC					
Prim.cons.	*****					
	GAAAGCAGATCGTGCTAATCAAGCAGTTCTTTTCGCTTACTAACGCGAAAAGAAAACATTGGC					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
14579	ATATTTATATCAGACTGTAGATCAAGCGATATTGTCTCTAACAAATATTCAAAAGCAATG					
L1	ATATTTATATCAGACTGTAGATCAAGCGATATTGTCTCTAACAAATATTCAAAAGCAATG					
Prim.cons.	*****					
	ATATTTATATCAGACTGTAGATCAAGCGATATTGTCTCTAACAAATATTCAAAAGCAATG					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
14579	GAATACAATGGGCGCAAATTATACAGATTTACTGGATAATATCGATTCTATGGAAGACCA					
L1	GAATACAATGGGCGCAAATTATACAGATTTACTGGATAATATCGATTCTATGGAAGACCA					
Prim.cons.	*****					
	GAATACAATGGGCGCAAATTATACAGATTTACTGGATAATATCGATTCTATGGAAGACCA					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
14579	CAAATTCTCTTTAATACCAGATGATTTAAAAGCCGCTAAAGAAAGTTGGAATGATATTCA					
L1	CAAATTCTCTTTAATACCAGATGATTTAAAAGCCGCTAAAGAAAGTTGGAATGATATTCA					
Prim.cons.	*****					
	CAAATTCTCTTTAATACCAGATGATTTAAAAGCCGCTAAAGAAAGTTGGAATGATATTCA					
	1270	1280	1290	1300	1310	
14579x0	TAAAGATGCAGAATTCATTTCAAAGATATTGCTTTTAAACAGGAGTAG					
L1xxxx1	TAAAGATGCAGAATTCATTTCAAAGATATTGCTTTTAAACAGGAGTTT					
Prim.cons.	*****					
	TAAAGATGCAGAATTCATTTCAAAGATATTGCTTTTAAACAGGAGT					

ANHANG

HBL-L₂

	10	20	30	40	50	60
14579						
L2	-----ATGAAAAC TAAAATAATTACAGGATTATTAGTCTC					
Prim. cons.	GAGATGACAGCTGGGATTGATCCCTTCACCAAACTAAAATAATTACAGGATTATTAGTCTC					
	70	80	90	100	110	120
14579						
L2	ACATCCATTGTAAC TGGAGGAAATATTCCTATCAATACTCTCGCAACACCAATCGTTCAA					
Prim. cons.	ACATCCATTGTAAC TGGAGGAAATATTCCTATCAATACTCTCGCAACACCAATCGTTCAA					
	130	140	150	160	170	180
14579						
L2	GCAGAACTCAACAGGAAGGCATGGATATTTCTCTTCATTACGAAAATTAGGTGCGCAA					
Prim. cons.	GCAGAACTCAACAGGAAGGCATGGATATTTCTCTTCATTACGAAAATTAGGTGCGCAA					
	190	200	210	220	230	240
14579						
L2	TCTAAATTAATCCAAACGTATATTGATCAATCTTTAATGAGTCCTAATGTACAGTTAGAG					
Prim. cons.	TCTAAATTAATCCAAACGTATATTGATCAATCTTTAATGAGTCCTAATGTACAGTTAGAG					
	250	260	270	280	290	300
14579						
L2	GAAGTCACAGCTTTAAATACAAATCAATTCCTAATCAAACAAGATATGAAGGAATGGTCA					
Prim. cons.	GAAGTCACAGCTTTAAATACAAATCAATTCCTAATCAAACAAGATATGAAGGAATGGTCA					
	310	320	330	340	350	360
14579						
L2	TCGGAAC TCTATCCACAGTTAATTCTATTAATAATTCAAAAAGCAAAGGATTTGTAACAAAA					
Prim. cons.	TCGGAAC TCTATCCACAGTTAATTCTATTAATAATTCAAAAAGCAAAGGATTTGTAACAAAA					
	370	380	390	400	410	420
14579						
L2	TTTAATAGCTATTACCCGACATTAATAATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGATAGAGAAGGG					
Prim. cons.	TTTAATAGCTATTACCCGACATTAATAATCGTTTGTAGACAATAAAGAAGATAGAGAAGGG					
	430	440	450	460	470	480
14579						
L2	TTTTCGGATAGACTTGAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATACGCAA					
Prim. cons.	TTTTCGGATAGACTTGAAGTACTTCAAGAAATGGCTATGACGAATCAAGAAAATACGCAA					

ANHANG

	490	500	510	520	530	540
14579	CGGCAAATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAAATTA AAAAGATTTT					
L2	CGGCAAATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAAATTA AAAAGATTTT					
Prim.cons.	CGGCAAATCAATGAATTAACAGATCTTAAATTACAGCTTGATAAAAAAATTA AAAAGATTTT					
	550	560	570	580	590	600
14579	GATACCAATGTGGCAACTGCGCAAGGCATACTAAGTACAGATGGAAACAGGAAAAATAGAT					
L2	GATACCAATGTGGCAACTGCGCAAGGCATACTAAGTACAGATGGAAACAGGAAAAATAGAT					
Prim.cons.	GATACCAATGTGGCAACTGCGCAAGGCATACTAAGTACAGATGGAAACAGGAAAAATAGAT					
	610	620	630	640	650	660
14579	CAGTTAAAAAATGAAATATTAAATACAAAAAAGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAT					
L2	CAGTTAAAAAATGAAATATTAAATACAAAAAAGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAT					
Prim.cons.	CAGTTAAAAAATGAAATATTAAATACAAAAAAGCAATTCAAAATGATTTACAGCAAAT					
	670	680	690	700	710	720
14579	GCATTAATACCAGGGGCTTTAAATGAACAGGGATTTGCTATATTCAAAGAAGTTTATAGT					
L2	GCATTAATACCAGGGGCTTTAAATGAACAGGGATTTGCTATATTCAAAGAAGTTTATAGT					
Prim.cons.	GCATTAATACCAGGGGCTTTAAATGAACAGGGATTTGCTATATTCAAAGAAGTTTATAGT					
	730	740	750	760	770	780
14579	CTTTCAAAGAAATTATTGAACCAGCTGCGCAAGCAGGGGTGGCAGCATATAACAAAGGA					
L2	CTTTCAAAGAAATTATTGAACCAGCTGCGCAAGCAGGGGTGGCAGCATATAACAAAGGA					
Prim.cons.	CTTTCAAAGAAATTATTGAACCAGCTGCGCAAGCAGGGGTGGCAGCATATAACAAAGGA					
	790	800	810	820	830	840
14579	AAAGAAATTAACAACCTCTATTCTAGAAGCTGAGAAAAAAGCAGTGCAAGAAGCAACAGAG					
L2	AAAGAAATTAACAACCTCTATTCTAGAAGCTGAGAAAAAAGCAGTGCAAGAAGCAACAGAG					
Prim.cons.	AAAGAAATTAACAACCTCTATTCTAGAAGCTGAGAAAAAAGCAGTGCAAGAAGCAACAGAG					
	850	860	870	880	890	900
14579	CAAGGTAAAACGGCTCTAGAGATTGAATCAGCAAAAAAAGCAGCTCGTGAAGCAATTGAG					
L2	CAAGGTAAAACGGCTCTAGAGATTGAATCAGCAAAAAAAGCAGCTCGTGAAGCAATTGAG					
Prim.cons.	CAAGGTAAAACGGCTCTAGAGATTGAATCAGCAAAAAAAGCAGCTCGTGAAGCAATTGAG					
	910	920	930	940	950	960
14579	AAAAGCAAACAAGGTGAAATAGCAGCCGAGCCGAGCAAAAAACACAAGAGTATGACCTG					
L2	AAAAGCAAACAAGGTGAAATAGCAGCCGAGCCGAGCAAAAAACACAAGAGTATGACCTG					
Prim.cons.	AAAAGCAAACAAGGTGAAATAGCAGCCGAGCCGAGCAAAAAACACAAGAGTATGACCTG					

ANHANG

```
          970          980          990          1000          1010          1020
          |           |           |           |           |           |
14579    ATGAAGGTCATTGATAACCGAAAAGATTAAGAAAACATTTGGCGTTTTTGCTGAAGTAAAT
L2       ATGAAGGTCATTGATAACCGAAAAGATTAAGAAAACATTTGGCGTTTTTGCTGAAGTAAAT
          *****
Prim.cons. ATGAAGGTCATTGATAACCGAAAAGATTAAGAAAACATTTGGCGTTTTTGCTGAAGTAAAT
```

```
          1030          1040          1050
          |           |           |
14579    AAATTAACAGCAGAACAGCGAGCATATTTA
L2       AAATTAACAGCAGAACAGCGAGCATATTTA
          *****
Prim.cons. AAATTAACAGCAGAACAGCGAGCATATTTA
```

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Betreuung der Dissertation bedanke ich mich bei Frau Dr. A. Didier.

Großen Dank gilt vor allem dem „großen“ Max (Dr. M. Moravek), der mich und meinen Hund in seinem Büro nun fast zwei Jahre ertragen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die stets gefüllte „Schoki- und Bonbonschublade“ die mich aus so manchem Unterzucker gerettet hat. Vielen Dank für alles.

Dank der geistigen Unterstützung von Dr. Mouse (Dr. R. Dietrich) hat sich so manches Problem lösen lassen. Danke auch für die tollen Antikörper.

Heinzi (Dr. H. Becker) sei für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit und den netten Zwerg auf unserem Computer gedankt.

Meiner „Mit-Doktorandin“ Frau Gruber danke ich einfach für alles was wir gemeinsam am Institut erlebt und durchgestanden haben. Ich hatte viel Spaß mit Dir!

Ebenso danke ich Frau Bock, Carina, Esther, Maria und dem „kleinen Max" für die kollegiale Zusammenarbeit.

Vielen Dank den „Labormäusen“ Brunilein, Diana, Gabi Goldstück, Josefine, Maja, Marion, Susi Sorglos und Ute für die Unterstützung und Anleitung im Labor sowie den einen oder anderen netten Plausch. Auch ein herzliches Dankeschön an Fr. A. Welter.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei:

Hasilein für seine jahrelange Freundschaft und seine telefonische Seelsorge, wenn ich mal wieder etwas Doktoranden-Frust hatte und ein offenes Ohr brauchte.

Mutti Kögel und Frau Doktorle, die mich während meines Studiums und der Doktorarbeit immer wieder moralisch unterstützt haben.

Frau Penzlchen und Frau Seypoldi - ohne Euch hätte ich meine Panikattacken vor den Prüfungen nie bewältigen können.

Steffi, Ludwig und Doris, die mir Kraft gegeben haben und für meine Erholung sowie meinen seelischen Ausgleich in Schnuttenbach gesorgt haben. Ohne Euch wäre ich ein „nervliches Wrack“.

Helga, Herbert, Frank, Katja, Rolf, Silke und Stefan.

natürlich auch Mausli, Pimpfi und Pansi ♥.

meinen Großeltern für all ihre Unterstützung in meinem bisherigen Leben.

meinem Papili, der mir mit guten Ratschlägen zur Seite stand und mich immer wieder aufgebaut und zum Lachen gebracht hat.

Mein größter Dank gilt meiner Mum, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Ohne Dich hätte ich es nie geschafft diesen Weg zu gehen. Danke Mum, Du bist die Beste!!!