

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer

Charakterisierung des Infektionsverlaufs von *Cronobacter* spp.
und dessen Einfluss auf wirtsspezifische intrazelluläre
Signalwege

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

von

Kerstin Weiner

aus

Bad Bergzabern

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	10
II.	LITERATURÜBERSICHT	11
I.	<i>Cronobacter</i> spp.	11
1.1.	Taxonomische Stellung von <i>Cronobacter</i> spp.	11
1.2.	Erkrankungen	12
1.3.	Vorkommen.....	12
1.4.	Pathogenitätsmechanismen	13
1.5.	Einfluss von <i>Cronobacter</i> spp. auf Abwehrmechanismen der Wirtszelle ..	21
III.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	Materialien.....	25
1.1.	Chemikalien	25
1.2.	Bakterienstämme	27
1.3.	Nährmedien	28
1.4.	Biochemische Testkits.....	28
1.5.	Zellkultur.....	29
1.5.1.	Zelllinien	29
1.5.2.	Zellkulturmedien und -lösungen.....	29
1.6.	Puffer und Lösungen	29
1.7.	Primäre und sekundäre Antikörper	31
1.8.	Enzyme.....	31
1.9.	PCR- Primer	32
1.10.	Verbrauchsmaterialien	32
1.11.	Geräte	33
1.12.	Software	34
2.	Methoden.....	35
2.1.	Kultivierung von Bakterien.....	35
2.2.	Allgemeine biochemische Methoden	35
2.3.	Wachstumsanalysen	35
2.3.1.	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur.....	35
2.3.2.	Wachstumsanalyse der <i>Cronobacter</i> -Stämme	35
2.4.	DNA-Isolierung.....	36

2.4.1.	Chromosomale DNA-Präparation für PCR (<i>long version</i>)	36
2.4.2.	Chromosomale DNA-Präparation für PCR (<i>quick version</i>).....	36
2.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.5.1.	PCR-Primer	37
2.5.2.	PCR mit Gesamt-DNA als Template	37
2.6.	Zellkultur	38
2.6.1.	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	38
2.6.2.	Subkultivierung von eukaryotischen Zellen.....	38
2.6.2.1.	Caco-2 und IPEC-J2.....	38
2.6.2.2.	Raw 264.7.....	39
2.7.	Zytotoxizitätstest	39
2.8.	Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>Cronobacter</i> spp. im Gentamycinassay	40
2.8.1.	Untersuchung der Invasion und intrazellulären Proliferation von <i>Cronobacter</i> spp. in Caco-2 Zellen	40
2.8.2.	Modifizierte Invasionsassays	41
2.8.2.1.	Invasionsassay mit Cytochalasin D.....	41
2.8.2.2.	Invasionsassay mit monoklonalem Antikörper 2G4	42
2.8.3.	Untersuchung der Adhäsion von <i>Cronobacter</i> -Stämmen an eukaryotischen Zellen	42
2.9.	Proteinanalytische Methoden	42
2.9.1.	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus mit <i>Cronobacter</i> spp. infizierten eukaryotischen Zellen	42
2.9.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford	43
2.9.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.9.4.	Western-Blot	44
2.9.5.	Immunologischer Nachweis	45
2.10.	Immunfluoreszenz	45
IV.	ERGEBNISSE	47
1.	Charakterisierung ausgewählter <i>Cronobacter</i>-Stämme	47
1.1.	Untersuchungen der Invasivität in Caco-2 Zellen.....	47
1.2.	Detektion der Pathogenitätsdeterminante <i>ompA</i>	49
1.3.	Nachweis der Enterotoxinbildung	50
1.4.	Detektion der MAPK in Caco-2 Zellen.....	50

2.	Physiologische und biochemische Analyse der <i>Cronobacter</i>-Stämme <i>Csa</i> 823, <i>Csa</i> 824 und <i>Ctu</i> 3032.....	51
2.1.	Wachstum auf verschiedenen Nährmedien.....	52
2.2.	Biochemische Charakterisierung der Stoffwechselaktivität.....	55
2.2.1.	Enterotube.....	55
2.2.2.	Api 20.....	56
3.	Phänotypische Analyse der ausgewählten <i>Cronobacter</i>-Stämme im Zellkultursystem.....	57
3.1.	Adhäsion: Untersuchung der frühen Assoziation von <i>Cronobacter</i> -Stämmen mit Caco-2 Zellen.....	57
3.2.	Invasion: Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit von Caco-2 Zellen durch <i>Cronobacter</i> spp.	58
3.3.	Proliferation: Untersuchung der <i>Cronobacter</i> -Stämme auf intrazelluläre Vermehrung in Caco-2 Zellen.....	59
3.4.	Proliferation: Untersuchung der <i>Cronobacter</i> -Stämme auf intrazelluläre Vermehrung in Raw 264.7 Zellen.....	60
3.5.	Einfluss von Cytochalasin D auf die Invasivität der <i>Cronobacter</i> -Stämme in Caco-2 Zellen.....	61
3.6.	Charakterisierung des monoklonalen, gegen <i>Ctu</i> 3032 gerichteten Antikörpers 2G4.....	65
3.6.1.	Einfluss des monoklonalen Antikörper 2G4 auf die Invasion von <i>Ctu</i> 3032.....	65
3.6.2.	Einfluss des monoklonalen Antikörpers 2G4 auf das Wachstumsverhalten von <i>Ctu</i> 3032.....	66
3.6.3.	Etablierung eines Immunfluoreszenztests unter Einsatz des monoklonalen Antikörpers 2G4.....	67
4.	Analyse der wirtsspezifischen Signalkaskaden während der <i>Cronobacter</i>-Infektion.....	70
4.1.	Einfluss von <i>Cronobacter</i> spp. auf den MAPK-Weg in Caco-2 und Raw 264.7 Zellen.....	70
4.2.	Einfluss von <i>Cronobacter</i> spp. auf die iNOS-Produktion.....	72

V.	DISKUSSION	75
1.	Beobachtungen zu möglichen Virulenzfaktoren von <i>Cronobacter</i> spp. anhand ausgesuchter Stämme.....	75
1.1.	Überprüfung der Inositol-Fermentation	75
1.2.	Enterotoxinproduktion	76
1.3.	Wachstumsverhalten und Koloniemorphologie der <i>Cronobacter</i> -Stämme auf verschiedenen Nährmedien	77
1.4.	Beeinflussung des MAPK-Weges durch <i>Cronobacter</i> spp.....	78
1.5.	Beeinflussung der iNOS-Produktion durch <i>Cronobacter</i> spp.....	79
2.	Kolonisations- und Proliferationsfähigkeit von <i>Cronobacter</i> spp. in Monozyten.....	80
3.	Der Infektionsverlauf von <i>Cronobacter</i> spp. in Enterozyten.....	80
3.1.	Invasion in Enterozyten.....	80
3.2.	Adhäsion an Enterozyten	83
3.3.	Proliferation in Enterozyten	83
3.4.	Bedeutung von OmpA für die Invasion von <i>Cronobacter</i> spp.	84
3.5.	Bedeutung des Zytoskeletts für die Invasion von <i>Cronobacter</i> spp.	85
3.6.	Einfluss des monoklonalen Antikörpers 2G4 auf Invasion und Wachstum von <i>Ctu</i> 3032.....	86
3.7.	Beobachtungen zur intrazellulären Lage von <i>Cronobacter</i> spp.....	87
4.	Einordnung des Isolates <i>Csa</i> 824	87
5.	Identifizierung von MHI 968 - <i>Enterobacter asburiae</i>	89
6.	Ausblick.....	89
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	91
VII.	SUMMARY.....	93
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	95
IX.	ANHANG	113
1.	Tabellenverzeichnis.....	113
2.	Abbildungsverzeichnis.....	113
X.	DANKSAGUNG	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
CFU	<i>colony-forming unit</i>
CyD	Cytochalasin D
d.h.	das heißt
DC	dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
M	molar (Mol/l)
mA	Milliampere

mk	monoklonal
Mg	Magnesium
min	Minute(n)
murine	Maus betreffend
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
nm	Nanometer
NEA	<i>non-essential amino acids</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	<i>post infectionem</i>
PIF	<i>powdered infant formula</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSB	<i>trypticase soy broth</i>
ü/N	über Nacht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weights per volume</i>
x g	x-fache Gravitationskraft
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Cronobacter spp. sind Gram-negative, motile, opportunistisch pathogene Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie stehen im Zusammenhang mit lebensbedrohlichen Infektionen insbesondere bei Neugeborenen und immunsupprimierten Personen. Zu den typischen klinischen Symptomen von *Cronobacter* spp. Infektionen zählen dabei u. a. Meningitis, Septikämie und nekrotisierende Enterokolitis (Lai, 2001). *Cronobacter* spp. sind ubiquitär verbreitet und konnten bereits in einer Vielzahl von Lebensmitteln, darunter Milchprodukte, Hackfleisch und Gewürze, nachgewiesen werden (Leclercq *et al.*, 2002). Die wichtigste Infektionsquelle stellt jedoch kontaminierte Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis dar (Bowen & Braden, 2006). Trotz verstärkter Forschungsarbeiten in den letzten Jahren sind die Pathogenitätsmechanismen und der Infektionsverlauf von *Cronobacter* spp. noch immer größtenteils unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Untersuchungen zum Infektionsverlauf von *Cronobacter* spp. in der humanen Epithelzelllinie Caco-2 durchzuführen, um neue Erkenntnisse über die Infektionsstrategien des Pathogens zu erhalten. Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Virulenz verschiedener Isolate innerhalb des Genus *Cronobacter* sollten aufgezeigt sowie der Einfluss des Pathogens auf die intrazellulären Abwehrmechanismen der Wirtszellen untersucht werden. Weiterhin sollten biochemische Analysen sowie Wachstumsuntersuchungen durchgeführt werden, um Hinweise bezüglich der Auswirkung des Stoffwechsels auf die bakterielle Pathogenität zu gewinnen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Cronobacter* spp.

1.1. Taxonomische Stellung von *Cronobacter* spp.

Cronobacter spp. sind Gram-negative Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Erstmals beschrieben wurde *Cronobacter*, damals noch als gelb-pigmentierte Biogruppe von *Enterobacter cloacae*, von Urmenyi und Franklin (1961) im Rahmen einer tödlich endenden, generalisierten Sepsis und Meningitis bei zwei Neugeborenen im Osterhills Hospital (St. Albans City Hospital). Die Klassifizierung als eigene Spezies mit dem Namen *Enterobacter sakazakii* erfolgte im Jahre 1980 durch Farmer *et al.* (1980) basierend auf maßgeblichen Unterschieden zwischen *E. cloacae* und *E. sakazakii* bezüglich der DNA-Zusammensetzung, der biochemischen Reaktionen, der Antibiotika-Sensibilität und der Pigmentierung. Im Jahr 2007 konnte von Iversen *et al.* (2007); (2008) mittels ausführlicher polyphasischer Untersuchungen gezeigt werden, dass der Organismus mindestens sechs Arten umfasst: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* und *C. genomspecies I*. Im Rahmen dieser Studie schlugen sie eine taxonomische Reklassifizierung von *Enterobacter sakazakii* im neuen Genus „*Cronobacter*“ vor. Nach der Identifizierung einer neuen Spezies, *C. condimenti*, durch Joseph *et al.* (2012) und der Umbenennung von *C. genomspecies I* in *C. universalis* stellt sich die Gattung *Cronobacter* derzeit folgendermaßen dar (Tab. 1):

Tabelle 1: Taxonomische Stellung von *Cronobacter* spp.

Taxon	Bezeichnung	Benennung durch
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>	Castellani (1919)
Genus	<i>Cronobacter</i>	Iversen <i>et al.</i> (2007)
Species	<i>C. sakazakii</i>	Iversen <i>et al.</i> (2007)
Species	<i>C. malonaticus</i>	Iversen <i>et al.</i> (2007)
Species	<i>C. turicensis</i>	Iversen <i>et al.</i> (2007)
Species	<i>C. muytjensii</i>	Iversen <i>et al.</i> (2007)
Species	<i>C. dublinensis</i>	Iversen <i>et al.</i> (2007)
Species	<i>C. universalis</i>	Joseph <i>et al.</i> (2012)
Species	<i>C. condimenti</i>	Joseph <i>et al.</i> (2012)

1.2. Erkrankungen

Cronobacter spp. sind motile, peritrich begeißelte, fakultativ anaerobe, Gram-negative Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie gelten als opportunistisch pathogen und stehen im Zusammenhang mit lebensbedrohlichen Infektionen insbesondere bei Säuglingen und immunsupprimierten Personen. Betroffen sind hier vor allem „Frühchen“, Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unter 2500 g und Säuglinge innerhalb der ersten vier Lebenswochen (Lai, 2001). Sporadisch auftretende Krankheitsfälle bei Erwachsenen betreffen vor allem ältere und immunsupprimierte Menschen (See *et al.*, 2007). Zu den klinischen Symptomen zählen nekrotisierende Enterokolitis (NEC), Bakteriämie, Septikämie und Meningitis (Lee *et al.*, 2011). Die Letalität bei erkrankten Neugeborenen ist hoch und liegt zwischen 40 % und 80 % (Nazarowec-White & Farber, 1997a). Zudem leiden 94 % der Kinder, die eine *Cronobacter*-assoziierte Meningitis überleben, unter irreversiblen neurologischen Spätschäden wie Hydrocephalus, Quadriplegie, Entwicklungsstörungen oder Beeinträchtigungen des Hör- oder Sehvermögens (Drudy *et al.*, 2006). Aufgrund der sehr geringen Fallzahlen (ca. 120 Fallberichte von 1961-2008) und dem Fehlen aktiver Kontrollsysteme für durch *Cronobacter* spp. ausgelöste Erkrankungen ist eine genaue Einschätzung der Situation jedoch schwierig (World Health Organization, 2008).

1.3. Vorkommen

Cronobacter spp. konnten bereits in einer Vielzahl von Lebensmittel- und Umweltproben nachgewiesen werden, ohne dass ein natürliches Habitat identifiziert werden konnte, wodurch *Cronobacter* als ein ubiquitäres Bakterium einzustufen ist. Lebensmittel, aus denen *Cronobacter* spp. isoliert wurden, waren u.a. Milchprodukte, Babynahrung, Hackfleisch, Gemüse, sowie getrocknete Kräuter und Gewürze (Baumgartner *et al.*, 2009; Iversen & Forsythe, 2004; Leclercq *et al.*, 2002). Kandhai *et al.* (2004) isolierten *Cronobacter sakazakii* aus Umfeldproben verschiedener Lebensmittelfabriken und aus Proben von Haushaltsstaubsaugern. Auch in klinischem Material wie Blut, Knochenmark, Speichel, Urin, Wundsekret und Stuhl, sowie in klinischen Umfeldproben fanden sich *Cronobacter* spp. (Lai, 2001; Masaki *et al.*, 2001). Kuzina *et al.* (2001) und

Hamilton *et al.* (2003) berichteten von Isolationen des Mikroorganismus aus mexikanischen Fruchtfliegen (*Anastrepha ludens*) beziehungsweise dem Darm der gemeinen Stechfliege (*Stomoxys calcitrans*) und zeigten damit ein mögliches Umweltreservoir und die Möglichkeit einer Umgebungskontamination durch Insekten als wichtige Verbreitungsmöglichkeit auf.

Die epidemiologisch wichtigste Quelle für klinische *Cronobacter*-Infektionen ist allerdings kontaminierte Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (*powdered infant formula*, PIF) (Biering *et al.*, 1989; Bowen & Braden, 2006; Centers for Disease & Prevention, 2002). Mikrobiologische Untersuchungen zum Vorkommen des Erregers in PIF-Produkten zeigten zwischen 2 % und 14 % positive Proben (Iversen & Forsythe, 2004; Muyltjens *et al.*, 1988). Trotz erheblicher Unterschiede bezüglich der Thermotoleranz zwischen den verschiedenen Stämmen (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004) führten Untersuchungen zur Hitzetoleranz sowohl von Nazarowec-White und Farber (1997b) als auch von Iversen *et al.* (2004) zu der Annahme, dass die gängigen Pasteurisierungsverfahren in der Lage sind, *Cronobacter* zuverlässig abzutöten. Die Kontamination der PIF muss dementsprechend im Herstellungsbetrieb nach der Pasteurisierung, bei der Rekonstitution der Nahrung oder bei der Lagerung der rekonstituierten Nahrung erfolgen (Drudy *et al.*, 2006).

1.4. Pathogenitätsmechanismen

Die Pathogenität, also die Fähigkeit des Bakteriums eine Krankheit auszulösen, ist in erster Linie von Virulenzfaktoren sowie der Anzahl der beteiligten Erreger abhängig. Virulenzfaktoren können einerseits Strukturelemente, wie z.B. Zellwandkomponenten, andererseits auch Stoffwechselprodukte, z.B. Enterotoxine, sein. Sie führen zur Besiedlung des Wirtsorganismus und/oder Schädigung des Wirts, was sich dann in klinischen Symptomen äußert. Virulenzfaktoren bestimmen somit beispielsweise die Infektiosität, die Gewebeaffinität und die Toxizität.

Adhäsion und Invasion

Trotz zahlreicher Untersuchungen zum Adhäsions- und Invasionsvermögen von *Cronobacter* spp. in den letzten Jahren ist der genaue Invasions-Mechanismus noch immer unbekannt. Townsend *et al.* (2008) veröffentlichten im Jahr 2008 Untersuchungen zu vier verschiedenen *C. sakazakii*-Pulsotypen aus einem *Cronobacter*-Ausbruch auf einer Säuglingsintensivstation in Frankreich. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Stämme sich an Intestinalzellen (Caco-2) sowohl anheften als auch in diese eindringen konnten, was als starkes Indiz für eine potentielle Virulenz gewertet wurde.

Des Weiteren konnte in dieser Studie eine Invasion in kapilläre Endothelzellen, welche die Blut-Hirn-Schranke bilden, nachgewiesen werden sowie die Persistenz der untersuchten Stämme in Makrophagen über bis zu 48 h. Um in Makrophagen persistieren bzw. proliferieren zu können, müssen die Bakterien einen Virulenzmechanismus aufweisen, welcher ihnen ermöglicht, den bakteriziden Abwehrmechanismen der Makrophagen zu widerstehen. Dieser Mechanismus konnte bis zum heutigen Tag jedoch nicht aufgedeckt werden. Auch eine direkte Korrelation zwischen *in vitro* Studien und dem klinischen Verlauf konnte noch nicht gezeigt werden (Mange *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2008).

Endo- und Enterotoxine

Wie alle Gram-negativen Bakterien besitzen auch *Cronobacter* spp. Endotoxine, welche in der äußeren Zellmembran lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um Lipopolysaccharide (LPS), die bei den *Enterobacteriaceae* aus drei verschiedenen, kovalent miteinander verbundenen Regionen bestehen: einem Lipid A, einer Kernzone und einer O-spezifischen Hetero-Polysaccharidseitenkette. Das Endotoxin wird meist in Folge des Absterbens der Bakterien freigesetzt und führt durch die Interaktion mit LPS-sensitiven Zellen zur Produktion endogener Entzündungsmediatoren wie TNF α (Galanos & Freudenberg, 1993; MacLean *et al.*, 2009).

Neben den bei allen *Enterobacteriaceae* vorhandenen Endotoxinen sind einige Bakterien auch in der Lage, Exotoxine zu produzieren. Studien von Pagotto *et al.* (2003) und Raghav und Aggarwal (2007) konnten bei einigen *Cronobacter*-

Isolaten die Bildung eines Enterotoxins nachweisen. Im *suckling mouse model* erwiesen sich dabei 4 von 18 bzw. 3 von 11 getesteten Stämmen als enterotoxisch. Pagotto *et al.* (2003) führten zusätzlich zu den Versuchen im Tiermodell auch Zytotoxizitätsversuche in verschiedenen Zellkultursystemen durch, wobei die Resultate bezüglich des toxischen Effekts nicht immer mit denen des Tiermodells übereinstimmten. So konnte beispielsweise für das Isolat MONT die Enterotoxinproduktion im *suckling mouse model* nachgewiesen werden, jedoch kein zytopathischer Effekt in den Zelllinien CHO, Vero und Y-1. Demgegenüber zeigte der Stamm LA sowohl Enterotoxin-Bildungsvermögen im *suckling mouse model*, als auch einen zytopathischen Effekt auf die genannten Zelllinien. Dies erklärt sich laut Pagotto *et al.* (2003) möglicherweise durch differierende Rezeptor-Toxin-Bindungssysteme bei unterschiedlichen Zelllinien.

Minimale letale Dosis

Ebenfalls anhand des *suckling mouse models* bestimmte Pagotto *et al.* (2003) die minimale letale Dosis von 18 ausgewählten *Cronobacter*-Stämmen. Eine CFU von 10^8 erwies sich dabei, bei intraperitonealer (i.p.) Applikation, für alle Isolate als tödlich. Bei peroraler Gabe konnte nur für 2 Isolate eine Letalität aufgezeigt werden. Interessanterweise zeigten die beiden Stämme mit den niedrigsten minimal-tödlichen-i.p.-Dosen bei peroraler Gabe auch in hohen Dosen keine Wirkung. Pagotto *et al.* (2003) mutmaßten, dass diesen Stämmen ein Faktor fehlt, der ihnen die unbeschadete Passage des Magens ermöglicht. Bei Richardson *et al.* (2009) erwiesen sich orale Dosen mit CFUs zwischen 10^2 und 10^{11} für neonatale Cd1-Mäuse als tödlich.

Genomstatus des Genus *Cronobacter* und potentielle Virulenzfaktoren auf Genomebene

Studien von Kucerova *et al.* (2010) und Stephan *et al.* (2011), die sich mit der Genomsequenzierung verschiedener *Cronobacter*-Stämme beschäftigten, konnten einige potentielle Virulenzfaktoren aufzeigen, die als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dienen könnten. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind zwei *Cronobacter*-Stämme vollständig sequenziert. Im Jahr 2010 publizierte Kucerova *et al.* (2010) die Genomsequenz des *C. sakazakii* ATCC®BAA-894. Dabei handelt

es sich um einen aus PIF isolierten *C. sakazakii*-Stamm, der mit der klinischen Infektion und dem Tod eines Neugeborenen in Tennessee 2001 in Verbindung steht (Himmelright *et al.*, 2002). Sein Genom besteht aus einem Chromosom von 4.4 Mb (57 % GC) und den zwei Plasmiden pESA2 (31 kb, 51 % GC) und pESA3 (131 kb, 56 % GC). Mittels *comparative genomic hybridization* (CGH) wurden die Gene zehn verschiedener *Cronobacter*-Stämme, darunter auch Vertreter von *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* und *C. dublinensis*, mit dem Genom von *Csa* BAA-894 verglichen. Unter den 4382 in dieser Studie betrachteten annotierten Genen von *Csa* BAA-894 waren 55 % in allen untersuchten *C. sakazakii*-Stämmen und 43 % in allen untersuchten *Cronobacter*-Arten zu finden, wobei der größte Teil dieser gemeinsamen Gene wohl für essentielle Zellfunktionen wie Energiemetabolismus, Biosynthese, RNA- und DNA-Protein-Synthese, Zellteilung und Membrantransportmechanismen kodiert. Einige Gene konnten ausschließlich in den mit neonatalen Infektionen in Verbindung stehenden *Cronobacter*-Spezies - *C. sakazakii*, *C. turicensis* und *C. malonaticus* - gefunden werden. Darunter ein Kupfer/Silber-Resistenz-System, zu dessen Gen-Cluster u.a. *cusC* gehört, welches bekanntermaßen bei der Invasion des *E. coli*-Stammes K1, ebenfalls einem Verursacher von Neugeborenen-Meningitis, von Bedeutung ist (Huang *et al.*, 1999; Kucerova *et al.*, 2010; Munson *et al.*, 2000). Die Zerstörung des Gens *ibeB*, welches allelisch zu *cusC* ist, führt beim *E. coli*-Stamm K1 laut Huang *et al.* (1999) zu einer Reduktion der Invasivität in HBMEC-Zellen (*human brain microvascular endothelial cells*) und in das Zentralnervensystem neugeborener Ratten. Da IbeB Charakteristiken eines *outer membrane proteins* aufweist, wäre es möglich, dass die IbeB-vermittelte Invasion von *E. coli* K1 in HBMEC-Zellen über einen Liganden-Rezeptor stattfindet. Der genaue Mechanismus ist jedoch auch bei *E. coli* K1 noch unbekannt (Wang & Kim, 2002).

Die vollständige Genomsequenz von *C. turicensis* LMG 23827 (*Ctu* 3032) wurde im Jahre 2011 von Stephan *et al.* (2011) veröffentlicht. Auch hier handelt es sich um ein klinisches Isolat, welches 2005 für den Tod zweier Neugeborener in einem Züricher Kinderkrankenhaus verantwortlich war und aus dem Blut eines der Patienten isoliert werden konnte (Mange *et al.*, 2006). Das Genom des untersuchten *C. turicensis* 3032 besteht aus einem zirkulären Chromosom mit einer Größe von 4.4 Mb (57 % GC) und drei Plasmiden mit einer Größe von 138

kb, 22 kb und 54 kb. Von 4455 gefundenen, kodierenden Gensequenzen konnten ca. 9 % mithilfe der öffentlichen Sequenzierungsdatenbanken keine Annotierung zugeordnet werden; sie stellen somit unbekannte Proteine dar. 223 der gefundenen Gene haben einen Virulenz- und Krankheitsbezug. So kodieren sie beispielsweise für einen putativen O-Antigen-Cluster, für Gene der Exopolysaccharidbiosynthese oder für kapsuläre Polysaccharide. Eine genauere Untersuchung der gefundenen, potentiellen Pathogenitätsfaktoren steht allerdings noch aus.

OmpA

Eine wichtige und vergleichsweise gut untersuchte Rolle bezüglich der Virulenz bei *Cronobacter* spp. scheinen die *outer membrane proteins* (Omps), wie bspw. OmpA, zu spielen. OmpA ist ein evolutionär stark konserviertes, multifunktionelles Hauptprotein, das u.a. bei der Familie der *Enterobacteriaceae* zu finden ist. OmpA besitzt eine β -barrel-Faltstruktur mit vier extrazellulären Schleifen und dient als wichtiges Strukturprotein, als Rezeptor für verschiedene Bakteriocine und Bakteriophagen und als Vermittler der bakteriellen Konjugation und Virulenz (Krishnan & Prasadarao, 2012).

Aus vielen Studien ist mittlerweile bekannt, dass *Cronobacter* spp. für die Invasion verschiedener Zelllinien OmpA benötigen. Von entscheidender Bedeutung ist OmpA beispielsweise für die Invasion von *Cronobacter* spp. in HBMEC-Zellen (*human brain microvascular endothelial cells*) und in die Darmepithel-Zelllinien INT-407 und Caco-2. Interessanterweise sind im Falle der INT-407 Zellen sowohl Mikrotubuli als auch Mikrofilamente an der Invasion beteiligt, während bei der Invasion in HBMEC-Zellen nur Mikrotubuli, nicht aber Aktinfilamente eine Rolle spielen (Mohan Nair & Venkitanarayanan, 2007; Singamsetty *et al.*, 2008). Neben OmpA ist bei der Invasion in Caco-2 und INT-407 Zellen auch das Oberflächenprotein OmpX beteiligt. Kim *et al.* (2010) konnten zeigen, dass OmpA-OmpX Deletionsmutanten eine signifikant niedrigere Invasionsrate aufweisen.

Auch Untersuchungen im Tiermodell unterstreichen die Bedeutung von OmpA für die Pathogenität. Mittal *et al.* (2009b) verglichen die Wirkung von OmpA-positiven (OmpA+) und OmpA-negativen (OmpA-) *C. sakazakii*-Stämmen in einem Meningitis-Tiermodell (neugeborene Ratten).

Dabei zeigte sich, dass nur OmpA+ *C. sakasakii*-Stämme in der Lage waren, die Darmbarriere zu überwinden, sich in Makrophagen zu replizieren, über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn zu gelangen und dort Veränderungen hervorzurufen. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen im Maus-Modell der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC): während eine Infektion der Mäuse mit OmpA+ *C. sakasakii*-Stämmen zur Zerstörung der Darmepithelien führte, konnte ein solcher Effekt bei OmpA- *C. sakasakii*-Stämmen nicht festgestellt werden (Mittal *et al.*, 2009a).

Wichtig für die Pathogenität der Stämme scheint auch die Interaktion von OmpA mit dendritischen Zellen (DC) zu sein. Im Gegensatz zu den bereits genannten, nicht professionell phagozytotischen Darm- und Hirnendothelzelllinien werden *Cronobacter* spp. von den professionell phagozytotischen DC aktiv aufgenommen. Allerdings zeigten sich nur OmpA+ *Cronobacter*-Stämme als in DC überlebensfähig, indem sie an DC-SIGN Proteine (spezifische ICAM Nonintegrine) banden, die Bildung immunsuppressiver Faktoren wie IL-10 und TGF- β induzierten und letztendlich die DC-Reifung unterdrückten (Mittal *et al.*, 2009a). Dies scheint für die Pathogenese der nekrotisierenden Enterokolitis eine wesentliche Rolle zu spielen. Im NEC-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass die epithelialen Schäden bei *C. sakazakii*-Infektionen in einem direkten Zusammenhang mit der Rekrutierung dendritischer Zellen und der Unterdrückung deren Reifung stehen. Werden Intestinalzell-Monolayer mit Überständen aus OmpA+ *C. sakasakii*/DC-Kulturen behandelt, so führt dies zu einer starken Erhöhung der TGF- β - und iNOS-Produktion, der Zerstörung von *tight junctions*, einer erhöhten Membranpermeabilität und letztendlich zur Apoptose der Intestinalzellen (Emami *et al.*, 2011). Die Bedeutung von *outer membrane proteins* (Omps) für die Pathogenese der NEC wurde bereits für enteroinvasive *E. coli* beschrieben. Auch hier spielen die Omps eine wichtige Rolle bei der Schädigung der Zellbarriere. Desweiteren induzieren sie eine Neuordnung der Strukturen des Zytoskeletts und triggern die Entzündungskaskade (V. Malladi *et al.*, 2004).

Rolle des Zytoskeletts und der *tight junctions*

Invasive Bakterien nutzen oftmals das Zytoskelett von eukaryotischen Zellen, um in diese einzudringen. Sowohl Mikrofilamente als auch Mikrotubuli können dabei eine entscheidende Rolle spielen. So induzieren Salmonellen beispielsweise über bakterielle Effektormoleküle die Ausbildung von Aktin-reichen „Membran-Krausen“ (*membrane ruffles*) an der Wirtszelloberfläche, über welche das Bakterium dann, eingeschlossen in eine intrazellulären Vakuole, internalisiert wird (Hayward & Koronakiss, 2002; Takeuchi, 1967). Die herausragende Bedeutung der Aktin-Polymerisation an diesem Vorgang zeigt sich in Versuchen mit Inhibitoren der Mikrofilamentformation wie Cytochalasin D. Unter dem Einfluss von Cytochalasin D kommt es zu einer deutlichen Hemmung der Salmonellen-Invasion. (Finlay *et al.*, 1991). Die Verwendung eines Mikrotubuli-Inhibitors wie Nocadazol hat hingegen keinen Einfluss auf die Invasion der Salmonellen (Finlay *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu konnte für *Campylobacter jejuni* eine Beteiligung der Mikrotubuli, nicht aber der Mikrofilamente bei der Wirtszellinvasion in INT-407 Zellen nachgewiesen werden (Oelschlaeger *et al.*, 1993). Oelschlaeger *et al.* (1993) konnten in ihrer Arbeit zudem zeigen, dass der Invasionsmechanismus bei verschiedenen Wirtszelltypen variieren kann. So sind an der Invasion von *Citrobacter freundii* in T24 bladder cells alleine die Mikrotubuli beteiligt, an dessen Invasion anderer Zelllinien jedoch Mikrotubuli und Mikrofilamente.

Für *Cronobacter* spp. konnte gezeigt werden, dass sowohl funktionsfähige Mikrotubuli als auch ein intaktes Aktinskelett für die Invasion von Nöten sind (Kim & Loessner, 2008; Mohan Nair & Venkitanarayanan, 2007; Singamsetty *et al.*, 2008). Mohan Nair und Venkitanarayanan (2007) erreichten sowohl mit dem f-Aktin-Inhibitor Cytochalasin D, als auch durch die Depolarisierung der Mikrotubuli mittels Nocodazol, Colchicin und Vinblasin eine Reduktion der Invasivität von *Cronobacter* spp. in INT-407 Zellen. Auch Kim und Loessner (2008) konnten bei Versuchen mit Colchicin eine Hemmung der Bakterieninvasion (hier in Caco-2 Zellen) nachweisen. Versuche mit Cytochalasin D führten in dieser Studie jedoch nicht zur Reduktion, sondern zur Steigerung der Invasivität. Dies kann auf den Umstand zurückgeführt werden, dass Cytochalasin D nicht nur in der Lage ist die Aktinpolymerisation zu inhibieren, sondern auch zur Zerstörung der *tight junctions* der Zellen führen

kann. Eine Öffnung der *tight junctions* mittels EGTA *prae infectionem* führte nämlich ebenfalls zu einer Steigerung der Invasionsrate. Zerstörte oder geöffnete *tight junctions* als invasionsfördernder Faktor stellen somit laut Kim und Loessner (2008) ein weiteres wichtiges Charakteristikum im Invasionsverhalten von *Cronobacter* spp. dar. Bei *tight junctions* handelt es sich um Zellkontakte benachbarter Epithelzellen, durch welche die Zellen aneinandergeheftet sind. Sie befinden sich am apikalen Ende der basolateralen Membran und werden von einem Netzwerk aus Transmembranproteinen wie den Occludinen und Claudinen gebildet, die wiederum über *zonula occludens*-Proteine mit dem Zytoskelett der Zellen in Verbindung stehen. *Tight junctions* dienen der Stabilisierung des Epithelzellverbands, der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und haben eine wichtige Barrierefunktion (Citi, 1993; Miyoshi & Takai, 2005).

Tiermodelle

Nach dem Zellkulturmodell stellen die Tiermodelle die nächste Analyseebene dar und können wertvolle Erkenntnisse bezüglich des genauen Infektionsmechanismus und möglicher Pathogenitätsmechanismen im gesamten Wirtsorganismus liefern. Die momentan bei *Cronobacter*-Studien am häufigsten verwendeten Tiermodelle sind neugeborene Mäuse und Ratten. Sie kommen sowohl als Meningitis- (Mittal *et al.*, 2009b) als auch als NEC-Modell (Emami *et al.*, 2011) zum Einsatz. Als problematisch erweisen sich bei diesen Modellen allerdings die zum Teil sehr hohen Dosen, welche nötig sind, um Infektionen auszulösen (Carranza *et al.*, 2009; Farber, 2008). Richardson *et al.* (2009) berichten von erfolgreichen Versuchen mit drei Tage alten Mäusen, wobei sich vor allem die CD-1 Linie mit letalen Infektionsdosen von 10^2 CFU als vielversprechend erwies. Lee *et al.* (2011) verwendeten, ebenfalls erfolgreich, drei Tage alte ICR Mäuse. Franco Pagotto (2009) verglich verschiedene Tiermodelle, darunter Ferkel, Kaninchen, Meerschweinchen, Eintagsküken und junge Gerbils, auf ihre Eignung. Nach peroraler Gabe von 10^9 CFU verschiedener *Cronobacter*-Isolate konnte zwar im Kot aller Tiere das Bakterium nachgewiesen werden, allein bei den Gerbils gelang jedoch auch ein Nachweis im Gewebe. Weiterführende Untersuchungen zu neonatalen Gerbils als Tiermodell für *Cronobacter* spp. stehen bisher noch aus. Auch im Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), einem beliebten Modellorganismus zur

Aufklärung pathogener Mechanismen, konnte eine pathogene Wirkung von *Cronobacter* spp. nachgewiesen werden (Sivamaruthi *et al.*, 2011). Am Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene der Universität Zürich laufen momentan noch unveröffentlichte Versuche mit Zebrafisch-Embryonen als Modellorganismen.

1.5. Einfluss von *Cronobacter* spp. auf Abwehrmechanismen der Wirtszelle

MAP-Kinase Weg

Beim *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Weg handelt es sich um einen mehrstufigen Signaltransduktionsweg, welcher evolutionär stark konserviert und in allen eukaryotischen Zellen zu finden ist (Robinson & Cobb, 1997). Die *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) sind als Regulatoren an einer Vielzahl von physiologischen Zellprozessen, wie beispielsweise Differenzierung, Wachstum und Apoptose beteiligt (Junttila *et al.*, 2008). Des Weiteren spielen sie eine bedeutende Rolle bei der zellulären Antwort auf diverse Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Stressfaktoren (z.B. Toxine, UV-Licht, Hitze) (Schaeffer & Weber, 1999). Bei Vertebraten sind zur Zeit sechs verschiedene MAPK-Familien bekannt, darunter die drei bereits sehr gut untersuchten Pfade der *extracellular signal-regulated kinases* ERK1/2, *c-Jun N-terminal kinases* JNK1/2/3 und *p38 α / β / δ / μ* , sowie die der bisher weniger betrachteten *extracellular signal-regulated kinases* ERK3, ERK5 und ERK7 (Cuevas *et al.*, 2007). Während der ERK1/2 Pfad vorzugsweise Zelldifferenzierung und –proliferation reguliert und das Überleben der Zellen fördert, sind die beiden Kinasen JNK und p38 in erster Linie an der zellulären Antwort auf Stressreize beteiligt und begünstigen die Entstehung von Entzündungen sowie die Apoptose (Schaeffer & Weber, 1999). Der MAPK-Weg besteht im Allgemeinen aus drei linear hintereinandergeschalteten Proteinkinasen: MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) \rightarrow MAP Kinase Kinase (MAPKK) \rightarrow MAP Kinase (MAPK). Eine schematische Darstellung des Kaskadeweges ist Abbildung 1 zu entnehmen.

Die initiale Aktivierung der MAPKKK erfolgt in der Regel durch die Interaktion eines äußeren Stimulus mit diversen membranständigen Rezeptoren,

beispielsweise G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Integrinen (Crown, 2012; Loeser *et al.*, 2008). Die Aktivierung erfolgt durch die Phosphorylierung eines Threonin-Xaa-Tyrosin Motivs im MAPK *activation loop*, der allen beteiligten Kinasen zu Eigen ist (Avruch, 2007). Die aktivierte MAPK kann dann entweder im Zytoplasma verbleiben und zytoplasmatische Proteine wie Apoptose- oder Zytoskelettproteine mittels Serin/Threonin-Phosphorylierung aktivieren oder aber in den Zellkern wandern, um dort die Transkription bestimmter Gene zu starten (Junttila *et al.*, 2008). Die Vielzahl von verschiedenen MAPKKK, MAPKK und MAPK, die Tatsache, dass eine MAPKKK nicht nur eine, sondern gleich mehrere verschiedene MAPKK aktivieren kann (*crossstalk*) (Johnson *et al.*, 2005) und das Vorhandensein vieler Rückkopplungsschleifen (Jeffrey *et al.*, 2007) macht das MAPK-System zu einem sehr komplexen zellulären Regulationssystem.

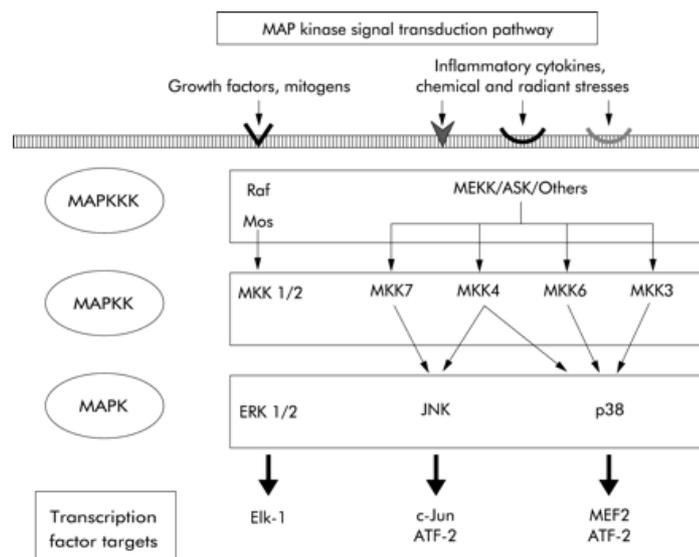


Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei wichtigsten MAPK-Signaltransduktionswege (aus Hommes *et al.* (2003)).

Über den Einfluss von *Cronobacter* spp. auf den MAPK-Weg ist bisher noch sehr wenig bekannt. Hunter *et al.* (2009) untersuchte mittels DNA *microarray*-Analyse das Genom von IEC-6 Zellen (*rat intestinal epithelial cells*), auf durch eine *Cronobacter sakazakii*-Infektion verursachte Veränderungen. Bei einigen MAPK konnte dabei eine Regulierung unter das Kontrollniveau beobachtet werden, während die Levels anderer marginal erhöht waren. Mittal *et al.* (2009a) berichten

von einer Suppression der MAPK-Aktivierung durch *Cronobacter* spp. in dendritischen Zellen. Laut dieser Studie können die Bakterien die Reifung dendritischer Zellen unterbinden, indem sie den MAPK-Weg der Zellen inaktivieren und zugleich die IL-10 und TGF- β Produktion steigern.

NO und iNOS

Stickstoffmonoxid (NO) hat verschiedene biologische Funktionen, die von Signaltransduktion bis zur unspezifischen Immunabwehr reichen und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Mikroorganismen. Da NO sowohl fett- als auch wasserlöslich ist, kann es schnell und ungehindert durch die Zellmembranen diffundieren und sich lokal rasch ausbreiten. Bei der Reaktion von NO mit einem Superoxid-Anion entsteht hochtoxisches Peroxynitrit, welches für die Großzahl der biologischen Effekte von NO verantwortlich ist (Chokshi *et al.*, 2008). NO entsteht bei der Umsetzung von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). Man unterscheidet drei verschiedene Isoformen der NOS: zwei konstitutive Formen, die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS), welche konstitutiv auf niedrigem Level exprimiert werden, sowie eine induzierbare Variante, die iNOS, deren Bildung erst durch verschiedene Signalmoleküle (bspw. proinflammatorische Zytokine) induziert wird (Vasantha Malladi *et al.*, 2004). Mittels einer erhöhten iNOS-Expression und daraus folgend einer erhöhten NO-Produktion reagieren viele Zelltypen auf die Gegenwart von Bakterien. So antworten beispielsweise humane Kolonepithelzellen (Caco-2) auf eine Infektion mit enteroinvasiven Bakterien wie *Salmonella dublin* und *Shigella flexneri* mit einer deutlichen Hochregulierung der iNOS- und damit verbunden der NO-Produktion, während eine Infektion mit nicht-enteroinvasiven Bakterien keinen Effekt zeigt (Witthöft *et al.*, 1998). Außerdem gilt die induzierbare NOS als wichtiger Mediator der intestinalen Entzündungsreaktion und spielt eine Schlüsselrolle beim Zusammenbruch der Darmbarriere beim Krankheitsbild der nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) (Chokshi *et al.*, 2008). Die NO-induzierte Apoptose der Enterozyten führt hier zur Zerstörung der Darmbarriere (Ford *et al.*, 1997).

Obwohl *Cronobacter* spp. als mögliche Verursacher einer NEC betrachtet werden, ist zu deren Rolle in der Pathogenese der NEC noch sehr wenig bekannt. Hunter *et al.* (2008); (2009) konnten im Tiermodell an neugeborenen Ratten sowie in der Zellkultur an intestinalen Epithelzellen (IEC-6) zeigen, dass die Bindung von *C. sakazakii* an die Zellen zu einer erhöhten iNOS-Expression und NO-Produktion und dadurch letztlich zur Apoptose führt. Emami *et al.* (2011) untersuchten die Beteiligung der dendritischen Zellen an der Entstehung der NEC genauer und stellten fest, dass eine Interaktion von OmpA+ *C. sakazakii* mit DC eine starke Erhöhung der TGF- β - und iNOS-Konzentration induziert und so zur Zerstörung des Darmepithels führt.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1. Chemikalien

6-Amino-n-Caprinsäure (Sigma-Aldrich, A2504-500G)
Agar Bacteriological (AGAR No. 1), (Oxoid, LP0011)
Agarose peq GOLD (Peqlab, 35-1020)
Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, A4514)
Caseinhydrolysat (Merck, 1.02245.0500)
Cell Lysis Buffer (10X), (Cell Signaling, 9803)
Chloroform, Roti-Chloroform II (Roth, X9841)
Columbia Agar mit Schafblut Plus (Oxoid, PB5039A)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, 04693124001)
Cytochalasin D from *Zygosporium Mansonii* (Sigma-Aldrich, 10-900010 C8273)
Dinatriumhydrogenphosphat (Riedel-de Haen, 30407)
DNA-Polymerase Thermoprime Plus (Thermo Scientific, AB-0301)
DNA-Leiter 100 bp (Peqlab, 44085)
Dulbecco's MEM Zellkulturmedium (Biochrom AG, F0435)
Eisen(III)-Chlorid-Tetrahydrat (Sigma-Aldrich, M3634-100G)
Ethanol, absolut (Riedel-de Haen, 32205)
Fetales Kälberserum (FCS; Biochrom AG, S0115)
Filterpapier (GE Healthcare, 80-1106-19)
Gentamycin (Serva, 22185.02)
Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, G5882-10X1ML)
Glycin (Sigma-Aldrich, G2526)
Griess reagent (*modified*) (Sigma-Aldrich, G4410)
Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)
Hirn-Herz-Bouillon (Merck, 1.10493.0500)
Isopropanol (Fluka, 59310)
Kaliumphosphat monobasisch (Riedel-de Haen, 30407)
Ladepuffer (6x) (Peqlab, 20337)
L-Glutamin (Biochrom AG, K0282)
Lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich, L6143 und L4391)
Lysozym (Merck 4403)
Magermilchpulver (Merck, 1.15363.0500)
Magnesium Chloride (MgCl₂) (Thermo Scientific, 2401/18)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck, 1058860500)
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat (Sigma-Aldrich, M3634-100G)
MEM-EARLE Zellkulturmedium (Biochrom AG, FG0325)
Methanol (Sigma-Aldrich, 34860)
Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, 31434)
Natriumnitrit (Sigma-Aldrich, S2252)
Natriumpyruvat (Biochrom AG, L0473)
Natronlauge (Fluka, 35256)
Paraformaldehyd (Fluka, 76240)

Phosphatasehemmer (Sigma-Aldrich, P5726-1ml)
Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad, 161-0373)
ProLong Gold antifade mit DAPI (Invitrogen, P36931)
Proteinase K (Roth 7528.1)
Reaction Buffer IV (Thermo Scientific, AB0289)
Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, 46430)
Ringerlösung (Oxoid, BR0052G)
RNase A (Roth 7156.1)
Salzsäure (Merck, 1.15363.0500)
Sodium cacodylate trihydrate (Sigma-Aldrich, C0250)
Standard II Nutrient Agar (Merck, 1.07883.0500)
Staurosporine, *Streptomyces* sp. (Calbiochem, 569397)
SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, 37075)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 93443)
Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503)
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, T3924)
Trypton (Fluka, 95039)
Tween-20 (Sigma-Aldrich, P1379)
XT MOPS Running Buffer, 20x (Bio-Rad, 161-0788)
XT Reducing Agent, 20x (Bio-Rad, 161-0792)
XT Sample Buffer, 4x (Bio-Rad, 161-0791)
Ziegen-Serum (MP Biomedicals, 2939149)

1.2. Bakterienstämme

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme. *Im Folgenden wurden diese Kurzbezeichnungen verwendet.

Bakterienstamm		Kurz- bezeichnung*	Herkunft	Herkunftsland	Genom- sequenzierung	Referenz
E604	<i>C. sakazakii</i>	604	klinisch	Kanada	-	
E789	<i>C. sakazakii</i>	789	Neugeborenes	Holland	-	
E793	<i>C. sakazakii</i>	793	human	USA	-	
E821	<i>C. sakazakii</i> BAA 893-1	821	Milchpulver	USA	-	
E823	<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA-894	823	Neugeborenes (Meningitis)	USA	+	Kucerova <i>et al.</i> (2010)
E824	<i>C. sakazakii</i> CDC996-77	824	Neugeborenes (Spinalflüssigkeit)	USA	-	Farmer <i>et al.</i> (1980)
ES5	<i>C. sakazakii</i>	ES5	human (nicht Neugeborenes)	Schweiz	-	
3032	<i>C. turicensis</i> LMG23827T	3032	Neugeborene (2 tödliche Fälle in Zürich)	Schweiz	+	Stephan <i>et al.</i> (2011)
MHI 968	<i>E. asburiae</i>	968	unbekannt	Japan	-	
MHI 977	<i>C. sakazakii</i>	977	Milchpulver	Deutschland	-	
MHI 978	<i>C. sakazakii</i>	978	Milchpulver	Deutschland	-	
MHI 979	<i>C. sakazakii</i>	979	Milchpulver	Deutschland	-	
MHI 21001	<i>C. sakazakii</i>	21001	Milchpulver	Deutschland	-	
MHI 21002	<i>C. sakazakii</i>	21002	Milchpulver	Deutschland	-	
K12	<i>E. coli</i>	K12	Stuhlprobe (human)	USA	+	Blattner <i>et al.</i> (1997)

1.3. Nährmedien

Die Medien wurden nach den aufgeführten Rezepten zusammengestellt und bei 120°C für 20 min autoklaviert.

- LB (Luria-Bertani): 10g Tryptone
5g Hefeextrakt
10g NaCl
auf 1 l auffüllen, pH 7,0
Festmedium: 15g Agar zugeben
- BHI (*brain heart infusion*): 37 g BHI
auf 1 l auffüllen
- TSB (*tryptone soya broth*): 30 g TSB
auf 1 l auffüllen
- *Casaminoacids Yeast Broth* : 20 g Casaminoacids
6 g Hefeextrakt
2,5 g NaCl
8,7 g K₂HPO₄
1 ml Spurensalze
auf 1 l auffüllen
- Spurensalze: 5 % MgSO₄
0,5 % MnCl₂
0,5 % FeCl₃
in 0,001 mol/l H₂SO₄
- Standard II–Agar: 25 g Standard II Nutrient Agar
auf 1 l auffüllen
- Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid, PB 5039 A)
- PC-Agar (Oxoid, PO5013A)
- ESIA-Agar (AES, AEB 520010)

1.4. Biochemische Testkits

- Enterotube II (BD, 273176)
- Api 20 E (Biomerieux, 20100)

1.5. Zellkultur

1.5.1. Zelllinien

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
Caco-2	humane, epitheliale Dickdarmadenokarzinomzellen	DSMZ: ACC 169
Raw 264.7	murine Monozyten-Makrophagenzellen	ATCC: TIB-71
IPEC-J2	porcine Dünndarmepithelzellen	DSMZ: ACC 701

1.5.2. Zellkulturmedien und -lösungen

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien und -lösungen.

Zelllinie	Medium	FCS hitzeinaktiviert (v/v)	Natrium- pyruvat	L- Glutamin (v/v)	NEA
Caco-2	MEM- Earle	10 %	-	-	1 %
Raw 264.7	Dulbecco's MEM	10 %	1 %	1 %	-
IPEC-J2	Dulbecco's MEM	10 %	1 %	2 %	-

Für die Gentamycinassays wurden Medien ohne FCS-Zusatz verwendet.

- PBS:
 - 6,79 g NaCl
 - 1,47 g Na₂HPO₄
 - 0,43 g KH₂PO₄
 - auf 1l auffüllen, pH 7,0 – 7,5
 - bei 120°C für 20 min autoklavieren

1.6. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese und Immunoblot:

- Lysepuffer (5 ml):
 - 500 µl Cell Lysis Buffer
 - 50 µl Phosphatasehemmer
 - 746 µl Complete Mini Protease Hemmer
 - 3704 µl A. dest
- SDS-PAGE-Laufpuffer:
 - 70 µl Probe
 - 25 µl XT Sample Buffer
 - 5 µl Reducing Agent

- Anodenpuffer I: 37,2 g Trizma Base
200 ml Methanol
auf 1l auffüllen
- Anodenpuffer II: 3,02 g Trizma Base
200 ml Methanol
auf 1l auffüllen
- Kathodenpuffer: 5,24 g 6-Amino-n-Capronsäure
3,02 g Trizma Base
200 ml Methanol
auf 1l auffüllen
- Blockierungspuffer: 94,9 % (v/v) TBS
0,1 % (v/v) Tween20
5 % (w/v) Magermilchpulver
auf 37°C erwärmt und durch Papierfilter
filtriert
- TBS 2,42 g Tris Base
8 g NaCl
auf 1l auffüllen, pH 7,6
- TBS-T 99,9 % (v/v) TBS
0,1 % (v/v) Tween20

Immunfluoreszenz:

- BSA-PBS-Lösung: 1 % BSA (w/v) in PBS
- Blockierungspuffer: 5 % (v/v) inaktiviertes Ziegenserum
1 % BSA (w/v)
94 % (v/v) PBS
- TritonX-PBS-Lösung: 0,5 % (v/v) TritonX-100 in PBS

1.7. Primäre und sekundäre Antikörper

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Antikörper	relevante Eigenschaften	eingesetzte Verdünnung	Molekular Antigen	Herkunft
p-p38	mouse anti-p38 MAPK (pT180/pY182)	1:2000	38 kDa	BD Lab. # 612280
p-ERK	p-p44/42 MAPK (T202/Y204) rabbit anti-human, polyclonal	1:1000	42/44 kDa	Cell Signal. # 9101S
p-JNK	P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) rabbit anti-human, polyclonal	1:1000	46/54 kDa	Cell Signal. #9251
iNOS (mouse)	mouse anti-mouse, IgG _{2a,k}	1:4000	130 kDa	BD Lab. # 610431
iNOS (rabbit)	rabbit anti-human, polyclonal	1:1000	130 kDa	Cell Signal. # 2977S
β-Actin	rabbit anti-human, polyclonal	1:1000	45 kDa	Cell Signal. # 4967
anti-mouse IgG (HRP- linked)	horse anti-mouse IgG (H&L)	1:2000		Cell Signal. # 7076
anti-rabbit IgG (HRP- linked)	goat anti-rabbit IgG (H&L)	1:2000		Cell Signal. # 7074
Alexa Fluor [®] 488	goat anti-mouse IgG (H+L)	6µg/ml		Invitrogen #A11001
C.s. prot. Ia 2G4	mouse IgG, monoclonal	1–10 µg/ml		Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, München
HT2-KLHI 2A12	mouse IgG, monoclonal	10 µg/ml		

1.8. Enzyme

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

Proteinase K (Roth, 7528.1)

RNase A (Roth, 7156.1)

Lysozym (Merck, 4403)

1.9. PCR- Primer

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete PCR- Primer.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße (bp)	Referenz
ESSF	GGATTTAACCGTGAACTTTTCC	469	Mohan Nair und Venkitanarayanan (2006)
ESSR	CGCCAGCGATGTTAGAAGA		

1.10. Verbrauchsmaterialien

Zellkultur:

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm² (Nunc, 178905)

Multidish 6 well, Nunclon Delta SI (Nunc, 119847)

Multidish 24 well, Nunclon Delta SI (Nunc, 142475)

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

Gelelektrophorese und Immunoblot

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

Immobilon-P Transfermembran, PVDF, 0,45 µm (Milipore, IPVH304F0)

Criterion XT Bis-Tris Gels, 12 % Resolving Gel, 18 wells (Bio-Rad, 345-0118)

Criterion XT Bis-Tris Gels, 12 %, 12 + 2 wells (Bio-Rad, 345-0117)

PCR

PCR Tubes, 0,2 ml (Peqlab, 820337-A)

Sonstige

PP-Röhrchen, steril, 15 ml (Greiner bio-one, 188271)

PP-Röhrchen, steril, 50 ml (Greiner bio-one, 227261)

Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml (Eppendorf, 0030 120.094)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, 0030 120.086)

Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml (Eppendorf, 0030 121.023)

Zählkammer nach Thoma (Brand)

Variable Zwölfkanalpipette 30 - 300 µl (Eppendorf)

Variable Pipetten: 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl (Eppendorf)

Accu-Jet Pipettierhilfe (Brand)

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

Sterilfilter Millex GV Filter Unit 0,22 (Millipore, SLGV033RB)

1.11. Geräte

Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH)
Brutschrank	Hera Cell 150 CO ₂ -Inkubator (Heraeus) Brutschrank (Mettler)
Gelelektrophorese	<u>vertikales Elektrophoresesystem:</u> Criterion Cell (Bio-Rad) <u>horizontales Elektrophoresesystem:</u> PerfectBlue Gelsystem Mini M (Peqlab) <u>Blottingkammer:</u> NovoBlot Multiphor II (Amersham Bioscience) <u>Stromversorgungsgeräte:</u> Power Pac HC (Biorad) Electrophoresis Power Supply EPS 1001 (GE Healthcare) Consort E835 (Sigma-Aldrich) <u>Immunodetektion:</u> Kodak Image Station 200MM (Biostep) <u>Chemodetektion:</u> Chemilumineszenz-System (Biostep)
Heizblock	Thermomixer comfort (Eppendorf)
Mikroskope	Inverses Mikroskop (Zeiss) Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence)
Photometer	Photometer UV - 1602 (Shimadzu Corporation) BioPhotometer (Eppendorf)
Schüttler	Vortex-Genie Modell K-550-GE (Merck)
Schüttelinkubator	Controlled Environment Incub. Shaker (New Brunswick)
Sterilbank	Sterilwerkbank HERA-safe (Heraeus)
Taumlern	Taumlern, Heidolph Polymax 1040 (Schütt)
Thermocycler	Thermocycler PCR express (Thermo Scientific)

	Thermocycler PCR sprint (Thermo Scientific)
Ultraschall	Ultraschallbad (Bachofer)
Zentrifuge	Zentrifuge Multifuge 1 S-R (Heraeus)
	Biofuge pico (Heraeus)

1.12. Software

Bildanalyse Software, BZ-Analyser für Fluoreszenzmikroskop (Keyence)

Ridawin (R-Biopharm AG)

KODAK 1D 3.6. Software (Biostep)

Argus X1, Bio-Imaging-Control-Software (Biostep)

2. Methoden

2.1. Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte standardmäßig in flüssigem LB-Medium. Hierzu wurden 10 ml LB-Medium mit einer auf Columbia-Schafblut-Agar gewachsenen Einzelkolonie angeimpft und im Brutschrank bei 37°C für ca. 16 h inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 3220 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in frischem LB-Medium resuspendiert und auf die gewünschte Gesamtkeimzahl verdünnt.

Zum Vergleich der Koloniemorphologie auf verschiedenen Nährböden wurden auf Columbia-Schafblut-Agar gewachsene Einzelkolonien mittels 3-Ösen-Ausstrich auf PC-Agar, Standard II-Agar und ESIA-Agar ausgestrichen und bei 37°C für 24 h inkubiert.

2.2. Allgemeine biochemische Methoden

Die *Cronobacter*-Stämme *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 wurden mittels API 20 E V4.1 (Biomérieux) und Enterotube II (BD BBL) biochemisch differenziert. Beide Tests wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.3. Wachstumsanalysen

2.3.1. Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Mittels einer photometrischen Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm kann die Anzahl der Bakterien in einer Flüssigkultur bestimmt werden. Als Referenz dient dabei das sterile Medium, in dem die Bakterien angezogen wurden.

2.3.2. Wachstumsanalyse der *Cronobacter*-Stämme

Das Wachstumsverhalten von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 wurde mittels OD₆₀₀-Bestimmung über einen Zeitraum von 9 h analysiert. Hierfür wurden 50 ml LB-Medium in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und aus den ü/N-

Kulturen beimpft. Die OD_{600} der ü/N-Kulturen wurde dabei mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet, wodurch die Start- OD_{600} in jedem Ansatz 0,01 betrug. Die Wachstumsversuche erfolgten in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 240 rpm. In konstanten Abständen, zunächst alle 60 min und ab einer $OD_{600} = 0,1$ alle 30 min, wurden Proben entnommen und die OD_{600} bestimmt.

2.4. DNA-Isolierung

2.4.1. Chromosomale DNA-Präparation für PCR (*long version*)

Zur Gewinnung der DNA wurden 1,5 ml einer ü/N-Kultur bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugiert, das Pellet in 400 µl Lysepuffer (100 mM Tris-HCl, pH=8,5, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10 mg/ml Lysozym) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 µl von 10 %igem SDS und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben, invertiert und ü/N bei 55°C im Thermoblock inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden 500 µl Isopropanol hinzugefügt. Die gefällte DNA wurde mit einer sterilen gelben Spitze zunächst in 500 µl 96 %igem und dann in 70 %igem EtOH gewaschen und in einem neuen Eppendorfgefäß bei 70°C im Thermoblock getrocknet, bevor sie in TE-Puffer oder A. bidest. aufgenommen wurde. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C, über längeren Zeitraum bei -20°C.

2.4.2. Chromosomale DNA-Präparation für PCR (*quick version*)

Zur Gewinnung der DNA wurde Bakterienmaterial mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Platte in ein Eppendorfgefäß überführt, in 200 µl A. bidest. resuspendiert und für 5 min bei 100°C gekocht. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Roti-Chloroform II im Verhältnis 1:2 gemischt und zur Phasentrennung erneut bei 13000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die DNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C, über längeren Zeitraum bei -20°C.

2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.5.1. PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert. Primersequenzen sowie Größe der entstandenen Amplifikationsprodukte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

2.5.2. PCR mit Gesamt-DNA als Template

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Zwei spezifische, das zu amplifizierende Fragment flankierende, Oligonukleotid-Primer lagern sich an das Template an und mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase und dNTPs werden die komplementären Enden synthetisiert. Das Primerpaar ESSF und ESSR wurde für das 469 bp große Fragment des *ompA*-Gens von *Cronobacter* spp. konstruiert. Als Template diente verdünnte Gesamt-DNA.

PCR-Ansatz (50 µl):

Reaktionspuffer IV	10x	5µl
MgCl ₂	25 µM	3 µl
dNTPs (Mix)	40 mM, je 10 mM	1 µl
Primer 1 (ESSF)	10µl	2 µl
Primer 2 (ESSR)	10 µl	2 µl
DNA-Polymerase	5 µl/U	0,15 µl
Template	10 – 100 ng	2–6 µl
bidest. H ₂ O		34,85-30,85 µl

PCR-Bedingungen:

initiale Denaturierung	1x	8 min	95°C
Denaturierung	} 30 x	35 sec	95°C
Annealing		40 sec	60°C
Elongation		1 min	72°C
finale Elongation	1x	10 min	72°C

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurde das PCR-Produkt mittels Agarosegelelektrophorese charakterisiert.

2.6. Zellkultur

2.6.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Zelllinien wurden im begasten Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ in den entsprechenden Medien (Tab. 4) kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte in der Regel alle drei Tage. Die verwendeten Puffer und Medien wurden vorher auf Raumtemperatur vorgewärmt.

2.6.2. Subkultivierung von eukaryotischen Zellen

2.6.2.1. Caco-2 und IPEC-J2

- Medium abnehmen, mit 20 ml PBS waschen
- 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (pro 80 cm²-Kulturflasche) in die Flasche geben, so dass der Monolayer vollständig benetzt ist
- 5-7 min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren, bis die Zellen sich abgelöst haben
- 10 ml des entsprechenden FCS-haltigen Mediums hinzufügen und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren die Zellen resuspendieren und in sterile 50 ml Röhren überführen
- 8 min bei 600 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet in frischem Kulturmedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut resuspendieren
- Zellsuspension um den Faktor 6 mit Kulturmedium in einer neuen Zellkulturflasche verdünnen
- im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren
- Um ausdifferenzierte Caco-2 Zellen zu erhalten, wurden die Zellen am Tag 0 in einer Konzentration von 4 x 10⁴ Zellen in 24-Well Platten ausgesät und für 17–20 Tage im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ kultiviert. Für eine ausreichende Nährstoffversorgung wurde alle 2-3 Tage ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt.

2.6.2.2. Raw 264.7

- Zellen durch vorsichtiges Abspülen mit Kulturmedium vom Boden der Flasche lösen
- Zellsuspension um den Faktor 20 mit Kulturmedium in einer neuen Zellkulturflasche verdünnen
- im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren

2.7. Zytotoxizitätstest

Zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten *Cronobacter*-Stämme wurde ein WST-Zytotoxizitätstest in IPEC-J2 Zellen durchgeführt. Zur Probenaufbereitung und Anzucht der Stämme wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurden die Bakterien, in Anlehnung an Pagotto *et al.* (2003), in 10 ml TSB über Nacht bei 36°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend bei 2500 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels 0,22 µm Sterilfiltern filtriert. Die sterilen Zellfiltrate wurden in jeweils zwei Hälften geteilt, von denen je eine einer 20 minütigen Hitzebehandlung (100°C) unterzogen wurde.

Der zweite Ansatz basierte auf den leicht modifizierten Anzuchtprotokollen von Raghav und Aggarwal (2007). Je eine Kolonie der frisch auf Schafblut-Agar angezüchteten Stämme wurde ü/N in 10 ml *casamino yeast extract broth* bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 1 % der ü/N-Kultur entnommen, in 50 ml frischem Medium verdünnt und für 24 h bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach 24 h wurden 250 µl erneut in 10 ml frischem Medium verdünnt und für 18 h bei 30°C und 200 rpm in den Schüttelinkubator gestellt. Am Folgetag wurden die Kulturen bei 12000 g für 30 min zentrifugiert und die gewonnenen Überstände steril filtriert.

Eine 96-Well Zellkulturplatte wurde, unter Auslassung der äußeren Reihen A und H zur Vermeidung von Randeffekten, mit Zellkulturmedium beschickt (100µl/Well) und in den Spalten 1-10 eine log-2 Verdünnungsreihe der Proben im Doppelansatz angelegt. In die Reihen 11 und 12 wurde keine Probe gegeben, wodurch sie als Zellkontrolle verwendet werden konnten. Anschließend wurden 100 µl Zellsuspension mit einer Zellzahl von 5000 Zellen pro Well zugegeben und

die Zellkulturplatte bei 37°C und 7 % CO₂ inkubiert. Nach der 24- bzw. 48-stündigen Inkubation wurde zuerst die Morphologie der Zellen mikroskopisch beurteilt und dann ihre Vitalität anhand der Stoffwechselaktivität mittels WST-1 Reagenz bestimmt. Dazu wurden 100 µl Medium pro Well abgenommen und je 10 µl WST-1 Reagenz zugegeben. Mitochondriale Enzyme stoffwechselaktiver Zellen reduzieren das Tetrazoliumsalz (WST) zu Formazan, welches durch einen Farbumschlag von rosa nach orange sichtbar wird. Die Intensität kann quantitativ bei 450 nm in einem Spektralphotometer gemessen werden. Als Zytotoxizitätstiter wird diejenige Verdünnungsstufe der Präparationen definiert, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer 50 %igen Reduktion der Stoffwechselaktivität der Zellen führt.

2.8. Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *Cronobacter* spp. im Gentamycinassay

Das Kolonisationsvermögen verschiedener *Cronobacter*-Stämme in Caco-2 Zellen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Gentamycinassays (*Gentamycin Protection Assay*) untersucht (Jones *et al.*, 1994). Aufgrund seiner Variabilität ist es möglich, verschiedene Stadien der *Cronobacter*-Kolonisation wie Adhäsion, Invasion sowie auch intrazelluläre Proliferation zu analysieren.

2.8.1. Untersuchung der Invasion und intrazellulären Proliferation von *Cronobacter* spp. in Caco-2 Zellen

- 17–20 h vor der Infektion 4 x 10⁵ Caco-2 Zellen/Well in 1 ml Kompletmedium in 24-Well-Platten aussäen
- direkt vor der Infektion die Infektionslösung in FCS-freiem Medium mit MOI = 100 ansetzen
- Medium von den Zellen abnehmen und mit 1 ml/Well PBS waschen
- 500 µl/Well an Infektionslösung auf die Zellen geben
- 90 min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren
- Infektionslösung abnehmen, 2 x mit je 1 ml/Well PBS waschen
- um die extrazellulären Bakterien (*post infectionem*) abzutöten, 500 µl/Well Kompletmedium mit Gentamycin (100µg/ml) zugeben

- zur Ermittlung der Invasion 60 min und der intrazellulären Proliferation 5,5 h im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren
- Medium abnehmen und 2x mit 1 ml/Well PBS waschen
- zum Lysieren der Zellen 1 ml/Well an 0,1 % TritonX-100 zugeben
- 10 min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren
- durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Zellen lysieren, Lysat in ein Eppendorfgefäß überführen
- Lysat 30 sec vortexen, um alle eukaryotischen Zellen zu lysieren
- Verdünnungsreihe ansetzen und auf LB-Platten ausplattieren
- CFU/ml nach 20 h bestimmen
- weitere Messwerte zu anderen Zeitpunkten werden auf die gleiche Weise genommen

Zur Ermittlung der Invasionsrate wurde die CFU/ml der aus den Caco-2 Zellen isolierten Bakterien durch die CFU/ml der Infektionslösung geteilt:

$$\text{Invasionsrate: } \frac{\text{CFU/ml Invasion}}{\text{CFU/ml Infektionslösung}}$$

Zur Ermittlung der Proliferationsrate wurde die CFU/ml der nach 7 h aus den Caco-2 Zellen isolierten Bakterien durch die CFU/ml nach 2,5 h geteilt:

$$\text{Proliferationsrate: } \frac{\text{CFU/ml Proliferation}}{\text{CFU/ml Invasion}}$$

2.8.2. Modifizierte Invasionsassays

2.8.2.1. Invasionsassay mit Cytochalasin D

Um den Einfluss des Aktinpolymerisations-Inhibitors Cytochalasin D auf die Invasion von *Cronobacter* spp. zu untersuchen, wurden die Caco-2 Zellen vor der Infektion für 1 h mit 2 µM Cytochalasin D/Well vorinkubiert und anschließend ein Gentamycinassay, wie unter 2.8.1 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden sowohl der Infektionslösung als auch dem Medium mit Gentamycin (100 µg/ml) Cytochalasin D in einer Konzentration von 2 µM/Well hinzugefügt.

2.8.2.2. Invasionsassay mit monoklonalem Antikörper 2G4

Um den Einfluss des gegen *Ctu* 3032 gerichteten, monoklonalen IgG-Antikörpers 2G4 (mAk 2G4) auf das Invasionsvermögen dieses *Cronobacter*-Stammes zu untersuchen, wurde sowohl der Infektionslösung als auch dem Medium mit Gentamycin (100 µg/ml) mAk 2G4 in einer Konzentration von 1, 10 und 20 µg/ml hinzugefügt. Als Kontrolle wurde ein monoklonaler *Bacillus cereus*-IgG-Antikörper (mAk 2A12) in einer Konzentration von 10 µg/ml sowie ein Ansatz ohne Antikörper verwendet.

2.8.3. Untersuchung der Adhäsion von *Cronobacter*-Stämmen an eukaryotischen Zellen

Das Adhäsionsvermögen der *Cronobacter*-Stämme wurde bereits 30 min nach Zugabe der Infektionslösung bestimmt, um so die Anzahl der intrazellulären Bakterien gering zu halten. Im Unterschied zur Bestimmung der Invasion und Proliferation erfolgte hier keine Behandlung mit Gentamycin-haltigem Medium. Nach der verkürzten Infektionszeit wurden die Caco-2 Zellen lediglich, wie unter 2.8.1 beschrieben, gewaschen, mit Triton X-100 lysiert und anschließend die Adhäsionsrate bestimmt.

Zur Ermittlung der Adhäsionsrate wurde die CFU/ml der an den Caco-2 Zellen adhären Bakterien durch die CFU/ml in der entsprechenden Infektionslösung geteilt.

$$\text{Adhäsionsrate: } \frac{\text{CFU/ml Adhäsion}}{\text{CFU/ml Infektionslösung}}$$

2.9. Proteinanalytische Methoden

2.9.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten aus mit *Cronobacter* spp. infizierten eukaryotischen Zellen

- 17–20 h vor der Infektion 1×10^6 Caco-2 Zellen/Well in 2 ml Kompletmedium in 6-Well-Platten aussäen
- direkt vor der Infektion die Infektionslösung in FCS-freiem Medium mit

MOI = 100 ansetzen

- Medium von den Zellen abnehmen und mit 2 ml/Well PBS waschen
- 1 ml/Well an Infektionslösung auf die Zellen geben
- 90 min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren
- Infektionslösung abnehmen, 2 x mit je 2 ml/Well PBS waschen
- um die extrazellulären Bakterien (*post infectionem*) abzutöten, 1 ml/Well Kompletmedium mit Gentamycin (100µg/ml) zugeben
- 60 min im Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 7 % CO₂ inkubieren
- alle weiteren Schritte auf Eis bzw. mit eisgekühlten Lösungen durchführen
- Medium abnehmen und 2x mit je 2 ml/Well PBS waschen
- 300 µl Lysepuffer/Well zugeben
- 6-Well-Platten für 5 min auf Eis inkubieren
- Zellen durch mechanisches Abkratzen ablösen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- 30 sec vortexen, um restliche eukaryotische Zellen zu lysieren
- Proben für 10 min auf Eis ins Ultraschallbad stellen
- 30 sec vortexen und 10 min bei 14000 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und nach Proteinkonzentrationsbestimmung für SDS-PAGE einsetzen oder bei -20°C lagern
- SDS-PAGE-Proben (100 µl):

Überstand	70 µl
XT Sample Buffer (4x)	25 µl
XT Reducing Agent (20x)	5 µl
- Proben für 5 min bei 100°C kochen, anschließend bei -80 oder -20°C lagern.

2.9.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford

Die Proteinproben wurden vor der Messung im Verhältnis 1:3 mit A. dest. verdünnt und 10 µl dieser Verdünnung für die Messung eingesetzt. Dafür wurden 500 µl des auf Raumtemperatur vorgewärmten Bradford-Reagenz mit 10 µl Probe gemischt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz dienten 500 ml Bradford-Reagenz

mit 10 µl A. dest.. Anhand einer vorher erstellten Eichgeraden mit BSA wurde die Proteinmenge ermittelt.

2.9.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die SDS-Bindung an die hydrophoben Bereiche der Proteine wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und stattdessen eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht der Proteine generiert. Das Mercaptoethanol im Reducing Agent und das Kochen der Proben führen durch die Lösung der Disulfid- und Wasserstoffbrücken zu einer Linearisierung der Proteine. Dies ermöglicht eine Auftrennung nach der Kettenlänge und proportional zur Molekülmasse. Die Prozentigkeit des Gels richtet sich nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Für den Nachweis von MAPK und iNOS wurden 12 %ige Criterion XT Bis-Tris Gele verwendet.

- Criterion XT Bis-Tris Gel in die mit MOPS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer einspannen und Luftblasen entfernen
- Kamm herausziehen und die Taschen mit Laufpuffer ausspülen
- Proteinproben und Eichprotein auftragen
- Auftrennung bei 200 V und 87 mA für 50 min

2.9.4. Western-Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert.

- das Trenngel mit aufgetrennten Proteinen in Anodenpuffer I legen
- zwei mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere auf der als Anode dienenden Platte blasenfrei ausrollen
- ein mit Anodenpuffer II getränktes Filterpapier passend darauf platzieren
- PVDF-Membran für 10 sec in 100 %igem Methanol inkubieren, für 1 min in A. dest. waschen und anschließend 5 min im Kathodenpuffer äquilibrieren
- Membran passend und blasenfrei auf die Filterpapiere legen
- darüber das Gel auflegen

- abschließend drei mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere auflegen, Luftblasen entfernen und Kathodenplatte aufsetzen
- Transfer der Proteine auf PVDF-Membran für 1h bei 86 mA (1mA/cm² Gel) und 200 V
- nach dem Blotten die Membran in A. dest. auf die gewünschte Größe zuschneiden und für 1 h mit Blockierungspuffer absättigen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren

2.9.5. Immunologischer Nachweis

- den 1. Antikörper in filtriertem TBS-T mit 3 % Magermilch verdünnen (je nach Antikörper 1:1000 – 1:4000)
- Membran ü/N bei 4°C mit dem 1. Antikörper inkubieren
- Membran dreimal 10 min bei RT unter Schwenken mit TBS-T waschen
- den 2. Antikörper 1:1000 in filtriertem TBS-T mit 3 % Magermilch verdünnen, auf die Membran geben und 1 h bei RT inkubieren
- 2x 5 min mit TBS-T bei RT waschen
- 2x 5 min mit TBS bei RT waschen
- Membran mit Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal West Femto Sensitivity Substrat, Thermo Scientific) versetzen und 10 min im Dunkeln inkubieren
- Chemilumineszenzsignal für 5 min mittels Imager erfassen

2.10. Immunfluoreszenz

Die Caco-2 Zellen wurden 17-20 h vor der Infektion mit *Cronobacter* spp. in einer Konzentration von 6×10^4 Zellen/Kammer in 300 µl Kompletmedium in Chamber Slides ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Gentamycinassay mit einer Gesamtdauer von 2,5 h, wie in 2.8.1. beschrieben, durchgeführt und die Zellen, nach Entfernung des Gentamycin-haltigen Mediums und dreimaligem Waschen mit PBS, mit eiskaltem Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die fixierten Zellen mittels 0,5 %igem TritonX-100 permeabilisiert und für 40 min in 5 %igem, hitzeinaktiviertem Ziegen-Serum in BSA-PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Zugabe des in 1 %igem BSA-PBS verdünnten mAk

2G4. Nach 1-stündiger Inkubationszeit wurde das Slide dreimal gewaschen, mit dem 2. fluoreszenzmarkierten Antikörper beschickt (2 µg in je 150 µl BSA-PBS pro Well) und nochmals 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Kammer abgenommen, das Slide für kurze Zeit in PBS gelegt und anschließend luftgetrocknet. Zum Schluß erfolgte das Eindecken und die Kernfärbung mittels ProLong Gold antifade mit DAPI. Nachdem der Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln vollständig getrocknet war, wurden am Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen gemacht und ausgewertet.

IV. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung ausgewählter *Cronobacter*-Stämme

Um die Infektionsmechanismen von *Cronobacter* spp. näher charakterisieren zu können sowie Unterschiede innerhalb der Spezies *C. sakazakii* aufzudecken, wurden 14 *Cronobacter* spp. Stämme aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München und des Instituts für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich ausgewählt (siehe Tab. 2). Dabei handelte es sich um sieben klinische/humane Isolate und um sechs Lebensmittelisolate. Der zunächst als *C. sakazakii* klassifizierte Stamm MHI 968, dessen Herkunft nicht bekannt ist, konnte im Laufe dieser Arbeit als *Enterobacter asburiae* identifiziert werden und wurde nicht in die Auswertung mit einbezogen bzw. diente als zusätzlicher Kontrollstamm. Unter den sieben klinischen Isolaten war neben sechs *Cronobacter sakazakii* auch ein *Cronobacter turicensis* (Ctu 3032) vertreten.

1.1. Untersuchungen der Invasivität in Caco-2 Zellen

Um zu eruieren, ob alle 13 vorliegenden *Cronobacter*-Stämme in der Lage sind, in humane Darmepithelien zu invadieren, wurden Caco-2 Zellen als Modellsystem genutzt. Das Invasionsverhalten der Bakterien in Caco-2 Zellen wurde mittels Gentamycinassay geprüft und mit dem des nicht-invasiven *E. coli* Stammes K12 und des invasiven *E. asburiae* Isolats MHI 968 verglichen. Hierzu wurden die Caco-2 Zellen mit den Bakterienstämmen infiziert, 2,5 h *post infectionem* aus den eukaryotischen Zellen isoliert, der Bakterientiter durch Anlegen von Verdünnungsreihen und Ausplattieren auf LB-Medium bestimmt und die Invasionsrate errechnet. Die Ergebnisse lieferten eine große Variationsbreite bezüglich der Invasionseffizienz der Stämme, weshalb die Daten zur besseren Übersicht in vier Kategorien eingeordnet wurden:

1. +++ = stark invasiv (>0,2 %)
2. ++ = mäßig invasiv (0,1 % - 0,2 %)
3. + = schwach invasiv (0,01 % - 0,1 %)
4. - = nicht invasiv (<0,01 %).

Die Zuordnung der Stämme in die jeweilige Kategorie ist in Tabelle 7 dargestellt. Der Stamm *Csa* 824 konnte, mit einer Invasivitätsrate von nur 0,0005 %, als einziger der untersuchten *Cronobacter*-Stämme als nicht invasiv identifiziert werden. Alle anderen untersuchten *Cronobacter*-Stämme zeigten eine unterschiedlich starke Invasivität, die in Abbildung 2 dargestellt ist.

Tabelle 7: Einordnung der 13 untersuchten *Cronobacter*-Stämme sowie der als Kontrollen dienenden *E. coli* K12- und *E. asburiae* 968-Stämme bezüglich ihrer Invasivität in Caco-2 Zellen.

Stämme	Invasivitätskategorie	Invasionsrate
968	+++	0,37 %
ES5	+++	0,32 %
978	+++	0,27 %
21001	++	0,18 %
604	++	0,17 %
821	++	0,14 %
823	++	0,14 %
793	++	0,09 %
977	+	0,08 %
21002	+	0,06 %
3032	+	0,05 %
789	+	0,04 %
979	+	0,04 %
824	-	0,0005 %
K12	-	0,0016 %

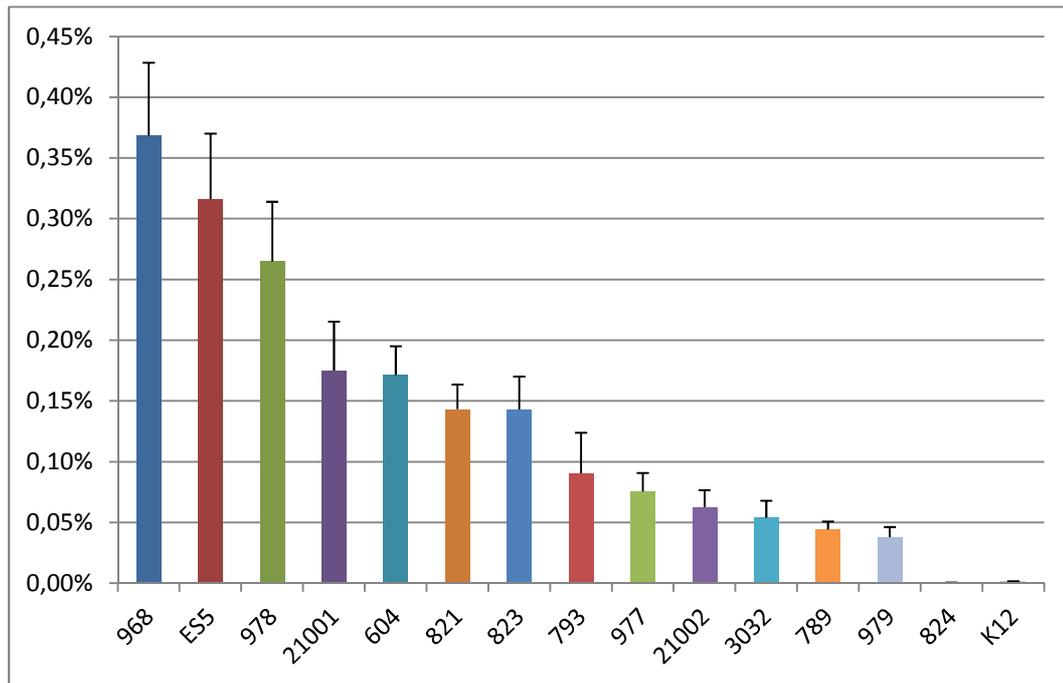


Abbildung 2: Prozentuale Darstellung der Invasivität in Caco-2 Zellen von 13 untersuchten *Cronobacter*-Stämmen sowie den als Kontrollen dienenden *E. coli* K12- und *E. asburiae* 968-Stämmen.

1.2. Detektion der Pathogenitätsdeterminante *ompA*

Da *OmpA* von Kim *et al.* (2010) und Mohan Nair und Venkitanarayanan (2007) als essentiell wichtig für die Invasion in INT407 Zellen beschrieben wurde, wurde das Vorhandensein des *ompA*-Gens durch PCR in allen dreizehn *Cronobacter*-Stämmen sowie dem als Negativkontrolle dienenden *E. asburiae*-Stamm MHI 968 überprüft. Bei Anwesenheit des *ompA*-Gens sollte es ein PCR-Produkt mit einer Größe von 469 bp geben. Das Resultat der PCR ist in Abbildung 3 dargestellt und bestätigt das Vorhandensein von *ompA* in allen getesteten *Cronobacter*-Stämmen, inklusive des nicht-invasiven *Csa* 824.

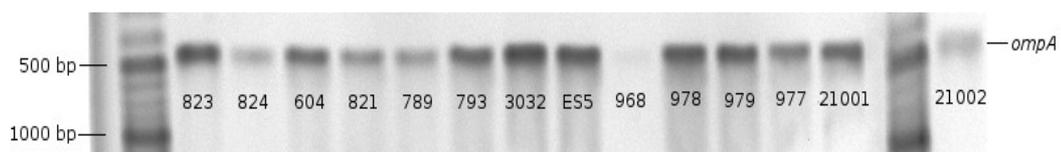


Abbildung 3: Nachweis von *ompA* in *Cronobacter*-Stämmen mittels PCR. Als Negativkontrolle diente der *E. asburiae*-Stamm 968.

1.3. Nachweis der Enterotoxinbildung

Laut Raghav und Aggarwal (2007) und Pagotto *et al.* (2003) sind einige *Cronobacter*-Isolate in der Lage, Enterotoxine zu produzieren. Mittels Zytotoxizitätstest wurden die 13 Stämme auf die Bildung von Enterotoxinen untersucht. Hierfür wurden zwei verschiedene Anzuchtansätze für die Bakterienkulturen und Probenaufbereitung verwendet und die dabei gewonnenen, steril filtrierte Überstände im Zytotoxizitätstest an IPEC-J2 Zellen getestet. Als Positivkontrolle diente der Kulturüberstand von *B. cereus* (NVH0075/95) und als Negativkontrolle wurde das jeweils zur Anzucht verwendete Kulturmedium eingesetzt. Da nach 24 h im Vergleich zur Negativkontrolle keinerlei morphologische Veränderungen bzw. Zellschädigungen erkennbar waren, wurde die Inkubationszeit um weitere 24 h verlängert. Auch nach 48 h konnten keine Unterschiede in der Zellmorphologie im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. Die Bestimmung der Zellvitalität anhand der Stoffwechselaktivität mittels WST-1 Reagenz ergab ebenfalls ein negatives Ergebnis: Es konnte bei keinem der durchgeführten Versuche Zytotoxizität in den 13 untersuchten *Cronobacter*-Stämmen nachgewiesen werden.

1.4. Detektion der MAPK in Caco-2 Zellen

Um die Beteiligung phosphorylierter MAPK an der Zellantwort mit *Cronobacter*-infizierter Caco-2 Zellen zu untersuchen, wurden Zellysate mittels Immunoblot und Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von ERK, p38 und JNK analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass alle untersuchten Stämme, mit Ausnahme des *C. sakazakii* 824 (*Csa* 824), in Caco-2 Zellen zu einer Aktivierung aller drei MAPK führten (Abb. 4). Für *C. sakazakii* 823 (*Csa* 823) wurde Polymyxin B (PB) als zusätzliche Antibiotika-Variante verwendet. Auch hier zeigte sich eine Aktivierung aller drei MAPK und somit kein Unterschied zur Behandlung mit Gentamycin. Auch eine mit LPS (1 µg/ml) behandelte Kontrolle wurde mitgeführt, um den Anteil von LPS an der MAPK-Aktivierung zu ermitteln.

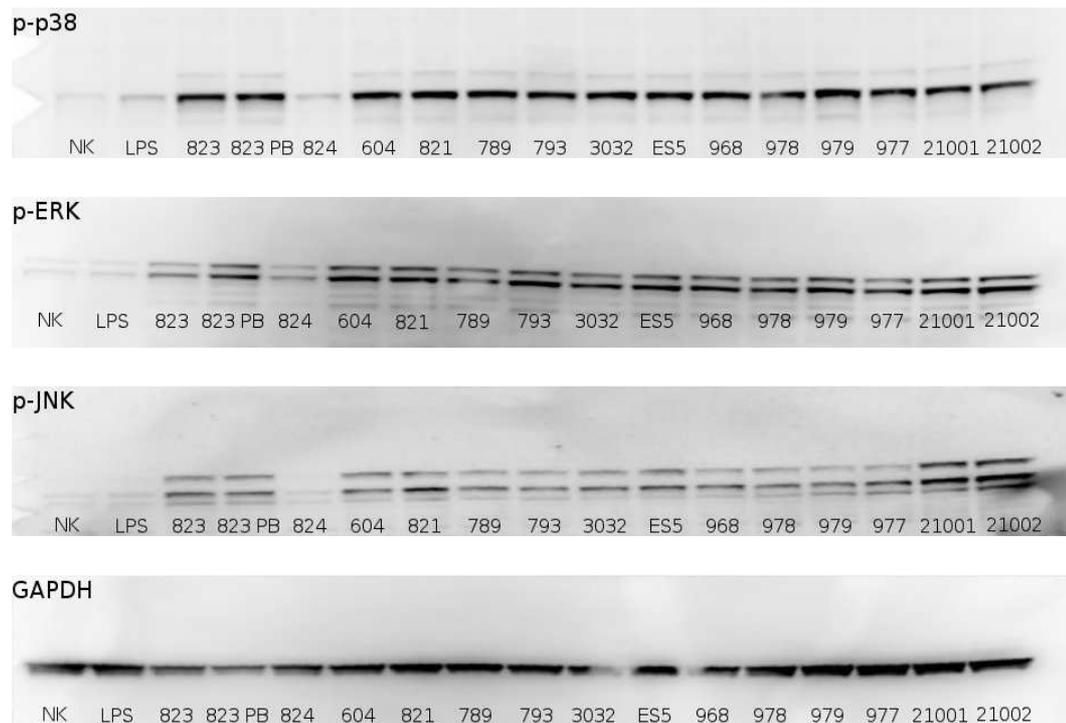


Abbildung 4: Western Blots zum Nachweis der Induktion der MAPK in Caco-2 Zellen durch 13 *Cronobacter*-Stämme sowie den *E. asburiae*-Stamm 968 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

2. Physiologische und biochemische Analyse der *Cronobacter*-Stämme *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032

Basierend auf der Untersuchung der 13 *Cronobacter*-Isolate bezüglich ihrer Wirkung auf den MAPK-Weg, ihrer Invasionsfähigkeit, ihrer Zytotoxizität und der Ergebnisse der *ompA*-PCR, wurden drei Stämme zur weitergehenden Untersuchung und Charakterisierung ausgewählt:

- *C. sakazakii* 823 (*Csa* 823)
- *C. sakazakii* 824 (*Csa* 824)
- *C. turicensis* 3032 (*Ctu* 3032).

Alle drei Stämme sind humane/klinische Isolate, die zum Teil bereits in der Literatur beschrieben wurden. Während *Csa* 824 in der Literatur lediglich kurz thematisiert wird (Farmer *et al.*, 1980; Iversen *et al.*, 2006; Joseph & Forsythe, 2011), sind sowohl *Csa* 823 (Kucerova *et al.*, 2010) als auch *Ctu* 3032 (Stephan *et*

al., 2011) bereits vollständig sequenziert und näher charakterisiert worden. *Csa* 824 bot sich aufgrund seiner von den anderen Isolaten deutlich abweichenden Eigenschaften bezüglich der Invasivität und Induktion intrazellulärer Signalwege in Caco-2 Zellen für eine weitergehende Untersuchung an. Im Gegensatz zu *Csa* 824 präsentierten sich *Csa* 823 und *Ctu* 3032 sowohl als invasiv als auch als potente Aktivatoren der MAPK-Signalkaskade und stellten damit gute Vergleichsstämme zu *Csa* 824 dar. Der Stamm *Ctu* 3032 erwies sich zudem als besonders interessant, da parallel zu dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU im Rahmen einer Doktorarbeit von Ina Kleinsteuber ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen diesen Stamm entwickelt wurde.

2.1. Wachstum auf verschiedenen Nährmedien

PC-Agar

Plate-Count (PC)-Agar wird routinemäßig zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl aerober Bakterien eingesetzt. Der Nährboden ist weitgehend frei von Hemmstoffen und ermöglicht das Wachstum wenig bis mäßig anspruchsvoller Bakterien. Die drei Stämme wurden im 3-Ösen-Verfahren ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Alle drei Stämme zeigten nach 24 h die für *Cronobacter* spp. typischen, runden, glatten, glänzenden und gelb pigmentierten Kolonien. *Csa* 824 wies jedoch kleinere Kolonien auf als die beiden anderen Stämme (Abb. 5). Diese erreichten jedoch bei weiterer Bebrütung dieselbe Größe wie die Kolonien von *Csa* 823 und *Ctu* 3032. Die Verzögerung im Wachstum von *Csa* 824 könnte darauf zurückzuführen sein, dass diesem *Cronobacter*-Stamm eventuell einige Enzyme fehlen, wodurch bestimmte Stoffwechselwege unterbrochen sind und somit ein Teil der im Nährboden vorhandenen Substanzen nicht mehr verstoffwechselt werden kann. Um diese Hypothese zu bestätigen bzw. zu bekräftigen wurden die *Cronobacter*-Stämme auf weiteren, nährstoffreicheren sowie nährstoffärmeren, Medien auf ihr Wachstumsverhalten und ihre Morphologie hin untersucht.



Abbildung 5: Vergleich des Wachstums von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 auf PC-Agar. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

ESIA- Agar

ESIA-Agar (*Enterobacter sakazakii* isolation chromogenic agar) ist ein Selektivnährboden, der zum Nachweis von *Cronobacter sakazakii* in Milchpulver und Säuglingsnahrung (nach ISO 22964) eingesetzt wird. *Cronobacter* spp. bilden darauf typische, blau-grüne Kolonien aus, wie sie in Abb. 6 bei allen drei Stämmen zu sehen sind. Auch auf ESIA-Agar waren die Kolonien von *Csa* 824 deutlich kleiner als die der anderen Stämme, wiesen aber sonst keine anderen morphologischen Unterschiede auf.

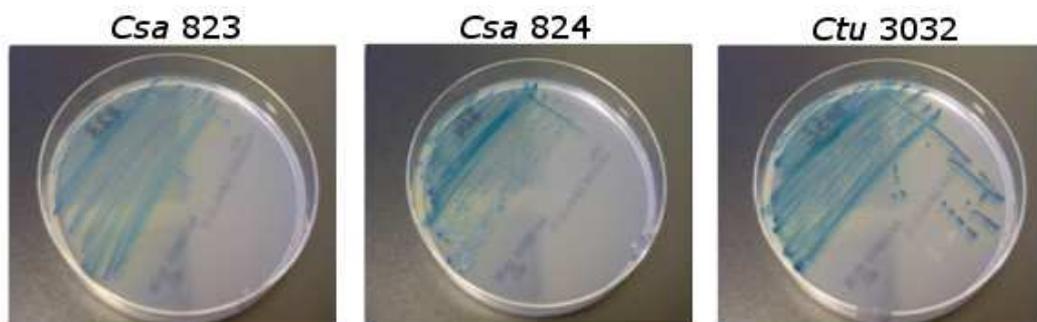


Abbildung 6: Vergleich des Wachstums von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 auf ESIA-Agar. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

Standard II-Agar

Bei Standard II-Agar handelt es sich um ein zuckerfreies Medium für anspruchslose Bakterien. Auch auf diesem Nährboden zeigten die drei *Cronobacter*-Stämme ihr typisches Wachstum mit runden, glatten, glänzenden, leicht gelblichen Kolonien (Abb. 7). Im Unterschied zu den Ergebnissen auf PC- und ESIA-Agar war hier kein wesentlicher Unterschied in den Koloniegrößen der Stämme erkennbar.

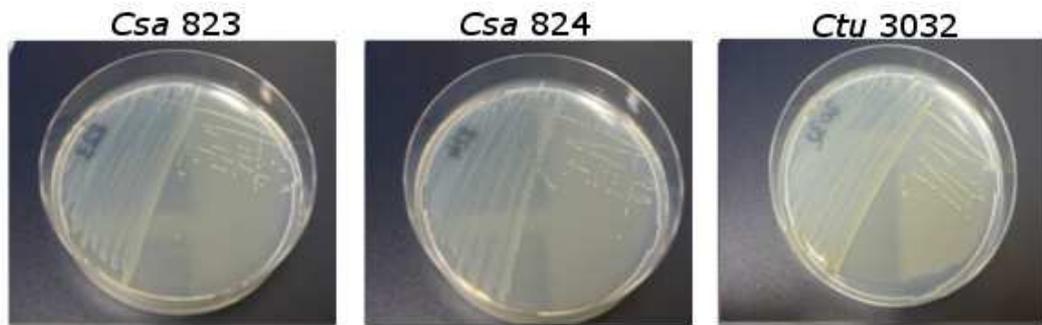


Abbildung 7: Vergleich des Wachstums von *Csa 823*, *Csa 824* und *Ctu 3032* auf Standard II-Agar. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

LB-Flüssigmedium

LB-Medium ist ein nährstoffreiches Medium, welches insbesondere zur Kultivierung von *Enterobacteriaceae* eingesetzt wird. Dieses Medium wurde gewählt, um den zeitlichen Wachstumsverlauf der drei *Cronobacter*-Stämme über einen Zeitraum von 24 h zu untersuchen. Dabei ergab sich folgendes Wachstumsverhalten (Abb. 8):

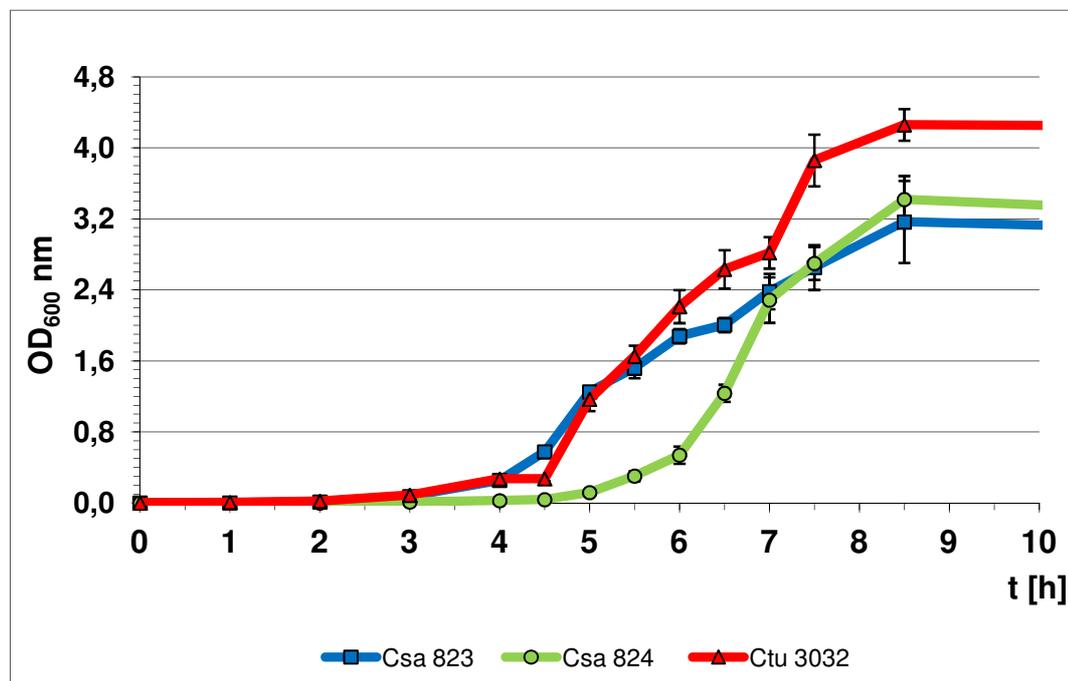


Abbildung 8: Wachstumsverhalten von *Csa 823*, *Csa 824* und *Ctu 3032* in LB-Medium. Die dargestellten Werte stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

Betrachtet wurde die Adaptationsphase der drei Stämme unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Während sich die *Csa 823*- und *Ctu 3032*-

Wachstumskurven annähernd gleich verhielten und nach ca. 4 - 4,5-stündigen lag-Phasen in die log-Phasen und damit ins exponentielle Wachstum übergingen, wies *Csa* 824 eine längere lag-Phase, etwa 5,5 h, auf. *Csa* 824 brauchte dementsprechend wesentlich mehr Zeit als die beiden anderen Stämme, um sich an die geänderten Wachstumsbedingungen anzupassen. In der logarithmischen Wachstumsphase verhielt sich *Csa* 824 wie die beiden anderen Stämme und zeigte auch nahezu keinen Unterschied in der Wachstumsrate, indem der *Csa* 824-Stamm die gleiche maximale optische Dichte von 3,42 wie der Vergleichsstamm *Csa* 823 ($OD_{600}=3,17$) erreichte. Auch zwischen den beiden *Cronobacter*-Arten ließ sich ein Unterschied beobachten. *Ctu* 3032 wies ein wesentlich stärkeres Wachstum auf als die beiden *Csa*-Stämme und erreichte nach 8,5 h die optische Dichte von 4,29. Nach dem Erreichen der stationären Phase nach 8,5 h verblieben alle drei Stämme für ca. 8-9 h darin, bevor sie in die Absterbephase übergingen. Nach 24 h sank die OD_{600} bei *Ctu* 3032 auf 4,17 und bei *Csa* 823 und *Csa* 824 auf 2,77 (Daten nicht gezeigt).

2.2. Biochemische Charakterisierung der Stoffwechselaktivität

Die auf PC-Agar angezogenen *Cronobacter*-Stämme wurden mittels Enterotube und Api 20 biochemisch differenziert (Tab. 8 und 9). Alle Stämme zeigten in diesen kommerziellen Testkits ein für *Cronobacter* spp. typisches Verhalten. Zusammen mit dem durchgeführten Zusatztest auf gelbe Pigmentierung auf PC-Agar-Platten ergaben sich Identifizierungswahrscheinlichkeiten zwischen 98 % und 98,4 %.

2.2.1. Enterotube

Im Enterotube zeigten *Csa* 823 und *Csa* 824 ein ähnliches Reaktionsmuster. Unterschiede gab es nur in der Verstoffwechslung von Sorbitol, welche bei *Csa* 824 eher positiv war als bei *Csa* 823. Der Biocode von *Ctu* 3032 identifizierte das Isolat als *E. sakazakii* mit atypischem Verhalten bei Dulcitol. *C. turicensis* kann mithilfe des Enterotubes nicht nachgewiesen werden, da kein Biocode für diese Spezies hinterlegt ist. Die Ergebnisse des Enterotubes sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnisse des Enterotubes für *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032.

	Glucose/ Gas	Lysine	Ornithine	H ₂ S/ Indole	Adonitol	Lactose	Arabinose	Sorbitol	VP	Dulcitol/ Phenylalanine	Harnstoff	Citrate
823	++	-	+	--	-	+	+	- ?	+	--	-	+
824	++	-	+	--	-	+	+	- ?	+	--	-	+
3032	++	-	+	--	-	+	+	+/-	+	+/-	-	+

2.2.2. Api 20

Zur Absicherung und Überprüfung des Enterotubes wurde parallel ein Api 20-Test durchgeführt. Für alle drei *Cronobacter*-Stämme wurde bei der Auswertung der positive Zusatztest auf gelb pigmentierte Kolonien berücksichtigt. Die Auswertung von *Csa* 823 ergab *E. sakazakii* mit einer Identifizierungswahrscheinlichkeit von 98 %, mit widersprüchlichem Inositol-Test. *Csa* 824 wurde ebenfalls mit 98 % Wahrscheinlichkeit als *E. sakazakii* identifiziert, trotz widersprüchlichem Test auf die Verstoffwechslung von Sorbitol. Auch der *C. turicensis*-Stamm 3032 wurde mit 98 % Wahrscheinlichkeit als *E. sakazakii*, mit widersprüchlichem Lysin-Decarboxylase-Test, erkannt, was allerdings, ebenso wie beim Enterotube, auf eine fehlende Berücksichtigung dieser Spezies in den Auswertungstabellen zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Api 20-Tests sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse des Api 20 für *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN
823	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
824	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
3032	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+

	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
823	-	-	+	+	+	+	+	-
824	+	+	+	+	+	+	+	-
3032	+	-	+	+	+	+	+	-

3. Phänotypische Analyse der ausgewählten *Cronobacter*-Stämme im Zellkultursystem

Um zusätzliche Informationen über den Infektionsverlauf zu erhalten, wurden die in 1.1. beschriebenen Invasionsversuche mit den drei Stämmen *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 in ausdifferenzierten (polarisierten), 17-20 Tage alten Caco-2 Zellen wiederholt und mit den vorherigen Ergebnissen verglichen. Desweiteren wurde das Adhäsionsvermögen aller drei Stämme, sowie die intrazelluläre Überlebens- bzw. Vermehrungsfähigkeit der beiden invasiven Stämme *Csa* 823 und *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen analysiert. Auch hier wurden die nötigen Gentamycinassays sowohl mit einem Tag alten, nicht ausdifferenzierten (nicht polarisierten) Zellen als auch mit 17-20 Tage alten, ausdifferenzierten (polarisierten) Caco-2 Zellen durchgeführt, um potentielle Unterschiede zu detektieren. Die dargestellten Daten wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchen bestätigt.

3.1. Adhäsion: Untersuchung der frühen Assoziation von *Cronobacter*-Stämmen mit Caco-2 Zellen

Die Untersuchung der 13 *Cronobacter*-Stämme konnte bereits zeigen, dass deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen bezüglich ihrer Invasivität in Caco-2 Zellen bestehen (siehe 1.1.). Es stellte sich die Frage, ob diese Unterschiede in der Intensität des Invasionsvermögens im Zusammenhang mit einer verminderten Adhäsion stehen. Aus diesem Grund wurden die drei ausgewählten *Cronobacter*-Stämme auf ihr Adhäsionsvermögen in Caco-2 Zellen hin geprüft. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, zeigte der Wildtypstamm *Csa* 823 in nicht ausdifferenzierten Zellen mit einer Adhäsionsrate von 1,8 % ein wesentlich größeres Anheftungsvermögen als *Ctu* 3032 mit 0,8 % und *Csa* 824 mit 0,6 %. In ausdifferenzierten Zellen waren die Adhäsionsraten aller drei Stämme deutlich niedriger und die Unterschiede zwischen den Stämmen weniger ausgeprägt. Hier betrug die Adhäsionsrate von *Ctu* 823 0,53 % gegenüber 0,41 % bei *Ctu* 3032 und 0,42 % bei *Csa* 824 (Abb. 9). Der *E. coli* K12, welcher in den Invasionsversuchen als Negativkontrolle diente, wurde auch hier mitgeführt und zeigte Anheftungsraten von 0,59 % in nicht ausdifferenzierten Zellen und 0,25 % in ausdifferenzierten Zellen.

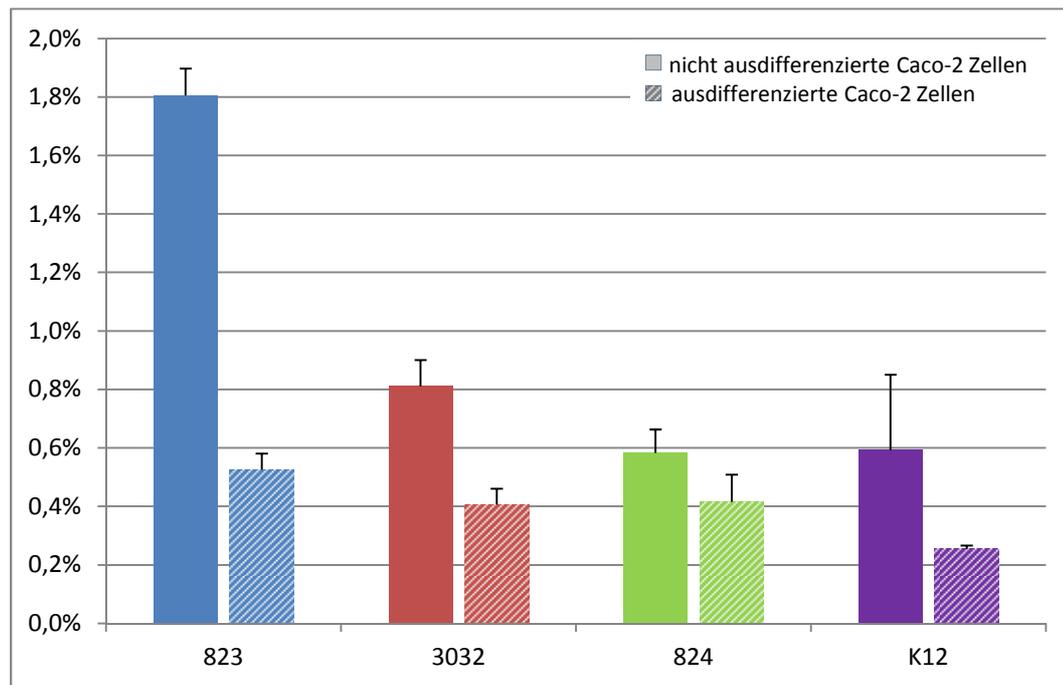


Abbildung 9: Adhäsionsverhalten von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2. Invasion: Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit von Caco-2 Zellen durch *Cronobacter* spp.

Die Kolonisationsfähigkeit von pathogenen Bakterien ist ein entscheidender Virulenzfaktor und eine wichtige Voraussetzung für die im Spätstadium der Infektion auftretende Symptomausbildung. Bezüglich der Invasion ließen sich *Csa* 823 und *Ctu* 3032 in nicht ausdifferenzierten Zellen, wie schon in 1.1. beschrieben, deutlich von *Csa* 824 abgrenzen. Während *Csa* 823 und *Ctu* 3032 mit Invasionsraten von 0,14 % und 0,05 % in nicht ausdifferenzierten bzw. 0,07 % und 0,02 % in ausdifferenzierten Zellen im Vergleich zum nicht-invasiven Kontrollstamm *E. coli* K12 als invasiv charakterisiert werden konnten, war *Csa* 824 mit Invasionswerten von 0,0005 % (nicht ausdifferenzierte Zellen) bzw. 0,00002 % (ausdifferenzierte Zellen) eindeutig als nicht invasiv einzustufen. Im direkten Vergleich von *Csa* 823 mit *Ctu* 3032 präsentierte sich der *C. sakazakii*-Stamm als wesentlich invasiver als der *C. turicensis*-Stamm (Abb. 10). Ebenso wie die Adhäsionsrate (siehe 3.1) fiel auch die Invasionsrate in ausdifferenzierten Zellen deutlich niedriger aus als in nicht ausdifferenzierten Zellen.

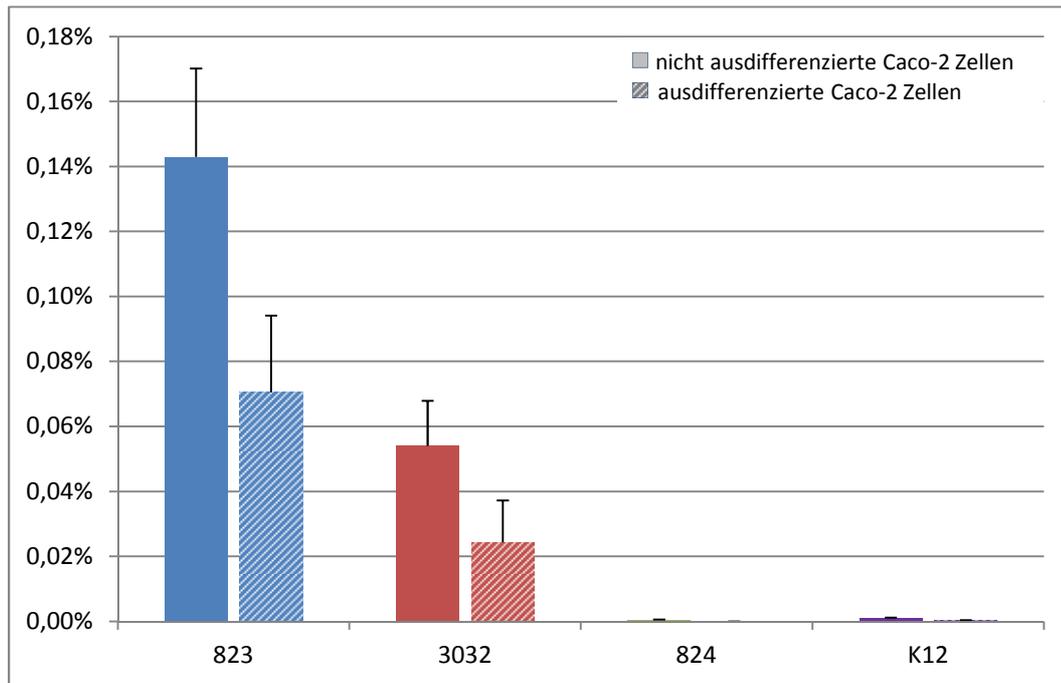


Abbildung 10: Invasionsverhalten von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.3. Proliferation: Untersuchung der *Cronobacter*-Stämme auf intrazelluläre Vermehrung in Caco-2 Zellen

Die Analyse der intrazellulären Überlebens- bzw. Vermehrungsfähigkeit der beiden invasiven *Cronobacter*-Stämme *Csa* 823 und *Ctu* 3032 zeigte, dass keiner der Stämme in der Lage war, seine Bakterienzahl intrazellulär zu erhöhen. Während beim *C. sakazakii*-Stamm *Csa* 823 die absolute Bakterienzahl über den Zeitraum von 7 h intrazellulär nahezu konstant blieb, war beim *C. turicensis* 3032 eine deutliche Reduzierung der intrazellulären Bakterienanzahl nach 7 h erkennbar (Abb. 11). Zwischen ausdifferenzierten und nicht ausdifferenzierten Zellen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Proliferationsraten lagen für *Csa* 823 bei 89,1 % (nicht ausdifferenzierte Zellen) bzw. 90,0 % (ausdifferenzierte Zellen) und für *Ctu* 3032 bei 58,9 % (nicht ausdifferenzierte Zellen) und 34,0 % (ausdifferenzierte Zellen).

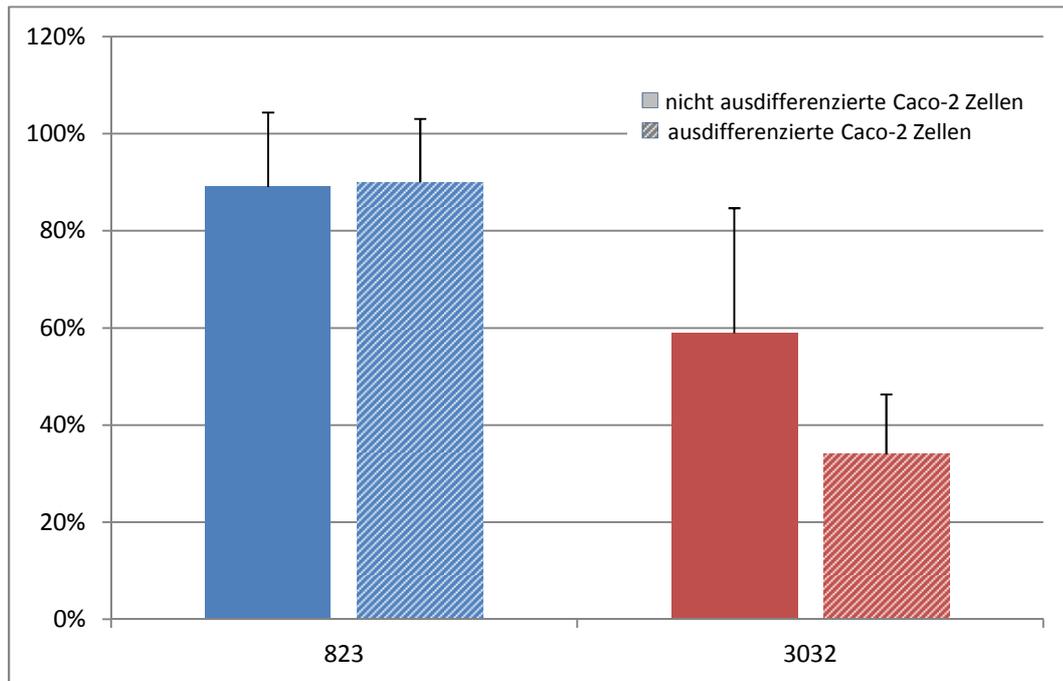


Abbildung 11: Proliferationsverhalten von *Csa* 823 und *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4. Proliferation: Untersuchung der *Cronobacter*-Stämme auf intrazelluläre Vermehrung in Raw 264.7 Zellen

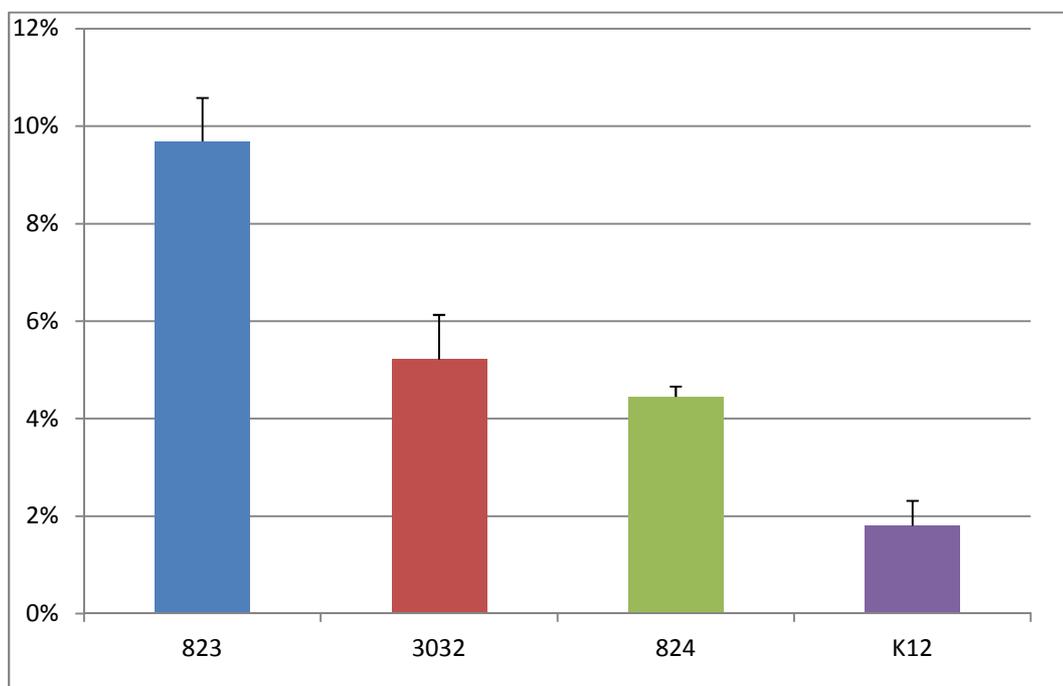


Abbildung 12: Intrazelluläre Vermehrung von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Raw 264.7 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Neben der Analyse des Infektionsverlaufs in Caco-2 Zellen wurde auch die Überlebensfähigkeit der *Cronobacter*-Stämme in immunkompetenten, professionell phagozytischen Zellen untersucht. Hierzu wurden, wie auch bei den Versuchen zur intrazellulären Signaltransduktion, Raw 264.7 Zellen verwendet und der Bakterientiter nach 2,5 h bestimmt.

Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, war die intrazelluläre Vermehrung bei *Csa* 824 mit 4,5 % und *Ctu* 3032 mit 5,2 % deutlich geringer als bei *Csa* 823 mit 9,7 %. Sie lag jedoch bei allen drei *Cronobacter*-Stämmen höher als bei der Negativkontrolle *E. coli* K12 mit einem intrazellulären Bakterientiter von 1,8 %.

3.5. Einfluss von Cytochalasin D auf die Invasivität der *Cronobacter*-Stämme in Caco-2 Zellen

Für die Kontaktaufnahme des Pathogens mit einer Wirtszelle sind neben den allgemeinen und unspezifischen Wechselwirkungen vor allem spezifische Interaktionen zwischen bakteriellen und eukaryotischen Oberflächenmolekülen verantwortlich. Mit Hilfe verschiedener Hemmstoffe lässt sich die Oberflächenstruktur der Wirtszelle verändern und so die Interaktion mit dem Pathogen näher untersuchen. Die bisherigen Studien zur Invasion von *Cronobacter* spp. deuten darauf hin, dass *tight junctions* bei dieser Kontaktaufnahme eine wichtige Rolle spielen. Diese lassen sich in ihrer Funktion durch Cytochalasin D beeinflussen. Bei Cytochalasin D (CyD) handelt es sich um ein Mykotoxin, welches die Aktin-Polymerisation hemmt und zu einer erhöhten Durchlässigkeit der *tight junctions* eukaryotischer Zellen führt. Für die Invasionsversuche mit *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 wurde Cytochalasin D in einer Konzentration von 2 μ M eingesetzt. Da das Toxin in DMSO gelöst vorlag, dienten mit DMSO behandelte Zellen als zweite, zusätzliche Kontrolle. In Abbildung 13 sind die Invasionsraten aller untersuchten Stämme sowohl in ausdifferenzierten als auch in nicht ausdifferenzierten Zellen zusammengestellt. Die Abbildungen 14-17 zeigen die prozentuale Änderung der Invasivität der einzelnen Stämme in Bezug auf einen nicht mit Cytochalasin D behandelten Ansatz.

Für die beiden invasiven Stämme *Csa* 823 und *Ctu* 3032 ergab sich unter Einfluss von Cytochalasin D eine enorme Steigerung der Invasivität. In nicht

ausdifferenzierten Zellen stieg die ermittelte Invasionsrate von *Csa* 823 von 0,08 % auf 3,8 % an (Abb. 13). Dies entspricht einer Erhöhung um mehr als 5000 % (Abb. 14). Beim Stamm *Ctu* 3032 war in nicht ausdifferenzierten Zellen eine Steigerung um fast 4000 % zu beobachten (Abb. 15); hier stieg die Invasionsrate in Folge der Cytochalasin D-Behandlung von 0,1 % auf 3 % an (Abb. 13). In ausdifferenzierten Zellen war der Effekt noch deutlicher. Hier erhöhte sich die Invasionsrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle um das 68fache auf 5,8 % bei *Csa* 823 und um das 54fache auf 3,7 % bei *Ctu* 3032 (Abbildungen 13, 14 und 15). Im Vergleich dazu zeigten die Invasionsraten der ausschließlich mit DMSO-behandelten Zellen nur geringe Veränderungen gegenüber dem unbehandelten Ansatz. Beim nicht-invasiven *Csa* 824 konnte durch Cytochalasin D keine Steigerung der Invasivität induziert werden (Abb. 13 und 16). Hier sanken die Invasionsrate: in nicht ausdifferenzierten Zellen von 0,000007 % auf 0,000001 % und in ausdifferenzierten Zellen von 0,00008 % auf 0,00001 %. Nach DMSO-Behandlung lagen die ermittelten Invasionswerte in nicht ausdifferenzierten Zellen bei 0,000003 % und in ausdifferenzierten Zellen bei 0,00006 %. Ein ähnliches Bild wie bei *Csa* 824 lieferte der Kontrollstamm *E. coli* K12 (Abb. 13 und 17)

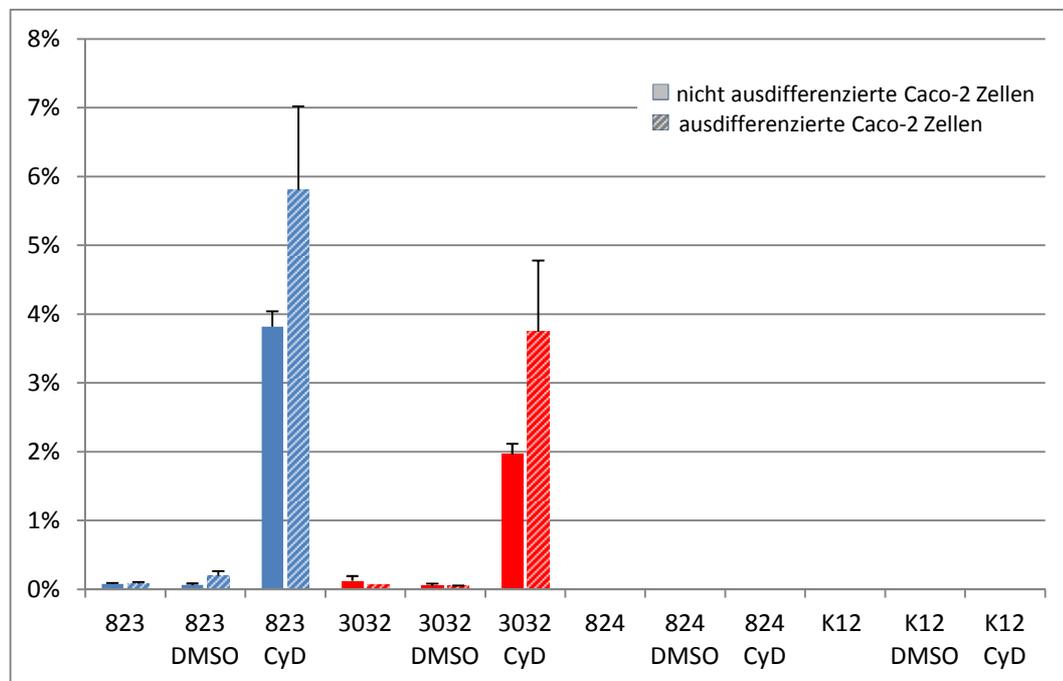


Abbildung 13: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

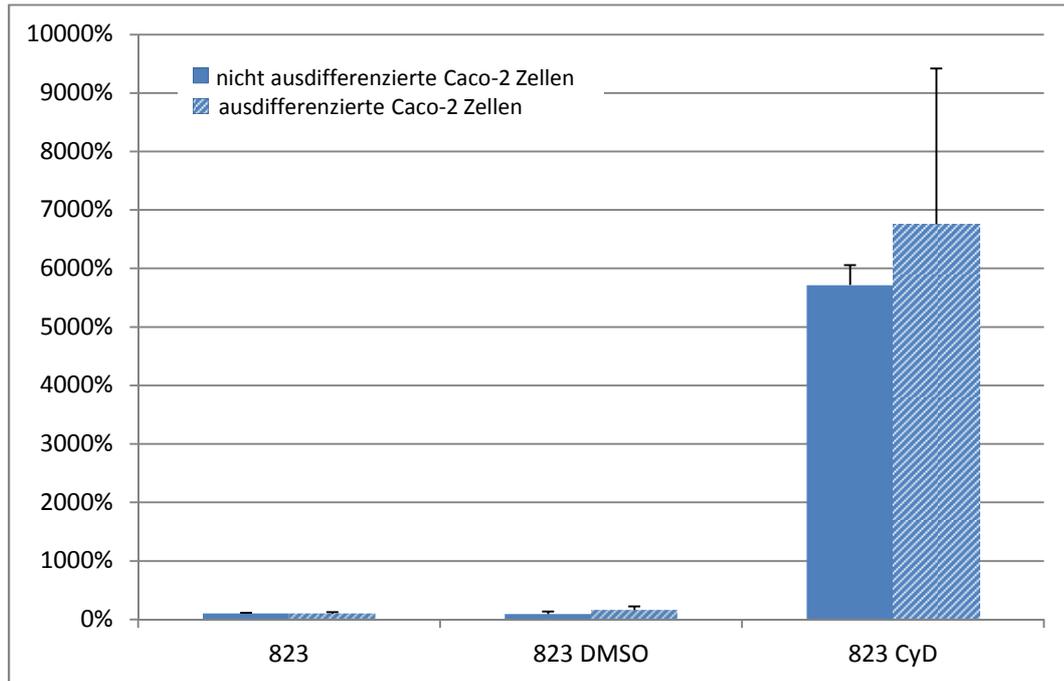


Abbildung 14: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Csa* 823 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (823) in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

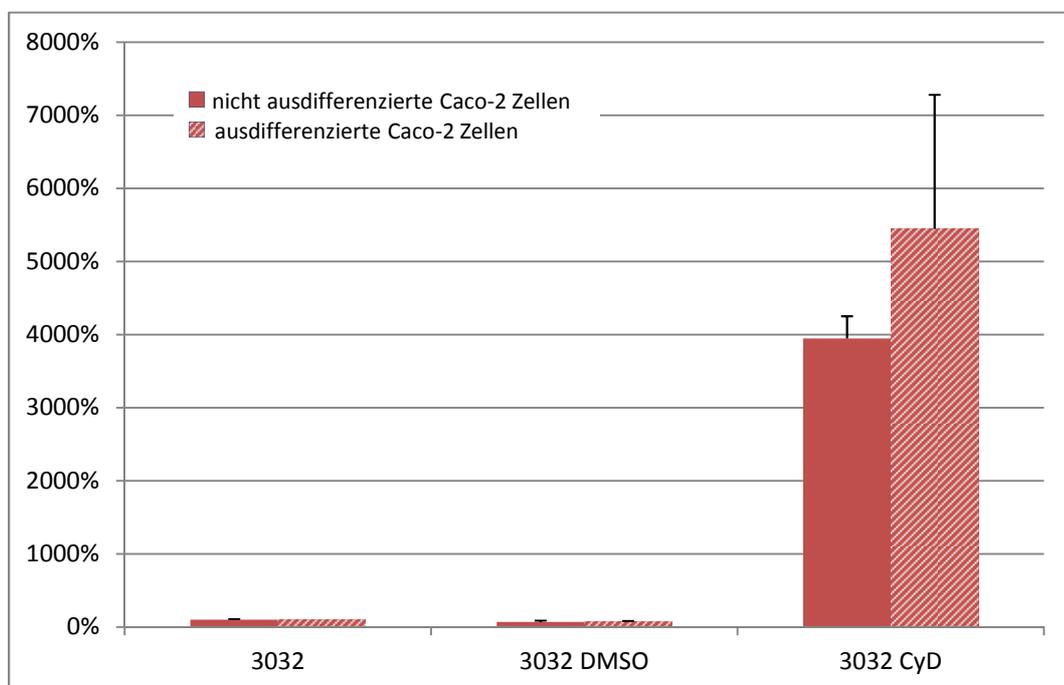


Abbildung 15: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Ctu* 3032 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (3032) in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

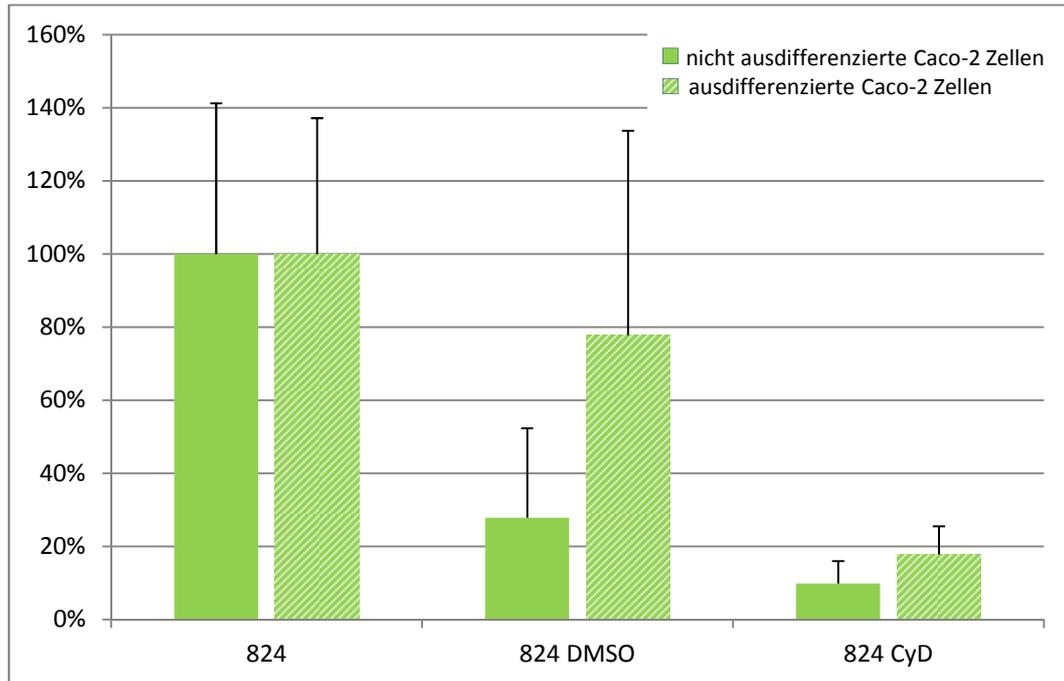


Abbildung 16: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Csa* 824 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (824) in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

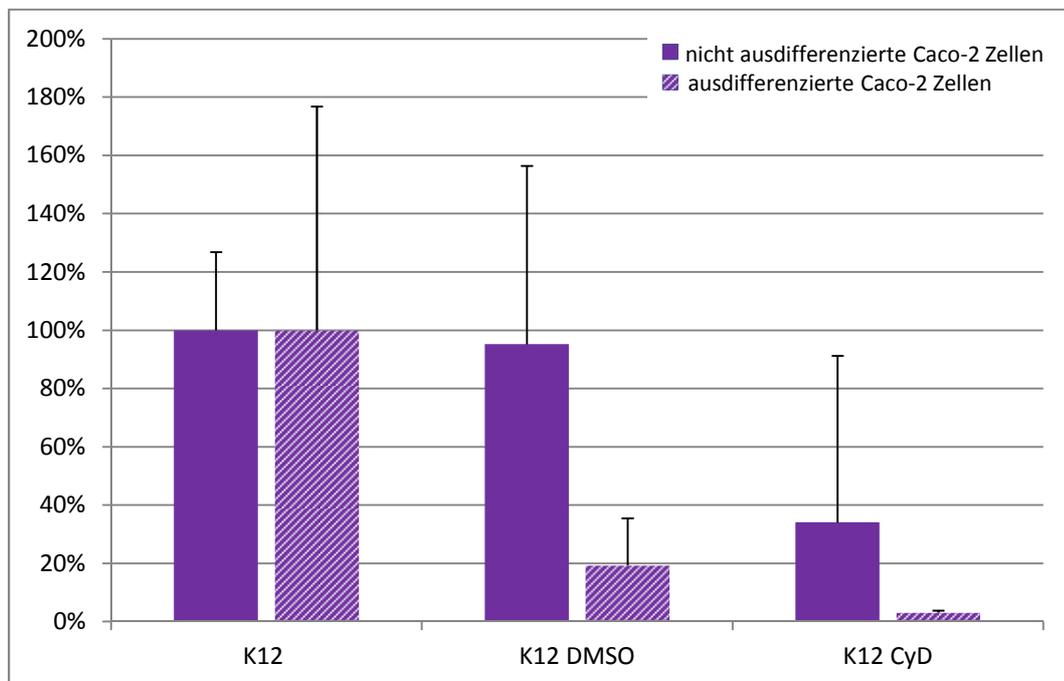


Abbildung 17: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *E. coli* K12 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (K12) in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.6. Charakterisierung des monoklonalen, gegen *Ctu* 3032 gerichteten Antikörpers 2G4

3.6.1. Einfluss des monoklonalen Antikörper 2G4 auf die Invasion von *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen

Im Rahmen der Dissertation von Ina Kleinsteuber am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU wurde ein monoklonaler Antikörper (mAK) angefertigt, welcher spezifisch gegen *Cronobacter turicensis* 3032 gerichtet ist. Dieser monoklonale IgG Antikörper, 2G4, wurde in der vorliegenden Arbeit im Zellkultursystem mit Caco-2 Zellen eingesetzt, um seine Wirkung auf die Invasionsfähigkeit von *Ctu* 3032 zu analysieren. Hierfür wurden Antikörperkonzentrationen von 1 µg, 10 µg und 20 µg verwendet. Als Negativkontrollen dienten Versuchsansätze ohne Antikörper, sowie Ansätze mit dem monoklonalen IgG Antikörper 2A12, welcher nach dem gleichen Protokoll hergestellt wurde, jedoch spezifisch gegen einen *B. cereus*-Stamm gerichtet ist. Der mAK 2A12 wurde in einer Konzentration von 10 µg eingesetzt. Vor Infektion der Caco-2 Zellen wurde die *Ctu*-Infektionslösung gemeinsam mit dem Antikörper für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, die CFU/ml bestimmt und anschließend auf die Zellen ausgebracht. In Abb. 18 sind die prozentualen Änderungen der Invasivität im Vergleich zu einem nicht mit Antikörpern behandelten Kontrollansatz dargestellt. Mit zunehmender 2G4-Konzentration war ein deutliches Sinken der Invasionswerte sowohl in ausdifferenzierten als auch in nicht ausdifferenzierten Caco-2 Zellen zu beobachten.

In nicht ausdifferenzierten Zellen betrug die Invasivität bei Zugabe von 1 µg mAK 2G4 noch 81,9 %, von 10 µg mAK 2G4 noch 32,2 % und von 20 µg mAK 2G4 nur noch 29,6 % vom Invasionswert des unbehandelten Kontrollansatzes. Bei Einsatz des nicht-spezifischen mAK 2A12 (Konzentration: 10 µg) lag die errechnete Invasivitätsrate bei 91,3 % des unbehandelten Kontrollansatzes und damit deutlich höher als bei Einsatz des mAK 2G4 in einer Konzentration von 10 oder 20 µg/ml. In ausdifferenzierten Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier sank die Invasivität bei Behandlung mit 1 µg mAK 2G4 auf 81,2 %, mit 10 µg mAK 2G4 auf 31,0 % und mit 20 µg mAK 2G4 auf 4,7 %. Der Einsatz von mAK 2A12 (10 µg) ergab gegenüber dem Kontrollansatz eine Invasivitätsrate von 99,7 %.

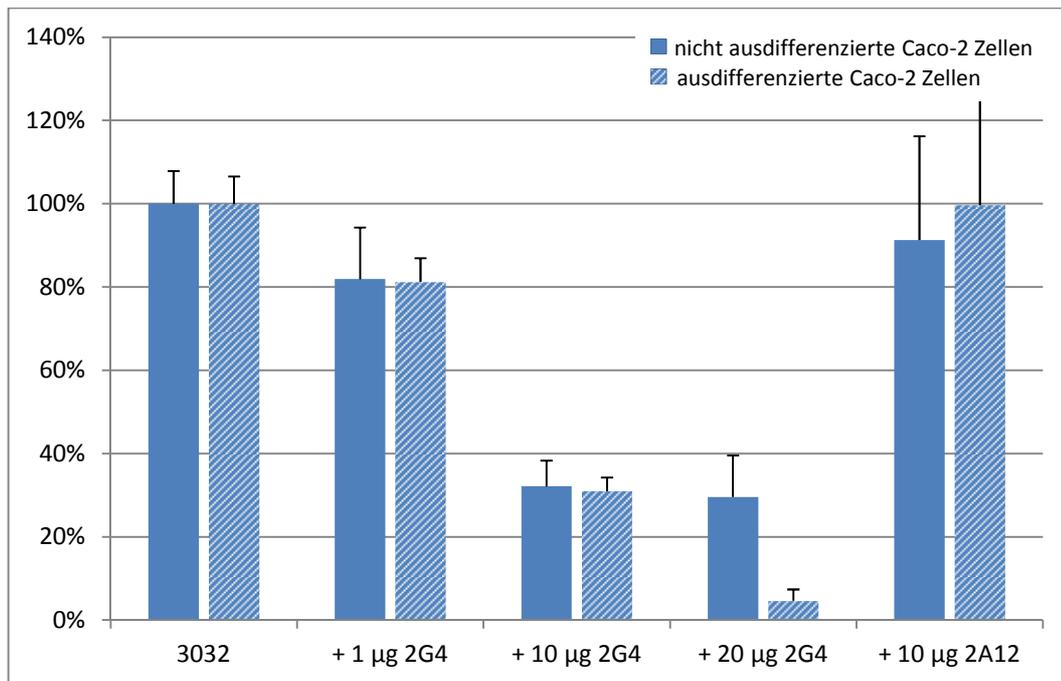


Abbildung 18: Wirkung des spezifischen mAK 2G4 auf das Invasionsverhalten von *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.6.2. Einfluss des monoklonalen Antikörpers 2G4 auf das Wachstumsverhalten von *Ctu* 3032

Um weiteren Aufschluss über die Wirkungsweise des Antikörpers, beispielsweise seinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum, zu erhalten, wurden auch Versuche außerhalb des Zellkultursystems durchgeführt. Hierfür wurden die *Ctu* 3032-Infektionslösungen mit verschiedenen Konzentrationen des mAK 2G4 für 1,5 h, entsprechend der Infektionszeit im Gentamycinassay, inkubiert und anschließend die CFU/ml bestimmt. Für die Inkubation wurden zwei verschiedene Temperaturansätze gewählt: Einerseits wurden die Lösungen bei 4°C inkubiert, um die Wachstumsrate der Bakterien möglichst gering zu halten sowie Abbauprozessen des Antikörpers durch die Bakterien entgegenzuwirken. Andererseits wurden die Infektionslösungen bei einer Temperatur von 37°C inkubiert, um die Bedingungen während der Invasion der Caco-2 Zellen möglichst genau nachzustellen. Für beide Temperaturansätze wurden zudem Negativkontrollen ohne Antikörper sowie mit dem für *Cronobacter turicensis* unspezifischen mAK 2A12 mitgeführt. Sowohl bei 4°C als auch bei 37°C konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Bakterienanzahl durch den spezifischen mAK 2G4 gegenüber den Negativkontrollen festgestellt werden

(Abb. 19). Bei 4°C sank die CFU/ml nach Zugabe von 1 µg mAK 2G4 um 31 %, nach Zugabe von 10 µg mAK 2G4 um 53 % und nach Zugabe von 20 µg mAK 2G4 um 51 % gegenüber der cfu/ml des Kontrollansatzes ohne Antikörperbehandlung. Der Einsatz von 10 µg mAK 2A12 führte zu einem relativen Bakterientiter von 98,6 %, der also dem des Kontrollansatzes gleicht. Bei 37°C lagen die ermittelten Werte im prozentualen Vergleich mit der unbehandelten Negativkontrolle bei 62 % nach Einsatz von 1 µg mAK 2G4, bei 31 % nach Einsatz von 10 µg mAK 2G4, bei 32 % nach Einsatz von 20 µg mAK 2G4 und bei 57 % nach Einsatz von 10µg mAK 2A12.

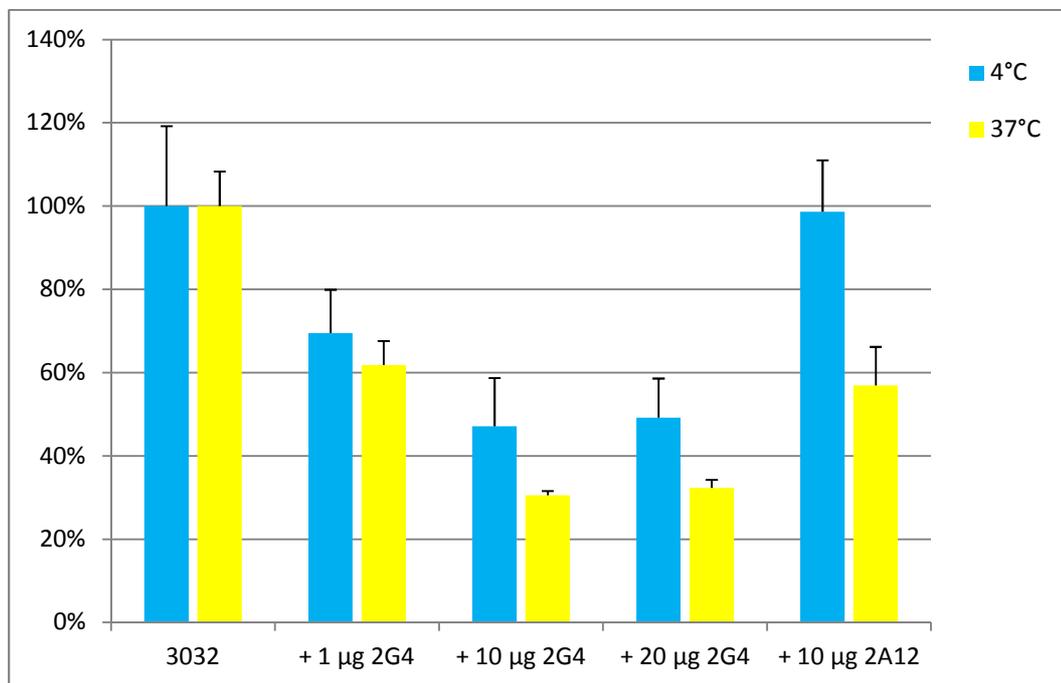


Abbildung 19: Wirkung des spezifischen mAK 2G4 auf das Wachstum von *Ctu* 3032 bei 4°C bzw. 37°C für 1,5 h. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.6.3. Etablierung eines Immunfluoreszenztests unter Einsatz des monoklonalen Antikörpers 2G4

Um die intrazelluläre Lage der Bakterien in der Wirtszelle näher bestimmen zu können, wurde in dieser Arbeit versucht, mit Hilfe des mAK 2G4 einen Immunfluoreszenztest zu etablieren. Die Caco-2 Zellen wurden, wie im Kapitel Material und Methoden 2.10 beschrieben, behandelt und anschließend unter dem Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet. Zwei verschiedene Ansätze dienten dabei

als Negativkontrollen: Für die Negativkontrolle 1 (Abb. 20 D) wurden die Zellen nur mit Zellkulturmedium inkubiert, um auszuschließen, dass die verwendeten Antikörper unspezifisch mit den Zellen reagieren. Als Negativkontrolle 2 diente ein Ansatz, bei dem die Zellen statt mit dem spezifischen mAK 2G4 mit dem für *Ctu* 3032 unspezifischen mAK 2A12 behandelt wurden, um eine unspezifische Reaktion der Bakterien mit dem 1. Antikörper auszuschließen (Abb. 20 E). In Abbildung 20 sind ausgewählte Immunfluoreszenzbilder dargestellt. In den mit mAK 2G4-behandelten Zellen sind deutlich die grün-fluoreszierenden *Cronobacter*-Bakterien zu erkennen, die sich vorwiegend um die mittels DAPI blau gefärbten Zellkerne gruppieren. Die Overlay-Bilder der Negativkontrolle weisen keine grüne Fluoreszenz auf und beweisen damit, dass weder der erste noch der zweite Antikörper unspezifisch an die Wirtszell- bzw. Bakterienoberfläche binden.

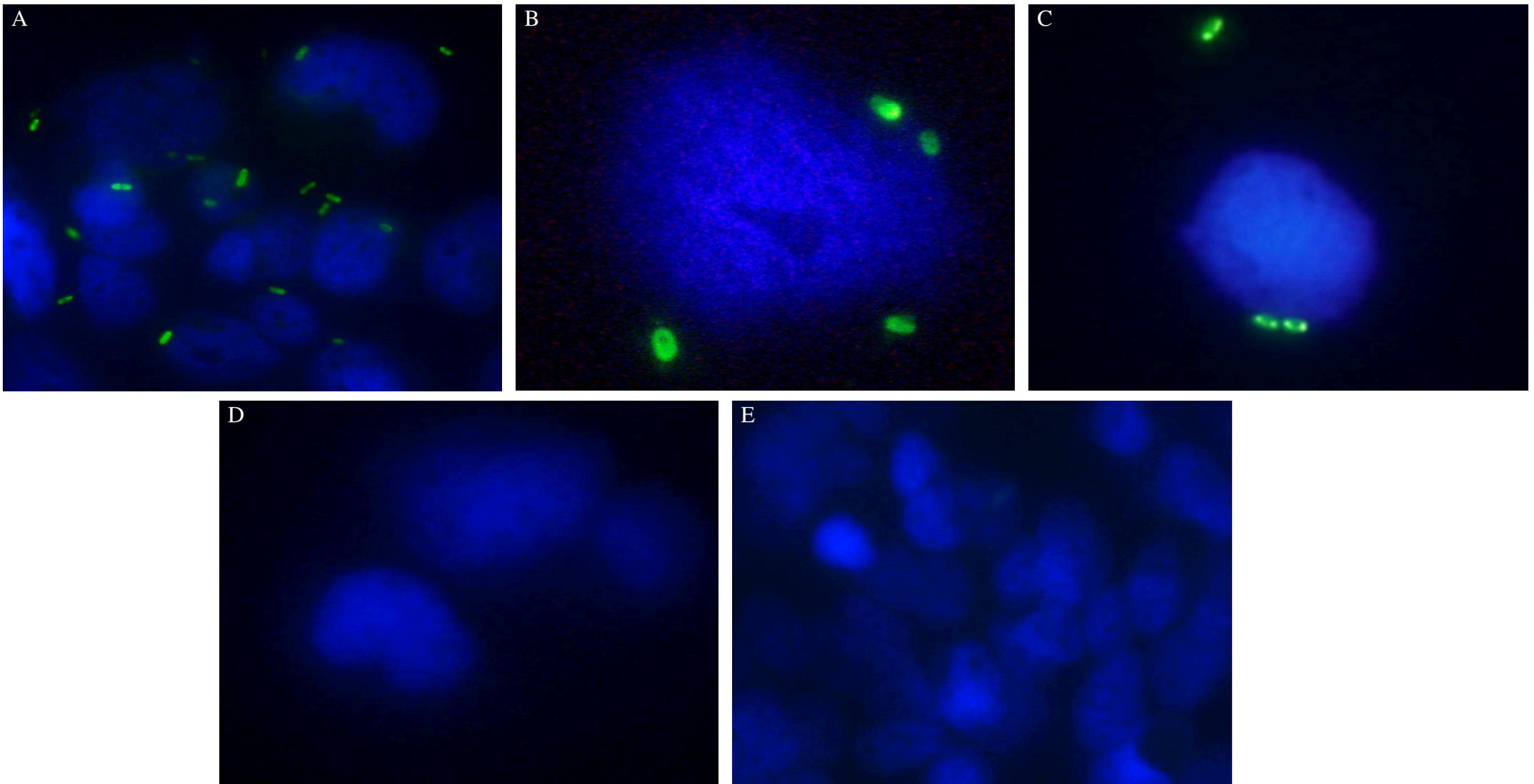


Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen von *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen.

A–C: *Cronobacter turicensis* 3032 in Caco-2 Zellen, nach Behandlung mit mAK 2G4

D: Negativkontrolle 1: nicht infizierte Caco-2 Zellen, nach Behandlung mit mAK 2G4

E: Negativkontrolle 2: *Cronobacter turicensis* 3032 in Caco-2 Zellen, nach Behandlung mit mAK 2A12

4. Analyse der wirtsspezifischen Signalkaskaden während der *Cronobacter*-Infektion

4.1. Einfluss von *Cronobacter* spp. auf den MAPK-Weg in Caco-2 und Raw 264.7 Zellen

Wie bereits bei der Untersuchung aller 13 *Cronobacter*-Stämme in 1.4. gezeigt wurde, kam es nach Infektion der Caco-2 Zellen mit *Csa* 824 nicht zu einer Aktivierung der *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen, wohingegen *Csa* 823, *Ctu* 3032 und alle anderen getesteten Stämme zu einer Aktivierung der Kinasen p38, ERK und JNK führten (Abb. 4 und Abb. 21).

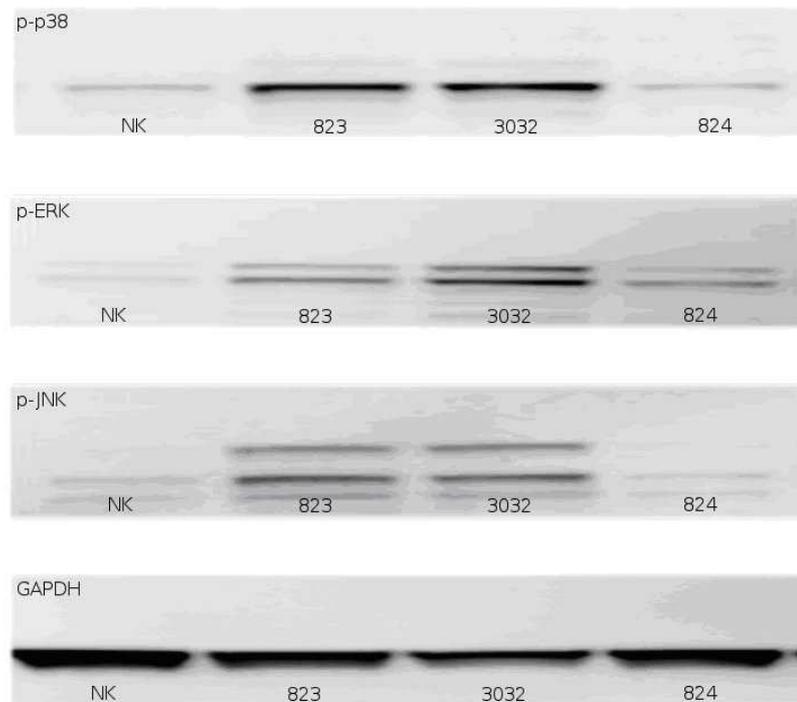


Abbildung 21: Western Blots zum Nachweis der Induktion der MAPK in Caco-2 Zellen durch *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Die Aktivierung der MAPK geschieht in der Regel sehr schnell und ist bereits nach wenigen Minuten nachweisbar. Die Aktivierung durch *Cronobacter* spp. wurde anhand des Isolates *Csa* 823 über einen Zeitraum von 24 h beobachtet (Abb. 22).

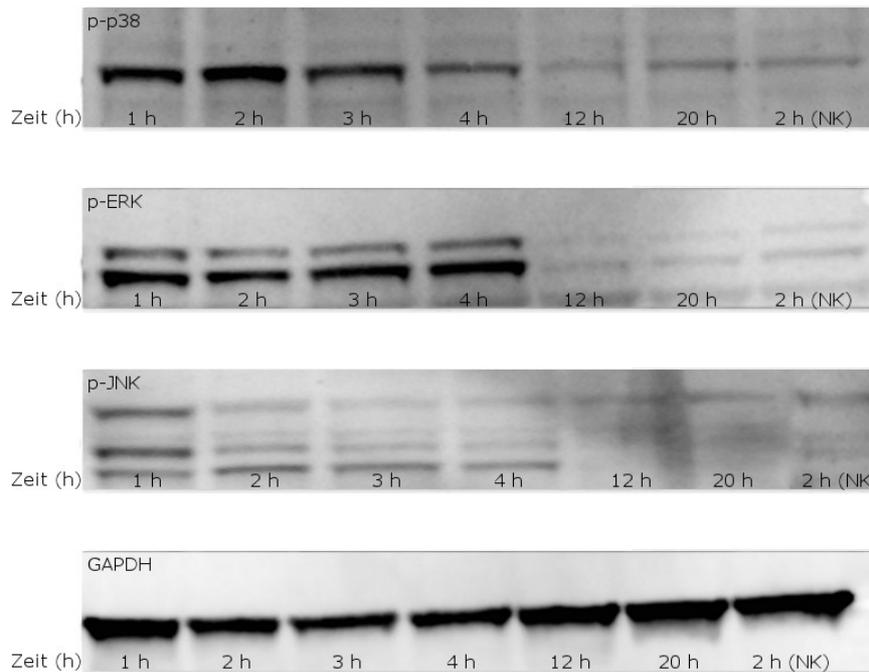


Abbildung 22: Western Blots zum Nachweis des zeitlichen Verlaufs der Induktion der MAPK in Caco-2 Zellen durch *Csa* 823 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, war die phosphorylierte Form von p38 bereits 1 h nach Bakterienexposition deutlich nachweisbar und erreichte nach 2 h ihren maximalen Wert. Nach 4 h war eine deutliche Abschwächung der Bande und damit der Menge der phosphoryliert vorliegenden Kinase p38 sichtbar. Nach 12 h war kein Unterschied zur Negativkontrolle mehr erkennbar. Ein ähnliches Bild ergab sich für die c-Jun N-terminale Kinase (JNK). Die stärkste Aktivierung zeigte sich hier bereits nach 1 h, anschließend nahm die Menge an phosphoryliert vorliegender JNK wieder kontinuierlich ab. Nach 12 h war anhand des p-JNK-Levels kein Unterschied zwischen Bakterien-exponierten Zellen und Negativkontrolle mehr erkennbar. Eine Aktivierung der *extracellular-signal-regulated* Kinase (ERK) war ebenfalls bereits nach 1 h deutlich sichtbar und ihre Menge blieb bis zur Messung nach 4 h konstant. Nach 12 h war auch die p-ERK-Konzentration wieder auf ihr Ausgangsniveau gesunken.

Bei Raw 264.7 Zellen handelt es sich um murine Monozyten, also immunkompetente, professionell phagozytische Zellen. Die Betrachtung einer immunkompetenten Zelllinie bietet sich im Zusammenhang mit *Cronobacter* spp. an, da diese ein Carriersystem darstellen, durch das die Bakterien vom Darm ins

Gehirn gelangen können, um hier eine Meningitis hervorzurufen. Die Gesamtzellextrakte wurden analog zu den Versuchen in Caco-2 Zellen mittels Western Blot und Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von p38, ERK und JNK auf eine Aktivierung der MAPK hin untersucht. Im Gegensatz zu den Caco-2 Zellen zeigten die Raw 264.7 Zellen für alle drei *Cronobacter*-Stämme das gleiche Bild. Es kam zu einer Bakterien-induzierten Aktivierung der p38 und JNK, wohingegen die p-ERK durch die Bakterien gehemmt wurde (Abb. 23).

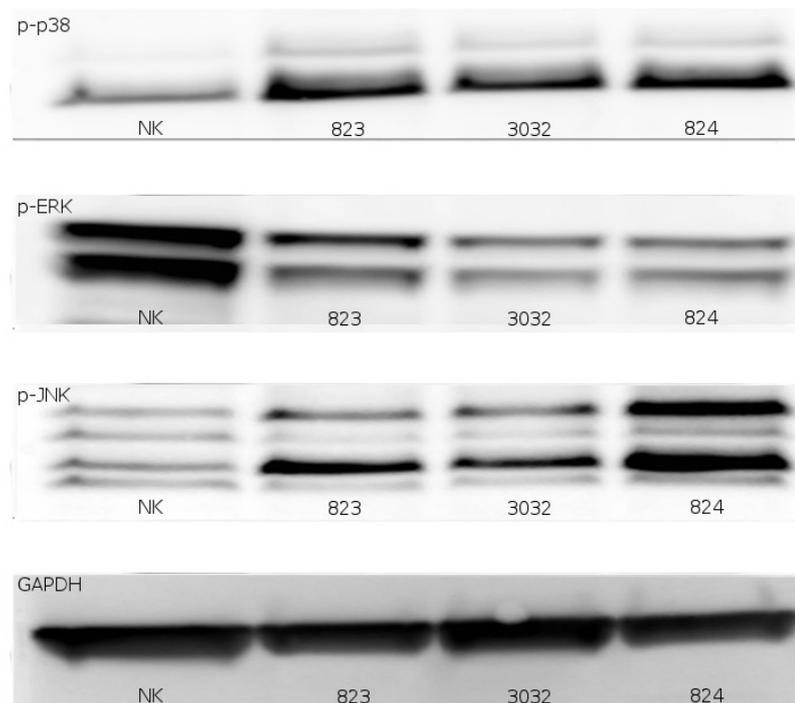


Abbildung 23: Western Blots zum Nachweis der Induktion der MAPK in Raw 264.7 Zellen durch *Csa* 823, *Ctu* 3032 und *Csa* 824 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

4.2. Einfluss von *Cronobacter* spp. auf die iNOS-Produktion

Das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin, welches in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt und einen wichtigen Bestandteil der Zellabwehr gegen Protozoen, Bakterien, Pilze und Viren darstellt. Als Indikator für die zelluläre Abwehr wurde die iNOS-Aktivität nach Bakterienexposition sowohl in Caco-2 als auch in Raw 264.7 Zellen bestimmt.

Die iNOS-Aktivität in Caco-2 Zellen wurde nach 20 h mittels Western Blot und immunologischem Nachweis ermittelt. In dieser Zelllinie konnte keine iNOS-Induktion nach Bakterienexposition festgestellt werden (Abb. 24).

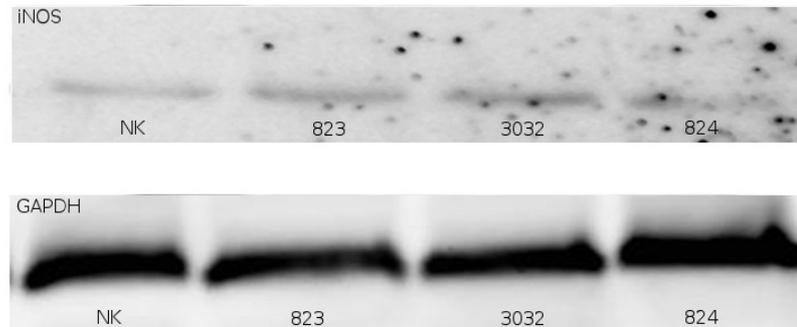


Abbildung 24: Western Blots zum Nachweis der iNOS-Induktion in Caco-2 Zellen durch *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Der beschriebene Versuch wurde mit Raw 264.7 Zellen wiederholt. Hier war in den mit *Cronobacter* spp. infizierten Zellen nach 20 h eine deutliche Erhöhung von iNOS gegenüber der Bakterien-freien Kontrolle sichtbar. Die iNOS-Produktion wurde dabei von allen drei Isolaten induziert. Mit LPS behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle. (Abb. 25).

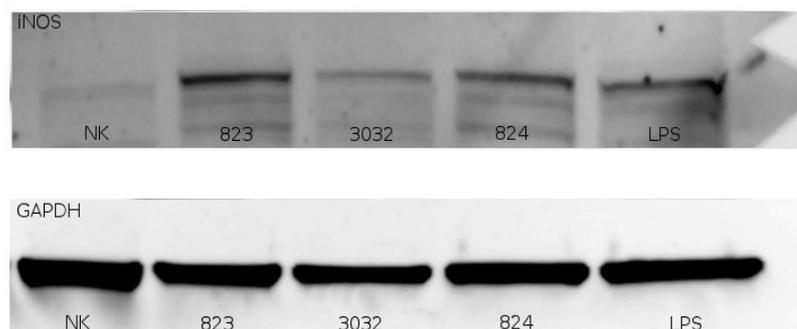


Abbildung 25: Western Blots zum Nachweis der iNOS-Induktion in Raw 264.7 Zellen durch *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 mittels spezifischer Antikörper. Als Positivkontrolle dienten mit LPS behandelte Zellen. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Auch hier wurde *Csa* 823 ausgewählt, um den zeitlichen Verlauf der iNOS-Induktion durch *Cronobacter* spp. zu beobachten. Hierfür wurden 2 h, 6 h und 20 h nach der Infektion Zelllysate hergestellt und deren iNOS-Gehalt mittels Western Blot ermittelt. Während 2 h nach Bakterienexposition noch kein Anstieg von iNOS sichtbar war, war dieser nach 6 h bereits deutlich erkennbar und blieb bis zur Messung nach 20h konstant (Abb. 26).

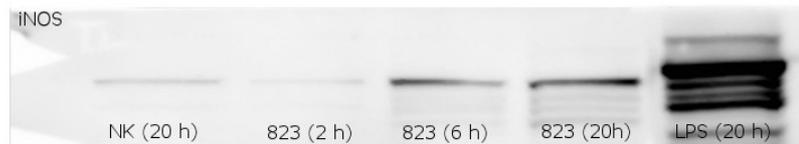


Abbildung 26: Western Blots zum zeitlichen Verlauf der iNOS-Induktion in Raw 264.7 Zellen durch *Csa* 823 mittels spezifischer Antikörper. Als Positivkontrolle dienten mit LPS behandelte Zellen. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

V. DISKUSSION

1. Beobachtungen zu möglichen Virulenzfaktoren von *Cronobacter* spp. anhand ausgesuchter Stämme

Infektionen durch *Cronobacter* spp. sind zwar selten, jedoch mit einer hohen Letalität verbunden (Pagotto & Farber, 2009). Die Bakterien sind ubiquitär verbreitet und konnten sowohl aus einer Vielzahl an Lebensmitteln als auch aus klinischen Proben isoliert werden (Baumgartner *et al.*, 2009). Bis jetzt ist es allerdings nicht gelungen eine zuverlässige Aussage über das Pathogenitätspotential verschiedener Stämme zu machen. Zwar ist bekannt, dass sich sowohl die verschiedenen Spezies als auch Subspezies bezüglich ihrer Virulenz und Pathogenität unterscheiden, aber noch existiert kein aussagekräftiges Testverfahren, mit welchem zwischen pathogenen und apathogenen Isolaten unterschieden werden kann. Mögliche Virulenzfaktoren wie OmpA, Adhäsine und ein Eisen-Aufnahme-Mechanismen wurden bereits identifiziert, scheinen allerdings nicht mit dem klinischen Verlauf zu korrelieren (Hamby *et al.*, 2011; Kucerova *et al.*, 2011). Die Invasions- und Adhäsionsfähigkeit als wichtiges Virulenzkriterium wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht und eine große Variationsbreite zwischen verschiedenen Isolaten aufgezeigt, ohne jedoch eine eindeutige Korrelation mit dem Krankheitsverlauf nachweisen zu können (Giri *et al.*, 2012; Townsend *et al.*, 2008).

1.1. Überprüfung der Inositol-Fermentation

Hamby *et al.* (2011) versuchten anhand von Daten aus verschiedenen biochemischen Standardtests Rückschlüsse auf die Pathogenität zu ziehen. Dabei stellte sich heraus, dass als pathogen eingestufte klinische Isolate eine positive Inositol-Fermentations-Reaktion zeigten, während der Test bei den als nicht-pathogen eingestuften Isolaten negativ verlief. Dies erklärt sich möglicherweise durch die enge Nachbarschaft der Gene des Inositol-Stoffwechsels, vor allem der Inositol-Monophosphatase, mit für putative Virulenzfaktoren kodierenden Genclustern, welche im Genom von *Csa* BAA-894 identifiziert werden konnten (Hamby *et al.*, 2011; Kucerova *et al.*, 2010). Die genaue Funktion dieser Virulenzfaktoren ist allerdings noch nicht bekannt.

Die von Hamby *et al.* (2011) aufgestellte These wurde in der vorliegenden Arbeit an den Stämmen *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 überprüft. Da es sich um drei klinische und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit pathogene Isolate handelt, wäre für alle drei Isolate mit einer positiven Inositolreaktion zu rechnen. *Csa* 824 und *Ctu* 3032 zeigten im API 20 auch die erwartete positive Inositolreaktion. *Csa* 823 hingegen reagierte negativ und müsste somit als nicht pathogen eingestuft werden. Allerdings wird *Csa* 823 (*Csa* BAA-894) bereits in der Arbeit von Hamby *et al.* (2011) als Ausnahme aufgeführt, bei der die negative Inositolreaktion auf den Verlust eines noch nicht identifizierten Gens zurückzuführen sei, welches an der Inositol-Fermentation beteiligt ist. Dementsprechend ist die von Hamby *et al.* (2011) aufgestellte Hypothese im Falle der hier untersuchten Stämme zwar gültig, jedoch handelt es sich bei der Betrachtung der Inositolreaktion um einen recht unsicheren Virulenzindikator, da die Regulation der Inositol-Fermentation einem komplexen, noch nicht vollständig identifizierten Mechanismus unterliegt.

1.2. Enterotoxinproduktion

Enterotoxine stellen einen Virulenzfaktor bei *Cronobacter* spp. dar, für den es in der Literatur allerdings nur vereinzelte Berichte (Pagotto *et al.*, 2003; Raghav & Aggarwal, 2007) gibt. Die positiven Ergebnisse wurden hierbei zum Großteil im Tiermodell (*suckling mouse model*) und nicht in der Zellkultur erzielt. Während sich im *suckling mouse model* immerhin 4 von 18 bzw. 3 von 11 getesteten Stämmen als Enterotoxinproduzenten erwiesen, berichtet Pagotto *et al.* (2003) von lediglich einem Stamm, welcher einen zytopathischen Effekt in den Zelllinien CHO, Vero und Y-1 zeigte. Dies macht eine Interpretation der Ergebnisse und eine definitive Aussage über das Enterotoxin-Bildungsvermögen von *Cronobacter* spp. schwierig. Bei der Überprüfung der 13 vorliegenden *Cronobacter*-Stämme erwiesen sich alle untersuchten Stämme unter den beschriebenen Versuchsbedingungen als nicht zytotoxisch auf IPEC-J2 Zellen. Möglicherweise unterliegt die Enterotoxinproduktion, wie schon von Pagotto *et al.* (2003) vermutet, einem komplexen Regulationsmechanismus, welcher erst beim Vorliegen passender äußerer Bedingungen aktiviert wird. Eventuell handelt es sich dabei um Bedingungen, die in den durchgeführten Zellkulturversuchen nicht gegeben waren, z.B. die Aktivierung eines Regulationsfaktors durch den

niedrigen pH-Wert bei der Magenpassage. Dies könnte die Diskrepanz der veröffentlichten Ergebnisse im Tiermodell und den hier beschriebenen Zellkulturdaten erklären. Möglicherweise spielt auch die verwendete Zelllinie eine entscheidende Rolle dabei, ob ein zytopathischer Effekt nachgewiesen werden kann. So zeigten die Filtrate des zytopathischen Stamms LA bei Pagotto *et al.* (2003) einen ausgeprägteren Effekt auf Y-1 und Vero-Zellen als auf CHO-Zellen. Die negativen Ergebnisse der in dieser Arbeit untersuchten Stämme in IPEC-2 Zellen schließen dementsprechend eine zytopathische Wirkung auf andere Zelllinien nicht aus.

1.3. Wachstumsverhalten und Koloniemorphologie der *Cronobacter*-Stämme auf verschiedenen Nährmedien

Anders als Virulenzfaktoren, die einen direkten Einfluss auf die Wirtszelle haben, sind Virulenz-assoziierte Faktoren nur indirekt an der Virulenzausprägung beteiligt, indem sie als Regulatoren von Virulenzgenen oder Stoffwechsellzymen, welche für die Anpassung des Erregerstoffwechsels an den Wirtsorganismus wichtig sind, fungieren. So kann beispielsweise die Expression verschiedener Oberflächenproteine von entscheidender Bedeutung für die Interaktion mit der Wirtszelle und damit auch für die Virulenz sein (Parker & Armstrong, 1988). Bei der morphologischen Betrachtung von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 fiel sowohl auf PC-Agar als auch auf ESIA-Agar das wesentlich kleinere Koloniewachstum von *Csa* 824 im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen auf. Nur auf dem Minimalmedium (Standard II-Nährboden) zeigte sich zwischen den Stämmen kein Unterschied bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. der Koloniegröße nach 24 h. Im Wachstumstest in LB-Medium zeigte *Csa* 824, im Vergleich zu *Csa* 823 und *Ctu* 3032, ein wesentlich langsames Wachstum, welches auf einer verlängerten lag-Phase beruhte. Dies könnte auf das Fehlen eines oder mehrerer Stoffwechsellzyme bei *Csa* 824 hinweisen. Durch ein fehlendes Stoffwechsellzym wird ein Stoffwechselweg unterbrochen, was zu einer schlechteren Verwertung der bereitgestellten Vielfalt an Nährstoffen und somit zu einem deutlich langsameren Wachstum bzw. einer deutlichen Verlängerung der Adaptationszeit an veränderte Umweltbedingungen führt. Nur das Minimalmedium bremste alle drei Stämme

gleichermaßen in ihrem Wachstum und scheint den nachteiligen Effekt des Stoffwechseldefekts von *Csa* 824 aufzuheben. Bezüglich ihrer Kolonimorphologie unterschieden sich die Stämme nicht voneinander. Trotzdem ist es möglich, dass die bei *Csa* 824 vermuteten Gendefekte Auswirkungen auf die Oberflächenstruktur des Bakteriums haben und somit zu einer nicht optimalen Kontaktaufnahme des Pathogens mit seiner Wirtszelle führen. Hierauf deuten die Ergebnisse der Adhäsions- und Invasionsversuche hin. *Csa* 824 stellte sich als nicht invasiv dar und auch sein Adhäsionsvermögen war, verglichen mit *Csa* 823, reduziert. Möglicherweise besteht zwischen dem verlangsamten Wachstum, dem schlechten Adhäsions- und dem fehlenden Invasionsvermögen ein Zusammenhang und die vorliegenden Veränderungen haben sowohl Auswirkungen auf den Stoffwechsel des Bakterienstammes als auch auf seine Oberflächenbeschaffenheit und damit seine Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion.

1.4. Beeinflussung des MAPK-Weges durch *Cronobacter* spp.

Als weitere Möglichkeit die Virulenz der Stämme indirekt zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit ein intrazellulärer Signalweg der Wirtszellen, der MAPK-Weg, näher analysiert. Bis auf *Csa* 824 führten alle untersuchten Stämme in Caco-2 Zellen zu einer Aktivierung der drei „großen“ MAP-Kinasen ERK, JNK und p38. Diese Zellen scheinen also im Allgemeinen auf eine *Cronobacter*-Exposition mit einer Aktivierung der MAPK-Signalkaskaden zu reagieren. Die Tatsache, dass hier alleine *Csa* 824 zu keinerlei Veränderung verglichen mit den unbehandelten Zellen führte, kann als weiterer Hinweis auf das Fehlen eines wichtigen Virulenzfaktors bei *Csa* 824 gedeutet werden.

Der fehlende Virulenzfaktor scheint von entscheidender Bedeutung für die Interaktion der Bakterien mit Caco-2 Zellen, nicht aber mit Monozyten zu sein, denn in Versuchen mit *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 in Raw 264.7 Zellen zeigten alle drei Isolate das gleiche Reaktionsmuster; es kam zu einer Aktivierung der p38 und JNK und einer Herabregulierung der ERK. Die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien bezüglich der Aktivierung der MAPK erklären sich aus deren natürlichen Phagozytoseverhalten. Während die Monozyten die Bakterien aktiv aufnehmen, ist bei den Caco-2 Zellen eine aktive Adhäsion bzw. Invasion von Seiten der Bakterien nötig. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen

Ergebnissen geht hervor, dass bei *Csa* 824 sowohl im Adhäsions- als auch im Invasionsverhalten Defekte vorliegen (siehe auch 3.1. und 3.2.). Hiermit lässt sich die fehlende Aktivierung der MAPK durch *Csa* 824 in Caco-2 Zellen und ihre Aktivierung in Raw 264.7 Zellen erklären.

Während es in Caco-2 Zellen zu einer Aktivierung aller drei großen MAPK kommt, werden in Raw 264.7 Zellen nur die beiden Kinasen JNK und p38 aktiviert, welche in erster Linie mit der Entstehung von Entzündung und Apoptose in Verbindung stehen, wohingegen die ERK, welche eher mit Zellproliferation und Differenzierung assoziiert ist, gehemmt wird. Die Reaktion der Raw 264.7 Zellen scheint dementsprechend gerichteter abzulaufen, als dies bei den Caco-2 Zellen der Fall ist.

Desweiteren scheint die Wirkung von *Cronobacter* spp. auf den MAPK-Weg stark Wirtszell-abhängig zu sein. Zwar gibt es in der Literatur bisher nur sehr vereinzelte Untersuchungen zu diesem Thema, jedoch berichten sowohl Mittal *et al.* (2009a) als auch Hunter *et al.* (2009) von einer Suppression der MAPK durch *Cronobacter* spp.. Mittal *et al.* (2009a) konnte in DC eine Hemmung der MAPK beobachten, welche auch mit der Unterdrückung der Reifung der DC in Zusammenhang stand. Hunter *et al.* (2009) konnte mittels DNA *microarray*-Analysen in IEC-6 Zellen bei einigen MAPK eine Herabregulierung unter das Kontrollniveau beobachten.

1.5. Beeinflussung der iNOS-Produktion durch *Cronobacter* spp.

Viele Zellen reagieren auf die Gegenwart pathogener Bakterien mit einer Erhöhung der iNOS-Expression und damit verbunden der NO-Produktion. Hunter *et al.* (2009) (2008) konnte sowohl im Tiermodell als auch in IEC-6 Zellen eine durch *Cronobacter* spp. induzierte Erhöhung der iNOS-Produktion feststellen und auch Emami *et al.* (2011) fand erhöhte iNOS-Konzentrationen in mit *ompA*-positiven *C. sakazakii* infizierten dendritischen Zellen. Hierzu passen die für *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 gewonnenen Ergebnisse in Raw 264.7 Zellen. Auch hier reagierten die Zellen auf die Gegenwart der *Cronobacter*-Stämme mit einer Erhöhung der iNOS-Konzentration. Im Gegensatz dazu konnte in Caco-2 Zellen für keinen der drei untersuchten Stämme eine Wirkung auf die intrazelluläre iNOS-Konzentration nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten,

dass *Cronobacter* spp. in der Lage sind, die zelluläre Abwehr der Caco-2 Zellen bezüglich der iNOS-Produktion zu unterdrücken. Hierfür liegen allerdings sonst keinerlei Hinweise vor. Wahrscheinlicher ist, dass es aufgrund einer Besonderheit dieser Zelllinie nicht zu einer verstärkten iNOS-Produktion als Reaktion auf die Gegenwart der Bakterien kommt.

2. Kolonisations- und Proliferationsfähigkeit von *Cronobacter* spp. in Monozyten

Untersuchungen zur intrazellulären Bakterienanzahl in Raw 264.7 Zellen nach 2,5 h ergaben für *Csa* 823 einen Bakterientiter von 9,7 %, für *Ctu* 3032 von 5,2 %, für *Csa* 824 von 4,5 % und für den Kontrollstamm K12 von 1,8 %. Alle drei untersuchten *Cronobacter*-Stämme sind also intrazellulär präsent und haben hier die Möglichkeit auf die Signalwege der Wirtszelle einzuwirken. Die in der Studie betrachteten 2,5 h-Werte geben, anders als bei den Caco-2 Zellen, aufgrund der schnellen, aktiven Aufnahme der Bakterien durch die Monozyten, Auskunft über die intrazelluläre Proliferation bzw. Überlebensfähigkeit der Bakterien. Vergleicht man die intrazellulären Wiederfindungsraten der Stämme miteinander, so scheinen sich *Csa* 824 und *Ctu* 3032 wesentlich schlechter an die intrazellulären Gegebenheiten zu adaptieren bzw. hier proliferieren zu können als *Csa* 823.

3. Der Infektionsverlauf von *Cronobacter* spp. in Enterozyten

3.1. Invasion in Enterozyten

Um Aufschluss über den Infektionsverlauf in Enterozyten zu erhalten, wurde die Invasivität aller 13 ausgewählten *Cronobacter*-Isolate bestimmt. Der nicht-invasive *E. coli* K12 diente als Negativkontrolle und der *Enterobacter asburiae* (MHI 968) als Positivkontrolle. Die untersuchten Isolate zeigten eine große Variationsbreite bezüglich ihrer Invasionsrate und wurden, wie bereits im Kapitel Ergebnisse 1.1. beschrieben, in vier Kategorien eingeteilt:

- 1) sehr invasiv ($> 0,2 \%$): 968, ES5, 978
- 2) mäßig invasiv ($< 0,2 \%$ und $> 0,1 \%$): 823, 793, 821, 604, 21001
- 3) schwach invasiv: ($< 0,1 \%$ und $> 0,01 \%$): 977, 789, 21002, 979, 3032
- 4) nicht invasiv: ($< 0,01$): 824, K12

Damit wurden 12 der 13 untersuchten Stämme, trotz erheblicher Unterschiede bezüglich der Invasionsrate, als invasiv kategorisiert. Nur *Csa* 824 war mit einer Invasionsrate von $0,0005 \%$ eindeutig nicht invasiv. Zur weitergehenden Untersuchung wurden *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 nicht nur auf ihr Infektionsverhalten in einen Tag alten Zellen, sondern auch in ausdifferenzierten Zellen betrachtet. Bei der Ausdifferenzierung von Caco-2 Zellen kommt es zu einer Verstärkung der Zell-Zell-Adhäsion (Schreider *et al.*, 2002) und damit zu einer sehr guten Differenzierung in apikale und basolaterale Zellkompartimente. Diese wohldefinierte Kompartimentierung macht polarisierte Zellen zu einem hervorragenden Modell für die Invasion (Desin *et al.*, 2009). Desweiteren berichten Studien von Unterschieden bezüglich des Infektionsverhaltens von Bakterien in ausdifferenzierten und nicht ausdifferenzierten Zellen. Criss *et al.* (2001) etwa berichtet von signifikanten Unterschieden bei der Invasion von *Salmonella typhimurium*. Hier sind in ausdifferenzierten Zellen andere zytoskelettale Regulationsfaktoren beteiligt als in nicht ausdifferenzierten Zellen. Während beispielsweise die GTPase Cdc42 in nicht ausdifferenzierten Zellen eine entscheidende Rolle bei der Invasion von *Salmonella typhimurium* einnimmt, ist in ausdifferenzierten Zellen die GTPase Rac1 der entscheidende Invasionsfaktor.

Bezüglich der Invasion lagen die absoluten Werte (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen) bei den ausdifferenzierten Zellen durchweg niedriger als bei den nicht-ausdifferenzierten Zellen, die relativen Werte, aus dem Vergleich der Stämme miteinander, waren jedoch vergleichbar. So besaßen die beiden invasiven Stämme *Csa* 823 und *Ctu* 3032 in nicht ausdifferenzierten Zellen eine Invasivität von $0,14 \%$ bzw. $0,05 \%$, in ausdifferenzierten Zellen eine Invasivität von $0,07 \%$ bzw. $0,02 \%$. Bei dem nicht invasiven *Csa* 824 und der Negativkontrolle *E. coli* K12 standen einer Invasivität von $0,0005 \%$ bzw. $0,001 \%$ in nicht ausdifferenzierten Zellen eine Invasivität von $0,00002 \%$ bzw. $0,0002 \%$ in ausdifferenzierten Zellen gegenüber. Die starke Abgrenzung zwischen apikalen und basolateralen Zellkompartimenten in ausdifferenzierten

Zellen scheint also die Invasion der *Cronobacter*-Bakterien einzuschränken. Dies könnte drauf hinweisen, dass sich der Wirtszellrezeptor, der von Kim und Loessner (2008) postuliert wurde, in ausdifferenzierten Zellen in erster Linie basolateral befindet. In ausdifferenzierten Zellen wird das Vordringen der Bakterien in basolaterale Zellkompartimente im Vergleich zu nicht ausdifferenzierten Zellen wesentlich erschwert, was bedeutet, dass den Bakterien nur die apikal gelegenen Rezeptoren und damit eine geringe Gesamtzahl an Rezeptoren für die Invasion zur Verfügung steht. Die reduzierte Anzahl der zu Verfügung stehenden Rezeptoren resultierte letztendlich in einer verringerten Anzahl an intrazellulär vorliegenden Bakterien pro Zeiteinheit. Diese Rezeptor-Theorie liefert auch einen möglichen Erklärungsansatz für das verstärkte Auftreten von *Cronobacter*-Infektionen bei Säuglingen und Neugeborenen. Bei dieser Patientengruppe ist die intestinale Permeabilität meist noch sehr hoch (Beach *et al.*, 1982; Rouwet *et al.*, 2002) und die Barrierefunktion der *tight junctions* noch weniger gut ausgeprägt. So könnte sich den Bakterien in Säuglingen die Möglichkeit bieten, sowohl die apikalen als teilweise auch die basolateralen Rezeptoren zu nutzen, was wiederum zu einer höheren intrazellulären Bakterienlast führen würde. Desweiteren sind im Darm von Neugeborenen auch physikalische Abwehrkomponenten, wie der stark saure Magensaft, die Darmperistaltik, die in den Darm abgegebenen proteolytischen Enzyme (Pankreasenzyme, Gallensäuren, Lysozyme) und die bakterizide Zusammensetzung des Intestinalmukus noch weniger gut ausgeprägt als dies bei älteren Kindern und Adulten der Fall ist (Claud, 2009; Claud & Walker, 2001). Das macht sie anfälliger für die Besiedlung mit Pathogenen, was entweder direkt (z.B. *Salmonella typhimurium*, (Walker, 2000)), oder indirekt durch die Induktion der Einwanderung von Neutrophilen (Claud & Walker, 2001), zu einer Öffnung der *tight junctions* führen kann.

Entsprechend der „Rezeptor-Theorie“ könnten die höheren Invasionsraten von *Csa* 823 im Vergleich zu *Ctu* 3032 damit erklärt werden, dass *Csa* 823 eine größere Affinität zum Wirtszellrezeptor zeigt, als dies bei *Ctu* 3032 der Fall ist. *Csa* 824 ist aufgrund einer veränderten Oberflächenstruktur möglicherweise nicht in der Lage, korrekt an den Rezeptor zu binden und so seine Aufnahme in die Wirtszelle zu induzieren.

3.2. Adhäsion an Enterozyten

Um einen vollständigeren Überblick über das Infektionsverhalten der ausgewählten Stämme in Caco-2 Zellen zu erhalten, wurde neben der Invasions- (2,5 h *post infectionem*) auch die Adhäsionsfähigkeit (30 min p.i.) bestimmt. Diese Versuche wurden ebenfalls sowohl in polarisierten als auch unpolarisierten Caco-2 Zellen durchgeführt. Alle vier untersuchten Stämme, inklusive des mitgeführten Kontrollstamms *E. coli* K12, waren grundsätzlich adhären. Die größte Adhäsionsfähigkeit zeigte *Csa* 823 mit 1,81 % (nicht ausdifferenzierte Zellen) bzw. 0,53 % (ausdifferenzierte Zellen). Im Vergleich hierzu zeigten sich *Ctu* 3032 mit 0,81 % bzw. 0,41 % und der nicht invasive *Csa* 824 mit 0,58 % bzw. 0,42 % deutlich weniger adhären. Aus diesen Daten geht hervor, dass *Csa* 824 nicht nur Defekte im Invasionsvermögen, sondern auch im Adhäsionsvermögen aufweist, wodurch die Hypothese der veränderten Zelloberfläche erneut unterstützt wird. Da es sich bei *Ctu* 3032 um die Spezies *C. turicensis* und bei *Csa* 823 um *C. sakazakii* handelt, ist der Vergleich dieser beiden Stämme schwieriger, jedoch durchaus interessant. Eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit von *Csa* 823 gegenüber *Ctu* 3032 bzgl. Invasivität und Adhäsion wäre, wie bereits erwähnt, eine vermutlich höhere Affinität von *Csa* 823 zum postulierten Wirtszellrezeptor. Auch die deutlich niedrigeren absoluten Adhäsionswerte in ausdifferenzierten Zellen gegenüber nicht ausdifferenzierten Zellen könnten anhand der „Rezeptor-Theorie“, wie bereits in 3.1. beschrieben, erklärt werden.

3.3. Proliferation in Enterozyten

Anders als bei der Adhäsion und Invasion von *Cronobacter* spp. in Caco-2 Zellen unterschieden sich die Proliferationswerte (7 h *post infectionem*) in ausdifferenzierten und nicht ausdifferenzierten Zellen kaum. Dies entspricht der Annahme, dass sich ausdifferenzierte Zellen zwar bezüglich der Organisation ihrer Aktin-Struktur und *tight junctions* unterscheiden (Criss et al., 2001; Desin et al., 2009), nicht aber hinsichtlich ihrer intrazellulären Abwehrmechanismen und physiologischen Gegebenheiten des Cytosols für die Proliferation des Pathogens. Eine Verlängerung der Inkubationszeit in Gegenwart von Gentamycin von 2,5 h auf 7 h ergab für *Csa* 823 keine Steigerung, sondern sogar einen leichten Abfall

der intrazellulären Bakterienzahl. Entweder scheinen die Bakterien sich intrazellulär nicht zu teilen oder aber ihre Teilungsrate liegt leicht unterhalb ihrer Mortalitätsrate. Kim und Loessner (2008) erzielten bei der Untersuchung der Proliferation dreier *C. sakazakii*-Stämme ähnliche Ergebnisse. Anders verhält sich *C. turicensis* 3032: Hier war die Anzahl der intrazellulären Bakterien nach 7 h gegenüber des 2,5 h-Werts deutlich gesunken und lag bei 59 % bzw. 34 %. Dieser Stamm scheint im Vergleich zu *Csa* 823 nicht effektiv intrazellulär zu proliferieren und zeigt in den Adhäsions- und Invasionsanalysen ebenfalls eine deutliche Verminderung der Kolonisationsfähigkeit. Aufgrund der noch sehr wenigen Studien über *C. turicensis* ist es nicht möglich, eine präzise Aussage darüber zu treffen, ob dieses Verhalten typisch für diese Spezies oder eine Besonderheit des untersuchten Stammes ist.

3.4. Bedeutung von OmpA für die Invasion von *Cronobacter* spp.

In der Literatur wird OmpA als wichtiger Virulenzfaktor von *Cronobacter* beschrieben, der eng mit dem Invasionsvermögen der Bakterien verknüpft ist. Laut Mohan Nair und Venkitanarayanan (2007) kommt OmpA bei der Invasion von *C. sakazakii* in INT407 Zellen eine wichtige Rolle zu, da die Invasivität OmpA-negativer Mutanten, verglichen mit der OmpA-positiver Stämme, deutlich reduziert ist. Da es sich bei INT407 Zellen ebenso wie bei Caco-2 Zellen um humane Intestinalzellen handelt, lag eine Untersuchung der in dieser Arbeit verwendeten Stämme auf das Vorhandensein des *ompA*-Gens nahe. Alle 13 untersuchten *Cronobacter*-Stämme erwiesen sich bei der Untersuchung als *ompA*-positiv. Besonders für *Csa* 824 wäre eine Mutation im *ompA*-Gen eine mögliche Erklärung für das nicht vorhandene Invasionsvermögen gewesen. Das sich *Csa* 824 trotz des vorhandenen *ompA*-Gens als nicht invasiv präsentiert, kann als Zeichen dafür gewertet werden, dass neben OmpA noch andere Faktoren bei der Invasion von *Cronobacter* spp. in Darmepithelien eine entscheidende Rolle spielen.

3.5. Bedeutung des Zytoskeletts für die Invasion von *Cronobacter* spp.

Für die Invasion von *Cronobacter* spp. ist ein intaktes Wirtszell-Zytoskelett von großer Bedeutung. Sowohl funktionsfähige Mikrotubuli als auch ein intaktes Aktinskelett spielen bei der Invasion von *Cronobacter* spp. in Darmepithelzellen eine wichtige Rolle (Kim & Loessner, 2008; Mohan Nair & Venkitanarayanan, 2007). Doch während Mohan Nair und Venkitanarayanan (2007) beim Einsatz des f-Aktin-Inhibitors Cytochalasin D in INT407-Zellen eine Reduktion der Invasivität von *Cronobacter* spp. nachweisen konnten, berichten Kim und Loessner (2008) bei ihren Versuchen in Caco-2 Zellen von einer Steigerung der Invasivität aufgrund der Zerstörung von *tight junctions*. Die durchgeführten Versuche mit *Csa* 823, *Csa* 824, *Ctu* 3032 und der Negativkontrolle *E. coli* K12 bestätigen die Ergebnisse von Kim und Loessner (2008). Bei den beiden invasiven Stämmen kam es zu einer massiven Erhöhung der Invasivität, die in ausdifferenzierten Zellen noch deutlicher ausfiel als in nicht ausdifferenzierten. Dies kann aufgrund der Zerstörung der *tight junctions* durch CyD als weiterer Hinweis auf das Vorliegen des oben beschriebenen, postulierten Wirtsrezeptors gedeutet werden. Möglicherweise wird der Wirtszellrezeptor im Verlauf der Ausdifferenzierung der Caco-2 Zellen vorrangig in die basolaterale Membran eingebaut, so dass in ausdifferenzierten Zellen basolateral eine hohe Rezeptordichte vorliegt, welche nach Zerstörung der *tight junctions* durch CyD den Bakterien zur Verfügung steht. Auch die widersprüchlichen Ergebnisse von Kim und Loessner (2008) und Mohan Nair und Venkitanarayanan (2007) bezüglich der Wirkung von Cytochalasin D lassen sich mit Hilfe dieser „Rezeptor-Theorie“ erklären. Möglicherweise verfügen nur Caco-2 Zellen, nicht aber INT407 Zellen, in basolateraler Lokalisation über den postulierten Rezeptor. Ohne basolateral gelegene *Cronobacter*-Rezeptoren hätte die Öffnung der *tight junctions* durch Cytochalasin D keinen Einfluss auf die Invasion. In diesem Fall käme bei INT407 Zellen nur die Depolarisation des Aktins durch CyD zum Tragen, welche hemmend auf die Invasion von *Cronobacter* einwirkt. Diese Invasionshemmung ist zwar auch bei den Versuchen in Caco-2 Zellen vorhanden, wird jedoch laut Kim und Loessner (2008) vom Effekt der massiven Steigerung der Invasion durch die Öffnung der *tight junctions* überlagert.

Vergleicht man die prozentualen Invasionssteigerungen von *Csa* 823 und *Ctu* 3032 nach Cytochalasin D Gabe, so fallen diese bei *Csa* 823 deutlich höher aus. Dies unterstreicht nochmals die möglicherweise höhere Rezeptoraffinität von *Csa* 823 gegenüber *Ctu* 3032.

Bei *Csa* 824 führte der Einsatz von Cytochalasin D nicht zu einer Erhöhung sondern zu einer Senkung der Invasionsrate. Da allerdings auch die ausschließlich mit DMSO behandelte Kontrollgruppe eine geringere Invasionsrate zeigten als die unbehandelte Gruppe, ist dieser Effekt möglicherweise auf die allgemeine Verschlechterung der Invasionsbedingungen aufgrund des, wenn auch in der eingesetzten Konzentration minimalen, zytotoxischen Effekts von DMSO und weniger auf die Wirkung von Cytochalasin D auf die Aktinstrukturen und die *tight junctions*, zurückzuführen. Diese These wird von den Ergebnissen der Negativkontrolle *E. coli* K12 gestützt. Hier bewirkt sowohl die Zugabe von Cytochalasin D als auch die von DMSO allein in ausdifferenzierten Zellen eine Reduktion der intrazellulär nachweisbaren Bakterien. Eine Öffnung der *tight junctions* und die damit verbundene Freilegung von potentiellen Rezeptoren führt bei *Csa* 824 also nicht zu einer Erhöhung der Invasivität. Dies kann als weiterer Hinweis auf die veränderte Oberflächenstruktur von *Csa* 824 verstanden werden, aufgrund derer eine Bindung an den postulierten Rezeptor verhindert wird.

3.6. Einfluss des monoklonalen Antikörpers 2G4 auf Invasion und Wachstum von *Ctu* 3032

Neben Cytochalasin D wurde auch der am Institut hergestellte, spezifisch gegen den *Cronobacter turicensis* 3032 gerichtete, monoklonale IgG Antikörper 2G4 auf seine Wirkung auf die Bakterieninvasion hin untersucht. Weiterführende Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich bei dem Antigen um das Lipopolysaccharid handelt, sind jedoch noch nicht abgeschlossen. Die Untersuchungen in der Zellkultur zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion der Invasivität von *Ctu* 3032 sowohl in ausdifferenzierten als auch in nicht ausdifferenzierten Caco-2 Zellen. Die Invasivitätsrate sank dabei um bis zu 95 % bei einer Antikörperkonzentration von 20µg/ml. Diese Invasionshemmung ist möglicherweise auf die Anlagerung des Antikörpers an die

Bakterienoberfläche zurückzuführen, durch welche spezifische Bindungsstellen des Bakteriums für die Wirtszellmembran blockiert werden. Zusätzlich wurde durch die Zugabe des mAK 2G4 das Wachstum der Bakterien gehemmt. Die gemessene CFU/ml war nach 1,5-stündiger Inkubation bei 4°C bzw. 37°C in den mit mAK 2G4 behandelten Ansätzen deutlich niedriger als in den Kontrollansätzen mit unspezifischem mAK 2A12 oder ohne Antikörper. Auch bei Messungen der OD₆₀₀ (Daten nicht gezeigt) wiesen die mit mAK 2G4 behandelten Ansätze ein wesentlich geringeres Bakterienwachstum auf. Die Anlagerung des Antikörpers an die bakterielle Oberfläche führt eventuell nicht nur zu einer Blockierung der Wirtszellbindungsstellen, sondern verhindert auch die ungestörte Teilung der Bakterien.

3.7. Beobachtungen zur intrazellulären Lage von *Cronobacter* spp.

Neben dem Einsatz in Versuchen zur Invasion wurde der spezifische mAK 2G4 auch genutzt, um weiteren Aufschluss über das intrazelluläre Verhalten von *Cronobacter* spp. zu erhalten. Zwar steht die Invasionsfähigkeit der meisten Stämme von *Cronobacter* in Darmepithelien außer Frage, jedoch ist kaum etwas über das Verhalten und die Lage der Bakterien im Inneren der Wirtszelle bekannt. Mit Hilfe von mAK 2G4 und eines sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers konnte *Ctu* 3032 im Fluoreszenzmikroskop intrazellulär sichtbar gemacht werden. Die fluoreszierenden Bakterien gruppieren sich dabei im Wesentlichen um den Zellkern. Der Hintergrund für die Kern-nahe Lage muss allerdings noch eruiert werden.

4. Einordnung des Isolates *Csa* 824

Csa 824 ist das erste beschriebene klinische Isolat, bei dem keine Invasion in Enterozyten nachgewiesen werden konnte. Folgt man der Annahme, dass es einen bis jetzt noch nicht identifizierten Wirtszellrezeptor für *Cronobacter* gibt, so scheint *Csa* 824 nicht in der Lage zu sein diesen Rezeptor erfolgreich zur Invasion zu nutzen. Was das Adhäsionsvermögen betrifft, band *Csa* 824 zwar deutlich schlechter als *Csa* 823 an die Zellmembran, zeigte aber dennoch mit 0,55 % (nicht ausdifferenzierte Zellen) bzw. 0,42 % (ausdifferenzierte Zellen) ein, wenn auch

schwaches, Anheftungsvermögen, welches insbesondere in ausdifferenzierten Zellen mit dem von *Ctu* 3032 vergleichbar war. Möglicherweise ist also weniger das Bindungsvermögen an den Rezeptor als vielmehr die Induktion der Bakterieninternalisierung bei *Csa* 824 vermindert bzw. defekt.

Leider ist nur bekannt, dass *Csa* 824 im Rahmen eines klinischen Falles in New York aus Spinalflüssigkeit isoliert wurde (Farmer *et al.*, 1980; Iversen *et al.*, 2006; Joseph & Forsythe, 2011), jedoch sind weder Angaben zum Alter des Patienten noch zum Infektionsverlauf verfügbar. Es stellt sich daher die Frage, wie trotz des Wegfallens eines wichtigen Schrittes im vermuteten Infektionsverlauf, nämlich der Invasion in Enterozyten, eine Infektion des Patienten und die Verbreitung der Bakterien bis in die Spinalflüssigkeit möglich war. Geht man davon aus, dass es sich bei dem betroffenen Patienten um einen Patienten aus der größten Risikogruppe, den Säuglingen und Neugeborenen handelt, läge eine mögliche Erklärung in der bei Säuglingen noch nicht vollständig ausgebildeten Darmschranke und den noch nicht vollständig ausgeprägten physikalischen Barrieremechanismen, welche Risikofaktoren für das Eindringen von Pathogenen darstellen (Claud, 2009). Dem entspricht die Beobachtung, dass, ebenso wie bei *Csa* 823 und *Ctu* 3032, die ermittelten Invasionsraten von *Csa* 824 in ausdifferenzierten Zellen, mit stark ausgeprägten *tight junctions* noch niedriger waren als in nicht ausdifferenzierten Zellen (siehe Ergebnisse 3.2.). Jedoch führte eine aktive Öffnung der *tight junctions* durch Cytochalasin D, anders als bei den beiden invasiven Stämmen, nicht zu der erwarteten Erhöhung, sondern zu einer Senkung der Invasionsrate von *Csa* 824 gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Cytochalasin D-Behandlung. Eine noch nicht vollständig ausgebildete Darmschranke scheint im Fall der *Csa* 824 Infektion daher eher nicht der entscheidende Infektionsgrund gewesen zu sein. Jedoch ist auch bekannt, dass die Glykokonjugate an der Oberfläche der Intestinalzellen bei Neugeborenen ein anderes Carbohydrat-Muster aufweisen als bei Adulten. Da diese Glykokonjugate einer Vielzahl von Mikroorganismen als Adhäsionsstellen dienen, ist es möglich, dass Bakterien, und möglicherweise auch *Csa* 824, bei Säuglingen ein gesteigertes Adhäsions- und Invasionsvermögen besitzen (Claud, 2009). Eine weitere Möglichkeit für das Auffinden von *Csa* 824 in der Spinalflüssigkeit wäre das Vorliegen eines alternativen Infektionsweges, welcher ohne die Invasion bzw. Transzytose der Bakterien durch die

Darmepithelien verläuft. Hierfür gibt es allerdings keinerlei Anhaltspunkte, zumal die überwiegende Anzahl der untersuchten Stämme eine Invasionsfähigkeit in Enterozyten zeigt. Zuletzt kann auch die Möglichkeit einer Sekundärkontamination nach oder bei der Probenentnahme nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5. Identifizierung von MHI 968 - *Enterobacter asburiae*

Der anfangs als *C. sakazakii* eingeordnete Stamm MHI 968 erwies sich im Laufe der Untersuchungen als *Enterobacter asburiae*. Die Identifikation erfolgte durch das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim mittels MALDI-TOFF Analyse. Bei *E. asburiae* handelt es sich um Gram-negative Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, welche u.a. eng mit *Enterobacter cloacae*, *Erwinia dissolvens* und *Enterobacter agglomerans* verwandt sind (Brenner *et al.*, 1986). *E. asburiae* konnte sowohl aus Erd- und Wasserproben (Koth *et al.*, 2012) als auch aus einer Vielzahl humaner Quellen (Urin, Respirationstrakt, Stuhl, Wunden, Blut) isoliert werden (Brenner *et al.*, 1986). Seine klinische Bedeutung ist noch unbekannt. In der Literatur existiert nur ein Fallbericht bezüglich einer primären, respiratorischen Infektion durch *E. asburiae* (Koth *et al.*, 2012). Die mit dem *E. asburiae* MHI 968 durchgeführten Untersuchungen charakterisieren ihn mit einer Invasivität von 0,31 % als stark invasiv in Caco-2 Zellen. Außerdem kam es in den Caco-2 Zellen zu einer Aktivierung der MAPK p38, ERK und JNK.

6. Ausblick

In den letzten Jahren wurde auf dem Gebiet der Pathogenitätsfaktoren von *Cronobacter* spp. viel Forschungsarbeit geleistet. Dennoch bleibt noch eine Vielzahl von Fragen zu beantworten, um den Infektionsverlauf und das Krankheitsbild besser zu verstehen. Dazu zählen u. a. der Invasionsmechanismus, die Ausbreitung der Bakterien im Wirtsorganismus sowie die Ausbildung der Krankheitssymptome.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben neue Einblicke in das Infektionsverhalten und die Wirkungsweise des Pathogens, die eine gute Basis für weiterführende

Untersuchungen bilden. Von besonderem Interesse sind dabei die deutlichen Hinweise auf das Vorliegen eines spezifischen Wirtszellrezeptors, welchem bei der Invasion des Bakteriums eine entscheidende Rolle zuzukommen scheint. Auch eine genauere Untersuchung der an der Invasion beteiligten Oberflächenstrukturen von *Cronobacter* spp. steht noch aus. Oberflächenproteine können u. a. der Vermittlung der bakteriellen Konjugation und Virulenz dienen. Hier bietet sich möglicherweise der *C. sakazakii*-Stamm 824 als Negativkontrolle für weiterführende Untersuchungen an, da die Ergebnisse dieser Arbeit auf Mutationen der fraglichen, für die Invasion von *Cronobacter* spp. nötigen Oberflächenstrukturen schließen lassen.

Schließlich wäre hinsichtlich des verwendeten neutralisierenden Antikörpers 2G4 die Identifikation des zugehörigen Antigens interessant, sowie eine genauere Betrachtung der Wirkungsweise des Antikörpers auf das Invasionsverhalten und das Bakterienwachstum.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Cronobacter spp. sind Gram-negative, opportunistisch pathogene Keime, die insbesondere bei Säuglingen und immunsupprimierten Personen schwere Erkrankungen wie Meningitis, Septikämie und nekrotisierende Enterokolitis (NEC) auslösen können.

Im Rahmen dieser Studie wurden 13 sowohl klinische als auch nicht-klinische *Cronobacter*-Isolate ausgewählt und bezüglich ihres PCR-Status für *ompA*, ihrer Fähigkeit zur Enterotoxinbildung sowie ihrer Invasivität und Beeinflussung des *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*-Weges in humanen Epithelzellen (Caco-2) untersucht. Alle untersuchten Stämme waren *ompA* positiv und bildeten keine Enterotoxine. Der *C. sakazakii*-Stamm *Csa* 824 erwies sich jedoch, im Gegensatz zu den anderen überprüften Stämmen, als nicht invasiv und führte nicht zu einer Aktivierung der MAPK p38, JNK und ERK.

Um weiterführende Erkenntnisse über die Infektionsstrategien von *Cronobacter* spp. zu erhalten, wurden *Csa* 824 sowie die beiden bereits Genomsequenzierten Stämme *Csa* 823 und *Ctu* 3032 zur genaueren Charakterisierung ausgewählt. Ihre Fähigkeit zur Adhäsion, Invasion und intrazellulären Proliferation wurde sowohl in ausdifferenzierten als auch in nicht ausdifferenzierten Caco-2 Zellen untersucht. In nicht ausdifferenzierten Zellen betrug die Adhäsionsrate von *Csa* 823 1,8 %, von *Ctu* 3032 0,8 % und von *Csa* 824 0,6 %. Die Invasionsraten in nicht ausdifferenzierten Zellen lagen bei 0,15 % (*Csa* 823), 0,05 % (*Ctu* 3032) und 0,0005 % (*Csa* 824). In ausdifferenzierten Caco-2 Zellen wurden bei allen drei Stämmen deutlich niedrigere Adhäsions- und Invasionsraten ermittelt, welche vermutlich auf einem erschwerten Zugang der Bakterien zu wirtsspezifischen Zelloberflächenrezeptoren in ausdifferenzierten Zellen basieren. Auch Persistenz über einen Zeitraum von sieben Stunden konnte festgestellt werden, jedoch ohne wesentliche Zunahme der Bakterienzahl.

Um die Beteiligung des Zytoskeletts und der *tight junctions* der Wirtszellen an der Invasion zu untersuchen, wurde das Mykotoxin Cytochalasin D eingesetzt. Die Zugabe von Cytochalasin D bewirkte eine Veränderung im Invasionsverhalten der Bakterien: Beruhend auf der Zerstörung der *tight junctions* durch Cytochalasin D

und dem vorrangig basolateralen Einbau des putativen, wirtsspezifischen Rezeptors in Caco-2 Zellen kam es bei den beiden invasiven *Cronobacter*-Stämmen *Csa* 823 und *Ctu* 3032 zu einer Steigerung der Invasionsrate um bis zu 6700 %. In ausdifferenzierten Caco-2 Zellen war eine deutlichere Erhöhung zu beobachten als in nicht ausdifferenzierten Zellen.

Der Einsatz des spezifisch gegen *Ctu* 3032 gerichteten, monoklonalen Antikörpers 2G4 führte zu einem deutlichen, konzentrationsabhängigen Abfall der Invasionsrate von *Ctu* 3032 gegenüber einem nicht mit Antikörper behandelten Ansatz. In *in-vivo* Versuchen konnte eine von der Antikörperkonzentration abhängige Wachstumshemmung der Bakterien beobachtet werden. Mittels Immunfluoreszenz konnte außerdem eine Kern-nahe, intrazelluläre Lage von *Ctu* 3032 ermittelt werden.

Des Weiteren wurde das Verhalten der *Cronobacter*-Stämme in immunkompetenten, professionell phagozytischen Raw-264.7 Zellen untersucht. Hier lag die Invasionsrate von *Csa* 823 bei 9,7 %, von *Ctu* 3032 bei 5,2 % und von *Csa* 824 bei 4,5 %.

Außerdem wurde der Phänotyp von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 sowohl biochemisch als auch im Wachstumstest analysiert. *Csa* 824 zeigte dabei im Vergleich zu den beiden anderen *Cronobacter*-Stämmen eine verlängerte lag-Phase beim Wachstum in Vollmedium. Bei der biochemischen Untersuchung konnten zwischen den drei Stämmen Unterschiede hinsichtlich der Verstoffwechslung von Sorbitol und Inositol festgestellt werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss der drei *Cronobacter*-Stämme auf den MAPK-Weg und die Produktion von *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) in Raw 264.7 und Caco-2 Zellen untersucht. Während in Caco-2 Zellen nur *Csa* 823 und *Ctu* 3032 zu einer Aktivierung der MAPK p38, JNK und ERK führten, zeigten in Raw 264.7 Zellen alle drei Stämme das gleiche Reaktionsmuster: Die Kinasen p38 und JNK wurden aktiviert, während die ERK gehemmt wurde. Desweiteren führte die Exposition von Raw 264.7 Zellen gegenüber *Cronobacter* spp. zu einem deutlichen Anstieg der iNOS-Produktion, wohingegen bei Caco-2 Zellen kein solcher Anstieg erkennbar war.

VII. SUMMARY

Characterization of the process of infection of *Cronobacter* spp. and its effect on host-specific intracellular signaling pathways

Cronobacter species are Gram-negative, opportunistic pathogens that cause severe infections like meningitis, septicaemia and necrotizing enterocolitis, predominantly in newborns and immunocompromised persons.

In this study, 13 *Cronobacter* spp. isolates, both clinical and non-clinical, were selected and examined towards their PCR-status for *ompA*, their ability to produce enterotoxins and their invasiveness and influence on the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in human epithelial cells (Caco-2). All strains tested were *ompA* positive and did not produce enterotoxins. In contrast to all other strains examined, *C. sakazakii* Csa 824 was non-invasive and did not lead to an activation of the MAPK p38, JNK and ERK.

To obtain further information about the infection strategies of *Cronobacter* spp., Csa 824 and the two genome-sequenced strains Csa 823 and Ctu 3032 were selected for a more detailed characterization. Their abilities for adhesion, invasion and intracellular proliferation were examined both in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. In undifferentiated cells, the adhesion efficiency was 1.8 % for Csa 823, 0.8 % for Ctu 3032 and 0.6 % for Csa 824, while the invasion efficiency was 0.15 % (Csa 823), 0.05 % (Ctu 3032) and 0.0005 % (Csa 824). In differentiated cells, all three strains showed considerably lower adhesion and invasion efficiencies, presumably based on a limited access of the bacteria to host-specific cell surface receptors in differentiated cells. Bacterial persistence could be detected in both cell types over a period of seven hours; however, there was no increase in the intracellular number of bacteria.

To investigate the role of the cytoskeleton and the tight junctions of the host cell in the invasion process of Caco-2 cells, the mycotoxin Cytochalasin D was used. Presumably based on the disruption of tight junctions by Cytochalasin D and the predominantly basolateral installation of the putative, host-specific receptor in Caco-2 cells, the invasion efficiencies of the two invasive *Cronobacter* spp. strains Csa 823 and Ctu 3032 increased up to 6700 %. The increase was higher in

differentiated than in non-differentiated cells.

When treating Caco-2 cells with a specific monoclonal antibody (2G4), the invasion efficiency of *Ctu 3032* decreased considerably, in a concentration-dependent manner. In in-vivo experiments an inhibition of the bacterial growth could be observed, which as well depended on the antibody-concentration. By immunofluorescence, the intracellular location of *Ctu 3032* near the cell core could be determined.

Furthermore, the behavior of *Csa 823*, *Csa 824* and *Ctu 3032* was examined in immunocompetent, professional phagocytic Raw 264.7 cells. In those cells the invasion efficiency after 2.5 h was 9.7 % for *Csa 823*, 5.2 % for *Ctu 3032* and 4.5 % for *Csa 824*.

Additionally, the phenotypes of *Csa 823*, *Csa 824* and *Ctu 3032* were studied by growth assays as well as biochemical tests. Compared to the other strains, *Csa 824* showed an extended lag-phase during growth in LB-medium. Besides, there were differences in the metabolism of sorbitol and inositol between the strains.

Last but not least, the effect of *Csa 823*, *Csa 824* and *Ctu 3032* on the MAPK pathway and production of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was reviewed in Raw 264.7 and Caco-2 cells. In Caco-2 cells only *Csa 823* and *Ctu 3032* led to an activation of the MAPK p38, JNK and ERK, while in Raw 264.7 cells all three strains showed the same reaction pattern: the kinases p38 and JNK were activated and ERK was inhibited. The exposure of Raw 264.7 cells to *Cronobacter* spp. provoked the induction of iNOS, while there was no detectible effect on iNOS production in Caco-2 cells.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Avruch J. (2007):

MAP kinase pathways: the first twenty years.

Biochim Biophys Acta **1773**, 1150-1160.

Baumgartner A., Grand M., Liniger M., Iversen C. (2009):

Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula.

Int J Food Microbiol. **136**, 189-192.

Beach R.C., Menzies I.S., Clayden G.S., Scopes J.W. (1982):

Gastrointestinal permeability changes in the preterm neonate.

Arch Dis Child **57**, 141-145.

Biering G., Karlsson S., Clark N.C., Jonsdottir K.E., Ludvigsson P., Steingrimsdottir O. (1989):

Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk.

J Clin Microbiol. **27**, 2054-2056.

Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., et al. (1997):

The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.

Science **277**, 1453-1462.

Bowen A.B., Braden C.R. (2006):

Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants.

Emerg Infect Dis. **12**, 1185-1189.

Brenner D.J., McWhorter A.C., Kai A., Steigerwalt A.G., Farmer J.J., 3rd (1986):

Enterobacter asburiae sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov.

J Clin Microbiol. **23**, 1114-1120.

Carranza P., Hartmann I., Lehner A., Stephan R., Gehrig P., Grossmann J., Barkow-Oesterreicher S., Roschitzki B., et al. (2009):

Proteomic profiling of *Cronobacter turicensis* 3032, a food-borne opportunistic pathogen.

Proteomics **9**, 3564-3579.

Castellani A., Chalmers, A. J. (1919):

Manual of tropical medicine Vol 3,

William Wood and Company, New York

Centers for Disease C., Prevention (2002):

Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula--Tennessee, 2001.

MMWR Morb Mortal Wkly Rep **51**, 297-300.

Chokshi N.K., Guner Y.S., Hunter C.J., Upperman J.S., Grishin A., Ford H.R. (2008):

The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis.

Semin Perinatol **32**, 92-99.

Citi S. (1993):

The molecular organization of tight junctions.

J Cell Biol. **121**, 485-489.

Claud E.C. (2009):

Neonatal necrotizing enterocolitis - inflammation and intestinal immaturity.

Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem **8**, 248-259.

Claud E.C., Walker W.A. (2001):

Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis.

Faseb J **15**, 1398-1403.

Criss A.K., Ahlgren D.M., Jou T.S., McCormick B.A., Casanova J.E. (2001):

The GTPase Rac1 selectively regulates *Salmonella* invasion at the apical plasma membrane of polarized epithelial cells.

J Cell Sci **114**, 1331-1341.

Crown E.D. (2012):

The role of mitogen activated protein kinase signaling in microglia and neurons in the initiation and maintenance of chronic pain.

Exp Neurol. **234**, 330-339.

Cuevas B.D., Abell A.N., Johnson G.L. (2007):

Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration.

Oncogene **26**, 3159-3171.

Desin T.S., Lam P.K., Koch B., Mickael C., Berberov E., Wisner A.L., Townsend H.G., Potter A.A., et al. (2009):

Salmonella enterica serovar Enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens.

Infect Immun **77**, 2866-2875.

Drudy D., Mullane N.R., Quinn T., Wall P.G., Fanning S. (2006):

Enterobacter sakazakii: An emerging pathogen in powdered infant formula.

Clin Infect Dis. **42**, 996-1002.

Edelson-Mammel S.G., Buchanan R.L. (2004):

Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula.

J Food Prot. **67**, 60-63.

Emami C.N., Mittal R., Wang L., Ford H.R., Prasadarao N.V. (2011):

Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*.

J Immunol. **186**, 7067-7079.

Farber J.M., Forsythe, A. (2008):

Enterobacter sakazakii,

ASM Press, Washington

Farmer J.J., Asbury M.A., Hickman F.W., Brenner D.J. (1980):

Enterobacter sakazakii: A new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens.

Int J Syst Evol Microbiol. **30**, 569-584.

Finlay B.B., Ruschkowski S., Dedhar S. (1991):

Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells.

J Cell Sci **99** (Pt 2), 283-296.

Ford H., Watkins S., Reblock K., Rowe M. (1997):

The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis.

J Pediatr Surg. **32**, 275-282.

Franco Pagotto R.L., Karine Hébert, Min Lin, Luciana Esper and Jeffrey M. Farber (2009):

Development of a non-primate animal model for *Cronobacter* species.

1st International Conference on *Cronobacter* (University College Dublin, Ireland), Poster Abstract 37.

Galanos C., Freudenberg M.A. (1993):

Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action.

Mediators Inflamm. **2**, S11-S16.

Giri C.P., Shima K., Tall B.D., Curtis S., Sathyamoorthy V., Hanisch B., Kim K.S., Kopecko D.J. (2012):

Cronobacter spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) invade and translocate across both cultured human intestinal epithelial cells and human brain microvascular endothelial cells.

Microb Pathog **52**, 140-147.

Hamby S.E., Joseph S., Forsythe S.J., Chuzhanova N. (2011):

In silico identification of pathogenic strains of *Cronobacter* from biochemical data reveals association of inositol fermentation with pathogenicity.

Bmc Microbiol **11**, 204.

Hamilton J.V., Lehane M.J., Braig H.R. (2003):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*.

Emerg Infect Dis. **9**, 1355-1356.

Hayward R.D., Koronakiss V. (2002):

Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins.

Trends Cell Biol. **12**, 15-20.

Himelright I., Harris E., Lorch V., Anderson M., Jones T., Craig A., Kuehnert M., Forster T., et al. (2002):

Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula - Tennessee, 2001 (Reprinted from MMWR, vol 51, pg 297-300, 2002).

Jama-J Am Med Assoz **287**, 2204-2205.

Hommes D.W., Peppelenbosch M.P., van Deventer S.J.H. (2003):

Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets.

Gut **52**, 144-151.

Huang S.-H., Chen Y.-H., Fu Q., Stins M., Wang Y., Wass C., Kim K.S. (1999):

Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells.

Infect Immun. **67**, 2103-2109.

Hunter C.J., Singamsetty V.K., Chokshi N.K., Boyle P., Camerini V., Grishin A.V., Upperman J.S., Ford H.R., et al. (2008):

Enterobacter sakazakii enhances epithelial cell injury by inducing apoptosis in a rat model of necrotizing enterocolitis.

J Infect Dis **198**, 586-593.

Hunter C.J., Williams M., Petrosyan M., Guner Y., Mittal R., Mock D., Upperman J.S., Ford H.R., et al. (2009):

Lactobacillus bulgaricus prevents intestinal epithelial cell injury caused by *Enterobacter sakazakii*-induced nitric oxide both in vitro and in the newborn rat model of necrotizing enterocolitis.

Infect Immun. **77**, 1031-1043.

Iversen C., Forsythe S. (2004):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products.

Food Microbiol. **21**, 771-777.

Iversen C., Lane M., Forsythe S.J. (2004):

The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk.

Lett Appl Microbiol. **38**, 378-382.

Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., et al. (2007):

The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies I*.

BMC Evol Biol. **7**, 1442-1447.

Iversen C., Mullane N., McCardel B., Tal B.D., Lehner A., Fannin S., Stephan R., Joosten H. (2008):

Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen nov, comb nov, *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies 1*, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.

Int J Syst Evol Microbiol. **58**, 1442-1447.

Iversen C., Waddington M., Farmer J.J., 3rd, Forsythe S.J. (2006):

The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes.

Bmc Microbiol **6**, 94.

Jeffrey K.L., Camps M., Rommel C., Mackay C.R. (2007):

Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses.

Nat Rev Drug Discov **6**, 391-403.

Johnson G.L., Dohlman H.G., Graves L.M. (2005):

MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression.

Curr Opin Chem Biol **9**, 325-331.

Joseph S., Cetinkaya E., Drahovska H., Levican A., Figueras M.J., Forsythe S.J. (2012):

Cronobacter condimenti sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients.

Int J Syst Evol Microbiol **62**, 1277-1283.

Joseph S., Forsythe S.J. (2011):

Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections.

Emerg Infect Dis. **17**, 1713-1715.

Junttila M.R., Li S.P., Westermarck J. (2008):

Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival.

FASEB J **22**, 954-965.

Kandhai M.C., Reij M.W., Gorris L.G.M., Guillaume-Gentil O., van Schothorst M. (2004):

Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households.

Lancet **363**, 39-40.

Kim K., Kim K.-P., Choi J., Lim J.-A., Lee J., Hwang S., Ryu S. (2010):

Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*.

Appl Environ Microbiol. **76**, 5188-5198.

Kim K.P., Loessner M.J. (2008):

Enterobacter sakazakii invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction.

Infect Immun. **76**, 562-570.

Koth K., Boniface J., Chance E.A., Hanes M.C. (2012):

Enterobacter asburiae and *Aeromonas hydrophila*: soft tissue infection requiring debridement.

Orthopedics **35**, e996-999.

Krishnan S., Prasadarao N.V. (2012):

Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections.

Febs J **279**, 919-931.

Kucerova E., Clifton S.W., Xia X.-Q., Long F., Porwollik S., Fulton L., Fronick C., Minx P., et al. (2010):

Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species.

Plos One **5**, A51-A60.

Kucerova E., Joseph S., Forsythe S. (2011):

The *Cronobacter* genus: ubiquity and diversity.

QAS **3**, 104-122.

Kuzina L.V., Peloquin J.J., Vacek D.C., Miller T.A. (2001):

Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae).

Curr Microbiol. **42**, 290-294.

Lai K.K. (2001):

Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults - Case reports and a review of the literature.

Medicine **80**, 113-122.

Leclercq A., Wanegue C., Baylac P. (2002):

Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods.

Appl Environ Microbiol. **68**, 1631-1638.

Lee H.-A., Hong S., Park H., Kim H., Kim O. (2011):

Cronobacter sakazakii infection induced fatal clinical sequels including meningitis in neonatal ICR mice.

Lab Anim Res. **27**, 59-62.

Loeser R.F., Erickson E.A., Long D.L. (2008):

Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis.

Curr Opin Rheumatol **20**, 581-586.

MacLean L.L., Pagotto F., Farber J.M., Perry M.B. (2009):

The structure of the O-antigen in the endotoxin of the emerging food pathogen *Cronobacter* (*Enterobacter*) *muytjensii* strain 3270.

Carbohydr Res. **344**, 667-671.

Malladi V., Puthenedam M., Williams P., Balakrishnan A. (2004):

Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce iNOS by activation of NF-kappaB and MAP kinases.

Inflamm. **28**, 345-353.

Malladi V., Shankar B., Williams P.H., Balakrishnan A. (2004):

Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce changes in cadherin junctions of Caco-2 cells through activation of PKCalpha.

Microbes Infect **6**, 38-50.

Mange J.-P., Stephan R., Borel N., Wild P., Kim K.S., Pospischil A., Lehner A. (2006):

Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells.

Bmc Microbiol **6**, 58.

Masaki H., Asoh N., Tao M., Ikeda H., Degawa S., Matsumoto K., Inokuchi K., Watanabe K., et al. (2001):

Detection of Gram-negative bacteria in patients and hospital environment at a room in geriatric wards under the infection control against MRSA.

Kansenshogaku zasshi **75**, 144-150.

Mittal R., Bulgheresi S., Emami C., Prasadarao N.V. (2009a):

Enterobacter sakazakii targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs.

J Immunol. **183**, 6588-6599.

Mittal R., Wang Y., Hunter C.J., Gonzalez-Gomez I., Prasad Rao N.V. (2009b):

Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A.

Lab Invest **89**, 263-277.

Miyoshi J., Takai Y. (2005):

Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity.

Adv Drug Deliv Rev **57**, 815-855.

Mohan Nair M.K., Venkitanarayanan K. (2007):

Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*.

Pediatr Res. **62**, 664-669.

Mohan Nair M.K., Venkitanarayanan K.S. (2006):

Cloning and sequencing of the ompA gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula.

Appl Environ Microbiol. **72**, 2539-2546.

Munson G.P., Lam D.L., Outten F.W., O'Halloran T.V. (2000):

Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12.

J Bacteriol. **182**, 5864-5871.

Muytjens H.L., Roelofswillemse H., Jaspas G.H.J. (1988):

Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*.

J Clin Microbiol. **26**, 743-746.

Nazarowec-White M., Farber J.M. (1997a):

Enterobacter sakazakii: A review.

Int J Food Microbiol. **34**, 103-113.

Nazarowec-White M., Farber J.M. (1997b):

Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula.

Lett Appl Microbiol. **24**, 9-13.

Oelschlaeger T.A., Guerry P., Kopecko D.J. (1993):

Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*.

Proc Natl Acad Sci U S A. **90**, 6884-6888.

Pagotto F.J., Farber J.M. (2009):

Cronobacter spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada.

Int J Food Microbiol. **136**, 238-245.

Pagotto F.J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J.M. (2003):

Enterobacter sakazakii: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo.

J Food Prot. **66**, 370-375.

Parker C.D., Armstrong S.K. (1988):

Surface proteins of *Bordetella pertussis*.

Rev Infect Dis **10 Suppl 2**, S327-330.

Raghav M., Aggarwal P.K. (2007):

Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin.

Can J Microbiol **53**, 750-755.

Richardson A.N., Lambert S., Smith M.A. (2009):

Neonatal mice as models for *Cronobacter sakazakii* infection in infants.

J Food Prot. **72**, 2363-2367.

Robinson M.J., Cobb M.H. (1997):

Mitogen-activated protein kinase pathways.

Curr Opin Cell Biol. **9**, 180-186.

Rouwet E.V., Heineman E., Buurman W.A., ter Riet G., Ramsay G., Blanco C.E. (2002):

Intestinal permeability and carrier-mediated monosaccharide absorption in preterm neonates during the early postnatal period.

Pediatr Res **51**, 64-70.

Schaeffer H.J., Weber M.J. (1999):

Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers.

Mol Cell Biol. **19**, 2435-2444.

Schreider C., Peignon G., Thenet S., Chambaz J., Pinçon-Raymond M. (2002):

Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin-actin complexes.

J Cell Sci **115**, 543-552.

See K.C., Than H.A., Tang T. (2007):

Enterobacter sakazakii bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report.

Age and Ageing **36**, 595-596.

Singamsetty V.K., Wang Y., Shimada H., Prasadarao N.V. (2008):

Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion.

Microb Pathog **45**, 181-191.

Sivamaruthi B.S., Ganguli A., Kumar M., Bhaviya S., Pandian S.K., Balamurugan K. (2011):

Caenorhabditis elegans as a model for studying *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 pathogenesis.

J Basic Microbiol. **51**, 540-549.

Stephan R., Lehner A., Tischler P., Rattei T. (2011):

Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates.

J Bacteriol. **193**, 309-310.

Takeuchi A. (1967):

Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*.

Am J Pathol **50**, 109-136.

Townsend S., Hurrell E., Forsythe S. (2008):

Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak.

Bmc Microbiol **8**, 64.

Urmenyi A.M., Franklin A.W. (1961):

Neonatal death from pigmented coliform infection.

Lancet **1**, 313-315.

Walker W.A. (2000):

Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense.

J Pediatr Gastroenterol Nutr. **30**, S2-S7.

Wang Y., Kim K.S. (2002):

Role of OmpA and IbeB in *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo.

Pediatr Res **51**, 559-563.

Witthöft T., Eckmann L., Kim J.M., Kagnoff M.F. (1998):

Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **275**, G564-G571.

World Health Organization (2008):

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula:
meeting report,

Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome

IX. ANHANG

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Stellung von *Cronobacter* spp.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien und -lösungen.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete PCR- Primer.

Tabelle 7: Einordnung der 13 untersuchten *Cronobacter*-Stämme sowie der als Kontrollen dienenden *E. coli* K12- und *E. asburiae* 968-Stämme bezüglich ihrer Invasivität in Caco-2 Zellen.

Tabelle 8: Ergebnisse des Enterotubes für *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032.

Tabelle 9: Ergebnisse des Api 20 für *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032.

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei wichtigsten MAPK-Signaltransduktionswege (aus Hommes *et al.* (2003)).

Abbildung 2: Prozentuale Darstellung der Invasivität in Caco-2 Zellen von 13 untersuchten *Cronobacter*-Stämmen sowie den als Kontrollen dienenden *E. coli* K12- und *E. asburiae* 968-Stämmen.

Abbildung 3: Nachweis von *ompA* in *Cronobacter*-Stämmen mittels PCR. Als Negativkontrolle diente der *E. asburiae*-Stamm 968.

Abbildung 4: Western Blots zum Nachweis der Induktion der MAPK in Caco-2 Zellen durch 13 *Cronobacter*-Stämme sowie den *E. asburiae*-Stamm 968

mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Abbildung 5: Vergleich des Wachstums von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 auf PC-Agar. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

Abbildung 6: Vergleich des Wachstums von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 auf ESIA-Agar. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

Abbildung 7: Vergleich des Wachstums von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 auf Standard II -Agar. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

Abbildung 8: Wachstumsverhalten von *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 in LB-Medium. Die dargestellten Werte stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 9: Adhäsionsverhalten von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 10: Invasionsverhalten von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 11: Proliferationsverhalten von *Csa* 823 und *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 12: Intrazelluläre Vermehrung von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Raw 264.7 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 13: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Csa* 823, *Ctu* 3032, *Csa* 824 und dem Kontrollstamm *E. coli* K12 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 14: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Csa* 823 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (823) in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 15: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Ctu* 3032 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (3032) in Caco-2 Zellen.

Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 16: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *Csa* 824 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (824) in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 17: Wirkung von Cytochalasin D auf das Invasionsverhalten von *E. coli* K12 im Vergleich zum unbehandelten Ansatz (K12) in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 18: Wirkung des spezifischen mAK 2G4 auf das Invasionsverhalten von *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 19: Wirkung des spezifischen mAK 2G4 auf das Wachstum von *Ctu* 3032 bei 4°C bzw. 37°C für 1,5 h. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahme von *Ctu* 3032 in Caco-2 Zellen.

A-C: *Cronobacter turicensis* 3032 in Caco-2 Zellen, nach Behandlung mit mAK 2G4

D: Negativkontrolle 1: nicht infizierte Caco-2 Zellen, nach Behandlung mit mAK 2G4

E: Negativkontrolle 2: *Cronobacter turicensis* 3032 in Caco-2 Zellen, nach Behandlung mit mAK 2A12

Abbildung 21: Western Blots zum Nachweis der Induktion der MAPK in Caco-2 Zellen durch *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Abbildung 22: Western Blots zum Nachweis des zeitlichen Verlaufs der Induktion der MAPK in Caco-2 Zellen durch *Csa* 823 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Abbildung 23: Western Blots zum Nachweis der Induktion der MAPK in Raw 264.7 Zellen durch *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Abbildung 24: Western Blots zum Nachweis der iNOS-Induktion in Caco-2 Zellen durch *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 mittels spezifischer Antikörper. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Abbildung 25: Western Blots zum Nachweis der iNOS-Induktion in Raw 264.7 Zellen durch *Csa* 823, *Csa* 824 und *Ctu* 3032 mittels spezifischer Antikörper. Als Positivkontrolle dienten mit LPS behandelte Zellen. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

Abbildung 26: Western Blots zum zeitlichen Verlauf der iNOS-Induktion in Raw 264.7 Zellen durch *Csa* 823 mittels spezifischer Antikörper. Als Positivkontrolle dienten mit LPS behandelte Zellen. Zur Kontrolle der Proteinkonzentration wurde in den Proben die Menge an GAPDH detektiert. Als Negativkontrolle diente reines Zellkulturmedium.

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Kristina Schauer für die wirklich großartige Betreuung. Ihre kompetente und unermüdliche Unterstützung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Vielen Dank Kristina!

Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Ein besonderes Dankeschön geht an Anna, Fabian und Uta. Danke für die ausdauernde moralische Unterstützung, viele schöne Mittagspausen und die stets gefüllte „Hamsterkiste“.

Mein größter Dank geht an meine Eltern und meine Geschwister Silke und Fabian für die langjährige und liebevolle Unterstützung während meines Studiums und meiner Dissertation. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Peter für seinen unermüdlichen Einsatz beim Korrekturlesen, sein Durchhaltevermögen beim Motivieren und für die aufgebrauchte Geduld während der letzten zwei Jahre.