

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

**Enterotoxinproduktion von *Bacillus cereus*
unter simulierten intestinalen Bedingungen**

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

vorgelegt von
Ann-Katrin Mohr
aus Bingen am Rhein

2015

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dipl. ECAR J. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dipl. ECPHM M. Ritzmann

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meiner Familie

I	EINLEITUNG	1
II	SCHRIFTTUM	3
	1. Allgemeines	3
	2. Pathogene Relevanz von <i>B. cereus</i>	4
	3. Toxine enteropathogener <i>B. cereus</i>	6
	3.1 Hämolysin BL	7
	3.2 Nicht-hämolytisches Enterotoxin	8
	3.3 Cytotoxin K	9
	3.4 Regulation der Enterotoxinexpression	10
	3.5 Sekretion der Enterotoxine	11
	4. Simulation gastrointestinaler Bedingungen	12
III	MATERIAL UND METHODEN	14
	1. Material	14
	1.1 Chemikalien	14
	1.2 Nährmedien	15
	1.3 Lösungen und Puffer	16
	1.4 Immunreagenzien	17
	1.5 Verbrauchsmaterialien	18
	1.6 Geräte	18
	1.7 Software	19
	1.8 Sonstiges	19
	1.9 Zelllinien	19
	2. Methoden	20
	2.1 Kultivierung von <i>B. cereus</i>	20
	2.2 Gewinnung von Zellextrakt	21
	2.3 Enzymimmunassays	22
	2.4 Zellkulturtests	23

3. <i>B. cereus</i> Stammset.....	24
IV ERGEBNISSE	27
1. Analyse von Wachstumsverlauf, Toxinproduktion und Zytotoxizität von zwei <i>B. cereus</i> Referenzstämmen unter Laborbedingungen mit schrittweiser Annäherung an simulierte darmähnliche Bedingungen	27
1.1 Wachstum.....	28
1.2 Toxinproduktion.....	29
1.3 Zytotoxizität	34
2. Vergleichende Analyse von 19 <i>B. cereus</i> Stämmen in Bezug auf Wachstumsverlauf, Toxinproduktion und Zytotoxizität unter Labor- und unter simulierten intestinalen Bedingungen.....	36
2.1 Wachstum.....	36
2.2 Toxinproduktion.....	40
2.3 Zytotoxizität	44
3. Untersuchungen zur Proteinsekretion.....	49
3.1 Vergleich der extra- und intrazellulären Enterotoxintiter	49
3.2 Vergleich der extra- und intrazellulären Enterotoxintiter nach Zugabe von Natriumazid.....	51
V DISKUSSION.....	53
VI ZUSAMMENFASSUNG	62
VII SUMMARY.....	64
VIII LITERATURVERZEICHNIS	65

Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CGY	<i>casein-glucose-yeast</i> , Casein-Glucose-Hefe
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CytK	Cytotoxin K
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> , Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EIA	Enzymimmunoassay
EU	Europäische Union
FEA	Flagellen-Exportapparat
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
HBL	Hämolysin BL
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
KbE	Koloniebildende Einheiten
mAk	Monoklonaler Antikörper
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
Nhe	Nicht-hämolytisches Enterotoxin
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PI	Propidiumiodid
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SGF	<i>simulated gastric fluid</i>
SIF	<i>simulated intestinal fluid</i>
spp.	species pluralis
TMB	Tetramethylbenzidin
WST	<i>water-soluble tetrazolium salt</i> , wasserlösliches Tetrazoliumsalz

I EINLEITUNG

Bacillus cereus gilt als einer der wichtigsten Verursacher von Lebensmittelvergiftungen. Nach dem deutschen Infektionsschutzgesetz sind *B. cereus* bedingte Lebensmittelvergiftungen nicht meldepflichtig. Zudem äußern sie sich meist in milden Verläufen und bleiben daher oft unentdeckt. Aus diesen Gründen existieren wenig Daten zu lebensmittelbedingten *B. cereus* Krankheitsausbrüchen. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) konnte 2011 220 Ausbrüche innerhalb der EU registrieren (EFSA, 2013). Im Jahr 2012 konnte *B. cereus* in Deutschland in 4,8% der an das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gemeldeten lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüche als Auslöser identifiziert werden und war damit der vierthäufigste Erreger (BfR, 2013).

Die mit der Fähigkeit zur Sporenbildung einhergehende Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen und die weite Verbreitung in der Umwelt erleichtern eine Kontamination von Lebensmitteln und erhöhen das Risiko einer anschließenden Lebensmittelvergiftung (Stenfors Arnesen et al., 2008). Daneben spielt *B. cereus* durch seine proteo- und lipolytischen Eigenschaften eine wichtige Rolle als Verderbserreger in der Lebensmittelindustrie (Andersson et al., 1995).

Bei *B. cereus* bedingten Lebensmittelvergiftungen werden eine Diarrhoe- und eine emetische Form unterschieden. Enteropathogene *B. cereus* Stämme produzieren Enterotoxine im Dünndarm des Menschen nach dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel, wodurch bei den betroffenen Personen Durchfälle verursacht werden. Emetische Stämme hingegen produzieren das hitzestabile emetische Toxin Cereulid, welches präformiert im Lebensmittel vorliegt und nach dem Verzehr Erbrechen auslöst (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Die für die Enterotoxine kodierenden Gene können sowohl in mit Lebensmitteln als auch in mit Krankheitsausbrüchen assoziierten Stämmen nachgewiesen werden (Guinebretière et al., 2002; Moravek et al., 2006), weswegen ein alleiniger Nachweis der Toxingene keinen Hinweis auf das Toxizitätspotentials eines *B. cereus* Isolats geben kann. Außerdem ist die produzierte Enterotoxinmenge stammabhängig (Moravek et al., 2006).

Bei Untersuchungen zur Pathogenität einer größeren Stammauswahl wurden die Charakterisierungen der *B. cereus* Stämme häufig unter standardisierten Laborbedingungen vorgenommen (Moravek et al., 2006; Kamar et al., 2013). Andere Untersuchungen zeigen aber auf, dass veränderte Kultivierungsbedingungen Einfluss auf die Toxinproduktionsraten der einzelnen Stämmen nehmen können (Duport et al., 2004; Ouhib-Jacobs et al., 2009).

Da die Enterotoxine erst im Dünndarm des Menschen von vegetativen Bakterienzellen gebildet werden und anschließend eine Diarrhoe auslösen, sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen einer Kultivierung unter simulierten intestinalen Bedingungen auf Wachstum, Enterotoxinproduktion und Toxizität untersucht werden. Dazu wurde ein ausgewähltes *B. cereus* Stammset ausführlich charakterisiert und vergleichend unter simulierten intestinalen und Standard-Laborbedingungen untersucht.

Diese Arbeit wurde durch das IGF-Forschungsvorhaben 17506 N der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

II SCHRIFTTUM

1. Allgemeines

B. cereus ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, bewegliches, fakultativ anaerobes, sporenbildendes Bakterium, das in der Umwelt weit verbreitet ist. *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto*) bildet zusammen mit *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* und der neu definierten Spezies *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretière et al., 2013) die *B. cereus* Gruppe (*B. cereus sensu lato*). Innerhalb der *B. cereus* Gruppe lassen sich die genetisch eng miteinander verwandten Spezies anhand der von Granum (2007) beschriebenen Merkmale unterscheiden.

Tabelle 1. Kriterien zur Speziesdifferenzierung innerhalb der *B. cereus* Gruppe modifiziert nach Granum (2007).

Spezies	Kolonie- morphologie	Hämolyse	Beweglichkeit	Penicillin- Empfindlichkeit	Parasporale Kristalle
<i>B. cereus</i>	weiß	+	+	-	-
<i>B. anthracis</i>	weiß	-	-	+	-
<i>B. thuringiensis</i>	weiß/grau	+	+	-	+
<i>B. mycoides</i>	rhizoid	(+)	-	-	-
<i>B. weihenstephanensis</i>	Abgrenzung zu <i>B. cereus</i> : Wachstum bei < 7 °C, kein Wachstum bei 43 °C; Identifizierung mittels PCR (rRNA oder Kälteschock-Protein-A-Gen <i>cspA</i>) (Lechner et al., 1998).				
<i>B. pseudomycoides</i>	Unterscheidung von <i>B. mycoides</i> nur anhand des Fettsäuremusters und der 16S rRNA-Sequenz (Nakamura, 1998).				
<i>B. cytotoxicus</i>	Abgrenzung zur <i>B. cereus</i> Gruppe: thermotolerant, Wachstum auch bei 50 °C; Identifizierung anhand der 16S rRNA-Sequenz und des <i>cytKI</i> -Gens (Guinebretière et al., 2013).				

Mithilfe von molekularbiologischen Methoden wie des *Multilocus Sequence Typing* (MLST), das auf der Sequenzanalyse von *housekeeping* Genen beruht, lässt sich die genetisch eng verwandte *B. cereus* Gruppe aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in drei *Clades* einteilen. In *Clade I* finden sich *B. anthracis*, emetische und nicht emetische *B. cereus* und wenige *B. thuringiensis*, in *Clade II* nicht emetische *B. cereus* und überwiegend *B. thuringiensis* und in *Clade III* *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis* (Didelot et al., 2009). Eine andere Studie nahm anhand der phylogenetischen Verwandtschaft mithilfe von

genetischen und phänotypischen Kriterien eine Einteilung der *B. cereus* Gruppe in sieben (Unter-) Gruppen vor, die jeweils ein bestimmtes Temperaturoptimum haben (Guinebretière et al., 2008). Eine Untersuchung von Guinebretière et al. (2010) zur zytotoxischen Aktivität von Kulturüberständen von *B. spp.* aus der *B. cereus* Gruppe legte sogar nahe, dass die Zugehörigkeit zu einer dieser Gruppen mehr über das Pathogenitätspotentials eines Isolats aussagt, als die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Spezies.

2. Pathogene Relevanz von *B. cereus*

B. cereus ist in Böden und der Umwelt weit verbreitet (von Stetten et al., 1999). Außerdem stellt der Verdauungstrakt wirbelloser Tiere ein natürliches Habitat dar (Jensen et al., 2003). Das Bakterium besitzt die Fähigkeit, widerstandsfähige Endosporen auszubilden, die seine Überlebensfähigkeit auch unter widrigen Umständen garantieren, und ist somit resistent gegenüber Umwelteinflüssen wie Trockenheit, Hitze und Strahlung (Nicholson et al., 2000). In dieser Dauerform kann *B. cereus* leicht verbreitet werden und unter verbesserten Umweltbedingungen wieder auskeimen. Diese Umstände erleichtern einen Eintrag von *B. cereus* in die Lebensmittelkette (Stenfors Arnesen et al., 2008). Die Fähigkeit, Biofilme auszubilden, erschwert Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen nach Eintrag in einen Lebensmittel verarbeitenden Betrieb (Peng et al., 2002; Ryu & Beuchat, 2005; Wijman et al., 2007; Karunakaran & Biggs, 2011; Nam et al., 2014). Hier spielt *B. cereus* nicht nur als mögliches Pathogen eine wichtige Rolle, sondern durch seine proteo- und lipolytischen Eigenschaften auch als Verderbserreger (Andersson et al., 1995).

B. cereus wird in der Diagnostik häufig in Lebensmitteln nachgewiesen. Untersuchungen von Becker et al. (1994) ermittelten in 54% der untersuchten Proben aus der Produktgruppe Milchtrockenprodukte und Säuglingsnahrung eine Kontamination mit *B. cereus*. Choma et al. (2000) konnten in 20% von untersuchten hitzebehandelten Gemüsepürees *B. cereus* nachweisen.

Trotz der Häufigkeit des Nachweises von *B. cereus* in Lebensmitteln wird von lebensmittelbedingten *B. cereus* Krankheitsausbrüchen seltener berichtet. Dies liegt zum einen an der meist kurzen Krankheitsdauer und milden Verlaufsform von *B. cereus* bedingten Lebensmittelvergiftungen, weswegen betroffene Personen selten einen Arzt aufsuchen.

Außerdem kann die emetische Form als *Staphylococcus aureus* Intoxikation fehldiagnostiziert werden. Die Diarrhoe-Form ähnelt sehr einer Lebensmittelinfektion durch *Clostridium perfringens* Typ A (Stenfors Arnesen et al., 2008). Zum anderen sind *B. cereus* bedingte Lebensmittelvergiftungen nach dem deutschen Infektionsschutzgesetz nicht meldepflichtig und werden daher nicht an das Robert-Koch-Institut übermittelt. In einer Statistik der EFSA (2013) wurden für das Jahr 2011 220 lebensmittelbedingte *B. cereus* Krankheitsausbrüche in der EU registriert, dies entsprach einem Anstieg um 122% gegenüber dem Vorjahr und 3,9% aller lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüche. In Deutschland wurden für das Jahr 2012 vier *B. cereus* Krankheitsausbrüche von insgesamt 84 (4,8%) lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen an das BfR übermittelt, das eine Statistik zu an Krankheitsausbrüchen beteiligten Lebensmitteln erhebt. *B. cereus* war damit der vierthäufigste Erreger (BfR, 2013).

B. cereus ist der Verursacher zweier Formen von Lebensmittelvergiftungen. Die emetische Form, die durch die Leitsymptome Vomitus und Nausea gekennzeichnet ist, wird 0,5 bis 6 Stunden nach dem Verzehr mit emetischem Toxin (Cereulid) kontaminierter Lebensmittel ausgelöst und entspricht somit einer Lebensmittelintoxikation. Die Symptome klingen in der Regel nach 6 bis 24 Stunden wieder ab. Es werden vermutlich 10^3 - 10^5 KbE/g Lebensmittel benötigt, um eine ausreichend hohe Menge an Cereulid zu produzieren und eine Erkrankung auszulösen (8-10 µg Cereulid/kg Körpergewicht in Tierversuchsmodellen (Agata et al., 1995; Shinagawa et al., 1995)). Das dann präformiert im Lebensmittel vorliegende Cereulid ist hitze-, säure- und proteolysebeständig und kann nicht durch eine erneute Hitzebehandlung der Speisen, sowie während der Magenpassage durch den niedrigen pH oder die körpereigenen proteolytischen Enzyme im Dünndarm inaktiviert werden (Ehling-Schulz et al., 2004; Stenfors Arnesen et al., 2008). Lebensmittel, die am häufigsten mit einer *B. cereus* Lebensmittelintoxikation in Verbindung gebracht werden, sind stärkereiche Lebensmittel wie Reis, Teigwaren und Gebäck (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Die Diarrhoe-Form ist durch profuse, wässrige Durchfälle gekennzeichnet, die mit Bauchkrämpfen und gelegentlich Nausea einhergehen. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 8 bis 16 Stunden. Die Krankheitsdauer beläuft sich in den meisten Fällen auf 12 bis 24 Stunden. Die für die Symptome verantwortlichen Enterotoxine werden im Dünndarm durch vegetative *B. cereus* Zellen gebildet, die als solche oder als Sporen den Magen mit der aufgenommenen Nahrung passiert haben. Die Diarrhoe-Form entspricht somit einer Lebensmittelinfektion (Stenfors Arnesen et al., 2008; Logan, 2012). Bereits im Lebensmittel

vorliegende Enterotoxine sind nicht von Bedeutung, da diese hitze- und säurelabil und empfindlich gegenüber Proteasen sind (Ceuppens et al., 2012a). Nach bisher registrierten und untersuchten lebensmittelbedingten *B. cereus* Ausbrüchen liegt die infektiöse Dosis in den meisten Fällen bei 10^4 - 10^9 KBE/g Lebensmittel, wobei auch Ausbrüche mit niedrigeren Zellzahlen bekannt sind (EFSA, 2005; Logan, 2012) und Pielaat et al. (2006) schon 10^3 KBE/g Lebensmittel als kritisch befinden. Eine Infektion ist auch abhängig von der Art und der Menge des verzehrten Nahrungsmittels (Clavel et al., 2004), mit dem *B. cereus* Zellen bzw. Sporen aufgenommen werden. Außerdem sind Sporen während der Verdauung widerstandsfähiger als vegetative Zellen, weswegen weniger für eine Infektion ausreichend sein können (Stenfors Arnesen et al., 2008; Logan, 2012). Am häufigsten werden proteinreiche Lebensmittel aber auch Gemüse und verarbeitete Lebensmittel wie Suppen, Saucen und Puddings in den Zusammenhang mit einer *B. cereus* Lebensmittelinfektion gebracht (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Neben den beiden Formen gastrointestinaler Erkrankungen ist *B. cereus* auch in der Lage extraintestinale Erkrankungen hervorzurufen. Neben systemischen Infektionen wie Septikämien, Endokarditiden und Infektionen des Respirationstrakts sowie des zentralen Nervensystems ist dieses opportunistische Bakterium auch Verursacher von lokalen Hautinfektionen, v.a. postoperativ, nach Verbrennungen und äußerlichen Traumata, und von Endophthalmitiden (Drobniewski, 1993; Kotiranta et al., 2000; Bottone, 2010).

3. Toxine enteropathogener *B. cereus*

Heute stehen als Auslöser der Symptome einer *B. cereus* Lebensmittelinfektion die im Dünndarm gebildeten, porenformenden Enterotoxine fest. Hierbei unterscheiden sich die beiden aus drei Einzelkomponenten bestehenden Enterotoxinkomplexe Hämolyysin BL (HBL) (Beecher & Macmillan, 1991) und Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) (Lund & Granum, 1996) von dem aus einer Komponente bestehenden Enterotoxin Cytotoxin K (CytK) (Lund et al., 2000).

Jeder isolierte *B. cereus* Stamm ist Träger mindestens eines der bekannten Enterotoxingene. Die Toxinproduktion aber ist stammabhängig, weshalb der alleinige Gennachweis mittels PCR nicht zur Bestätigung des toxischen Potentials ausreicht. Nahezu 100% der untersuchten

B. cereus Isolate tragen die für Nhe kodierenden Gene. In weniger als 50% der Isolate sind die *hbl*-Gene vorhanden, wobei die Prävalenz unter Stämmen, die im Zusammenhang mit lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen stehen, steigt (Guinebretière et al., 2002; Moravek et al., 2006). Moravek et al. (2006) zeigten, dass die zytotoxische Aktivität eines Stammes stark mit der Konzentration des produzierten NheB korreliert. Bisher sind nur wenige Stämme bekannt, die das für CytK1 kodierende Gen tragen. Diese werden als eigene Spezies *B. cytotoxicus* geführt (Guinebretière et al., 2013).

Neben den bereits erwähnten Enterotoxinen werden weitere mögliche Virulenzfaktoren diskutiert. In einer von Clair et al. (2010) durchgeführten Sekretomstudie in der frühen Wachstumsphase des *B. cereus* Typstamms ATCC 14579 wurden 57 Virulenz-assoziierte Proteine, 31 davon das erste Mal überhaupt, im Sekretom gefunden. Unter diesen fanden sich Toxine und mutmaßliche Toxine, Abbauenzyme wie Proteasen, Adhäsine und Flagellenkomponenten. Innerhalb der Gruppe der Toxine fand sich neben CytK und den jeweils drei Komponenten der beiden Enterotoxinkomplexe HBL und Nhe auch die mutmaßlich vierte Komponente des HBL-Enterotoxinkomplexes HBL B'. Außerdem wurden Hämolyysin II (HlyII), Enterotoxin FM (EntFM) und drei neue mutmaßliche Enterotoxine EntA, EntB und EntC erstmals im Sekretom nachgewiesen. Cadot et al. (2010) untersuchten die Prävalenz und die Expression der Gene dreier möglicher Virulenzfaktoren, den beiden Metalloproteasen *InhA1* und *NprA* und des Hämolyisins HlyII in pathogenen und nicht pathogenen *B. cereus* Stämmen. Dabei wiesen sie die *inhA1*- und *nprA*-Gene in allen untersuchten Stämmen nach, wohingegen sich *hlyII* nur in pathogenen Stämmen nachweisen ließ. Die mittels qRT-PCR gemessenen Expressionslevel von *inhA1* und *nprA* waren in pathogenen Stämmen höher als in nicht pathogenen. Doll et al. (2013) zeigten, dass die *B. cereus* Sphingomyelinase in Zusammenarbeit mit Nhe signifikant zur Zytotoxizität und Pathogenität beiträgt.

3.1 Hämolyysin BL

Der hämolytische Drei-Komponenten-Enterotoxinkomplex HBL wird aus den drei Einzelproteinen HBL L2 (44,8 kDa), HBL L1 (39,5 kDa) und HBL B (38,1 kDa) gebildet (Beecher & Macmillan, 1991; Beecher & Wong, 2000). Erstmals beschrieben wurde HBL in dem heutigen *B. cereus* Referenzstamm F837/76 (Beecher & Macmillan, 1990), der

ursprünglich aus einer postoperativen Wunde isoliert worden war (Turnbull et al., 1979). Die Enteropathogenität von HBL wurde durch die Steigerung der vaskulären Permeabilität in der Haut von Kaninchen (Beecher & Macmillan, 1991) und den Darmschlingenligationstest bestätigt (Beecher et al., 1995). HBL ist zytotoxisch gegenüber Verozellen (Lund & Granum, 1997), dermonekrotisch (Beecher & Wong, 1994) und bildet typische ringförmige Hämolysezonen auf Schafblutagar aus (Beecher & Macmillan, 1990). Zur maximalen biologischen Aktivität sind alle drei Komponenten notwendig (Beecher et al., 1995).

Durch Immunfluoreszenzfärbungen von Erythrozyten wurde HBL B zunächst als Bindungskomponente des Enterotoxinkomplexes und HBL L1 und L2 als Lysekomponenten postuliert (Beecher & Macmillan, 1991). Durch spätere Untersuchungen kamen Beecher & Wong (1997) zu der Annahme, dass die drei Komponenten HBL L2, HBL L1 und HBL B unabhängig voneinander an Erythrozyten binden können und gemeinsam vermutlich in einem Membranangriffskomplex zusammenfinden, der nach Ausbildung transmembranärer Poren zur osmotischen Zelllyse führt. Sastalla et al. (2013) hingegen zeigten, dass HBL B als einzige Komponente an die Membran eukaryotischer Zielzellen binden kann und dass wiederum nur HBL L1 an HBL B bindet. HBL L2 folgt als dritte Komponente, was dann zur Zelllyse führt. Somit führt eine feste Bindungsreihenfolge der drei Komponenten HBL B, HBL L1 und HBL L2 zu einer transmembranären Pore und zum anschließenden Zelltod durch osmotische Lyse.

Die drei für HBL kodierenden Gene *hblC* (HBL L2), *hblD* (HBL L1) und *hblA* (HBL B) sind chromosomal auf einem gemeinsamen Operon organisiert und werden in eine polycistronische mRNA transkribiert (Heinrichs et al., 1993; Ryan et al., 1997).

3.2 Nicht-hämolytisches Enterotoxin

Nach einer Lebensmittelinfektion in Norwegen 1995 wurde erstmals ein enteropathogener *B. cereus* Stamm isoliert, für den kein HBL nachzuweisen war. Aus dem heutigen *B. cereus* Referenzstamm NVH 0075-95 konnte der Drei-Komponenten-Enterotoxinkomplex Nhe isoliert werden, der sich zunächst als nicht hämolytisch wirksam zeigte (Lund & Granum, 1996). Granum et al. (1999) klärten auf, dass sich Nhe aus den drei Proteinen NheA (41 kDa), NheB (39,8 kDa) und NheC (36,5 kDa) zusammensetzt, die von den gleichnamigen Genen

nheA, *nheB* und *nheC* chromosomal kodiert werden und sich auf einem Operon befinden. Bei der Gensequenzanalyse der beiden Enterotoxine Nhe und HBL zeigten sich Ähnlichkeiten zwischen *nheA* und *hblC*, *nheB* und *hblD* und *nheC* und *hblA*. Auch die aus der Gensequenz abgeleitete Proteinstruktur wies Ähnlichkeiten der entsprechenden Proteine auf.

Damit Nhe biologisch aktiv ist, wird jedes der drei Proteine benötigt (Lindbäck et al., 2004). Nhe erwies sich als hämolytisch wirksam, zytotoxisch und fähig, Poren in Lipiddoppelschichten auszubilden (Fagerlund et al., 2008). Für maximale Zytotoxizität auf Verozellen ist ein Komponentenverhältnis von 10:10:1 (NheA:NheB:NheC) notwendig (Lindbäck et al., 2004). Die zytotoxische Aktivität durch Ausbildung von Poren in Membranen eukaryotischer Zellen führt zur osmotischen Zelllyse (Fagerlund et al., 2008).

Lindbäck et al. (2010) zeigten, dass NheC und NheB fähig sind, direkt an die Oberfläche eukaryotischer Zellen zu binden, während NheA diese Fähigkeit fehlt. In Versuchen zur Nhe-induzierten Zytotoxizität konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Bindungsreihenfolge der Proteine erforderlich ist, wobei im ersten Schritt NheC und im letzten Schritt NheA obligatorisch ist, um Zytotoxizität auszubilden (Lindbäck et al., 2010; Didier et al., 2012). Heilkenbrinker et al. (2013) legten dar, dass die Ausbildung eines stabilen Komplexes zwischen NheC und NheB notwendig ist, um gemeinsam an die Zielzelle zu binden und toxisch gegenüber Verozellen zu sein. Im aktuellen Modell zum Wirkungsmechanismus von Nhe unter natürlichen Bedingungen wird angenommen, dass NheC und NheB zunächst stabile Komplexe bilden, bevor sie gemeinsam als Komplex an die eukaryotische Zelloberfläche binden. Durch darauf folgende Konformationsänderungen bindet weiteres freies NheB an den Komplex, wodurch eine ringförmige Struktur ausgebildet wird. Im Folgenden kann NheA an das zellgebundene NheB binden und dadurch die transmembranäre Pore komplettieren.

3.3 Cytotoxin K

CytK wurde erstmals 1998 nach einem Lebensmittelvergiftungsfall in einem Altenheim in Frankreich aus einem *B. cereus* Stamm (NVH 391-98) isoliert, bei dem 44 Menschen an Durchfällen erkrankten. Sechs der erkrankten Personen zeigten blutige Durchfälle, drei von ihnen starben. Für diesen Stamm konnten zunächst weder *hbl* noch *nhe* nachgewiesen werden. Die Aminosäuresequenz des isolierten 34 kDa schweren Proteins CytK zeigte Ähnlichkeiten

zu den Leukozidinen von *S. aureus*, zu dessen α - und γ -Hämolysin, zum β -Toxin von *C. perfringens* und zu HlyII von *B. cereus*, die zur Familie der β -barrel channel-forming toxins zählen (Menestrina et al., 2001; Ramarao & Sanchis, 2013; Popoff, 2014). CytK erwies sich als zytotoxisch, hämolytisch, dermonekrotisch und als fähig eine nekrotische Enteritis auszulösen. In der Promotorregion des *cytK*-Gens wurde eine Erkennungsstelle für den PlcR-Regulator gefunden (Lund et al., 2000). Außerdem zeigte sich, dass CytK fähig ist, Poren in Lipiddoppelschichten zu bilden (Hardy et al., 2001). Fagerlund et al. (2004) konnten eine zweite Variante des *cytK*-Gens (*cytK2*) nachweisen. Das CytK2-Protein erwies sich zwar ebenfalls als hämolytisch, zytotoxisch und porenbildend in Lipiddoppelschichten, die toxische Aktivität war aber gegenüber der Variante CytK1 des Typstamms NVH 391-98 um 80% reduziert. Während *cytK1* nur sehr selten auftritt, lässt sich *cytK2* in vielen *B. cereus* Stämmen nachweisen (Guinebretière et al., 2006). Später zeigte sich, dass *cytK1*-positive Stämme eine *nhe*-Genvariante tragen (Fagerlund et al., 2007).

Guinebretière et al. (2013) definierten *cytK1*-positive Stämme als *B. cytotoxicus*, als eigenständige Spezies innerhalb der *B. cereus* Gruppe. Die 16S rRNA Gensequenzanalyse zeigte eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu Stämmen der *B. cereus* Gruppe, innerhalb dieser bildeten die untersuchten *B. cytotoxicus* Stämme aber ein eigenes Cluster. *B. cytotoxicus* ist thermotolerant (Wachstum zwischen 20 und 50 °C) und grenzt sich dadurch zu anderen Spezies der *B. cereus* Gruppe ab. Tryptophan ist zum Wachstum essentiell, die Fähigkeit zur Stärkehydrolyse fehlt, die Voges-Proskauer-Reaktion fällt schwach positiv aus. Zum Zeitpunkt der Speziesdefinition waren nur fünf Stämme mit dem *cytK1*-Gen bekannt. Contzen et al. (2014) fanden hingegen bereits in 35% von 151 untersuchten Kartoffelprodukten *B. cytotoxicus*.

3.4 Regulation der Enterotoxinexpression

Die Enterotoxinexpression und die damit verbundene toxische Aktivität von *B. cereus* wird von den umgebenden Umweltfaktoren beeinflusst und mitreguliert. Temperatur, pH, Sauerstoffgehalt und -reduktionspotential, Nährstoffvorkommen wie Art und Menge der verfügbaren Kohlenstoffquelle nehmen hier maßgeblich Einfluss (Sutherland & Limond, 1993; Dupont et al., 2004; Ouhib et al., 2006; Zigha et al., 2006; Ouhib-Jacobs et al., 2009; Ceuppens et al., 2011). Redoxregulatoren sind das aus zwei Komponenten bestehende ResDE

(Duport et al., 2006) und Fnr (Zigha et al., 2007). Die durch das Vorhandensein von Glucose ausgelöste Katabolitrepression wird durch das Katabolit-Kontrollprotein A (CcpA) vermittelt und vermindert die Enterotoxinexpression (van der Voort et al., 2009).

Die meisten *B. cereus* Virulenzgene, unter anderem das *hbl*- und *nhe*-Operon und *cytK*, gehören einem durch den Aktivator PlcR kontrollierten Regulon an. Das Protein PlcR ist Teil eines *Quorum sensing* Systems, das abhängig von der Zelldichte die Expression der Virulenzgene reguliert (Gohar et al., 2008). Dabei wird PlcR vom autoinduzierten Peptid PapR aktiviert, das die Bindung von PlcR an die palindrome PlcR-Box vor den Zielgenen erleichtert und dadurch deren Transkription aktiviert (Agaisse et al., 1999; Slamti & Lereclus, 2002; Grenha et al., 2013). PlcR ist positiv autoreguliert (Lereclus et al., 1996) und wird vom Transkriptionsregulator Spo0A gehemmt (Lereclus et al., 2000).

3.5 Sekretion der Enterotoxine

Fagerlund et al. (2010) postulierten, dass die *B. cereus* Enterotoxine HBL, Nhe und CytK über den Sec-Translokationsweg sekretiert werden. Der Sec-Translokationsweg setzt sich zusammen aus dem Proteinkomplex SecYEG, der einen transmembranären Kanal bildet, und der ATPase SecA. Bei allen HBL- und Nhe-Komponenten und bei CytK wurden N-terminal Sec-typische Signalpeptide gefunden, die sich durch einen positiv geladenen N-Terminus, einen folgenden hydrophoben Abschnitt und eine anschließende Spaltungsstelle für die Signalpeptidase auszeichnen und nach erfolgter Proteintranslokation extrazellulär abgespalten werden (Tjalsma et al., 2004). Wurde die Signalpeptidsequenz von HBL B verändert, so wurde das HBL B Protein nicht mehr sekretiert und konnte im Zellpellet nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte reduzierte Sekretion und intrazelluläre Akkumulation der Enterotoxine nach Zugabe von Natriumazid, einem Inhibitor von SecA festgestellt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die HBL B Sekretion nicht vom Flagellen-Exportapparat (FEA) abhängig ist. Zwar waren Toxinexpression und Zytotoxizität in einem Stamm mit fehlerhaftem FEA reduziert, die Sekretion von überexprimiertem HBL B war davon aber nicht betroffen (Fagerlund et al., 2010). Vörös et al. (2014) zeigten außerdem, dass ebenfalls der Proteinkomplex SecDF an einer erfolgreichen Translokation der Enterotoxine beteiligt ist.

4. Simulation gastrointestinaler Bedingungen

Zum Verhalten und Überleben von *B. cereus* Sporen bzw. vegetativen Zellen nach Verzehr eines kontaminierten Lebensmittels im menschlichen Gastrointestinaltrakt wurden mehrere Studien durchgeführt, in denen gastrointestinale Bedingungen simuliert wurden. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf Überlebensfähigkeit, Auskeimung und Wachstum von *B. cereus* unter gastrointestinalen Bedingungen und nicht auf den Nachweis gebildeter Enterotoxine gelegt.

Wilcks et al. (2006) untersuchten das Überleben und die Auswirkung von *B. cereus* Sporen und vegetativen Zellen in Ratten mit menschlicher Darmflora. In den Faeces der Tiere, die vegetativen Zellen ausgesetzt worden waren, konnte *B. cereus* in der Regel nicht nachgewiesen werden, wohingegen Sporen die Magenpassage überlebten und über einen längeren Zeitraum nachweisbar waren, was auf eine zeitweilige Adhäsion hindeutete. Außerdem konnte eine Veränderung in der Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora beobachtet werden. Enterotoxine ließen sich in den Faeces nicht detektieren.

Clavel et al. (2004) untersuchten das Überleben von *B. cereus* Sporen und vegetativen Zellen in saurem Medium mit beigemischter Nahrung, den menschlichen Magen imitierend. Dabei zeigte sich, dass *B. cereus* Sporen besonders säurestabil und relativ unabhängig von der Art des umgebenden Lebensmittels waren, wohingegen vegetative Zellen sehr empfindlich auf niedrige pH-Werte reagierten, wobei bestimmte Lebensmittel ab einem gewissen pH-Wert einen protektiven Effekt ausübten. Somit ist eine mögliche Lebensmittelinfektion von der Art der aufgenommenen *B. cereus* Zellen (Sporen oder vegetativ), der Art des verzehrten Lebensmittels und der Magensäuerung abhängig. Bei einer simulierten Magen-Darm-Passage (Überführung von saurem Medium mit beigemischter Nahrung in simuliertes Darmmedium mit porciner Galle) waren Überleben, Wachstum und HBL-Produktion von vegetativen Zellen von der Gallekonzentration und ebenfalls von der Art des umgebenden Lebensmittels abhängig (Clavel et al., 2007).

Ceuppens et al. (2012d) bestätigten die Säureunempfindlichkeit von Sporen und die Säureempfindlichkeit von vegetativen Zellen unter Magensimulation. Während der durchgeführten Duodenumsimulation (intestinales Simulationsmedium mit Zusatz von Verdauungsenzymen und Galle) überlebten Sporen und vegetative Zellen und vermehrten

sich sogar. Während der Ileumsimulation überlebten nur die Sporen. Die gleichzeitig inkubierten humanen Darmbakterien verhinderten deren Auskeimung und Wachstum. Später wurde eine Passage des oberen Gastrointestinaltrakts mit den fünf Phasen Mund, Magen, Duodenum, Rückresorption der Galle und Ileum simuliert. Bis zur duodenalen Phase blieben die Sporen unbeeinflusst und konnten am Ende dieser Phase auskeimen. Das Wachstum wurde während der ilealen Phase durch die beigefügte intestinale Keimflora verhindert. *B. cereus* Sporen überlebten am Ende die gastrointestinale Passage. Enterotoxinproduktion konnte nicht festgestellt werden (Ceuppens et al., 2012b). In einem ähnlichen Experiment mit vegetativen Zellen stellte sich heraus, dass die vegetativen Zellen trotz der hohen Inokulumskonzentration die gastrointestinale Passage nicht überlebten, die ausgebildeten Sporen hingegen schon (Ceuppens et al., 2012c).

Wurde die Überlebensfähigkeit und Auskeimung von Sporen mesophiler und psychrotropher Stämme in *simulated gastric fluid* (SGF), in *simulated intestinal fluid* (SIF) und unter Simulation der gastrointestinalen Passage (Transfer von SGF in SIF) untersucht, so zeigte sich, dass in SGF keine relevante Inaktivierung der Sporen stattfand, in SIF die meisten Stämme auskeimen konnten, aber dass Sporen mesophiler Stämme bei Simulation der gastrointestinalen Passage besser auskeimten und schneller wuchsen als Stämme psychrotropher Stämme (Wijnands et al., 2006). Später bestimmten Wijnands et al. (2009) Inaktivierungsraten von vegetativen Zellen mesophiler und psychrotropher Stämme in SGF und fanden heraus, dass diese die Magenpassage in Anteilen überleben könnten und zwar abhängig von der Wachstumsphase bei Aufnahme und dem Alter des Konsumenten, das auch die Magensäuerung mitbestimmt.

Wijnands et al. (2007) konnten zeigen, dass die Sporenauskeimung von Komponenten ausdifferenzierter CaCo-2-Zellen im Gegensatz zu Hep-2-Zellen induziert wird, die unempfindlich gegenüber Proteaseaktivität und hitzestabil sind. Hornstra et al. (2009) konnten mit GerI und GerL zwei Auskeimungsrezeptoren identifizieren, die möglicherweise in die durch CaCo-2-Zellen induzierte Sporenauskeimung involviert sind.

III MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma-Aldrich, T2885)

Aceton (Sigma-Aldrich, 32201)

Ammoniumsulfat (Sigma-Aldrich, 31119)

Casein Natriumsalz aus Kuhmilch (Sigma-Aldrich, C8654)

Caseinhydrolysat (Merck, 1.02245.0500)

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11644807001)

Citronensäure-Monohydrat (Sigma-Aldrich, 33114)

cOmplete Mini Protease Inhibitor (Roche, 04693124001)

D-(+)-Glucose-Monohydrat (Sigma-Aldrich, 16301)

Dikaliumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, 60356)

Dinatriumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, 71640)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma-Aldrich, E1644)

Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, S 0115)

Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)

Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, 60220)

Kaliumhydroxid-Lösung (Sigma-Aldrich, Fluka, 35113)

Lysozym (Merck, 1.052.810.001)

Magnesiumsulfat Heptahydrat (Sigma-Aldrich, 63138)

MEM Earle's (Biochrom AG, FG 0325)

Methanol (Sigma-Aldrich, 34860)

Natriumazid (Sigma-Aldrich, 13412)

Natriumbicarbonat (Riedel-de Haën, 31437)

Natriumcarbonat (Riedel-de Haën, 31432)

Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, 31434)

Natriumcitrat-Dihydrat (Sigma-Aldrich, S4641)

Natrium-Pyruvat (Biochrom AG, L 0473)

Natriumhydroxid-Lösung (Fluka, 35256)

Paraffinöl (Sigma-Aldrich, 18512)
PBS Dulbecco (Biochrom AG, L 1825)
Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, A 2212)
Propidiumiodid (Fluka, 81845)
RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, FG 1215)
Schwefelsäure (Roth, X945.1)
Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503)
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, T3924)
Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)
Wasserstoffperoxid 35% (Merck 8600)

1.2 Nährmedien

1.2.1 Feste Nährmedien

Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid, PB5039A)

1.2.2 Flüssige Nährmedien für die Anzucht von *B. cereus*

Casein-Glucose-Hefe-Vollmedium 20 g Caseinhydrolysat
Nach Beecher & Wong (1994) 6 g Hefeextrakt
2 g Ammoniumsulfat
14 g Dikaliumhydrogenphosphat
6 g Kaliumdihydrogenphosphat
1 g Natriumcitrat
2 g Magnesiumsulfat

Nach Einwaage der Chemikalien wurde mit Aqua dest. auf 950 ml aufgefüllt und bei 120 °C für 20 min autoklaviert. Zuletzt wurden 50 ml steriler 20%iger Glucose zugegeben, um eine Endkonzentration von 1% Glucose zu erhalten.

Konditioniertes RPMI 1640 Medium

Zur Herstellung von konditioniertem RPMI 1640 Medium wurden CaCo-2-Zellen, 2,1 Mio. Zellen pro 80 cm² Zellkulturflasche, über 14 d ausdifferenziert. Der Mediumwechsel erfolgte

zweimal wöchentlich. 22 h vor Versuchsbeginn wurde den CaCo-2-Zellen 45 ml RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 0,8% Glucose und 2% Caseinhydrolysat, zugegeben. Nach 22 h Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

1.2.3 Flüssige Nährmedien für die Zellkultur

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien

Zelllinie	Zellmedium	Supplementierung
CaCo-2	RPMI 1640	+ 10% FCS
Vero	MEM Earle's	+ 1% FCS + 1% Natrium-Pyruvat + 0,2% Penicillin/Streptomycin

1.3 Lösungen und Puffer

1.3.1 Enzymimmunoassays (EIAs)

Bicarbonatpuffer: 15 mmol/l Na₂CO₃, 35 mmol/l NaHCO₃; pH 9,6

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

Citratpuffer: 210 mmol/l Citronensäure-Monohydrat,
pH 3,95 (1 mol/l KOH),
336 µl 35% H₂O₂

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS):

116 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Na₂HPO₄, 3 mmol/l KH₂PO₄,
pH 7,3

Schwefelsäure: 1 mol/l

Substrat/Chromogenlösung: 5% (v/v) TMB-Lösung in Citratpuffer

TMB-Lösung: 252 mg TMB, 5 ml Aceton, 45 ml Methanol

Tween 20 in PBS: 0,5% (v/v) Tween 20 in PBS

Waschlösung für EIA: 146 mmol/l NaCl, 0,025% (v/v) Tween 20

1.3.2 Herstellung von Gesamt-Zellextrakt

EDTA-Lösung:	100 mmol/l
Lysepuffer:	20 ml Proteinpuffer, 0,5 ml cOmplete Mini, 10 µg/ml Lysozym
Natronlauge:	10 mmol/l
Proteinpuffer:	100 mmol/l Trizma Base, 200 mol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA; pH 8

1.4 Immunreagenzien

1.4.1 Monoklonale Antikörper

Die in Tabelle 3 aufgeführten monoklonalen Antikörper (mAk) wurden am Lehrstuhl entwickelt (Dietrich et al., 1999; Dietrich et al., 2005).

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper

Toxinkomplex	Komponente	mAk
HBL	HBL B	HT-L1 II mAk 1B8
	HBL L1	HT-L1 II mAk 1E9
	HBL L2	B. cer 45 I mAk 1A12
		B. cer 45 I mAk 8B12
		B. cer 45 I mAk 8B12-HRP
Nhe	NheB	B. cer 39 II mAk 2B11
		B. cer 45 kD III mAk 1E11
		B. cer 45 kD III mAk 1E11-HRP

1.4.2 Polyklonale Antiseren

Kaninchen-Anti-Maus Immunglobuline-HRP (Dako, P0161)

1.5 Verbrauchsmaterialien

Cryotubes 1,8 ml, 4,5 ml (Thermo Fisher, 375418, 379146)
 Deckgläschen
 Einmalspritzen 5 ml, 20 ml (Braun, 4606051V, 4606205V)
 Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, 0030 120.086, 0030 120.086)
 Mikrotiterplatten, 96 Loch (Thermo Fisher, 439454)
 Mikrotiterplatten, 96 Loch, steril (Thermo Fisher, 167008)
 Mikrotiterplatten, 96 Loch, schwarz (Thermo Fisher, 165305)
 Petrischalen (greiner bio-one, 633102)
 Pipettenspitzen 0,5 – 20 µl, 2 – 200 µl, 50 – 1000 µl (Brand, 732024, 732028, 732032)
 Probenröhrchen 50 ml (greiner bio-one, 227270)
 Sterilfilter Millex-GV Filter Unit 0,22 µm (Merck Millipore, SLGV033RB)
 UV-Küvetten 70 µl (Brand, 759210)
 Zellkulturflaschen 80 cm² (Thermo Fisher, 178905)

1.6 Geräte

Begasungsbrutschrank (Heraeus)
 Biofuge pico (Heraeus)
 Biophotometer (Eppendorf)
 Brutschrank (Mettler)
 CO₂-Inkubator Heracell 150 (Thermo Fisher)
 Flockeneisbereiter (Scotsman)
 Heizplatte/Magnetrührer (Velp Scientific)
 Inverses Mikroskop (Zeiss)
 Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise Remote Control Reader (Tecan)
 Multifuge 1 S-R (Heraeus)
 pH-Meter (InoLab)
 Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific)
 Schüttelwasserbad (GFL)
 Sterilwerkbank Herasafe (Heraeus)
 Taumelschüttler Polymax 1040 (Heidolph)

Ultraschallbad (Bachofer Laboratoriumsgeräte)
 Varifuge 3.0 R (Heraeus)
 Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH)
 Victor³ 1420 multilabel counter (PerkinElmer)
 Vortex-2 Genie (Scientific Industries)
 Waage (Sartorius)

1.7 Software

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software)
 Ridasoft Win.net (R-Biopharm AG)
 Wallac 1420 Software (PerkinElmer)

1.8 Sonstiges

Accu-Jet Pipettierhilfe (Brand)
 Dispenser mit 0,6 ml Spritze (LKB Instrument GmbH)
 Erlenmeyerkolben 200 ml, 300 ml, 500 ml (Schott)
 Glaspipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml
 Handzählgerät
 Variable Achtkanalpipette 30 – 300 µl (Eppendorf)
 Variable Pipetten 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf)
 Variable Zwölfkanalpipette 30 – 300 µl (Eppendorf)
 Zählkammer nach Thoma (Brand)

1.9 Zelllinien

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
CaCo-2	Humane Kolonadenokarzinomzellen	DSMZ, ACC 169
Vero	Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze	ECACC, 841113001

2. Methoden

2.1 Kultivierung von *B. cereus*

2.1.1 Kultivierung in CGY-Vollmedium unter Standard-Laborbedingungen

Zur Voranreicherung wurden 20 ml CGY-Medium mit einer Kolonie eines *B. cereus* Stamms von einer Blutagar-Platte beimpft und für 17 h im Schüttelwasserbad bei 32 °C inkubiert. Aus dieser Übernachtkultur wurden 20 ml CGY in einem 200 ml Erlenmeyerkolben auf eine optische Dichte, photometrisch bestimmt bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}), von 0,2 angeimpft und bei 32 °C im Schüttelwasserbad für 6 h inkubiert. Zur Gewinnung von zellfreiem Kulturüberstand wurde die Kultur bei 2500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert, mit 1 mmol EDTA-Lösung versetzt, zu 1 ml in Cryotubes portioniert und bei -20 °C eingefroren.

2.1.2 Analyse des Wachstumsverlaufs unter Laborbedingungen mit schrittweiser Annäherung an simulierte darmähnliche Bedingungen

Aus einer *B. cereus* Übernachtkultur wurden 150 ml CGY-Medium, abgefüllt in 500 ml Erlenmeyerkolben, auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und über 48 h kultiviert. Die Kulturen wurden bei 32 °C bzw. 37 °C im Schüttelwasserbad (32 °C bzw. 37 °C Schüttelinkubation), 37 °C im Brutschrank (37 °C ohne Schüttelinkubation) und 37 °C im Brutschrank, zusätzlich überschichtet mit 30 ml Paraffinöl (37 °C anaerob), inkubiert. Um eine schrittweise Annäherung der Standard-Laborbedingungen an simulierte darmähnliche Bedingungen zu erreichen, wurde jeweils nur ein Parameter geändert. Der Wachstumsverlauf über 48 h wurde durch kontinuierliche photometrische Messung der OD_{600} der Kultur dokumentiert. Eine Probenentnahme von jeweils 1,5 ml erfolgte nach 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 36 und 48 h. Diese wurden bei Raumtemperatur (RT) bei 11500 x g für 3 min zentrifugiert. Zum Erhalt von zellfreiem Kulturüberstand wurde wie unter 2.1.1 beschrieben vorgegangen. Jeder Ansatz wurde dreimal durchgeführt.

2.1.3 Vergleich des Wachstumsverlaufs unter Laborbedingungen und unter simulierten intestinalen Bedingungen

Die Kultivierung unter Laborbedingungen erfolgte in 30 ml CGY-Medium in 300 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C unter Schüttelinkubation bei 125 rpm, die Kultivierung unter simulierten Darmbedingungen in 45 ml konditioniertem RPMI 1640 Medium in 80 cm² Zellkulturflaschen im Zellkulturinkubator bei 37 °C und 7% CO₂-Begasung. Die vorbereiteten Medien wurden jeweils aus einer *B. cereus* Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Dokumentation des Wachstumsverlaufs über 12 h erfolgte halbstündlich durch Messung der OD₆₀₀. Proben von jeweils 3 ml wurden nach 2, 4, 6, 8 und 10 h entnommen. Zentrifugation und Gewinnung von Kulturüberstand wurden wie unter 2.1.1 beschrieben durchgeführt. Jede Anzucht wurde zweimal wiederholt.

2.2 Gewinnung von Zellextrakt

Zum Erhalt von Zellextrakt und Kulturüberstand wurde *B. cereus* unter Standard-Laborbedingungen kultiviert. Nach 6 h wurde die Kultur bei 2500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der zellfreie Kulturüberstand wie unter 2.1.1 beschrieben gewonnen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 20 ml kaltem PBS gewaschen (Resuspension und anschließende Zentrifugation wie oben beschrieben), in 20 ml 0,01 mol/l Natronlauge resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen in PBS wurde das Zellpellet in 5 ml Lysepuffer aufgenommen und in vier 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Zur Zellyse wurde die Zellsuspension auf Eis für dreimal 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die lysierten Zellen wurden bei 14000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert und der Zellextrakt anschließend abgenommen, in Cryotubes abgefüllt und bei -20 °C eingefroren.

2.3 Enzymimmunoassays

2.3.1 Direkter Enzymimmunoassay (Sandwich-EIA)

Zum semiquantitativen Nachweis der Komponenten HBL L2 und NheB wurde ein direkter EIA durchgeführt. Zur Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit 100 µl/Kavität wurden 10 µg/ml des mAks 1A12 (gegen HBL L2) in Bicarbonatpuffer bzw. 5 µg/ml des mAks 2B11 (gegen NheB) in PBS eingesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Ausklopfen der Platte wurden zum Blockieren freier Bindungsstellen 150 µl/Kavität 3%iges Casein in PBS hinzugefügt und für 30 min in einer feuchten Kammer auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit EIA-Waschlösung und anschließendem Trockenklopfen wurden die Kulturüberstände in unterschiedlicher Ausgangskonzentration, verdünnt in 0,5% Tween 20 in PBS, in einer seriellen Verdünnungsreihe 1:2 und 100 µl/Kavität auf die Platte gegeben. Zum Verhindern einer Kreuzkontamination wurden die Proben nach einstündiger Inkubation abgesaugt. Nach viermaligem Waschen und Trockenklopfen wurde als Detektionsantikörper 8B12-HRP 1:2000 (gegen HBL L2) bzw. 1E11-HRP 1:4000 (gegen NheB) in 1%igem Casein in PBS je 100 µl/Kavität hinzugegeben und für 1 h auf dem Taumelschüttler inkubiert. Zur Detektion sind die mAks 8B12 und 1E11 mit *horseradish*-Peroxidase (HRP) markiert, die die Oxidation des Chromogens Tetramethylbenzidin katalysiert. Nach fünfmaligem Waschen und Trockenklopfen wurde 100 µl/Kavität der Substrat/Chromogenlösung hinzugefügt und die Platte im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach 20 min durch Zugabe von 100 µl/Kavität 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch im Sunrise Remote Control Reader gemessen. Zur Berechnung der reziproken Titer wurde der Extinktionswert, der 1 am nächsten liegt, mit der dazugehörigen Verdünnungsstufe multipliziert.

2.3.2 Indirekter Enzymimmunoassay

Der indirekte EIA wurde zum Nachweis der Komponenten HBL L1 und HBL B eingesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde mit den in Bicarbonatpuffer verdünnten Kulturüberständen in einer seriellen Verdünnungsreihe beschichtet. Die Absättigung erfolgte mit 200 µl/Kavität 3%igem Casein in PBS. Als primärer Antikörper wurden 1 µg/ml des mAks 1E9 (gegen HBL L1) bzw. 2 µg/ml des mAks 1B8 (gegen HBL B) in PBS eingesetzt. Zur Detektion diente das

polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Serum, konjugiert mit HRP, in 1% Casein in PBS. Folge- und Waschschrte sowie Inkubationszeiten wurden analog zum direkten EIA durchgeföhrt.

2.4 Zellkulturtests

2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Zytotoxizitätstests wurden auf den Zelllinien Vero bzw. CaCo-2 durchgeföhrt, die in 40 ml MEM Earle's bzw. 30 ml RPMI 1640 Medium (Supplementierung s. Tabelle 2) in 80 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 7% CO₂-Begasung kultiviert wurden. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Das verbrauchte Medium wurde abgeschüttet, der Zellrasen mit steriler PBS-Lösung gewaschen und die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 7 bzw. 5 min im Brutschrank abgelöst. Zur Neutralisierung wurden 10 ml des entsprechenden Mediums zugegeben, die trypsinierten Zellen darin suspendiert und anschließend bei 100 bzw. 51 x g für 7 bzw. 5 min und bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurde 1 ml der Zellsuspension in neues Medium gegeben, zur Verwendung in Zellkulturassays in der Zählkammer nach Thoma ausgezählt und entsprechend der gewünschten Zellzahl eine Zellsuspension hergestellt.

2.4.2 WST-Zytotoxizitätstest

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von *B. cereus* Kulturüberständen wurden WST-1-Bioassays auf Vero- und CaCo-2-Zellen durchgeföhrt. Hierzu wurden serielle Verdünnungsreihen der *B. cereus* Kulturüberstände im entsprechenden Zellkulturmedium mit einer Anfangsverdünnung von 1:20 in sterilen Mikrotiterplatten angelegt. Jeder Ansatz wurde zweifach durchgeföhrt. In jede Kavität wurden 3x10⁴ Vero- bzw. CaCo-2-Zellen in 100 µl zugegeben. Nach einer Inkubation über 22 h bei 37 °C und 7% CO₂-Begasung wurden 100 µl Medium entnommen und 10 µl des Tetrazoliumsalses WST-1 zugegeben und noch einmal für 2 h inkubiert. Das von mitochondrialen Enzymen vitaler Zellen in Formazan umgesetzte Tetrazoliumsals WST-1 und die Intensität des damit einhergehenden Farbumschlags von rosa nach orange wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Als reziproker Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe definiert, bei der die

Aktivität der mitochondrialen Enzyme um 50% im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert war.

2.4.3 Propidiumiodid-Test

Zum Nachweis der Fähigkeit zur Porenbildung von *B. cereus* Enterotoxinen in der Zellmembran von Zielzellen wurden Propidiumiodid-Tests auf CaCo-2-Zellen durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) kann nach Perforation der Zellmembran durch porenformende Toxine in diese einströmen und in die DNA interkalieren, wobei sich sein Absorptions- und Emissionsmaximum verschiebt. In schwarze Mikrotiterplatten mit transparentem Boden wurden 4×10^4 CaCo-2-Zellen in 200 μ l RPMI 1640 Medium pro Kavität ausgesät. Nach Inkubation über 24 h bei 37 °C und 7% CO₂-Begasung wurden 100 μ l Medium pro Kavität entnommen und 100 μ l RPMI 1640 Medium mit 10 μ g/ml PI und 1:20 Verdünnungen von *B. cereus* Kulturüberständen hinzugegeben. Die Messung der Fluoreszenzintensität (Anregung 530 nm, Emission 616 nm, Anregungszeit 1 s, Anregungsstärke 20000) im Fluorometer Victor³ 1420 erfolgte alle 2,5 min über 4 h. Hierdurch ergab sich für jede Probe eine charakteristische PI-Einstromkurve, dargestellt als Fluoreszenzzunahme über die Zeit, die von der Geschwindigkeit der Porenbildung abhängig war. Zum Vergleich der Proben miteinander wurde die Steigung der maximalen linearen Fluoreszenzzunahme jeder PI-Einstromkurve berechnet.

3. *B. cereus* Stammset

Das in Tabelle 5 aufgeführte und in dieser Arbeit verwendete *B. cereus* Stammset wurde während des Projekts „Enteropathogene *Bacillus cereus* in Lebensmitteln – Identifizierung und Risikoabschätzung“ in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Mikrobiologie des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) der TU München und dem Institut für Funktionelle Mikrobiologie des Departments für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien erarbeitet. Für das Stammset wurden *B. cereus* Stämme möglichst unterschiedlicher Herkunft, mit unterschiedlichen Toxingenenprofilen, Toxinexpressionsleveln und zytotoxischer Aktivität ausgewählt.

Tabelle 5: *B. cereus* Stammsset

<i>B. cereus</i> Stamm	Herkunft	Clade	Toxinprofil										EIA-Daten*	Zytotoxizität*	
			<i>ces</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>cytK2</i>	<i>hlyII</i>	<i>inhA1</i>	<i>nprA</i>	<i>sph</i>	Typ	NheB			Vero
I4294-3 (M6)	Eiskrem	I	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	A	2062	332
SDA KA96	Rohmilch	I	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	A	6481	1228
INRA A3	Stärke	II	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	A	1299	256
INRA C3	pasteurisierte Karotten	II	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	A	4460	754
RIVM BC 934	Salat	II	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	A	769	118
6/27/S	humane Faeces	II	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	A	1964	475
F3175/03 (D7)	humane Faeces	II	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	A	5157	430
F528/94	gebratener Reis	I	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	C	1759	214
F837/76	postoperative Infektion	I	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	C	8598	2106
RIVM BC 126	humane Faeces	I	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	C	7757	578
MHI 86	Babynahrung	I	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	D	87	0
F4429/71	Vanillepudding	I	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	D	4907	918
RIVM BC 964	Kebab	II	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	D	10266	858
F3162/04 (D8)	humane Faeces	I	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	D	41	858
MHI 226**	Milchprodukt	I	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	F	930	91
NVH 0075-95	Gemüseintopf	I	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	F	7729	674
WSBC 10035	pasteurisierte Milch	I	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	F	6205	1100
RIVM BC 90	humane Faeces	I	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	F	146	10
7/27/S	humane Faeces	I	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	F	9011	952

feri: Referenzstämme für HBL (F837/76) bzw. Nhe (NVH 0075-95); *rot*: *high producer*; *weiß*: *low producer*; *blau*: Isolat aus Lebensmittel ohne Verbindung zu Lebensmittelvergiftung; *grün*: Isolat aus Lebensmittel oder humanen Faeces nach Lebensmittelvergiftungsfall; *reziproke Titer; **in der Gesamtgenomsequenzierung wurde bei diesem Stamm ein verkürztes *hbl*-Operon nachgewiesen. HBL L2 und HBL B werden aber nicht exprimiert, daher Zuordnung von MHI 226 zum Toxintyp F.

Zur Auswahl wurden Isolate aus den Stammsammlungen der drei beteiligten Forschungseinrichtungen und aus aktuellen Lebensmittelvergiftungsfällen herangezogen. Die ausgewählten Stämme wurden aus Lebensmitteln (in Tabelle 5 grün markiert) und aus Lebensmittelvergiftungsfällen (in Tabelle 5 blau markiert) isoliert, wobei die Isolate aus den Lebensmittelvergiftungsfällen aus humanen Faeces oder Lebensmitteln stammen. Ebenfalls für das Stammset ausgewählt wurden die Referenzstämme für HBL, F837/76, und Nhe, NVH 0075-95. Die Einteilung in die genetischen Toxintypen A (*nhe*, *hbl*, *cytK2*), C (*nhe*, *hbl*), D (*nhe*, *cytK2*) und F (*nhe*) erfolgte mittels Multiplex-PCR und Sequenzierung des Gesamtgenoms an den Partnerforschungsstellen. Um emetische Stämme auszuschließen, wurde auf Vorhandensein des emetischen Toxinclusters *ces* untersucht. Auch die Untersuchung auf neuere, präsumtive Virulenzfaktoren wurde mittels Multiplex-PCR durchgeführt. Die Bestimmung der *Clade*-Zugehörigkeit erfolgte mittels Sequenzanalyse des genetischen Markers *spoIIIAB*. Zusätzlich wurde zur Differenzierung mesophiler und psychrotoleranter Stämme mittels PCR auf das Kälteschockprotein-Gen *cspA* untersucht, das nur bei psychrotoleranten Stämmen nachzuweisen ist, um nur mesophile *B. cereus sensu stricto* Stämme der *B. cereus* Gruppe aus *Clade* I und II in das Set aufzunehmen. Die Einteilung in starke, mittlere und schwache Toxinproduzenten (*high*, *medium* und *low producer*) erfolgte durch Bestimmung der reziproken Titer für NheB im Sandwich-EIA sowie durch Bestimmung der reziproken Zytotoxizitätstiter in WST-1-Bioassays auf Verozellen. Dazu wurde nach 6 h Anzucht unter Standard-Laborbedingungen bei 32 °C und Schüttelinkubation der zellfreie Kulturüberstand gewonnen. Als starke Toxinproduzenten (in Tabelle 5 rot markiert) wurden solche Stämme definiert, deren reziproker Titer für NheB größer als 4000 war, schwache lagen unter 2000 und mittlere dazwischen. Bei stark toxischen Stämmen war der reziproke Zytotoxizitätstiter größer als 500, bei schwach toxischen kleiner als 250. Bei der Auswahl der Stämme wurde darauf geachtet, dass sich unter jedem Toxintyp starke und schwache Toxinproduzenten mit unterschiedlicher Herkunft befinden.

IV ERGEBNISSE

Ziel der Arbeit war es, das Verhalten der ausgewählten *B. cereus* Stämme unter simulierten intestinalen Bedingungen zu untersuchen und die Auswirkungen der Kultivierung in darmähnlichem Milieu auf Wachstum, Toxinproduktion und Zytotoxizität zu ermitteln. Daher wurden zu Beginn der Arbeit die Auswirkungen einzelner Parameterveränderungen in der Kultivierung von *B. cereus* unter Standard-Laborbedingungen untersucht. Die Standard-Laborbedingungen waren in vorausgegangen Untersuchungen am Lehrstuhl im Hinblick auf eine maximale Toxinexpression optimiert worden. Im weiteren Verlauf wurden das Kultivierungsmedium und die Umgebungsbedingungen dem menschlichen Darm weiter angenähert, indem die Anzucht in konditioniertem, auf CaCo-2-Zellen vorinkubiertem Medium und in einem Inkubator bei 37 °C und 7% CO₂-Begasung durchgeführt wurde.

1. **Analyse von Wachstumsverlauf, Toxinproduktion und Zytotoxizität von zwei *B. cereus* Referenzstämmen unter Laborbedingungen mit schrittweiser Annäherung an simulierte darmähnliche Bedingungen**

Die beiden Referenzstämme F837/76 (HBL) und NVH 0075-95 (Nhe) wurden eingesetzt, um die Auswirkungen einzelner Parameterveränderungen bei der Anzucht unter Standard-Laborbedingungen in CGY-Vollmedium (32 °C Schüttelinkubation) auf Wachstum, Toxinproduktion und Zytotoxizität zu untersuchen. Hierbei wurde in einem ersten Schritt die Bebrütungstemperatur von 32 °C auf 37 °C erhöht, die Schüttelinkubation wurde beibehalten (37 °C Schüttelinkubation). Anschließend wurde die Schüttelinkubation eingestellt, um die Sauerstoffzufuhr zu reduzieren (37 °C ohne Schüttelinkubation). Im letzten Schritt wurde die Flüssigkultur mit Paraffinöl überschichtet, um ein anaerobes Milieu zu erzeugen (37 °C anaerob). Der Wachstumsverlauf wurde kontinuierlich dokumentiert und zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben aus zellfreiem Kulturüberstand entnommen, die im Folgenden in EIAs zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis der Enterotoxine und in Zytotoxizitätstests eingesetzt wurden.

1.1 Wachstum

Der Wachstumsverlauf der beiden Referenzstämme wurde während der Kultivierung regelmäßig photometrisch erfasst. Hierbei wurde die OD_{600} bestimmt. Der Referenzstamm für HBL F837/76 (Abb. 1 A) zeigte unter 37 °C Schüttelinkubation das stärkste Wachstum. Die Adaptationsphase war am kürzesten, die exponentielle Wachstumsphase im Vergleich mit den anderen drei Wachstumsbedingungen am steilsten. Die stationäre Phase mit einem Wachstumsmaximum bei einer OD_{600} von 7 wurde nach 7 h erreicht. Unter 32 °C Schüttelinkubation und 37 °C ohne Schüttelinkubation zeigten die Wachstumskurven einen ähnlichen Verlauf. Allein die Adaptationsphase war unter 32 °C kürzer. Nach 9 h wurde die stationäre Phase mit einer maximalen OD_{600} von 6 erreicht. Unter 37 °C anaerob war das Wachstum deutlich reduziert und verlangsamt. Der Referenzstamm für Nhe NVH 0075-95 (Abb. 1 B) zeigte unter 37 °C Schüttelinkubation eine kürzere Adaptationsphase und somit eine früher einsetzende exponentielle Wachstumsphase als unter 32 °C Schüttelinkubation. Unter beiden Wachstumsbedingungen wurde in der stationären Phase das Wachstumsmaximum bei einer OD_{600} von 6 nach 8 (37 °C) bzw. 9 h (32 °C) erreicht. Unter 37 °C ohne Schüttelinkubation und 37 °C anaerob war das Wachstum jeweils reduziert. Die Adaptationsphase verlängerte sich, das Wachstumsmaximum lag bei einer OD_{600} von 4,5 bzw. 4 nach 4 h Inkubation.

Beide Referenzstämme reagierten ähnlich auf die veränderten Wachstumsbedingungen. Eine Temperaturerhöhung auf 37 °C mit gleichbleibender Schüttelinkubation förderte das Wachstum. Eine Reduktion der Sauerstoffzufuhr durch Überschichtung der Flüssigkultur mit Paraffinöl führte zu vermindertem Wachstum.

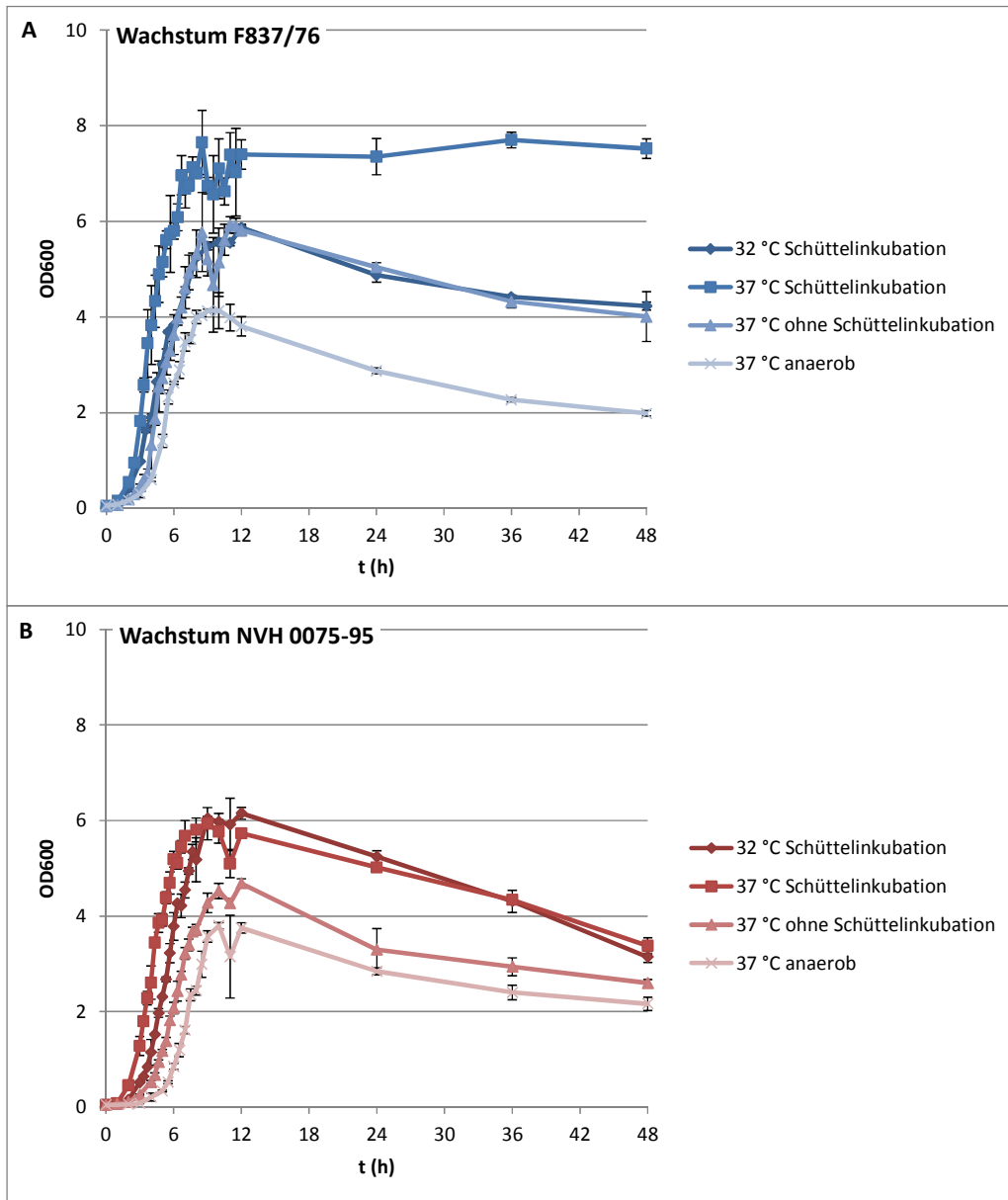


Abb. 1: Einfluss von Temperatur und Sauerstoffzufuhr auf das Wachstum der *B. cereus* Referenzstämme für HBL F837/76 (A) und Nhe NVH 0075-95 (B). Das Wachstum wurde über die Messung der OD₆₀₀ bestimmt.

1.2 Toxinproduktion

Die Toxinproduktion wurde durch Bestimmung der Titer der Einzelkomponenten der Enterotoxine in spezifischen direkten bzw. indirekten EIAs qualitativ und semiquantitativ ermittelt, die Produktivität als Quotient aus Titer pro Einheit optischer Dichte errechnet. Hierdurch wurde ein Maß für die Effizienz der Toxinproduktion der beiden Referenzstämme unter den vier beschriebenen Wachstumsbedingungen gefunden.

1.2.1 Nhe

Nhe ist ein Drei-Komponenten-Toxin, das sich aus den einzelnen Proteinkomponenten NheC, NheB und NheA zusammensetzt. Standardmäßig werden die Titer für NheB bestimmt, da diese am besten mit der Toxizität in Zellkultursystemen korrelieren (Moravek et al., 2006; Jeßberger et al., 2014).

In Abbildung 2 A und C sind die Verläufe der Toxintiter von NheB dargestellt. Bereits nach 2 h Inkubationszeit war NheB unter allen vier Wachstumsbedingungen im Kulturüberstand beider Referenzstämmen nachweisbar. Die Toxinproduktion stieg unter 32 °C und 37 °C Schüttelinkubation bei beiden Stämmen zu Beginn verstärkt an. Die maximalen Expressionslevel wurden unter Schüttelinkubation früher erreicht als unter reduzierter Sauerstoffzufuhr. Trotz verzögert einsetzender Toxinproduktion erreichten die Kulturen ohne Schüttelinkubation nur geringfügig niedrigere Expressionslevel als die Kulturen unter Schüttelinkubation. Auch nach 48 h war NheB im Kulturüberstand noch nachweisbar, wobei sich ein generell leichter Abfall ab 12 h unter allen vier Bedingungen und bei beiden Stämmen nachweisen ließ. Beim Referenzstamm F837/76 war unter 37 °C Schüttelinkubation nach 24 h ein starker Abfall des Toxintiters feststellbar.

Mit verminderter Sauerstoffzufuhr reduzierte sich das Wachstum beider Referenzstämmen und damit einhergehend die produzierte Toxinmenge. Um einen besseren Vergleich der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zu ermöglichen, wurde die Produktivität für jede Bedingung berechnet (Abb. 2 B und D). Dabei fiel auf, dass der Referenzstamm für HBL F837/76 unter 32 °C Schüttelinkubation zu Beginn die höchste Produktivitätsrate hatte, sich diese unter reduzierter Sauerstoffzufuhr verzögert steigerte und unter 37 °C Schüttelinkubation die Produktivitätsrate bereits nach 6 h wieder stark abnahm. Während der ersten 3 h zeigte der Referenzstamm für Nhe NVH 0075-95 unter den vier Wachstumsbedingungen keine großen Unterschiede in der Produktivität. Während der frühen exponentiellen Wachstumsphase steigerte sich die Produktivität unter Schüttelinkubation. Ab 6 h lagen die Produktivitätsraten für 32 °C Schüttelinkubation, 37 °C ohne Schüttelinkubation und 37 °C anaerob auf gleich hohem Niveau, wohingegen die Produktivitätsrate unter 37 °C Schüttelinkubation wieder abnahm.

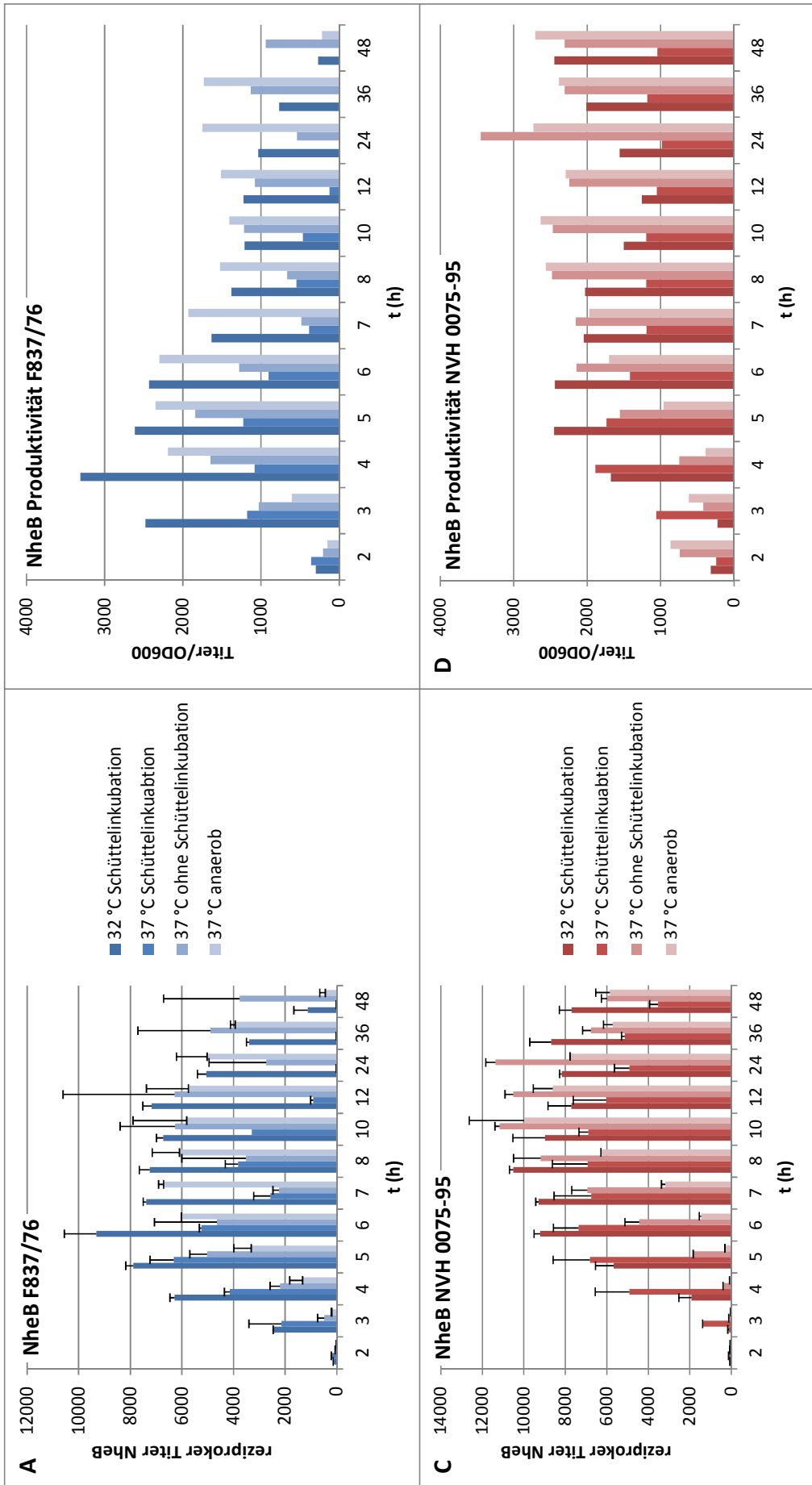


Abb. 2: Einfluss von Temperatur und Sauerstoffzufuhr auf die NheB-Produktion und -Produktivität der *B. cereus* Referenzstämme für HBL F837/76 (A+B) und Nhe NVH 0075-95 (C+D). Die NheB-Produktion ist dargestellt als reziproker Titer der Komponente NheB (A+C) und die Produktivität als Quotient aus reziprokem NheB-Titer und der OD₆₀₀ (B+D).

1.2.2 HBL

Da der Nhe-Referenzstamm NVH 0075-95 HBL-negativ ist, wurden die Titer der einzelnen HBL-Komponenten nur vom Stamm F837/76 bestimmt. HBL ist ebenfalls ein Drei-Komponenten-Toxin. Standardmäßig wird zum Nachweis des Hämolysin BL die Komponente L2 bestimmt, da hierfür ein Sandwich-EIA verfügbar ist. Da der HBL L2-Titer aber nicht mit der Zytotoxizität korreliert (Moravek et al., 2006; Jeßberger et al., 2014), wurden zusätzlich die Titer der Komponenten HBL L1 und HBL B ermittelt.

Der HBL L1-Titer stieg unter 37 °C Schüttelinkubation am schnellsten an (Abb. 3 A), erreichte sein Maximum bereits nach 4 h, fiel ab 8 h aber wieder ab und ab 24 h war HBL L1 im Kulturüberstand kaum mehr nachweisbar. Unter 32 °C Schüttelinkubation stieg der Titer ebenfalls stark an, wobei sein Maximum erst nach 6 h erreicht wurde und auch nur wenig im weiteren Verlauf abfiel. Dahingegen stiegen die Titer unter 37 °C Schüttelinkubation und anaerob nur langsam an und erreichten ihre maximalen Level erst nach 8 h, blieben dann aber auf diesem Niveau bis zum Ende der Messung stabil. Der HBL L1-Toxintiterverlauf glich unter allen vier Wachstumsbedingungen sehr dem von NheB. Die höchste Produktivität (Abb. 3 D) wurde nach 4 h unter 37 °C Schüttelinkubation erreicht, wobei sie danach wie der HBL L1-Titer sehr schnell wieder abfiel. Unter den beiden Bedingungen mit reduzierter Sauerstoffzufuhr stieg die Produktivität ähnlich wie die Toxintiter langsamer an. Ab 8 h war die Produktivität der Kulturen unter 32 °C Schüttelinkubation und 37 °C anaerob auf einem gleich hohen Niveau. Wie auch für die anderen Komponenten zeigte sich eine verstärkte HBL L2-Produktion (Abb. 3 B) zu Beginn der Inkubation unter 32 und 37 °C Schüttelinkubation. Die höchsten Expressionslevel erreichte die Kultur unter 32 °C Schüttelinkubation. Das gleiche galt auch für die Produktivitätsrate (Abb. 3 E). Nach 4 h war die höchste Produktivitätsrate erreicht und fiel nach 7 h nur leicht ab. Unter den anderen drei Bedingungen lag die Produktivitätsrate auf halb so hohem Niveau wie unter 32 °C, aber zueinander gleich hoch. Die HBL B-Titer (Abb. 3 C) erreichten nach 6 h ihr Maximalniveau, wobei nach 36 h die Titer unter 37 °C ohne Schüttelinkubation und anaerob nochmal weiter anstiegen, wohingegen die Titer unter 32 und 37 °C Schüttelinkubation nach 12 h abfielen. Die Produktivitätsrate (Abb. 3 F) unter 32 °C Schüttelinkubation war zu Beginn sehr hoch. Nach 6 h war unter allen Bedingungen die Produktivität gleich hoch, wobei sie nach 36 h unter 37 °C ohne Schüttelinkubation und anaerob noch einmal stark anstieg.

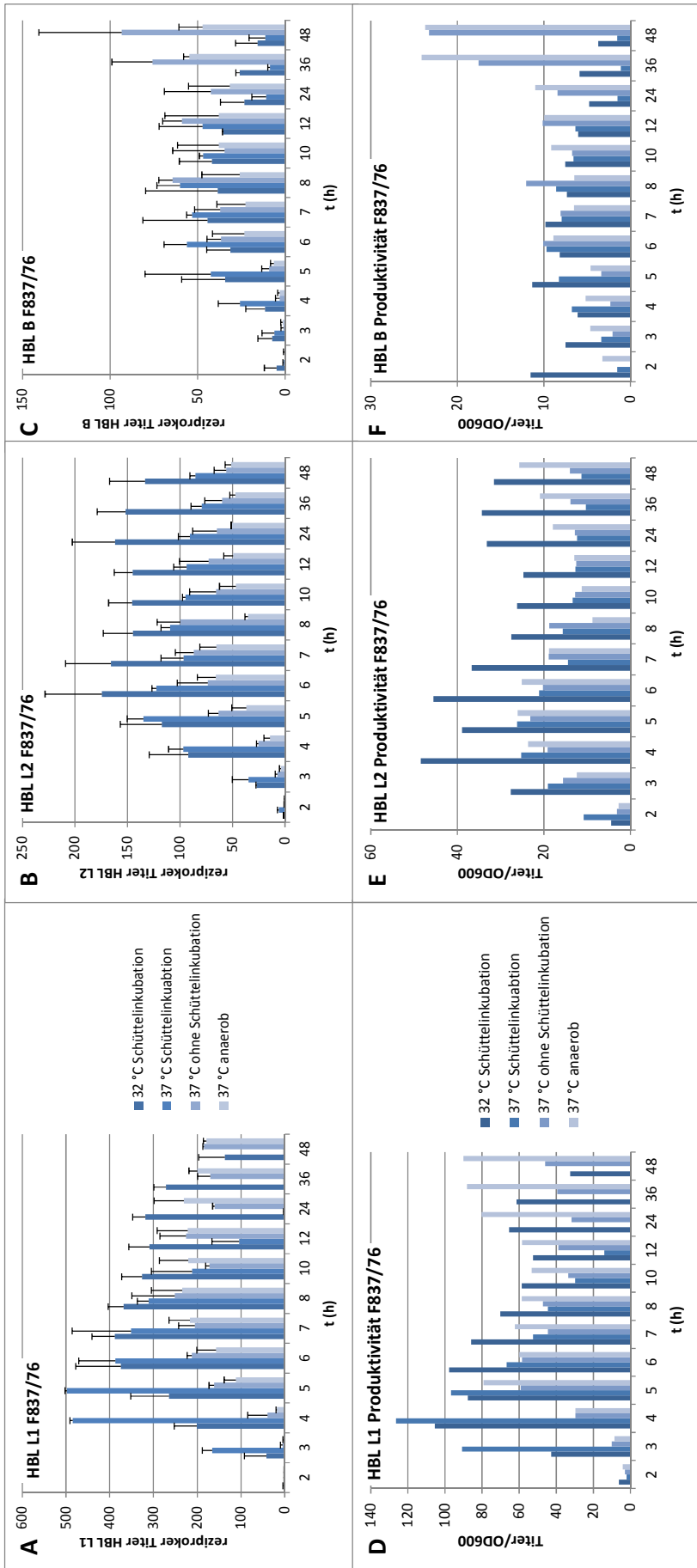


Abb. 3: Einfluss von Temperatur und Sauerstoffzufuhr auf die HBL-Produktion und -Produktivität des *B. cereus* Referenzstamms für HBL F837/76. Die HBL-Toxinproduktion ist dargestellt als reziproker Titer der Komponente HBL L1 (A), HBL L2 (B) und HBL B (C), die Produktivität als Quotient aus reziprokem Titer und OD_{600} (D-F).

1.3 Zytotoxizität

Die Untersuchungen zur Toxizität fanden in PI-Tests auf CaCo-2-Zellen statt. Diesen wurden verdünnte Kulturüberstände, versetzt mit PI, hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen, wodurch sich für jede Probe eine charakteristische PI-Einstromkurve ergab, deren maximale lineare Steigung berechnet wurde (Abb. 4).

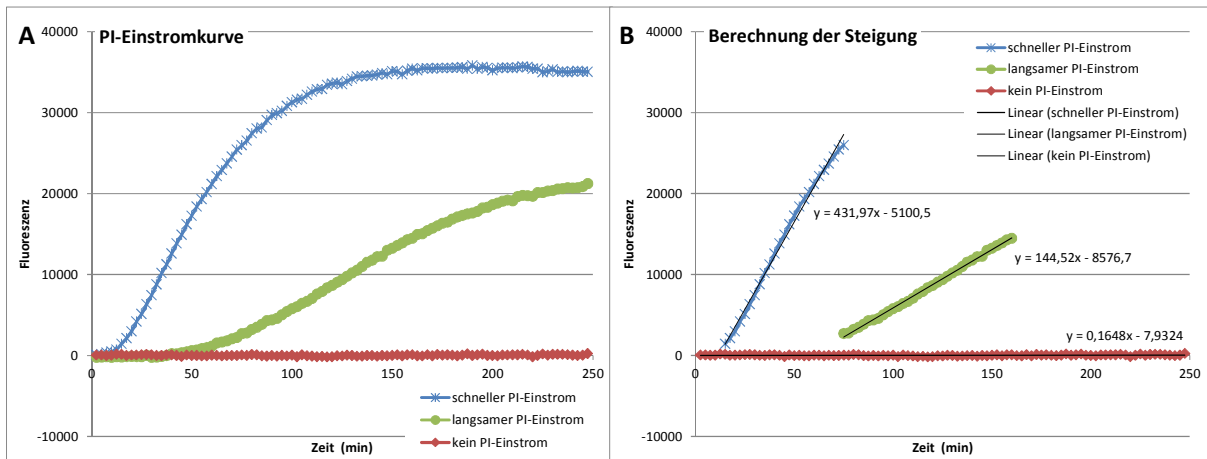


Abb. 4: Bestimmung der Zytotoxizität mittels PI-Test. A: Darstellung von drei PI-Einstromkurven. Alle 2,5 min wird die Fluoreszenzintensität gemessen, die abhängig vom PI-Einstrom in die Zellen ist. Bei schnellem PI-Einstrom steigt die PI-Einstromkurve stark an (blau). Ist der Einstrom langsamer, verläuft die Kurve flacher (grün). Wenn kein PI einströmt, ist der Verlauf linear entlang der Nulllinie (rot). **B: Berechnung der Steigung der maximalen Fluoreszenzzunahme.** Der Abschnitt der maximalen linearen Fluoreszenzzunahme wird bestimmt und seine Steigung berechnet.

Der Referenzstamm für HBL F837/76 (Abb. 5 A) hatte unter 32 °C Schüttelinkubation ab 4 h die höchste PI-Einstromgeschwindigkeit in die Zielzellen. Nach 48 h war der PI-Einstrom verlangsamt. Unter 37 °C ohne Schüttelinkubation und anaerob stieg die Fluoreszenz weniger stark an als unter 32 °C Schüttelinkubation. Die Einstromgeschwindigkeit blieb ab 5 bis 48 h konstant. Die Zunahmen der Fluoreszenz des Referenzstamms für Nhe NVH 0075-95 (Abb. 5 B) waren unter allen vier Wachstumsbedingungen und allen beprobten Zeitpunkten schwächer als beim Stamm F837/76. Die Fluoreszenz nahm unter 32 °C Schüttelinkubation zum Zeitpunkt von 6 h um ein Drittel weniger stark zu als beim HBL-Referenzstamm.

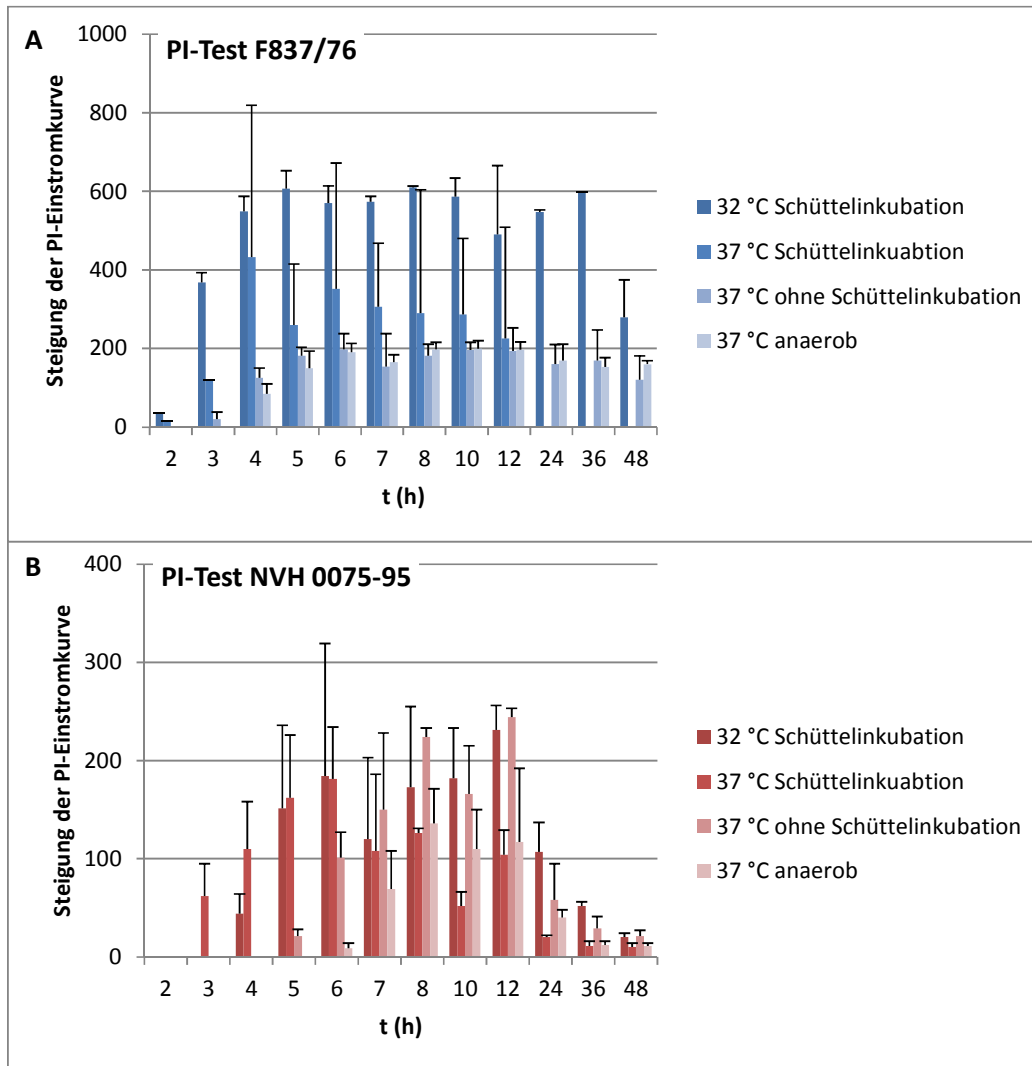


Abb. 5: PI-Test. A: Steigungen der maximalen linearen Fluoreszenzzunahme der PI-Einstromkurven zu allen beprobten Zeitpunkten für den *B. cereus* Referenzstamm F837/76. B: Referenzstamm NVH 0075-95.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich somit eine Temperaturerhöhung von 32 °C auf 37 °C unter Beibehaltung der Schüttelinkubation zwar fördernd auf Wachstum und Toxinproduktion vor allem zu Beginn der Untersuchung auswirkte, gleichzeitig aber mit einer Reduktion der Toxinproduktivität einherging, die sich aber nicht in einer Verminderung des toxischen Potentials fortsetzte, da dieses von der absoluten Menge der Enterotoxine und nicht vom Verhältnis zur Wachstumsdichte abhängig war. Die Einstellung der Schüttelinkubation und die damit einhergehende Reduktion der Sauerstoffzufuhr führten zu einer Wachstumsminderung. Bei einer Verminderung der gesamten Bakterienmasse verringerte sich auch die produzierte, absolute Toxinmenge, wohingegen sich die Produktivität erhöhte oder zumindest gleich blieb. Durch eine Verminderung der Gesamttoxinmenge verringerte sich ebenfalls die Zytotoxizität im PI-Test. Im Vergleich der beiden Referenzstämme blieben die Auswirkungen einzelner Parameterveränderungen auf Wachstum, Toxinproduktion und -

produktivität gleich. Unterschiede zeigten sich vor allem im PI-Test, in dem der Nhe-Referenzstamm einen verlangsamen PI-Einstrom zeigte.

2. Vergleichende Analyse von 19 *B. cereus* Stämmen in Bezug auf Wachstumsverlauf, Toxinproduktion und Zytotoxizität unter Labor- und unter simulierten intestinalen Bedingungen

Mittelpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Verhaltens von *B. cereus* unter simulierten Darmbedingungen. Daher wurde das ausgewählte *B. cereus* Stammset (Tabelle 5) zum Vergleich unter simulierten intestinalen und unter Laborbedingungen kultiviert, der Wachstumsverlauf dokumentiert sowie Untersuchungen zur Toxinproduktion und Zytotoxizität durchgeführt.

2.1 Wachstum

Der Verlauf des Wachstums wurde während der Kultivierung durch halbstündliche photometrische Messung der OD₆₀₀ dokumentiert.

2.1.1 Wachstum unter Laborbedingungen

Zum besseren Überblick wurde die Darstellung der Wachstumsverlaufskurven unter Laborbedingungen (CGY-Medium, 30 °C Schüttelinkubation) in Abbildung 6 für jedes Toxinprofil getrennt vorgenommen. Nach dreistündiger Adaptationsphase starteten alle Stämme mit der exponentiellen Wachstumsphase und erreichten nach 8 h die stationäre Phase. Ab diesem Zeitpunkt erhöhten sich die Standardabweichungen vermutlich aufgrund des deutlich verringerten Kulturvolumens im AnzuchtKolben. Im Toxinprofil A (Abb. 6 A) fiel vor allem der Stamm F3175/03 (D7) durch ein starkes Wachstum mit hoher OD₆₀₀ in der stationären Phase auf. Im Toxinprofil D (Abb. 6 C) zeigte der Stamm MHI 86, aus Vorversuchen bereits als *low producer* bekannt, im Vergleich zu den anderen Stämmen seines Profils kein vermindertes Wachstum. Der Stamm MHI 226 mit dem Toxinprofil F (Abb. 6 D) zeigte im Vergleich zu allen anderen Stämmen des Stammsets ein reduziertes Wachstum. Der Referenzstamm für Nhe NVH 0075-95 hatte ebenfalls ein leicht vermindertes Wachstum.

Wurden die Stämme und ihre Wachstumsverlaufskurven hinsichtlich ihrer Toxinprofile, nach der Einteilung nach Toxinproduktion in *high* bzw. *low producer* und ihrer Herkunft (Isolation nach Lebensmittelvergiftungsunfällen oder aus Lebensmitteln nach Routineuntersuchungen) betrachtet, konnte kein Muster bezüglich starkem oder schwachem Wachstum aufgezeigt werden. Es ergaben sich auch unter den vier definierten Toxinprofilen keine Unterschiede im Wachstumsverhalten. Ebenfalls wuchsen starke Toxinproduzenten nicht verstärkt im Vergleich mit schwachen. Auch die Herkunft gab keinen weiteren Aufschluss darüber.

2.1.2 Wachstum unter simulierten intestinalen Bedingungen

Um die Umgebungsbedingungen im Darm nachzuahmen, wurde zur Simulation von intestinalen Bedingungen als Inkubationstemperatur 37 statt 30 °C gewählt. Die Kulturen wurden in konditioniertem RPMI 1640 Medium angezogen, das im Vergleich zum CGY-Vollmedium nährstoffreduziert ist.

Unter den beschriebenen simulierten intestinalen Bedingungen war das Wachstum bei allen Stämmen gegenüber dem Wachstum unter Laborbedingungen signifikant reduziert (Abb. 7). Die Adaptationsphase verringerte sich auf 2 h, die exponentielle Wachstumsphase fiel dagegen deutlich schwächer aus. Im Toxinprofil C (Abb. 7 B) zeigte der Stamm RIVM BC 126 ein vermindertes Wachstum während der exponentiellen Wachstumsphase. Der Stamm F3162/04 (D8) im Toxinprofil D (Abb. 7 C) zeigte im Vergleich zu allen anderen Stämmen ein besonders starkes Wachstum. Der Stamm MHI 226 im Toxinprofil F, der unter Laborbedingungen ein vermindertes Wachstum zeigte (Abb. 7 D), erreichte unter simulierten intestinalen Bedingungen ein ähnliches Wachstum wie die anderen Stämme (Abb. 7 D). Auch unter simulierten intestinalen Bedingungen gab es keinen Zusammenhang zwischen Toxinprofil, Toxinproduktion oder Herkunft der Stämme und dem Wachstumsverhalten. So zeigten Stämme, die nach Lebensmittelvergiftungsunfällen isoliert worden waren, keine besondere Adaptationsfähigkeit an die gewählten intestinalen Bedingungen.

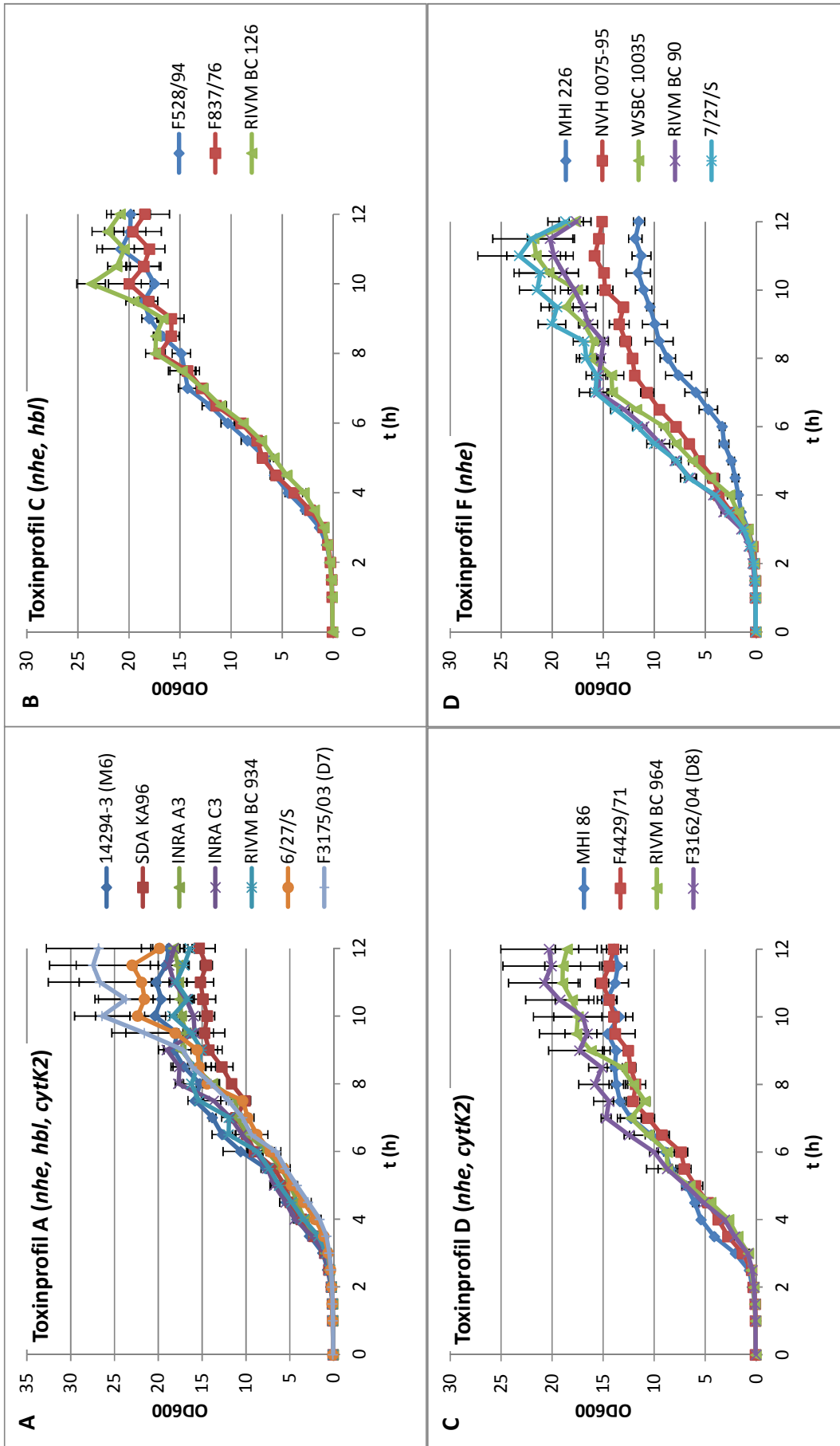


Abb. 6: Wachstum der 19 *B. cereus* Stämme unter Laborbedingungen, unterteilt nach Toxinprofil A (*nhe*, *hbl*, *cytK2*) (A), Toxinprofil C (*nhe*, *hbl*) (B), Toxinprofil D (*nhe*, *cytK2*) (C) und Toxinprofil F (*nhe*) (D). Das Wachstum wurde über die Messung der OD₆₀₀ bestimmt.

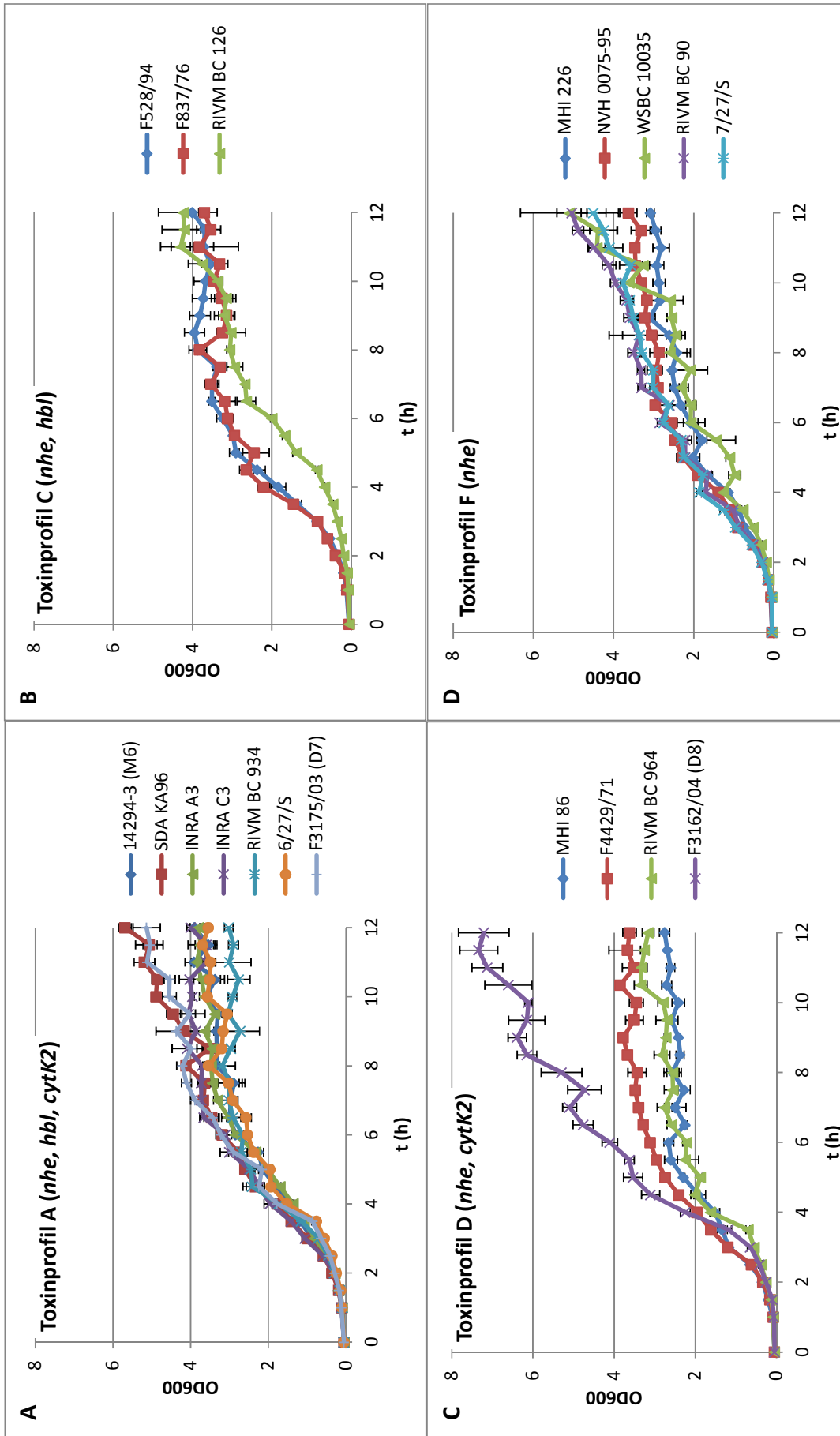


Abb. 7: Wachstum der 19 *B. cereus* Stämme unter simulierten intestinalen Bedingungen, unterteilt nach Toxinprofil A (*nhe*, *hbl*, *cytK2*) (A), Toxinprofil C (*nhe*, *hbl*) (B), Toxinprofil D (*nhe*, *cytK2*) (C) und Toxinprofil F (*nhe*) (D). Das Wachstum wurde über die Messung der OD₆₀₀ bestimmt.

2.2 Toxinproduktion

Die Titer der Enterotoxinkomponenten wurden in direkten und indirekten EIAs aus zellfreiem Kulturüberstand qualitativ und semiquantitativ bestimmt.

2.2.1 Nhe

Wie bereits erwähnt, korreliert die Zytotoxizität in Zellkultursystemen stark mit der Höhe des NheB-Titers. Daher wurden im Kulturüberstand für das Enterotoxin Nhe nur die Titer für die Komponente NheB bestimmt und auf eine Bestimmung der Titer von NheA und dem Komplex aus NheB und C verzichtet.

Die Einteilung in *high* und *low producer* erfolgte zu Beginn in Vorversuchen unter anderem anhand der Höhe des NheB-Titers nach 6 h Inkubation unter Laborbedingungen. Diese Unterschiede in der Toxinproduktion (Abb. 8 A+C) fielen unter simulierten intestinalen Bedingungen geringer aus und eine eindeutige Einteilung in *high* und *low producer* ließ sich nicht mehr so einfach vornehmen. Außerdem waren in konditioniertem RPMI 1640 Medium die NheB-Titer zu jedem Zeitpunkt vermindert gegenüber den Titern unter Laborbedingungen nach 6 h. Aufgrund des ebenfalls reduzierten Wachstums unter simulierten intestinalen Bedingungen wurde die Produktivität (Titer/OD₆₀₀) errechnet. 11 von 19 Stämmen (58%) des ausgewählten Sets zeigten nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen die höchste Produktivitätsrate (Abb. 8 B+D). Die restlichen 8 Stämme waren nach 6 h unter Laborbedingungen am produktivsten. Unter den 11 Stämmen waren Vertreter aller vier Toxinprofile, *high* und *low producer* sowie Stämme unterschiedlicher Herkunft zu finden. Die Produktivität veränderte sich über die gesamte Messung ab 4 bis 10 h für jeden Stamm gesehen nur wenig, ebenso die NheB-Titer.

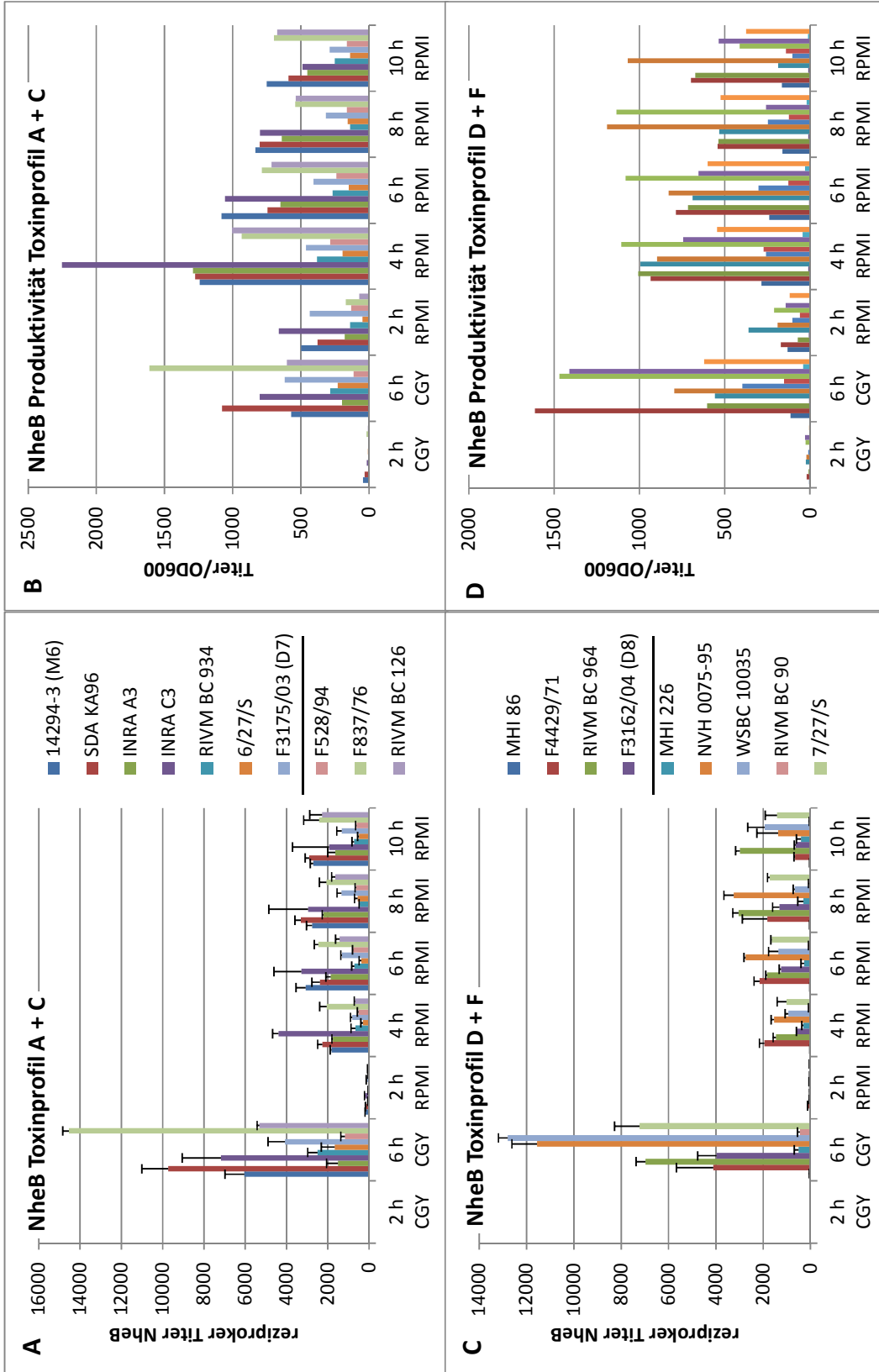


Abb. 8: NheB-Produktion und -Produktivität der 19 *B. cereus* Stämme unter Labor- und simulierten intestinalen Bedingungen, unterteilt nach Toxinprofil A+C (A+B) und Toxinprofil D+F (C+D). Die NheB-Produktion ist dargestellt als reziproker NheB-Titer (A+C) und die Produktivität als Quotient aus reziprokem NheB-Titer und der OD₆₀₀ (B+D). CGY: Laborbedingungen; RPMI: simulierte intestinale Bedingungen. Die Linie in der Legende grenzt Toxintyp A von C bzw. D von F ab.

Bei Bestimmung der Produktion von NheB war aufgefallen, dass in konditioniertem RPMI 1640 Medium im Gegensatz zum CGY-Medium NheB bereits nach 2 h bei allen ausgewählten Stämmen nachweisbar war (Abb. 9). Auch die Produktivitätsraten waren nach 2 h unter simulierten intestinalen Bedingungen höher als unter Laborbedingungen. Die Toxinproduktion startete somit unter simulierten intestinalen Bedingungen bereits nach 2 h. Die Kultivierung unter simulierten intestinalen Bedingungen förderte also die Produktion von NheB bereits zu Beginn der Inkubation maßgeblich. Dieser Effekt ließ sich zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr nachweisen. Auch konnte dies nur für NheB festgestellt werden, da der Sandwich-EIA zum Nachweis von NheB besonders sensitiv ist. Keine der drei HBL-Komponenten war nach 2 h unter Labor- oder simulierten intestinalen Bedingungen nachweisbar.

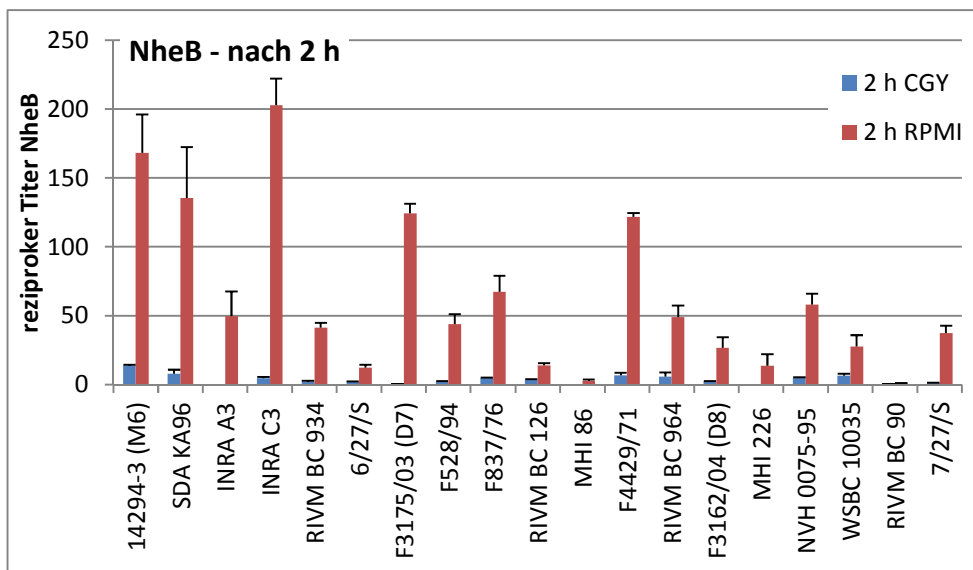


Abb. 9: NheB-Produktion aller 19 *B. cereus* Stämme nach 2 h unter Labor- (blau) und simulierten intestinalen Bedingungen (rot).

F3162/04 (D8)

Der Stamm F3162/04 (D8) war in den durchgeführten Vorversuchen durch eine hohe Toxizität im WST-Zytotoxizitätstest aufgefallen. Der Titer für NheB lag aber nur bei 1:41 (Tabelle 5). Daher wurden für diesen Stamm neben dem Sandwich-EIA für NheB auch die beiden indirekten EIAs mit jeweils nur einem der beiden mAk (2B11 bzw. 1E11) aus dem Sandwich-EIA durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass NheB dieses Stamms mit dem mAk 2B11 nur schlecht, mit dem mAk 1E11 hingegen gut nachgewiesen wurde. Im indirekten EIA mit dem mAk 2B11 lagen die Titer nach 6 h unter Laborbedingungen nur bei 1:12, mit dem mAk 1E11 bei 1:4000. Daher wurden in der Darstellung in Abbildung 8 C die Titer aus

diesem indirekten EIA verwendet. Bei vorangegangenen Untersuchungen von möglichen Kandidaten für das Stammset trat dieses Phänomen bei zwei weiteren Isolaten auf.

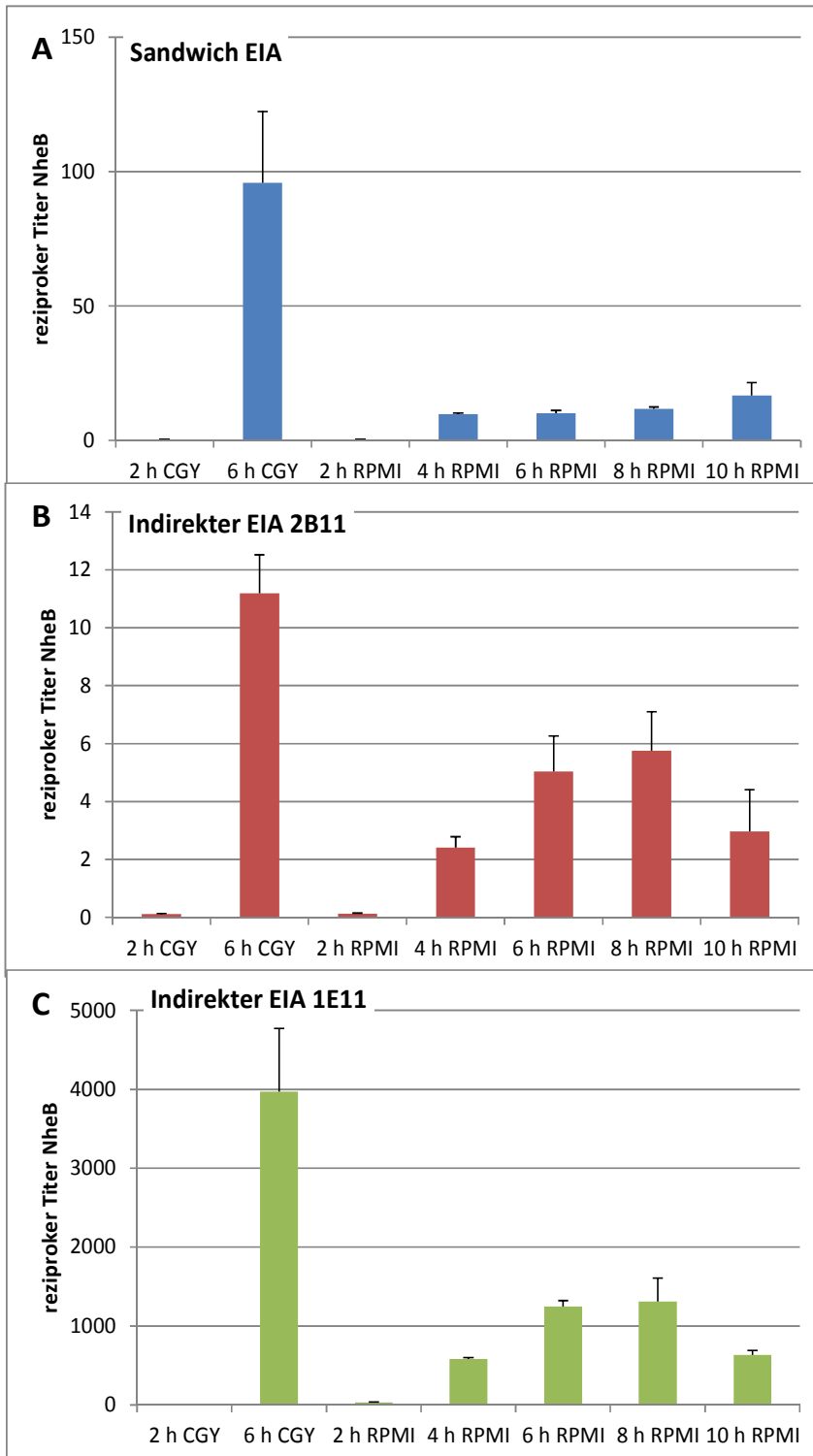


Abb. 10: NheB-Titer des Stamms F3162/04 (D8) im Sandwich-EIA (A), im indirekten EIA 2B11 (B) und 1E11 (C).

2.2.2 HBL

Für HBL L1 ergaben sich die höchsten Titer (Abb. 11 A) nach 6 h unter Laborbedingungen. Die höchste Produktivität (Abb. 11 B) zeigte sich bei 7 von 10 Stämmen (70%) nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen, bei 3 von 10 (30%) nach 6 h unter Laborbedingungen. Unter diesen 7 bzw. 3 Stämmen befanden sich Stämme beider Toxinprofile, unterschiedlicher Herkunft sowie *high* und *low producer*. Die HBL L1-Titer blieben über den gesamten Verlauf der Untersuchung unter simulierten intestinalen Bedingungen auf konstantem Niveau. Die Produktivität hingegen nahm leicht ab. Auch die HBL L2-Titer (Abb. 11 C) waren am höchsten nach 6 h unter Laborbedingungen. In der Produktivitätsrate (Abb. 11 D) zeigten sich zwischen beiden Bedingungen und zu allen Zeitpunkten (2 h ausgenommen) keine großen Unterschiede. Das gleiche galt für die HBL B-Expression (Abb. 11 E). Auch hier war diese nach 6 h unter Laborbedingungen am höchsten, die Produktivität (Abb. 11 F) nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen. Im Toxinprofil C waren Titer und Produktivität niedriger als im Toxinprofil A.

2.3 Zytotoxizität

Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden mithilfe zweier unterschiedlicher Tests durchgeführt. Beim WST-Zytotoxizitätstest verblieben die Kulturüberstände, mit den darin enthaltenen Enterotoxinen, 24 h auf den eukaryotischen Zellen. Am Ende wurde eine Messung der Stoffwechselaktivität durchgeführt, von der ausgehend der reziproke Zytotoxizitätstiter berechnet wurde, bei dem 50% der eukaryotischen Zellen überleben bzw. absterben. Der PI-Test ist eine dynamische Messung, bei der das PI und die Kulturüberstände gleichzeitig auf die Zellen gegeben wurden und sofort im Anschluss die Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen wurde, die abhängig war von der Porenbildung durch die Enterotoxine in der Membran der Zielzellen, durch die das PI einströmen konnte. Aus den sich ergebenden PI-Einstromkurven wurde die maximale lineare Steigung errechnet (vgl. Abb. 4. S. 34).

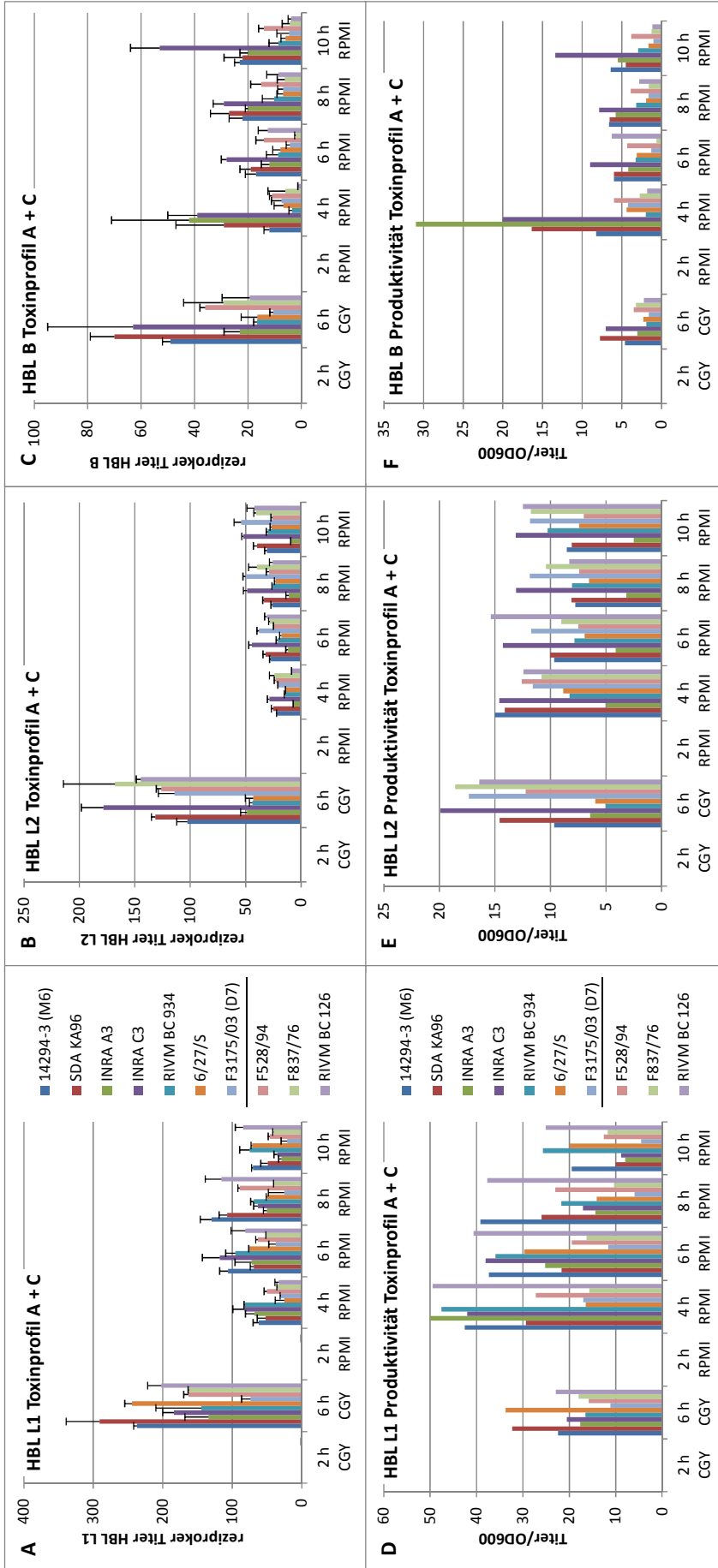


Abb. 11: HBL-Produktion und -Produktivität der 10 HBL-positiven *B. cereus* Stämme unter Labor- und simulierten intestinalen Bedingungen; HBL L1- (A), HBL L2- (B) und HBL B-Produktion (C); HBL L1- (D), HBL L2- (E) und HBL B-Produktivität (F). Die HBL-Produktion ist dargestellt als reziproker Titer (A-C) und die Produktivität als Quotient aus reziprokem Titer und OD₆₀₀ (D-F). CGY: Laborbedingungen; RPMI: simulierte intestinale Bedingungen. Die Linie in der Legende grenzt Toxintyp A von C ab.

2.3.1 WST-Zytotoxizitätstest

Der WST-Zytotoxizitätstest wurde auf Vero- und CaCo-2-Zellen durchgeführt und die Zytotoxizität der Stämme nach 6 h Anzucht unter Labor- (blau in Abb. 12) und simulierten intestinalen Bedingungen (rot in Abb. 12) verglichen. Die reziproken Zytotoxizitätstiter fielen auf Verozellen (Abb. 12 A) bei allen Stämmen unter simulierten intestinalen Bedingungen geringer aus als unter Laborbedingungen. Nach 6 h unter Laborbedingungen ließen sich stark und schwach toxische Stämme unterscheiden, die der vorherigen Einteilung in *high* und *low producer* entsprachen. Diese Unterscheidung war unter simulierten intestinalen Bedingungen aufgrund der viel niedrigeren Zytotoxizitätstiter nicht mehr so einfach möglich. Die reziproken Zytotoxizitätstiter waren auf CaCo-2-Zellen (Abb. 12 B) nach 6 h unter Laborbedingungen generell etwas niedriger als auf Verozellen, besonders aber bei den reinen Nhe-Produzenten.

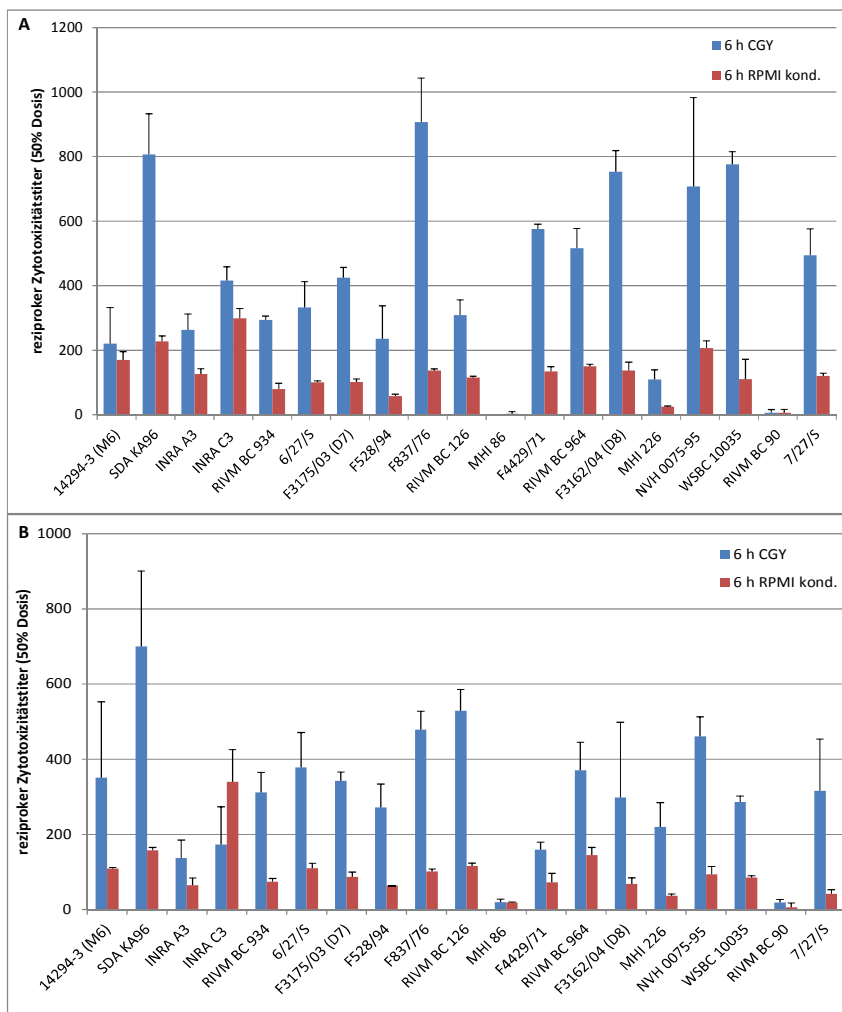


Abb. 12: WST-Zytotoxizitätstest auf Vero- (A) und CaCo-2-Zellen (B). CGY: Laborbedingungen; RPMI: simulierte intestinale Bedingungen.

2.3.2 Zytotoxizität im PI-Test

Die Steigung der Fluoreszenzkurven im PI-Test wurde zu allen beprobten Zeitpunkten bestimmt (Abb. 13). Nach 2 h Anzucht konnte unter beiden Wachstumsbedingungen keine bzw. nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Die höchsten Steigungen der PI-Einstromkurven wurden nach 6 h Anzucht unter Laborbedingungen erreicht (wie auch bei der Enterotoxinproduktion). Die schnellsten Zunahmen in der Fluoreszenzintensität unter simulierten intestinalen Bedingungen waren nach 6 h Anzucht zu beobachten, wobei nach 4, 8 und 10 h Anzucht nur eine leicht verringerte Zunahme aufzuzeigen war. Auffällig aber war, dass zu jedem Zeitpunkt die PI-Einstromgeschwindigkeit in die Zielzellen der Stämme des Toxinprofils D und F (reine Nhe-Produzenten) signifikant geringer war als die der Stämme des Toxinprofils A und C (HBL- und Nhe-Produzenten). Da gerade die NheB-Titer von *high producern* aus Toxinprofil D und F höher lagen als von *low producern* aus Toxinprofil A und C kann Nhe nicht allein für die Porenbildung in den CaCo-2-Zellen verantwortlich sein, sondern HBL muss maßgeblich daran beteiligt sein.

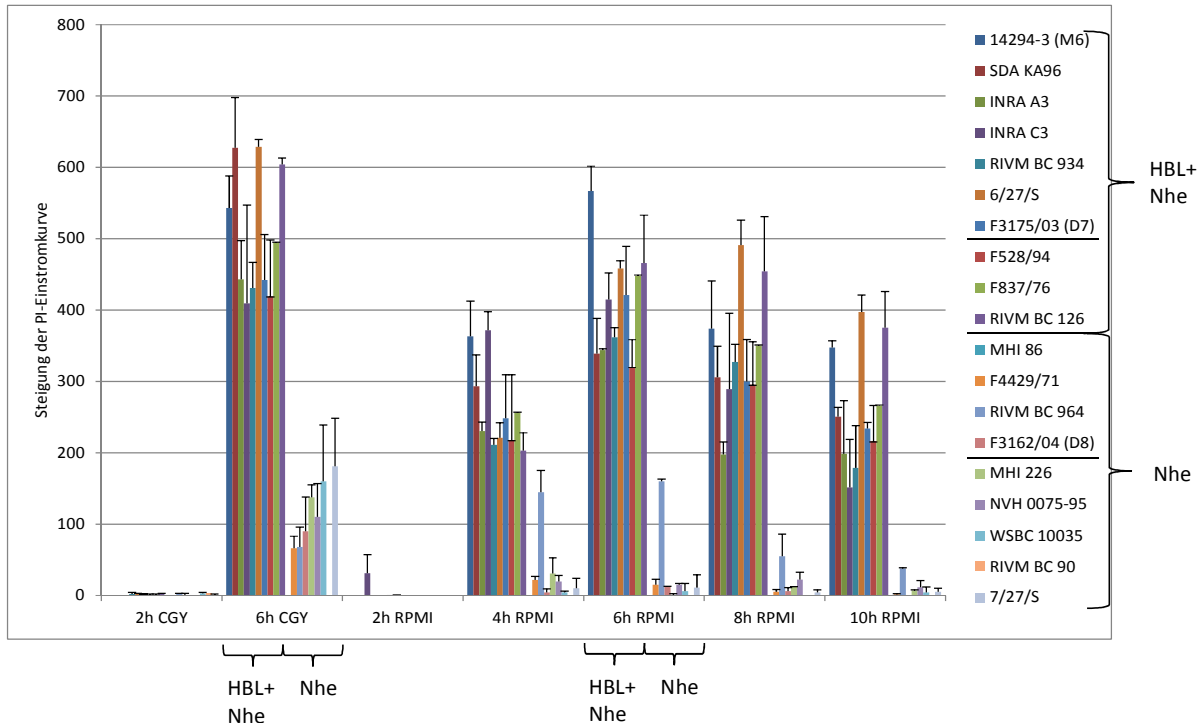


Abb. 13: PI-Test. CGY: Laborbedingungen; RPMI: simulierte intestinale Bedingungen.

2.3.3 WST-Zytotoxizitäts- und PI-Test im Vergleich

Im direkten Vergleich der beiden Referenzstämme für HBL (F837/76) und Nhe (NVH 0075-95) zeigte sich das unterschiedliche Verhalten von reinen Nhe- und HBL/Nhe-Produzenten in den beiden durchgeführten Zytotoxizitätstests deutlich (Abb. 14). Während beide Stämme nach 6 h Anzucht unter beiden Bedingungen ähnlich hohe reziproke Zytotoxizitätstiter im WST-Zytotoxizitätstest (Abb. 14 A) aufwiesen, zeigte sich im PI-Test (Abb. 14 B) ein anderes Bild. Die Einstromgeschwindigkeit von PI in die CaCo-2-Zellen war unter Laborbedingungen beim Nhe-Referenzstamm sehr gering und wurde nach 6 h Anzucht in konditioniertem RPMI 1640 Medium sogar noch weiter reduziert, während die PI-Einstromgeschwindigkeit beim HBL-Referenzstamm unter beiden Bedingungen sehr viel höher war als beim reinen Nhe-Produzenten und untereinander annähernd gleich hoch. Werden beide Zytotoxizitätstests mit den NheB-Titern verglichen (Abb. 14 C), so fällt auf, dass die NheB-Titer im Verhältnis den reziproken Zytotoxizitätstitern aus dem WST-Test entsprachen, während sich keine Übereinstimmung von NheB-Titern und Steigungen im PI-Test zeigte. Der starke PI-Einstrom in die Zellen beim HBL/Nhe-Produzenten ist somit vermutlich von HBL abhängig. Der HBL L1-Titer betrug nach 6 h unter simulierten intestinalen Bedingungen zwar nur 31% des Titors nach 6 h unter Laborbedingungen (HBL L2 17%; HBL B 7%). Die Einstromgeschwindigkeiten im PI-Test waren zu diesem Zeitpunkt aber in etwa gleich hoch. Dies spricht für eine besondere Empfindlichkeit der CaCo-2-Zellen gegenüber HBL.

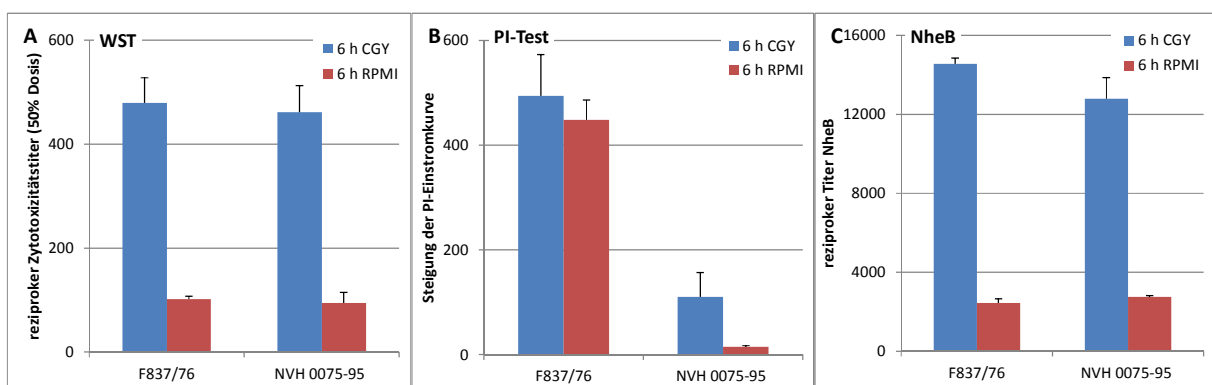


Abb. 14: WST-Zytotoxizitätstest (A) auf CaCo-2-Zellen, PI-Test (B) und NheB-Produktion (C) nach 6 h Anzucht unter Labor- (blau) und simulierten intestinalen Bedingungen (rot) der beiden Referenzstämme für HBL F837/76 und Nhe NVH 0075-95. CGY: Laborbedingungen; RPMI: simulierte intestinale Bedingungen.

3. Untersuchungen zur Proteinsekretion

3.1 Vergleich der extra- und intrazellulären Enterotoxintiter

Die Enterotoxine Nhe und HBL von *B. cereus* sind Exoproteine und lassen sich im Überstand von *B. cereus* Flüssigkulturen durch Anwendung spezifischer EIAs nachweisen. Abhängig von der Höhe des im Kulturüberstand bestimmten Toxintiters werden *B. cereus* Isolate in starke und schwache Toxinproduzenten eingeteilt. Die Ursache für hohe bzw. niedrige extrazelluläre Toxinkonzentrationen ist bislang unbekannt. Um eine unterschiedliche Proteinsekretion als Ursache für die verschieden hohen extrazellulären Enterotoxinkonzentrationen zu untersuchen, wurden im Folgenden die Titer der Komponenten NheB und HBL L1 im Kulturüberstand und im Gesamtzellextrakt ermittelt.

Die Untersuchungen zur Sekretion der Enterotoxine wurden mit dem Stammset durchgeführt, da hier bereits starke und schwache Toxinproduzenten z.T. in Paaren vorlagen (gleiches Toxingprofil, aber unterschiedlich hohe Enterotoxintiter). Die *B. cereus* Stämme wurden unter Standard-Laborbedingungen angezogen, die Flüssigkulturen nach sechsstündiger Inkubation abzentrifugiert und sterile Kulturüberstandsproben entnommen. Aus dem erhaltenen Zellpellet wurde der Zellextrakt gewonnen. Die Proben aus Zellextrakt und Kulturüberstand wurden im direkten EIA zum Nachweis von NheB und im indirekten EIA zum Nachweis von HBL L1 eingesetzt.

In Abbildung 15 sind die aus Kulturüberstand und Zellextrakt bestimmten NheB-Titer dargestellt. Die aus dem Kulturüberstand bestimmten NheB-Titer lagen bei starken Toxinproduzenten bis zu 1:20300 (WSBC 10035) und bei schwachen Toxinproduzenten bis zu 1:27 (MHI 86). Diese Titer unterscheiden sich zu denen aus Abbildung 8, Abschnitt 2.2.1, da sie aus einer unabhängigen Anzucht gewonnen wurden. Die intrazellulären NheB-Titer waren immer kleiner 1:10 und betragen immer weniger als 0,3% der extrazellulären Titer. Hier fand sich kein Unterschied zwischen starken und schwachen Toxinproduzenten. Das bedeutet, dass alle Stämme in der Lage sind, NheB zu sekretieren. Im Zellextrakt konnte kein HBL L1 nachgewiesen werden, daher sind in Abbildung 16 nur die aus dem Kulturüberstand bestimmten HBL L1-Titer der HBL positiven *B. cereus* Stämme dargestellt.

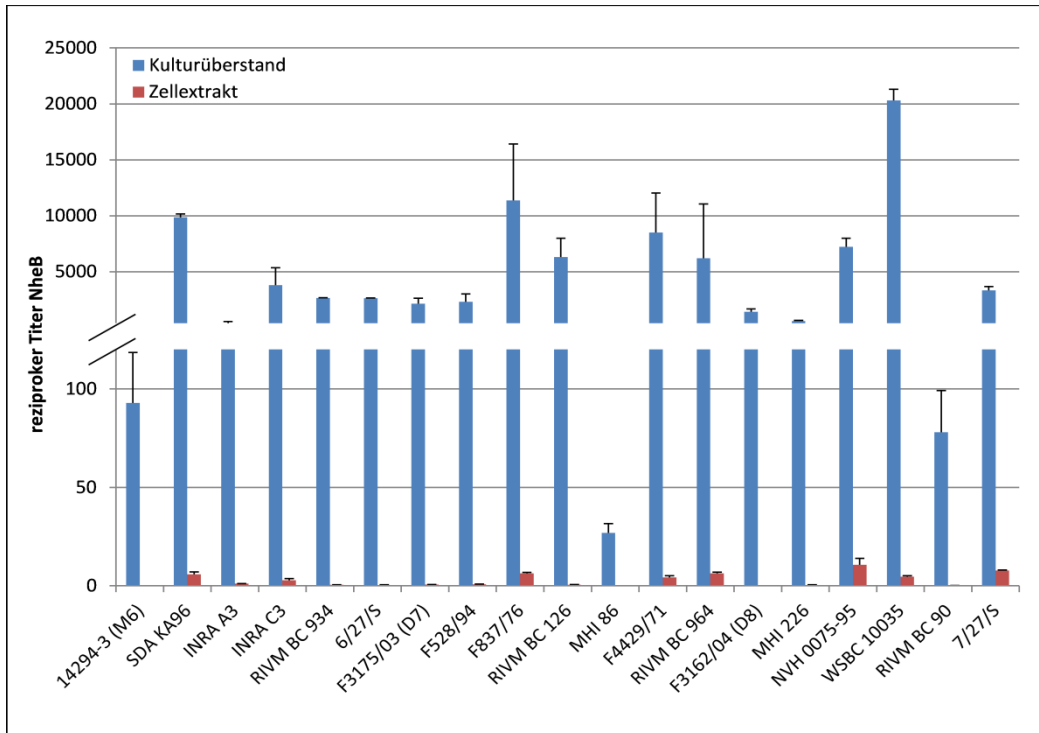


Abb. 15: Nachweis der Enterotoxinkomponente NheB im Kulturüberstand (blau) und Zellextrakt (rot) des *B. cereus* Stammsets.

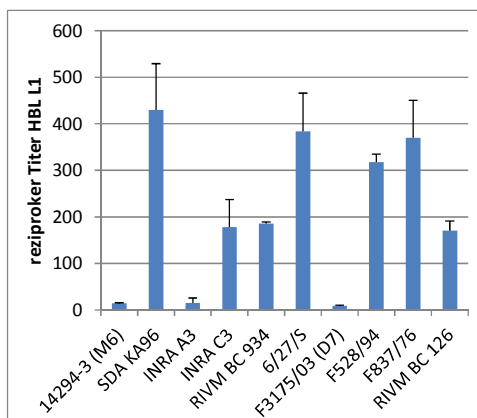


Abb. 16: Nachweis der Enterotoxinkomponente HBL L1 im Kulturüberstand und im Zellextrakt der 10 HBL-positiven *B. cereus* Stämme.

Da intrazellulär nur sehr wenig (NheB < 1:10) bzw. gar kein (HBL L1) Enterotoxin nachgewiesen werden konnte, können extrazelluläre Toxinkonzentrationen nicht mit einem Defekt im Ausschleusungsmechanismus der Zelle erklärt werden. Aufgrund der fehlenden Akkumulation der Enterotoxinkomponenten im Zytoplasma bei schwachen Toxinproduzenten ist ein Defekt in der Sekretion der Enterotoxine, der zu einer erniedrigten extrazellulären Toxinkonzentration führt, unwahrscheinlich. Somit müssen die unterschiedlich hohen Toxinlevel auf Unterschieden in der Toxinproduktion vor der Sekretion basieren.

3.2 Vergleich der extra- und intrazellulären Enterotoxintiter nach Zugabe von Natriumazid

Die einzelnen Komponenten der Enterotoxine Nhe und HBL werden vermutlich über den Sec-Translokationsweg aus der Zelle ausgeschleust (Fagerlund et al., 2010). Dieser Transport eines neu synthetisierten Proteins über die Zellmembran ist ATP-abhängig. Natriumazid stoppt durch Störung der Elektronentransportkette die ATP-Produktion und blockiert somit den Sec-Translokationsweg.

Die beiden Referenzstämme für HBL F837/76 und Nhe NVH 0075-95 wurden unter Standard-Laborbedingungen für 6 h kultiviert. Nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen in CGY, um bis zu diesem Zeitpunkt produziertes Toxin zu entfernen, wurde das Zellpellet in CGY resuspendiert und 2 mmol/l Natriumazid hinzu gegeben. Im Anschluss wurde die Kultivierung für weitere 20 min fortgesetzt. Danach wurden durch Zentrifugation Kulturüberstand und Zellpellet gewonnen, aus dem wiederum Gesamtzellextrakt hergestellt wurde. Zum Vergleich wurden Natriumazid freie Kulturen mitgeführt. Im EIA wurden die NheB-Titer aus Zellextrakt und Kulturüberstand ermittelt.

In Abbildung 17 sind die Titer der beiden Referenzstämme dargestellt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min erreichte F837/76 (blau) im Kulturüberstand ohne Zugabe von Natriumazid einen Titer von 1:750, mit Zugabe von Natriumazid einen Titer von 1:80. Im Zellextrakt wurde jeweils ein Titer von 1:10 erreicht. Ohne zusätzliche Zugabe von Natriumazid betrug dieser 1% des ermittelten Titers im Kulturüberstand, mit Zugabe von Natriumazid waren dies 11%. Der Referenzstamm für Nhe NVH 0075-95 (rot) erreichte im Kulturüberstand ohne Zugabe von Natriumazid einen Titer von 1:790 und mit Natriumazid 1:303. Im Zellextrakt betrug die Titer jeweils 1:60. Ohne Natriumazid waren dies 7% des Titers im Kulturüberstand und mit Zugabe 21%.

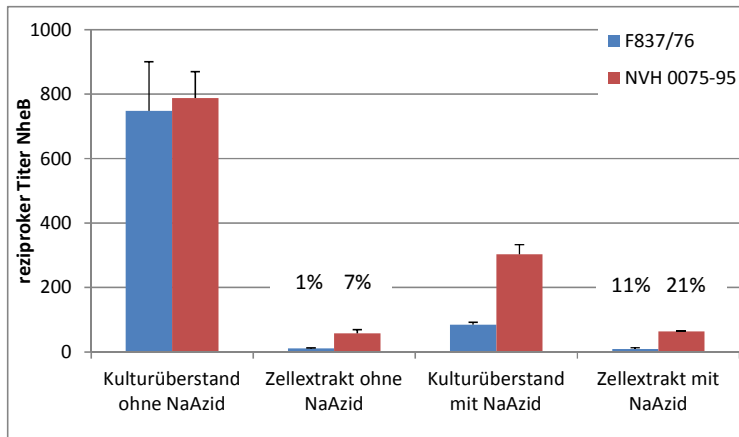


Abb. 17: Nachweis der Enterotoxinkomponente NheB ohne und nach Zugabe von Natriumazid (NaN₃) im Kulturüberstand und Zellextrakt der Referenzstämme F837/76 (blau) und NVH 0075-95 (rot). Prozentangaben beziehen sich auf das Verhältnis von reziprokem Titer im Zellextrakt zum Kulturüberstand.

Zwar ist Natriumazid nicht spezifisch in der Hemmung des Sec-Translokationswegs, sondern hemmt aufgrund der irreversiblen Störung der ATP-Produktion alle ATP-abhängigen Vorgänge in der Zelle. Aber der prozentuale Anstieg des im Zellextrakt ermittelten Titers für NheB im Verhältnis zum Kulturüberstand nach Natriumazid Zugabe lässt auf eine verstärkte Akkumulation der Enterotoxinkomponente NheB im Zytoplasma nach Hemmung des Sec-Translokationswegs schließen.

V DISKUSSION

B. cereus ist ein bedeutender Lebensmittelinfektions- und intoxicationserreger, der zwei Formen (Diarrhoe- und emetische Form) gastrointestinaler Erkrankungen auslösen kann. Problematisch ist das häufige Vorkommen von *B. cereus* in Lebensmitteln und die Schwierigkeit, das pathogene Potential dieser Isolate abzuschätzen. Mindestens eines der bekannten Enterotoxingene kann in jedem *B. cereus* Isolat nachgewiesen werden. Die Präsenz der Gene liefert jedoch keinen Hinweis auf das Toxizitätspotential, da die Enterotoxinproduktion stark stammabhängig ist und die Menge der produzierten Enterotoxine maßgeblich die Toxizität eines Stamms bestimmt (Guinebretière et al., 2002; Moravek et al., 2006). Bisher ist jedoch unbekannt, was diese unterschiedlich starke Enterotoxinproduktion der einzelnen Stämme und die davon abhängige Toxizität bedingt. Bereits gezeigt wurde aber, dass unterschiedliche Umgebungsbedingungen die Enterotoxinproduktion beeinflussen können (Duport et al., 2004; Ouhib et al., 2006; Ouhib-Jacobs et al., 2009). Daher sollte in dieser Arbeit das ausgewählte Stammset vergleichend unter Labor- und simulierten intestinalen Bedingungen untersucht werden, um auch intestinale Einflussfaktoren auf das Verhalten der einzelnen Stämme zu berücksichtigen. Da bisher nicht bekannt ist, ob das Toxizitätspotential eines *B. cereus* Stamms auf Genom-, Transkriptom- oder Proteomebene reguliert bzw. bestimmt wird, wurden gemeinsam mit den Partnerforschungsstellen vergleichende Analysen des Genoms, Transkriptoms und Proteoms bzw. Sekretoms der 19 ausgewählten *B. cereus* Stämme durchgeführt. Die Ergebnisse der Projektpartner sind noch nicht publiziert und im Folgenden als persönliche Mitteilungen eingefügt, wenn dies zur Ergänzung der eigenen Resultate nötig war.

Nach der Gesamtgenomsequenzierung am ZIEL der TU München wurde festgestellt, dass sich stark und schwach toxische Stämme nicht anhand ihrer Toxingensequenzen unterscheiden lassen. Die Sequenzen der einzelnen *nhe*- und *hbl*-Gene und auch ihrer Promotorregionen sind innerhalb des Stammsets stark konserviert. Für den Stamm MHI 226, mittels Multiplex-PCR zunächst dem Toxintyp F, also HBL-negativ, zugeordnet, konnte in der Sequenzierung ein verkürztes *hbl*-Operon nachgewiesen werden. *hblB* ist nicht vorhanden. Das *hblCDA*-Operon von MHI 226 wies starke Sequenzabweichungen zu *hblCDA* der anderen HBL-positiven Stämme auf (Boehm, persönliche Mitteilung). Im EIA ließ sich HBL L1 detektieren, wohingegen weder HBL B noch HBL L2 nachgewiesen werden

konnten. Daher wurde die Einteilung von MHI 226 zum Toxintyp F belassen, da für die biologische Aktivität von HBL alle drei Proteinkomponenten benötigt werden (Beecher et al., 1995). Die Gesamtgenomsequenzen der ausgewählten Stämme unterscheiden sich hingegen stark. Es besteht untereinander 42 – 82% Ähnlichkeit (Boehm, persönliche Mitteilung). Eine große Heterogenität unter Diarrhoe-assoziierten und anderen nicht emetischen *B. cereus* stellten auch Ehling-Schulz et al. (2005) fest, wohingegen emetische Stämme ein eigenes Cluster innerhalb des phylogenetischen Stammbaums bilden.

Ein Einfluss von zusätzlichen Virulenzfaktoren auf das toxische Potential eines *B. cereus* Stamms ist schwierig abzuschätzen. 100% aller in dieser Arbeit untersuchten Stämme besitzen die *nhe*-, *inhA1*-, *nprA*- und *sph*-Gene. *Hbl* ließ sich in 53% aller untersuchten Stämme nachweisen, wovon die eine Hälfte lebensmittelassoziiert ist und die andere in Verbindung mit einem Lebensmittelvergiftungsfall steht. *CytK2* war in 58% der Stämme nachweisbar und ebenfalls sowohl in lebensmittelassoziierten als auch in klinischen Isolaten zu finden. In vier der 19 untersuchten Stämme (21%) ließ sich *hlyII* nachweisen, wobei jeweils zwei Stämme als *high* bzw. *low producer* eingestuft wurden. Der Referenzstamm F837/76, einer der beiden *high producer*, die *hlyII* besitzen, wurde aus einer postoperativen Wundinfektion isoliert, der Stamm F528/94 nach einem Lebensmittelvergiftungsfall. Dieser wurde aber als *low producer* eingestuft. Die beiden anderen Stämme, jeweils ein *high* und ein *low producer*, wurden aus Lebensmitteln ohne Verbindung zu einer Lebensmittelvergiftung isoliert. Cadot et al. (2010) hingegen zeigten, dass *hlyII* in den von ihnen untersuchten Stämmen nur in den pathogenen vorkam. Nach unserer Studie besteht keine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Toxin- und zusätzlichen Virulenzgenen und dem Toxizitätspotential eines Stamms, was auch den Untersuchungen von Guinebretière et al. (2002) und Moravek et al. (2006) entspricht, womit sich stark und schwach toxische Stämme nicht anhand des Nachweises bestimmter Toxingene mittels PCR unterscheiden lassen.

Die Toxingentranskription, mittels qRT-PCR für *nheB* und *hblD* bestimmt, erwies sich wie die Toxinproduktion als ebenfalls stark stammspezifisch, korrelierte aber nicht bei jedem Stamm mit der produzierten, im Kulturüberstand nachweisbaren Toxinmenge (Krey, persönliche Mitteilung), weshalb eine posttranskriptionelle Regulation, die Einfluss auf die Produktion der Toxine nimmt, möglich ist. Die simulierten intestinalen Bedingungen in konditioniertem RPMI 1640 Medium hatten wie auf die Toxinproduktion ebenso einen fördernden Effekt auf die Toxingentranskription. Diese war unter simulierten intestinalen

Bedingungen im Vergleich zu Laborbedingungen immer erhöht und bereits nach 2 – 4 h maximal. Unter Laborbedingungen war die Toxingentranskription nach 6 h höher als nach 2 h. Während die Transkriptionseffizienz (Transkription/OD₆₀₀) von *nheB* und *hblD* nach 2 h in konditioniertem RPMI 1640 Medium am höchsten war (Krey, persönliche Mitteilung), war die NheB-Produktivität für 11 von 19 Stämmen nach 4 h in konditioniertem RPMI 1640 Medium am höchsten, für die anderen 8 Stämme nach 6 h unter Laborbedingungen. Die HBL L1-Produktivität war für 7 von 10 Stämmen ebenfalls nach 4 h in konditioniertem RPMI 1640 Medium am höchsten, für die verbleibenden drei nach 6 h in CGY-Vollmedium.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Toxinsekretion zeigten, dass die Ausschleusung der Enterotoxine aus der Zelle bei allen Stämmen nahezu vollständig erfolgte. Es konnte keine Akkumulation von Toxinen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. Daher werden Unterschiede in der Toxinproduktion bzw. in der Menge der nachweisbaren Enterotoxine im Kulturüberstand nicht auf einen möglichen Defekt im Sekretionsmechanismus zurückgeführt. Bei weiteren Untersuchungen des Proteoms und dessen Sekretion wurde festgestellt, dass durch Inkubation in konditioniertem RPMI 1640 Medium nicht nur die Toxinproduktion verstärkt, sondern die gesamte Proteinsekretion gefördert wurde. Diese begann wie die Toxinproduktion unter simulierten intestinalen Bedingungen ebenfalls früher als unter Laborbedingungen. Nach 2 h in konditioniertem RPMI 1640 Medium war die extrazelluläre Proteinkonzentration bei allen 19 Stämmen signifikant erhöht gegenüber der nach 2 h in CGY-Vollmedium (Rademacher, persönliche Mitteilung), ebenso wie die NheB-Titer. Die Proteinproduktivität (extrazelluläre Proteinkonzentration/OD₆₀₀) war ebenfalls nach 2 h unter simulierten intestinalen Bedingungen maximal, genauso wie die Proteinsekretionseffizienz (Anteil des Sekretoms am Gesamtprotein) nach 2 h unter simulierten intestinalen Bedingungen am höchsten war (Rademacher, persönliche Mitteilung).

Bei der Bestimmung der NheB- und Zytotoxizitätstiter, zur ausführlichen Charakterisierung der einzelnen Stämme, war der Stamm F3162/04 (D8) besonders aufgefallen. Für diesen Stamm konnte im Sandwich-EIA nur wenig NheB nachgewiesen werden, im WST-Zytotoxizitätstest reagierte dieser hingegen stark zytotoxisch. Wurde ein indirekter EIA mit dem für NheB spezifischen mAk 2B11 durchgeführt, so war fast kein NheB nachweisbar, mit dem ebenfalls für NheB spezifischen mAk 1E11 waren die NheB-Titer dagegen relativ hoch. Da im Sandwich-EIA der mAk 2B11 als Beschichtungsantikörper eingesetzt wird, wurde bei

der Durchführung dieses Tests NheB nur schlecht detektiert. Dies ist auf eine verringerte Bindungsfähigkeit des mAks 2B11 an das NheB-Protein dieses Stamms zurückzuführen, die auf einer Veränderung des Binde-Epitops des mAks 2B11 beruht. Didier et al. (2012) zeigten, dass das Epitop des mAks 2B11 zwischen den Aminosäuren 122 und 151 des NheB-Proteins liegt und diese Region vermutlich an der Bindung von NheB an NheC beteiligt ist. Der Stamm F3162/04 (D8) ist dennoch stark zytotoxisch, das heißt, die Epitopveränderung reduziert zwar die Bindungsfähigkeit des mAks 2B11, verhindert aber nicht die Interaktion von NheB und NheC. Die Sequenzierung des für NheB kodierenden Gens dieses Stamms zeigte eine Punktmutation, die einen Austausch der Aminosäure 151 von Glutaminsäure zu Asparaginsäure bewirkt und dadurch eine Verschlechterung der Bindungsfähigkeit des mAks 2B11 bedingt (Didier, persönliche Mitteilung). Da in der Regel das Zytotoxizitätspotential eines *B. cereus* Isolats durch die Höhe des NheB-Titers gut abgeschätzt werden kann (Moravek et al., 2006; Jeßberger et al., 2014), würde fälschlicherweise vermutet werden, dass dieser Stamm schwach toxisch ist. Um den Stamm F3162/04 (D8) mit den anderen 18 Stämmen des Stammsets vergleichen zu können, wurden in dieser Arbeit dessen NheB-Titer mit dem mAk 1E11 im indirekten EIA bestimmt.

Die NheB- und Zytotoxizitätstiter wurden in vorangegangenen Untersuchungen nach 6 h unter Standard-Laborbedingungen bestimmt und daran die Einteilung in *high* und *low producer* bzw. in stark und schwach toxische Stämme vorgenommen. Unter den aktuell durchgeführten Untersuchungen unter Laborbedingungen ließ sich diese Einteilung bestätigen, wobei unter simulierten intestinalen Bedingungen die Toxinproduktion verringert und eine deutliche Unterscheidung von vorher in *high* und *low producer* eingeteilten Stämmen weniger gut möglich war. NheB- und Zytotoxizitätstiter im WST-1-Bioassay auf Verozellen korrelierten nach 6 h unter Laborbedingungen miteinander ($R=0,84$; $P<0,05$) wie von Moravek et al. (2006) und Jeßberger et al. (2014) bereits beschrieben. Die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten R wurde nach positiver Testung auf Normalverteilung mit dem Pearson Korrelationstest durchgeführt. Nach 6 h unter simulierten intestinalen Bedingungen war die Korrelation sogar noch stärker ($R=0,9$; $P<0,05$). Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen HBL B und der Zytotoxizität unter simulierten intestinalen Bedingungen festgestellt werden ($R=0,76$; $P<0,05$). Für die anderen HBL-Toxinkomponenten bestand in dieser Studie keine Korrelation zur Zytotoxizität. Der WST-1-Bioassay wurde zusätzlich zu Vero- auch auf CaCo-2-Zellen durchgeführt, da sich diese aus humanen Kolonadenokarzinomzellen hervorgegangene Zelllinie zur Simulation von Darmepithel eignet. CaCo-2-Zellen waren

etwas weniger empfänglich für die zytotoxische Aktivität der Kulturüberstände als Verozellen. NheB- und Zytotoxizitätstiter korrelierten weniger stark miteinander als auf Verozellen (nach 6 h unter Laborbedingungen: $R=0,61$; $P<0,05$; nach 6 h unter simulierten intestinalen Bedingungen: $R=0,66$; $P<0,05$). Hierbei konnte ebenfalls eine Korrelation von HBL B ($R=0,76$; $P<0,05$) und HBL L2 ($R=0,70$; $P<0,05$) zur Zytotoxizität festgestellt werden, wobei vorher gezeigt worden war, dass keine Korrelation zwischen HBL L2 und der Zytotoxizität auf CaCo-2-Zellen besteht, stattdessen aber HBL L1 mit dieser korreliert (Jeßberger et al., 2014). Dies kann darin begründet sein, dass in dieser Arbeit nur zehn HBL-positive Stämme untersucht wurden. Besonders bei den reinen Nhe-Produzenten waren die reziproken Zytotoxizitätstiter nach 6 h unter Laborbedingungen auf CaCo-2-Zellen niedriger als auf Verozellen. Unterschiede zwischen *high* und *low producer* ließen sich dennoch erkennen, auch wenn diese nicht so stark wie auf Verozellen ausgebildet waren. Eine geringere Empfindlichkeit der CaCo-2-Zellen gegenüber dem Kulturüberstand eines reinen Nhe-Produzenten stellten auch Jeßberger et al. (2014) fest, außerdem zeigten sie, dass auf Verozellen Nhe einen größeren Anteil (mehr als 60%) an der zytotoxischen Aktivität hat als auf CaCo-2-Zellen (Nhe und HBL jeweils 50%). Zur Bestimmung des Toxizitätspotentials neuer *B. cereus* Isolate sollten Zytotoxizitätstests daher standardmäßig auf CaCo-2-Zellen durchgeführt werden.

Bei der Ermittlung der Zytotoxizität mit dem PI-Test wurde gezeigt, dass *high* und *low producer* HBL-positiver Stämme generell einen stärkeren PI-Einstrom in die CaCo-2-Zellen aufzeigen, als *high* und *low producer*, die nur Nhe produzieren. In WST-1-Bioassays dagegen wurde gezeigt, dass die Zytotoxizität hauptsächlich von Nhe abhängig ist (Moravek et al., 2006). HBL erwies sich als maßgeblich für einen schnellen PI-Einstrom in die Zielzelle, der durch eine Porenbildung in der Zellmembran bedingt ist, da PI eine intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Der PI-Einstrom ist vor allem durch HBL bedingt, da auch Stämme, die wenig HBL produzieren, einen im Vergleich zu reinen Nhe-Produzenten schnelleren PI-Einstrom in die Zelle aufweisen. Die geringen Unterschiede in der Einstromgeschwindigkeit von HBL-positiven starken und schwachen Toxinproduzenten legen nahe, dass zudem CaCo-2-Zellen besonders empfindlich auf HBL reagieren. Jeßberger et al. (2014) zeigten bereits den schnelleren PI-Einstrom bei HBL-/Nhe-Produzenten im Gegensatz zu reinen Nhe-Produzenten für die Zelllinien Vero, CaCo-2 und A549. Außerdem zeigten sie, dass verschiedene Zelllinien unterschiedlich empfindlich gegenüber Nhe und HBL sind. Für die Enterotoxine ist bisher nicht bekannt, ob sie unspezifisch oder über einen bestimmten

Rezeptor an die Zellmembran der Zielzelle binden. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der CaCo-2-Zellen gegenüber Nhe und HBL während des PI-Tests lassen zumindest einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der beiden Enterotoxinkomplexe vermuten und die unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen Zelllinien gegenüber Nhe und HBL eine Bindung über Rezeptoren.

Außer der unterschiedlich starken Enterotoxinproduktion, die die Toxizität von *B. cereus* Stämmen bedingt, konnten bisher keine spezifischen Merkmale bzw. Marker identifiziert werden, die eine sichere und eindeutige Unterscheidung von *high* und *low producer* und damit von stark und schwach toxischen Stämmen ermöglicht. Auch auf genetischer Ebene konnten keine Unterscheidungsmerkmale gefunden werden. Dafür wurde festgestellt, dass die Kultivierung unter simulierten intestinalen Bedingungen einen fördernden Einfluss auf die Toxinproduktion hat.

Diese vergleichende Untersuchung unter Labor- und simulierten intestinalen Bedingungen wurde durchgeführt, da die Diarrhoe-auslösenden Enterotoxine erst nach Verzehr eines mit *B. cereus* Sporen bzw. vegetativen Zellen kontaminierten Lebensmittels im menschlichen Darm gebildet werden. Hierbei wurden zunächst Änderungen in der Umgebungstemperatur (von 32 auf 37 °C) und der Sauerstoffzufuhr (aerob zu anaerob) vorgenommen und später der zusätzliche Einfluss von konditioniertem Medium auf Wachstum, Toxinproduktion und Zytotoxizität untersucht.

Eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C steigerte zunächst das Wachstum und zu Beginn der Kultivierung auch die Toxinproduktion bei beiden Referenzstämmen, wohingegen im weiteren Verlauf vor allem beim Referenzstamm F837/76 NheB und HBL L1 sehr schnell nicht mehr nachweisbar waren. Wurde die Sauerstoffzufuhr reduziert, so stiegen im Vergleich die Toxintiter langsamer an. Zum Ende der Kultivierung waren dagegen unter reduzierter Sauerstoffzufuhr die Toxinproduktivitätsraten höher. Duport et al. (2004) beobachteten, dass bei dem von ihnen untersuchten *B. cereus* Stamm unter Anaerobie die Wachstumsraten niedriger waren, wobei die HBL-Produktion erhöht war. Auch Ouhib et al. (2006) postulierten, dass niedrigere Wachstumsraten die Enterotoxinproduktion steigern. In der vorliegenden Untersuchung war dieser Effekt nicht so stark ausgebildet und an den absoluten Toxintitern nicht gut erkennbar. Allerdings konnte auch hier zum Ende der Kultivierung eine Erhöhung der Toxinproduktivitätsraten unter reduzierter Sauerstoffzufuhr beobachtet werden.

Um das Darmmilieu noch besser zu simulieren, wurde RPMI 1640 Medium verwendet, das auf CaCo-2-Zellen vorinkubiert wurde. Die Produktion sowie Produktivität von NheB war zu Beginn der Kultivierung in konditioniertem RPMI 1640 Medium im Vergleich zur Inkubation unter Laborbedingungen maßgeblich gesteigert. Dies konnte bei allen untersuchten Stämmen beobachtet werden. Um zu bestätigen, dass dieser Effekt durch die Präinkubation des Mediums mit den CaCo-2-Zellen bedingt ist, wurden unter sonst gleichen Bedingungen Wachstum und NheB-Produktion von zehn *B. cereus* Stämmen in konditioniertem und nicht vorbehandeltem RPMI 1640 Medium vergleichend bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die NheB-Produktion und -Produktivität während der ersten 4 h der Kultivierung in konditioniertem RPMI 1640 Medium gefördert und verstärkt wurde (Jeßberger, persönliche Mitteilung). Außerdem wurden zwei *B. cereus* Stämme mit ausdifferenzierten CaCo-2-Zellen in Transwells co-kultiviert. Dabei erlauben die Transwells einen Austausch von Molekülen, wohingegen Bakterien und CaCo-2-Zellen durch eine Membran (Porengröße 2 µm) voneinander getrennt sind und dadurch der direkte Kontakt verhindert wird. Während der Co-Kultivierung war die NheB-Produktion zu jedem Zeitpunkt gegenüber einer Vergleichskontrolle ohne CaCo-2-Zellen gesteigert (Jeßberger, persönliche Mitteilung). Die Toxinproduktion scheint also durch bislang unbekannte Faktoren angeregt zu werden, die von CaCo-2-Zellen sekretiert und von den Bakterien verbraucht werden.

Auch in Untersuchungen zur Auskeimung von *B. cereus* Sporen konnte gezeigt werden, dass diese durch ausdifferenzierte CaCo-2-Zellen induziert wird (Wijnands et al., 2007; Hornstra et al., 2009). Die Sporenauskeimung konnte sowohl bei gleichzeitiger Inkubation von Sporen und ausdifferenzierten CaCo-2-Zellen beobachtet werden, als auch im Kulturüberstand von ausdifferenzierten CaCo-2-Zellen (konditioniertes Medium), jedoch nicht im Kulturüberstand, in dem bereits *B. cereus* Sporen inkubiert worden waren, was eine Aufnahme oder einen Abbau der Auskeimung induzierenden Komponenten nahelegte (Wijnands et al., 2007). Da die Förderung der Toxinproduktion in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls durch auf CaCo-2-Zellen vorinkubiertes Medium erwirkt wurde, wäre es möglich, dass die von CaCo-2-Zellen abgegebenen Faktoren, die eine Auskeimung der Sporen induzieren, ebenfalls für die Förderung der Toxinproduktion verantwortlich sind. Wijnands et al. (2007) zeigten bereits, dass die von CaCo-2-Zellen abgegebenen, die Auskeimung induzierenden Komponenten hitze- und proteolysestabil sind.

Die höchste allgemeine Toxinproduktivitätsrate wurde bei einem Großteil der Stämme nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen erzielt. Relativ zum Wachstum wurde somit eine größere Toxinmenge unter simulierten intestinalen als unter Laborbedingungen produziert. Die höchsten absoluten Toxintiter wurden für jeden Stamm hingegen nach 6 h unter Laborbedingungen erreicht. Dies ist auf das starke Wachstum und die dadurch bedingte große Biomasse (hohe OD₆₀₀) zurückzuführen. Diese Beobachtungen bestätigten wiederum Duport et al. (2004), die bei einem *B. cereus* Stamm zeigten, dass langsame Wachstumsraten unter anaeroben Bedingungen die HBL-Toxinproduktion verstärken. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Stämme zwar in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, wuchsen aber viel langsamer als unter Laborbedingungen. Die hohe Toxinproduktivitätsrate nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen traf aber nicht für alle 19 untersuchten *B. cereus* Stämme zu. Dies deutet darauf hin, dass sich die ausgewählten Stämme an unterschiedliche Umweltbedingungen adaptiert haben und damit unterschiedlich auf die gegebenen Kultivierungsbedingungen reagieren, wobei unter den Stämmen, die nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen die höchste Toxinproduktivitätsrate zeigten, sowohl *high* als auch *low producer* und Stämme mit verschiedenen Toxigenprofilen und unterschiedlicher Herkunft waren.

Die Toxinproduktion in *B. cereus* unterliegt der Regulation durch das Protein PlcR. PlcR, dessen Transkription am Anfang der stationären Phase beginnt und positiv autoreguliert ist, ist Teil eines *Quorum sensing* Systems und damit von der Zelldichte abhängig (Lereclus et al., 1996; Gohar et al., 2008). Da nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen bei fast 60% der Stämme die höchste Produktivitätsrate beobachtet wurde, die Stämme sich zu diesem Zeitpunkt aber erst in der Mitte der exponentiellen Phase befanden und die stationäre Phase noch nicht erreicht hatten, kann die Toxinproduktion nicht allein durch PlcR reguliert werden. Auch andere Faktoren werden wahrscheinlich an der Regulation der Toxinproduktion beteiligt sein. Unter anderem können die bereits oben erwähnten sekretierten Faktoren der CaCo-2-Zellen hierbei eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit konnte durch die Charakterisierung eines ausgewählten Stammsets unter Labor- und simulierten intestinalen Bedingungen gezeigt werden, dass diese unterschiedlichen Kultivierungsmethoden unterschiedliche Auswirkungen auf Wachstum, Toxinproduktion und Zytotoxizität haben. Die Förderung der *B. cereus* Toxinproduktion durch von CaCo-2-Zellen sekretierte Faktoren legt nahe, dass der Kontakt von *B. cereus* mit

dem Epithel im menschlichen Darm, in unseren Untersuchungen durch CaCo-2-Zellen simuliert, ebenfalls Einfluss auf die Toxinproduktion nimmt. Daher ist es wichtig, dass bei der Bestimmung des Pathogenitätspotentials eines *B. cereus* Isolats der Effekt der Darmepithelzellen auf die Toxinproduktion berücksichtigt wird. Eine Eingrenzung, welche sekretierten Faktoren diesen Effekt ausüben, kann durch Analyse des konditionierten Mediums vorgenommen werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Da Clavel et al. (2004) gezeigt haben, dass auch die verzehrte Nahrung, mit der *B. cereus* aufgenommen wird, einen Effekt auf die Überlebensfähigkeit hat und damit auf die Zahl der vegetativen Zellen, die später im Darm Toxine produzieren können, wird zukünftig auch eine Untersuchung des protektiven Effekts der aufgenommenen Nahrung auf *B. cereus* wichtig sein.

VI ZUSAMMENFASSUNG

B. cereus ist ein wichtiger Auslöser lebensmittelbedingter Erkrankungen. Enteropathogene *B. cereus* produzieren Enterotoxine im Darm des Menschen nach Verzehr kontaminierter Lebensmittel und verursachen damit eine Diarrhoe. Die wichtigsten Enterotoxine sind die beiden Drei-Komponenten-Komplexe Nhe und HBL. Das Toxizitätspotential eines *B. cereus* Isolats ist maßgeblich abhängig von der Menge der produzierten Enterotoxine und kann nicht durch das Vorhandensein bestimmter Toxingene bestimmt werden. Daher wurden in dieser Arbeit die Enterotoxinproduktion und das zytotoxische Potential lebensmittelassoziierter und mit Krankheitsausbrüchen in Zusammenhang stehender *B. cereus* mit unterschiedlichen Toxingenprofilen und unterschiedlich starker Enterotoxinproduktion vergleichend unter simulierten intestinalen und Laborbedingungen untersucht.

Das Wachstum der 19 in dieser Arbeit untersuchten Stämme war unter simulierten intestinalen im Vergleich zu Laborbedingungen reduziert. Die höchsten Enterotoxintiter, bestimmt in EIAs mithilfe spezifischer mAk, wurden nach 6 h unter Laborbedingungen erreicht, wobei die Titer stammabhängig sehr unterschiedlich waren. Die Toxinproduktivität (Enterotoxintiter in Relation zum Wachstum) war bei den meisten Stämmen hingegen nach 4 h unter simulierten intestinalen Bedingungen am höchsten. Eine deutlich gesteigerte Enterotoxinproduktion konnte bei allen untersuchten Stämmen nach den ersten 2 h unter simulierten intestinalen im Vergleich zu Laborbedingungen beobachtet werden. Dies wird durch bislang unbekanntes, von CaCo-2-Zellen ins Medium sekretierte Faktoren bedingt. Die zytotoxische Aktivität wurde in WST-1-Bioassays auf Vero- und auf CaCo-2-Zellen nach 6 h bestimmt. Unter simulierten intestinalen Bedingungen waren die stammabhängigen WST-Zytotoxizitätstiter auf beiden Zelllinien nach 6 h reduziert. Eine deutliche Unterscheidung von stark und schwach toxischen Stämmen war so schlechter möglich. In auf CaCo-2-Zellen durchgeführten PI-Tests konnte gezeigt werden, dass der PI-Einstrom in die Zielzelle vor allem von HBL abhängig ist. In Untersuchungen zur Sekretion wurde festgestellt, dass die Enterotoxin Komponenten vollständig aus der Zelle ausgeschleust werden und unterschiedlich hohe Enterotoxinmengen nicht von einem Defekt in der Sekretion bedingt werden.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kultivierung unter simulierten intestinalen und Laborbedingungen große Unterschiede in Wachstum, Enterotoxinproduktion

und Zytotoxizität bedingen und dass CaCo-2-Zellen einen fördernden Effekt auf die Enterotoxinproduktion von *B. cereus* haben.

VII SUMMARY

Enterotoxin production of *Bacillus cereus* under simulated intestinal conditions

B. cereus is an important food-borne pathogen. Enteropathogenic *B. cereus* produce enterotoxins in the humane intestine after ingestion of contaminated food and cause diarrhea. The most important enterotoxins are the nonhemolytic enterotoxin (Nhe) and the hemolysin BL (HBL) each consisting of three components. The toxic potential of *B. cereus* depends on the amount of produced enterotoxins and cannot be determined by simple detection of the toxin genes. We analyzed enterotoxin production and the cytotoxic potential of 19 *B. cereus* strains associated with food and food-borne diseases with different toxin gene profiles and different toxin expression levels both under simulated intestinal and laboratory conditions.

The growth rates of all analyzed strains were reduced under simulated intestinal conditions. The highest enterotoxin titers, determined by EIA with specific monoclonal antibodies, were detected after 6 h under laboratory conditions and were strain-dependent. In contrast, the toxin production efficiency (enterotoxintiter in relation to growth) was highest after 4 h under simulated intestinal conditions. Enhanced toxin production of all strains was observed after 2 h under simulated intestinal conditions in comparison to laboratory conditions and was caused by so far unknown factors secreted by the Caco-2-cells. The cytotoxic activity after 6 h was determined in WST-1-bioassays using Vero- and Caco-2-cells. The cytotoxicity titers were strain-dependent, dependent on enterotoxin titers and reduced under simulated intestinal conditions. In the latter, discrimination between high and low toxic strains was less distinct. PI influx in Caco-2-cells was mainly dependent on HBL, not Nhe. It was also shown that the enterotoxins were secreted completely by all *B. cereus* strains and that a possible defect in the secretion mechanism is not the reason for the highly variable amounts of enterotoxins.

The results of this work show that cultivation under laboratory and simulated intestinal conditions cause differences in growth rate, enterotoxin production and cytotoxicity. So far unknown factors secreted by Caco-2-cells enhance enterotoxin production of *B. cereus*.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

AGAISSE, H., M. GOMINET, O. A. OKSTAD, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (1999):
PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*.

Mol. Microbiol. 32 (5), 1043-1053

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 129 (1), 17-20

ANDERSSON, A., U. RONNER & P. E. GRANUM (1995):

What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?

Int. J. Food Microbiol. 28 (2), 145-155

BECKER, H., G. SCHALLER, W. VON WIESE & G. TERPLAN (1994):

Bacillus cereus in infant foods and dried milk products.

Int. J. Food Microbiol. 23 (1), 1-15

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

A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*.

Infect. Immun. 58 (7), 2220-2227

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

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

Infect. Immun. 59 (5), 1778-1784

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

Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

Infect. Immun. 63 (11), 4423-4428

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

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

Infect. Immun. 62 (3), 980-986

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

Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

J. Biol. Chem. 272 (1), 233-239

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

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

Microbiology 146 (Pt 6), 1371-1380

BFR (2013):

An Krankheitsausbrüchen beteiligte Lebensmittel in Deutschland im Jahr 2012.

Stellungnahme Nr. 019/2013

BOTTONE, E. J. (2010):

Bacillus cereus, a volatile human pathogen.

Clin. Microbiol. Rev. 23 (2), 382-398

CADOT, C., S. L. TRAN, M. L. VIGNAUD, M. L. DE BUYSER, A. B. KOLSTO, A. BRISABOIS, C. NGUYEN-THE, D. LERECLUS, M. H. GUINEBRETIERE & N. RAMARAO (2010):

InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains.

J. Clin. Microbiol. 48 (4), 1358-1365

CEUPPENS, S., A. RAJKOVIC, S. HAMELINK, T. VAN DE WIELE, N. BOON & M. UYTTENDAELE (2012a):

Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits.

Foodborne Pathog. Dis. 9 (12), 1130-1136

CEUPPENS, S., A. RAJKOVIC, M. HEYNDRICKX, V. TSILIA, T. VAN DE WIELE, N. BOON & M. UYTTENDAELE (2011):

Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications.

Crit. Rev. Microbiol. 37 (3), 188-213

CEUPPENS, S., M. UYTTENDAELE, K. DRIESKENS, M. HEYNDRICKX, A. RAJKOVIC, N. BOON & T. VAN DE WIELE (2012b):

Survival and germination of *Bacillus cereus* spores without outgrowth or enterotoxin production during in vitro simulation of gastrointestinal transit.

Appl. Environ. Microbiol. 78 (21), 7698-7705

CEUPPENS, S., M. UYTTENDAELE, S. HAMELINK, N. BOON & T. VAN DE WIELE (2012c):

Inactivation of *Bacillus cereus* vegetative cells by gastric acid and bile during in vitro gastrointestinal transit.

Gut Pathog. 4 (1), 11

CEUPPENS, S., T. VAN DE WIELE, A. RAJKOVIC, T. FERRER-CABACERAN, M. HEYNDRICKX, N. BOON & M. UYTTENDAELE (2012d):

Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of *Bacillus cereus*.

Int. J. Food Microbiol. 155 (3), 241-246

CHOMA, C., M. H. GUINEBRETIERE, F. CARLIN, P. SCHMITT, P. VELGE, P. E. GRANUM & C. NGUYEN-THE (2000):

Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables.

J. Appl. Microbiol. 88 (4), 617-625

CLAIR, G., S. ROUSSI, J. ARMENGAUD & C. DUPORT (2010):

Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions.

Mol. Cell. Proteomics 9 (7), 1486-1498

CLAVEL, T., F. CARLIN, C. DARGAIGNARATZ, D. LAIRON, C. NGUYEN-THE & P. SCHMITT (2007):

Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media.

J. Appl. Microbiol. 103 (5), 1568-1575

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

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

J. Appl. Microbiol. 97 (1), 214-219

CONTZEN, M., M. HAILER & J. RAU (2014):

Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products.

Int. J. Food Microbiol. 174, 19-22

DIDELOT, X., M. BARKER, D. FALUSH & F. G. PRIEST (2009):

Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group.

Syst. Appl. Microbiol. 32 (2), 81-90

DIDIER, A., R. DIETRICH, S. GRUBER, S. BOCK, M. MORAVEK, T. NAKAMURA, T. LINDBÄCK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2012):

Monoclonal antibodies neutralize *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin by inhibiting ordered binding of its three exoprotein components.

Infect. Immun. 80 (2), 832-838

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

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

Appl. Environ. Microbiol. 65 (10), 4470-4474

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

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

Appl. Environ. Microbiol. 71 (12), 8214-8220

DOLL, V. M., M. EHLING-SCHULZ & R. VOGELMANN (2013):

Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*.

PloS one 8 (4), e61404

DROBNIEWSKI, F. A. (1993):

Bacillus cereus and related species.

Clin. Microbiol. Rev. 6 (4), 324-338

DUPORT, C., S. THOMASSIN, G. BOUREL & P. SCHMITT (2004):

Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73.

Arch. Microbiol. 182 (1), 90-95

DUPORT, C., A. ZIGHA, E. ROSENFELD & P. SCHMITT (2006):

Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system.

J. Bacteriol. 188 (18), 6640-6651

EFSA (2005):

Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs.

EFSA Journal 2005 175, 1-48

EFSA (2013):

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011.

EFSA Journal 2013 11 (4), 3129

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

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

Mol. Nutr. Food Res. 48 (7), 479-487

EHLING-SCHULZ, M., B. SVENSSON, M. H. GUINEBRETIERE, T. LINDBÄCK, M. ANDERSSON, A. SCHULZ, M. FRICKER, A. CHRISTIANSSON, P. E. GRANUM, E. MÄRTLBAUER, C. NGUYEN-THE, M. SALKINOJA-SALONEN & S. SCHERER (2005):
Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains.
Microbiology 151 (Pt 1), 183-197

FAGERLUND, A., J. BRILLARD, R. FÜRST, M. H. GUINEBRETIERE & P. E. GRANUM (2007):
Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group.
BMC Microbiol. 7, 43

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK & P. E. GRANUM (2010):
Bacillus cereus cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway.
BMC Microbiol. 10, 304

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK, A. K. STORSET, P. E. GRANUM & S. P. HARDY (2008):
Bacillus cereus Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia.
Microbiology 154 (Pt 3), 693-704

FAGERLUND, A., O. WEEN, T. LUND, S. P. HARDY & P. E. GRANUM (2004):
Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*.
Microbiology 150 (Pt 8), 2689-2697

GOHAR, M., K. FAEGRI, S. PERCHAT, S. RAVNUM, O. A. OKSTAD, M. GOMINET, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (2008):
The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*.
PloS one 3 (7), e2793

GRANUM, P. E. (2007):

Bacillus cereus.

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

ASM Press, Washington D.C.

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 177 (2), 225-229

GRENHA, R., L. SLAMTI, M. NICAISE, Y. REFES, D. LERECLUS & S. NESSLER (2013):

Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (3), 1047-1052

GUINEBRETIERE, M. H., S. AUGER, N. GALLERON, M. CONTZEN, B. DE SARRAU, M. L. DE BUYSER, G. LAMBERET, A. FAGERLUND, P. E. GRANUM, D. LERECLUS, P. DE VOS, C. NGUYEN-THE & A. SOROKIN (2013):

Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63 (Pt 1), 31-40

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

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

J. Clin. Microbiol. 40 (8), 3053-3056

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 259 (1), 74-80

GUINEBRETIERE, M. H., F. L. THOMPSON, A. SOROKIN, P. NORMAND, P. DAWYNDT, M. EHLING-SCHULZ, B. SVENSSON, V. SANCHIS, C. NGUYEN-THE, M. HEYNDRICKX & P. DE VOS (2008):

Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group.

Environ. Microbiol. 10 (4), 851-865

GUINEBRETIERE, M. H., P. VELGE, O. COUVERT, F. CARLIN, M.-L. DEBUYSER & C. NGUYEN-THE (2010):

Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation.

J. Clin. Microbiol. 48 (9), 3388-3391

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 197 (1), 47-71

HEILKENBRINKER, U., R. DIETRICH, A. DIDIER, K. ZHU, T. LINDBÄCK, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2013):

Complex formation between NheB and NheC is necessary to induce cytotoxic activity by the three-component *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin.

PloS one 8 (4), e63104

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

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

J. Bacteriol. 175 (21), 6760-6766

HORNSTRA, L. M., M. VAN DER VOORT, L. M. WIJNANDS, P. J. ROUBOS-VAN DEN HIL & T. ABEE (2009):

Role of germinant receptors in Caco-2 cell-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579 endospores.

Appl. Environ. Microbiol. 75 (4), 1201-1203

JENSEN, G. B., B. M. HANSEN, J. EILENBERG & J. MAHILLON (2003):

The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives.

Environ. Microbiol. 5 (8), 631-640

JEBBERGER, N., R. DIETRICH, S. BOCK, A. DIDIER & E. MÄRTLBAUER (2014):

Bacillus cereus enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines.

Toxicon 77, 49-57

KAMAR, R., M. GOHAR, I. JEHANNO, A. REJASSE, M. KALLASSY, D. LERECLUS, V. SANCHIS & N. RAMARAO (2013):

Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis.

J. Clin. Microbiol. 51 (1), 320-323

KARUNAKARAN, E. & C. A. BIGGS (2011):

Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 89 (4), 1161-1175

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

Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections.

Microb. Infect. 2 (2), 189-198

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

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

Int. J. Syst. Bacteriol. 48 (Pt 4), 1373-1382

LERECLUS, D., H. AGAISSE, M. GOMINET, S. SALAMITOU & V. SANCHIS (1996):

Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase.

J. Bacteriol. 178 (10), 2749-2756

LERECLUS, D., H. AGAISSE, C. GRANDVALET, S. SALAMITOU & M. GOMINET (2000):

Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*.

Int. J. Med. Microbiol. 245 (4-5), 295-299

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

Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin.

Microbiology 150 (Pt 12), 3959-3967

LINDBÄCK, T., S. P. HARDY, R. DIETRICH, M. SODRING, A. DIDIER, M. MORAVEK, A. FAGERLUND, S. BOCK, C. NIELSEN, M. CASTEEL, P. E. GRANUM & E. MÄRTLBAUER (2010):

Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components.

Infect. Immun. 78 (9), 3813-3821

LOGAN, N. A. (2012):

Bacillus and relatives in foodborne illness.

J. Appl. Microbiol. 112 (3), 417-429

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

A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis.

Mol. Microbiol. 38 (2), 254-261

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

Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak.

FEMS Microbiol. Lett. 141 (2-3), 151-156

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

Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*.

Microbiology 143 (Pt 10), 3329-3326

MENESTRINA, G., M. D. SERRA & G. PRÉVOST (2001):

Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family.

Toxicon 39 (11), 1661-1672

MORAVEK, M., R. DIETRICH, C. BÜRK, V. BROUSSOLLE, M. H. GUINEBRETIÈRE, P. E. GRANUM, C. NGUYEN-THE & E. MÄRTLBAUER (2006):

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

FEMS Microbiol. Lett. 257 (2), 293-298

NAKAMURA, L. K. (1998):

Bacillus pseudomycooides sp. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol. 48 (Pt 3), 1031-1035

NAM, H., H. S. SEO, J. BANG, H. KIM, L. R. BEUCHAT & J. H. RYU (2014):

Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel.

Int. J. Food Microbiol. 188, 122-127

NICHOLSON, W. L., N. MUNAKATA, G. HORNECK, H. J. MELOSH & P. SETLOW (2000):

Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64 (3), 548-572

OUHIB-JACOBS, O., N. D. LINDLEY, P. SCHMITT & T. CLAVEL (2009):

Fructose and glucose mediates enterotoxin production and anaerobic metabolism of *Bacillus cereus* ATCC14579(T).

J. Appl. Microbiol. 107 (3), 821-829

OUHIB, O., T. CLAVEL & P. SCHMITT (2006):

The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate.

Curr. Microbiol. 53 (3), 222-226

PENG, J.-S., W.-C. TSAI & C.-C. CHOU (2002):

Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent.

Int. J. Food Microbiol. 77 (1-2), 11-18

PIELAAT, A., L. M. WIJNANDS, K. TAKUMI, M. J. NAUTA & F. M. VAN LEUSDEN (2006):

The fate of *Bacillus cereus* in the gastrointestinal tract.

RIVM Report 250912005, 1-59

POPOFF, M. R. (2014):

Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors.

Anaerobe, 1-19

RAMARAO, N. & V. SANCHIS (2013):

The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review.

Toxins 5 (6), 1119-1139

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

Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

J. Bacteriol. 179 (8), 2551-2556

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

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

J. Food Prot. 68 (12), 2614-2622

SASTALLA, I., R. FATTAH, N. COPPAGE, P. NANDY, D. CROWN, A. P. POMERANTSEV & S. H. LEPPLA (2013):

The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe tripartite enterotoxin components assemble sequentially on the surface of target cells and are not interchangeable.

PloS one 8 (10), e76955

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 130 (1), 87-90

SLAMTI, L. & D. LERECLUS (2002):

A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group.

EMBO J. 21 (17), 4550-4559

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

From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.

FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 579-606

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

Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*.

J. Dairy Res. 60 (4), 575-580

TJALSMA, H., H. ANTELMANN, J. D. JONGBLOED, P. G. BRAUN, E. DARMON, R. DORENBOS, J. Y. DUBOIS, H. WESTERS, G. ZANEN, W. J. QUAX, O. P. KUIPERS, S. BRON, M. HECKER & J. M. VAN DIJL (2004):

Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68 (2), 207-233

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

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

J. Clin. Pathol. 32 (3), 289-293

VAN DER VOORT, M., O. P. KUIPERS, G. BUIST, W. M. DE VOS & T. ABEE (2009):
Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579.

BMC Microbiol. 8 (62),

VON STETTEN, F., R. MAYR & S. SCHERER (1999):

Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil.

Environ. Microbiol. 1 (6), 503-515

VÖRÖS, A., R. SIMM, L. SLAMTI, M. J. MCKAY, I. K. HEGNA, C. NIELSEN-LEROUX, K. A. HASSAN, I. T. PAULSEN, D. LERECLUS, O. A. ØKSTAD, M. P. MOLLOY & A. B. KOLSTØ (2014):

SecDF as part of the Sec-translocase facilitates efficient secretion of *Bacillus cereus* toxins and cell wall-associated proteins.

PloS one 9 (8), e103326

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

Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion.

Appl. Environ. Microbiol. 73 (5), 1481-1488

WIJNANDS, L. M., J. B. DUFRENNE, F. M. VAN LEUSDEN & T. ABEE (2007):

Germination of *Bacillus cereus* spores is induced by germinants from differentiated Caco-2 Cells, a human cell line mimicking the epithelial cells of the small intestine.

Appl. Environ. Microbiol. 73 (15), 5052-5054

WIJNANDS, L. M., J. B. DUFRENNE, M. H. ZWIETERING & F. M. VAN LEUSDEN (2006):

Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains.

Int. J. Food Microbiol. 112 (2), 120-128

WIJNANDS, L. M., A. PIELAAT, J. B. DUFRENNE, M. H. ZWIETERING & F. M. VAN LEUSDEN (2009):

Modelling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach.

J. Appl. Microbiol. 106 (1), 258-267

WILCKS, A., B. M. HANSEN, N. B. HENDRIKSEN & T. R. LICHT (2006):

Fate and effect of ingested *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in the intestinal tract of human-flora-associated rats.

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46 (1), 70-77

ZIGHA, A., E. ROSENFELD, P. SCHMITT & C. DUPORT (2006):

Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression.

Arch. Microbiol. 185 (3), 222-233

ZIGHA, A., E. ROSENFELD, P. SCHMITT & C. DUPORT (2007):

The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73.

J. Bacteriol. 189 (7), 2813-2824

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die stets bereitwillige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Nadja Jeßberger für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, ihre Geduld und immer gewährte Unterstützung und die zügige und aufmerksame Durchsicht des Manuskripts.

Des Weiteren danke ich herzlich allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere S. Straßner, G. Acar, B. Minich und F. Witzko.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Maria Knauer und Dr. Uta Heilkenbrinker für die schöne Zeit im gemeinsamen Büro bedanken, für die moralische Unterstützung, die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die Hilfe bei technischen Problemen jeder Art.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester Annika, bedanken, die mich während dieser Zeit immer motiviert und mich schon mein ganzes Leben unterstützt und mir Rückhalt gegeben haben.