

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel  
tierischen Ursprungs  
(Lehrstuhl : Prof. Dr. E. Märtlbauer)  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

---

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

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

von  
**Monika Wegscheider**  
aus Innsbruck

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Eisgruber

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum.....</b>	<b>3</b>
2.1	Allgemeines.....	3
2.2	Enterotoxine.....	3
2.2.1	Hämolysin BL .....	4
2.2.2	Non-Hemolytic Enterotoxin.....	6
2.2.3	Cytotoxin K.....	6
2.2.4	Bacillus cereus Enterotoxin T.....	7
2.3	In vitro Studien zur Wirkungsweise bakterieller Toxine.....	8
2.3.1	Methodische Aspekte.....	8
2.3.1.1	Modifizierung von Glykokonjugaten.....	8
2.3.1.2	Modifizierung der Lipidzusammensetzung.....	14
2.3.1.3	Osmoprotektive Substanzen.....	14
2.4	Wirkungsmechanismen bakterieller Toxine.....	15
2.4.1	Cytolytische Toxine.....	16
2.4.2	Intrazellulär wirkende Exotoxine.....	19
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen.....</b>	<b>21</b>
3.1	Materialien.....	21
3.1.1	Chemikalien und Biochemika.....	21
3.1.2	Bakterienstämme bzw. -isolate.....	22
3.1.3	Nährmedien.....	22
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	23
3.1.5	Zellkultur.....	23
3.1.6	Immunreagenzien.....	24
3.1.7	Sonstige Materialien.....	25
3.1.8	Geräte.....	25

3.2	Allgemeine Methodik.....	26
3.2.1	Anzucht von <i>B. cereus</i> in CGY-Bouillion.....	26
3.2.2	Enzymimmuntests.....	26
3.2.2.1	Indirekter Enzymimmuntest.....	26
3.2.2.2	Sandwich-Enzymimmuntest.....	27
3.2.3	Zytotoxizitätstest.....	27
3.3	Ergebnisse.....	29
3.3.1	Sensitivität verschiedener Zelllinien.....	29
3.3.2	Neutralisationstest.....	34
3.3.3	Toxische Aktivität des HBL.....	36
3.3.4	Immunaффinitätschromatographie (IAC).....	40
3.3.4.1	Subtraktive IAC der Nhe B-Komponente.....	41
3.3.4.2	Subtraktive IAC der L2-Komponente.....	41
3.3.4.3	Kombination der beiden IAC-Varianten.....	42
3.3.5	Beeinflussung der diskontinuierlichen Hämolyse durch Enterotoxin-Komponenten .....	44
3.3.6	Untersuchung der Toxinwirkung auf sensibilisierte Zellmembranen.....	49
3.3.6.1	Veränderung der Zuckerstruktur.....	49
3.3.6.1.1	Einsatz von Inhibitoren .....	49
3.3.6.1.1.1	Tunicamycin.....	49
3.3.6.1.1.2	Andere Inhibitoren.....	54
3.3.6.1.2	Einsatz von Glykosidasen.....	54
3.3.6.1.3	Einsatz eines Arylglykosids.....	57
3.3.7	Veränderung der Lipidzusammensetzung mittels Fumonisin B1.....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3 Ac-DON	3-Acetyl-Deoxynivalenol
BenzylGalNAc	Benzyl-2-Acetoamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid
BSA	bovines Serumalbumin
CGY-Bouillon	Nährmedium für <i>B. cereus</i>
CT	Choleratoxin
DT	Diphtheriatoxin
EIA	Enzymimmunoassay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum
FB <sub>1</sub>	Fumonisin B <sub>1</sub>
Gal	Galaktose
GB <sub>3</sub>	Gangliosid GB <sub>3</sub>
GM <sub>1</sub>	Gangliosid GM <sub>1</sub>
HBL	Hämolysin-BL
KLH	“Key-hole limpet” Hämocyanin
KÜ	Kulturüberstand
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IAS	Immunaффinitätschromatographiesäule
IB	Immunoblot
Nhe	Non-Hemolytic Enterotoxin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
RT	Raumtemperatur
Stx	Shigatoxin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TM	Tunicamycin

# 1 Einleitung

*Bacillus cereus*, ein ubiquitärer Keim, ist Gram-positiv, fakultativ anaerob und besitzt als Sporenbildner eine große Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen. Da die Sporen durch die lebensmitteltechnologisch üblichen Pasteurisierungsverfahren nicht abgetötet werden, gehört er zu den wichtigsten Verderbserregern von Milch und Milchprodukten, kann aber auch regelmäßig aus den verschiedensten Lebensmitteln, wie z. B. Reis, Gemüse und Fleisch isoliert werden.

*Bacillus cereus* gewinnt zunehmend an Bedeutung als Verursacher von Lebensmittelinfektionen und Lebensmittelintoxikationen, wobei eine emetische Form und eine Diarrhoe Form unterschieden werden. Die emetische Form wird durch ein hitzestabiles Toxin (Cereulid; AGATA et al., 1995) verursacht und ist durch eine kurze Inkubationszeit gekennzeichnet. Ursächlich beteiligt an der durch Diarrhoe charakterisierten *B. cereus*-Vergiftung sind vermutlich zwei verschiedene Proteinkomplexe: das Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe, LUND & GRANUM, 1996) und das Hämolysin-BL (HBL). Prinzipiell produzieren fast alle Stämme, also auch HBL-Produzenten das Non-Hemolytic Enterotoxin (VELD et al., 2001), Hämolysin BL wird hingegen nur von 40 - 50 % der *B. cereus* Isolate exprimiert. Im Jahr 2000 wurde noch ein weiteres von *B. cereus* produziertes Einzelprotein, nämlich Cytotoxin K (Cyt K) isoliert, das bei Menschen eine nekrotisierende Enteritis hervorruft (LUND et al., 2000).

Die Enteropathogenität des Hämolysin BL ist hinlänglich bewiesen (THOMPSON et al., 1984; BEECHER et al., 1995) und auch die biochemischen Charakteristika der Stämme korrelieren mit entsprechenden epidemiologischen Daten; so sind vor allem Stärke-positive Keime in Erkrankungen des Diarrhoe-Typs involviert (SHINAGAWA, 1990). Im Gegensatz dazu ist die pathogenetische Relevanz von Nhe bislang unklar. Dieser Komplex ist in vitro zwar hoch potent, Untersuchungen zur biologischen Wirkung in vivo stehen bislang aus. In älteren Untersuchungen reagierten *B. cereus* Referenzstämme (Stärke-negativ), die nachweislich große Mengen an Nhe und emetischem Toxin aber kein HBL produzieren, im für die Enteropathogenität beweisenden Darmschlingenligationstest negativ (SHINAGAWA et al., 1985).

Zur Wirkung der verschiedenen *B. cereus* Enterotoxine auf zellulärer Ebene ist bislang wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Aktivität der Enterotoxinkomplexe HBL und Nhe *in vitro* genauer untersucht werden, wobei vor allem deren zytotoxisches Potential im Zellkulturtest im Vordergrund stand. Da von allen HBL-produzierenden *B. cereus* Stämmen stets auch Nhe exprimiert wird, mussten zur gezielten Inaktivierung der Einzeltoxine effiziente Methoden, wie zum Beispiel Immunaффinitätschromatographie und Neutralisationstest, etabliert werden. Um des weiteren erste Hinweise darauf zu erhalten, welche Strukturen der Zellmembranoberfläche für die Bindung der Toxine relevant sein könnten, wurde die Toxinwirkung anhand von unterschiedlichen Zelllinien und metabolisch bzw. enzymatisch veränderten Vero-Zellen detaillierter untersucht.

---

Teile dieser Arbeit wurden gefördert durch die Europäische Kommission im Rahmen des Forschungsvorhabens: QLK-2001-00854 „Preventing *Bacillus cereus* foodborne poisoning in Europe – Detecting hazardous strains, tracing contamination routes and proposing criteria for foods“

## 2 Schrifttum

### 2.1 Allgemeines

*B. cereus* ist ein Gram-positives Stäbchen der Gattung *Bacillus* und gehört zur morphologischen Gruppe 1A. Diese wird in mehrere Spezies eingeteilt, unter anderem *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis* und *B. weihenstephanensis*. Aufgrund der Morphologie und des Hämolyseverhaltens können typische *B. mycooides*, bzw. *pseudomycooides* (rhizoides Koloniewachstum) und *B. anthracis* (ahämolytisch) eindeutig identifiziert werden. *B. thuringiensis* unterscheidet sich von *B. cereus* ausschließlich durch die Produktion parasporaler kristalliner Einschlüsse. LECHNER et al. (1998) schlugen vor, die psychrotoleranten Stämme in einer eigenen Gattung *B. weihenstephanensis* zusammenzufassen. Der Nachweis der Signalsequenz des *csp A* (cold-shock Protein A) und charakteristische Sequenzunterschiede in der 16S rDNA sollten als Kennzeichen dieser Gattung gelten. Allerdings wiesen STENFORS & GRANUM (2001) darauf hin, dass nicht bei allen psychrotoleranten Stämmen diese Kennzeichen zu finden sind.

Neben Lebensmittelintoxikationen und –infektionen sind auch einige nicht gastrointestinale Krankheitsbilder bei Mensch und Tier, die durch *B. cereus* verursacht werden, bekannt. Dazu zählen vor allem die wegen ihres schnellen Verlaufs gefürchteten Endophthalmitiden, aber auch Septikämien, Infektionen des ZNS, lokale Infektionen und Atemwegserkrankungen. Aus Organen (Euter, Plazenta, Lunge, Leber, und Cerebrospinalflüssigkeit) erkrankter Tiere isolierte *B. cereus* zeigten toxinogene und invasive Eigenschaften (ROWAN et al., 2001).

### 2.2 Enterotoxine

Bei den gastrointestinalen Erkrankungen wird eine emetische Form und eine Diarrhoe Form unterschieden.

Die emetische Form wird durch ein hitzestabiles Toxin (Cereulid) verursacht, das Ähnlichkeiten mit Valinomycin aufweist. Das Erkrankungsbild ähnelt einer *Staphylococcus*

*aureus* Vergiftung und tritt meist im Zusammenhang mit dem Verzehr von stärkehaltigen Lebensmitteln, v. a. Reis und Nudeln auf. Nach einer kurzen Inkubationsdauer von 1 - 5 Stunden kommt es zu Übelkeit und Erbrechen. Die Krankheitsdauer beträgt 6 - 24 Stunden und ist meist selbstlimitierend (KRAMER & GILBERT, 1989). Es gibt aber auch Berichte über dramatisch verlaufende Erkrankungen, so wurde von MAHLER et al. (1997) die bei einem Jugendlichen festgestellte Todesursache „Leberinsuffizienz“ auf den Verzehr von mit *B. cereus* kontaminierten, aufgewärmten Nudeln zurückgeführt. Der Nachweis des emetischen Toxins erfolgt üblicherweise mit Hilfe von Hep2-Zellen bzw. Spermienzytotoxizitätstests. Eine umfassende Literaturübersicht zu diesem Toxin ist bei SCHULZ (2004) zu finden.

Die Diarrhoe-Form wird vermutlich durch mehrere Exoproteine bzw. deren Komplexe verursacht. Dazu zählen das Hämolyisin BL (HBL), das Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe), Cytotoxin K (Cyt K) und das *Bacillus cereus* Enterotoxin (*BcET*), wobei nicht bei allen eine toxische Wirkung nachgewiesen ist. Diese beiden erstgenannten Enterotoxine lassen sich prinzipiell bei allen o. a. *Bacillus* Spezies der morphologischen Gruppe 1A genotypisch und zum Teil auch phänotypisch nachweisen (PRÜSS et al., 1998; RIVERA et al., 2000).

Da am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Dissertationen (FELLA, 1999; STRICH, 1999; BORCHARD, 2001; BUCK, 2002) zu *B. cereus* angefertigt und dabei die Literatur zu *B. cereus* als Lebensmittelinfektions- bzw. -intoxikationserreger ausführlich dargestellt wurde, beschränken sich die folgenden Ausführungen zum einen auf Publikationen jüngerer Datums und zum anderen auch auf einige für das Verständnis der Arbeit essentielle Aspekte der Enterotoxinproduktion von *B. cereus*.

### **2.2.1 Hämolyisin BL**

Erstmals 1990 wurde der hämolytisch wirksame Enterotoxinkomplex (Hämolyisin BL) von BEECHER & MACMILLAN beschrieben. Mittlerweile gilt als gesichert, dass der Komplex aus drei Proteinen mit den Molekulargewichten 38.080 Da (Komponente B), 39.540 Da ( $L_1$ ) und 44.800 Da ( $L_2$ ) besteht (BEECHER & WONG, 2000 a). Nur die Kombination aller drei

Komponenten zeigte biologische Aktivität im VPR- (vascular permeability reaction) und RIL-Test (rabbit ileal loop) (BEECHER & WONG, 1994; BEECHER et al., 1995). Ebenfalls BEECHER & WONG (2000 a) erhielten bei dem *B. cereus*-Isolat MGBC 145 ein weiteres, homologes Set zu HBL, nämlich HBL<sub>a</sub>. Dessen Einzelkomponenten unterscheiden sich von HBL in Größe (B<sub>a</sub> 42.500 Da; L<sub>1a</sub> 40.930 Da; L<sub>2a</sub> 45.900 Da), Ladung und dem chromatographischen Verhalten. LINDBÄCK et al. (1999) inaktivierten das *hblC* Gen, welches L<sub>2</sub> kodiert, und testeten den Bakterienüberstand im Zytotoxizitätstest (Vero-Zellen) und auf Blutplatte. Wie erwartet konnte 20 Minuten nach Zugabe der Überstände nur beim Wildstamm eine vollkommene Zerstörung des Zellrasens beobachtet werden. In Hinblick auf den Wirkungsmechanismus wurden im Laufe der Jahre von der Arbeitsgruppe um WONG und BEECHER verschiedene Hypothesen aufgestellt, das letzte Modell basierte auf der Annahme, dass alle Komponenten von HBL sich unabhängig voneinander an die Zielzellen binden und sich dann zu einem sog. „membrane attack complex“ formieren (BEECHER & WONG, 1997). Dadurch wird die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöht, und aufgrund des kolloidosmotischen Druckes kommt es schließlich zum Austreten von Zellmaterial und zum Zelltod. Durch den Zusatz von Maltotriose kann dieser Reaktionsablauf zumindest kurzfristig verhindert werden. Dieser osmoprotektive Effekt von Zuckerverbindungen ist in 2.3.1.3 detailliert beschrieben. Die für HBL erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Membranangriffskomplex in der Zellmembran Poren mit einem Durchmesser von 1,2 nm hervorruft.

Ebenfalls BEECHER & MACMILLAN (1990, 1991) beschrieben ein für HBL charakteristisches Merkmal, nämlich die Bildung eines paradoxen Zonenphänomens auf Schafblutagar. Die Hämolyse beginnt zuerst etwas entfernt von der Auftragstelle und nach einiger Zeit werden auch die Erythrozyten direkt um den Anfangspunkt hämolysiert. Die hämolytische Aktivität des HBL-Komplexes scheint grundsätzlich durch die ebenfalls von *B. cereus* gebildeten Enzyme Sphingomyelinase und Phospholipase C synergistisch bzw. antagonistisch beeinflusst zu werden (BEECHER & WONG, 2000 b). Mehrere Autoren verwendeten dieses Merkmal zur phänotypischen Identifizierung HBL-positiver *B. cereus*, doch VELD et al. (2001) zeigten, dass die Ergebnisse aus PCR und dem Hämolyseverhalten nicht immer übereinstimmten. HBL-negative Stämme (PCR-Ergebnisse) zeigten dieses Phänomen zwar nie, aber von 47 *hbl*-positiven Stämmen konnten nur 24 als HBL-Produzenten aufgrund ihres Hämolyseverhaltens auf Blutplatte identifiziert werden.

### 2.2.2 Non-Hemolytic Enterotoxin

GRANUM et al. (1996) beobachteten, dass manche *B. cereus* Stämme keine B-Komponente des HBL-Komplexes produzierten, und doch zytotoxisch waren. Sie folgerten daraus, dass noch ein weiteres Enterotoxin produziert werden musste. LUND & GRANUM (1996) konnten kurz danach aus dem in eine Lebensmittelvergiftung involvierten Stamm NVH 0075-95 das Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) isolieren. Dieser Komplex besteht aus drei Proteinen, mit den Molekulargewichten 39.820 Da (Nhe B), 41.019 Da (Nhe A) und 36.481 Da (Nhe C) (GRANUM et al., 1999). Im Zellkulturtest werden alle drei Komponenten für die maximale zytotoxische Aktivität benötigt. Strukturelle Ähnlichkeiten bestehen einerseits zwischen der L<sub>1</sub>-Komponente des HBL-Komplexes und der Nhe B Komponente, andererseits zwischen der B-Komponente des HBL-Komplexes und der Nhe C Komponente (LUND & GRANUM, 1997).

Mehrere Untersuchungen zeigten eine Prävalenz des Nhe-Komplexes bei *B. cereus* von 90 % und mehr (VELD et al., 2001; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001). Bei *B. thuringiensis* wurde das Nhe-Operon in einer umfangreichen Studie sogar bei 100 % der Stämme (n = 74) nachgewiesen (RIVERA et al., 2000).

### 2.2.3 Cytotoxin K

Aus einem in eine tödlich verlaufende Lebensmittelvergiftung involvierten *B. cereus*, der keinen der bekannten Enterotoxinkomplexe produzierte, konnten LUND et al. (2000) das Cytotoxin K (Cyt K) isolieren. In späteren Untersuchungen von STENFORS et al. (2001, 2002) wurde ein „Cyt K ähnliches“ Toxin mittels PCR auch bei fünf anderen Stämmen nachgewiesen, die zusätzlich HBL und/oder Nhe produzierten.

Cyt K ist ein Einzelprotein mit einem Molekulargewicht von 33,8 kDa, das mit dem von BAIDA et al. (1999) beschriebenen *B. cereus* Hämolysin II eine Sequenzhomologie von 37 % aufweist. Zudem bestehen Ähnlichkeiten mit dem *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Hämolysin (gleiche Größe, 30 % der Aminosäuresequenz identisch), dem Leukozidin LukF und dem C.

*perfringens*  $\beta$ -Toxin. Da der Wirkungsmechanismus der genannten Toxine in der Bildung von ionendurchlässigen Kanälen besteht (MENESTRINA et al., 2001), lag die Vermutung nahe, dass auch Cyt K zu dieser Gruppe von Toxinen zählt. HARDY et al. (2001) zeigten mittels Spannungsmessung an künstlichen Doppellipidschichten, dass Cyt K Kanäle mit einem Durchmesser von 0,7 nm innerhalb von 1 - 20 Minuten bildet. Im Analogschluss zu den bei *S. aureus*  $\alpha$ -Hämolyysin und Aerolysin bekannten Daten kann eine Länge des Kanals von 10 nm erwartet werden. Außerdem zeigte sich in der Untersuchung, dass bei Cyt K eine spontane Bildung von Oligomeren auftritt. Der Arrhenius-Effekt (durch kurzzeitiges Erhitzen bei hoher Temperatur wird das Hämolyseverhalten nicht beeinträchtigt) wurde im Gegensatz zu dem beschriebenen Hämolyysin II bei Cyt K nicht beobachtet.

#### **2.2.4 *Bacillus cereus* Enterotoxin T**

Als ein weiterer möglicher Pathogenitätsfaktor wurde 1995 von AGATA et al. das aus *B. cereus* B4-ac (DSM 4384) klonierte Enterotoxin T beschrieben. Das Gen konnte als rekombinantes Protein (bc-D-ENT) in *Escherichia coli* exprimiert werden und kodiert ein 336 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 41.039 Da. Biologische Untersuchungen zur Enterotoxizität dieses Proteins mittels Darmschlingenligations-, Gefäßpermeabilitäts-, sowie Mausletalitätstests führten bei AGATA et al. (1995) in den genannten Testreihen zu positiven Ergebnissen, wobei das rekombinante Protein eine deutlich schwächere biologische Aktivität zeigte als ein Kulturüberstand des ursprünglichen Stammes Bc4-ac.

Nach HANSEN et al. (2003) handelte es sich bei dem von AGATA et al. (1995) beschriebenen *bceT* nicht um ein einzelnes Gen sondern mehrere unabhängige durch die verwendeten Restriktionsenzyme entstandene Fragmente. Diese haben sich offensichtlich erst während des Ligationsprozesses rein zufällig miteinander verbunden. Da eines der Fragmente zu 95 % mit dem open reading frame (ORF 101) des Virulenzplasmids pXO1 von *B. anthracis* identisch ist, führten sie den von AGATA et al. (1995) beschriebenen zytotoxischen Effekt des bc-D-ENT auf die Expression des pXO1-Fragments zurück.

Auch von CHOMA & GRANUM (2002) wurde die Relevanz des bc-D-ENT angezweifelt, da in ihren Untersuchungen dieses Protein keinerlei biologische Aktivität zeigte. Außerdem wiesen sie darauf hin, dass das *BcET*-Gen keine für Exoproteine typische Startsequenz besitzt bzw. das Toxin bislang auch noch nie als Ursache einer Lebensmittelvergiftung nachgewiesen werden konnte.

## **2.3 *In vitro* Studien zur Wirkungsweise bakterieller Toxine**

Die meisten bakteriellen Exotoxine sind makromolekulare Polypeptide, die – im Gegensatz zu den Endotoxinen - direkt eine schädigende Wirkung auf Zellen ausüben. Ausgehend von ihrem Wirkort kann man zellmembranschädigende und intrazellulär wirkende Toxine unterscheiden. Die Bindung der Toxine an die Zellen erfolgt oft über spezifische Rezeptoren, aber auch allgemeine Zelloberflächenstrukturen können hierbei eine Rolle spielen. Zur Untersuchung der Interaktion von mikrobiellen Toxinen mit Zellen wurden vielfach durch verschiedene Wirkstoffe sensibilisierte Zellen eingesetzt.

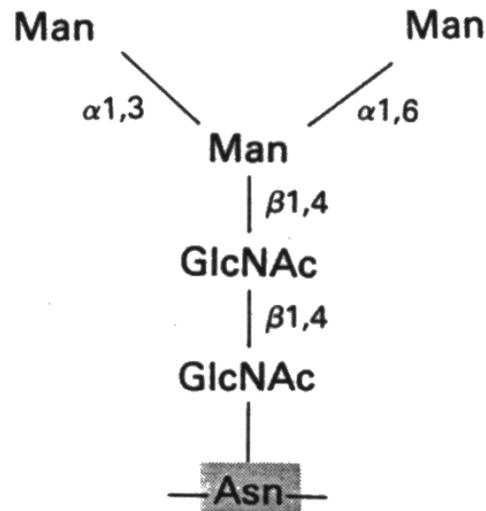
Im folgenden Abschnitt soll kurz auf einige dieser Biochemika und deren Anwendung in verschiedenen Studien eingegangen werden, da diese auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Modifizierung von Zellen verwendet wurden.

### **2.3.1 Methodische Aspekte**

#### **2.3.1.1 Modifizierung von Glykokonjugaten**

Bekanntermaßen zählen zu den Glykokonjugaten sowohl Glykoproteine als auch Glykolipide. Beinahe alle membranassoziierten und sekretorischen Proteine von eukaryotischen Zellen sind glykosyliert. Man kann die Glykoproteine hauptsächlich in zwei Gruppen einteilen: Proteine mit N-glykosidisch und mit O-glykosidisch gebundenem Oligosaccharid-Anteil.

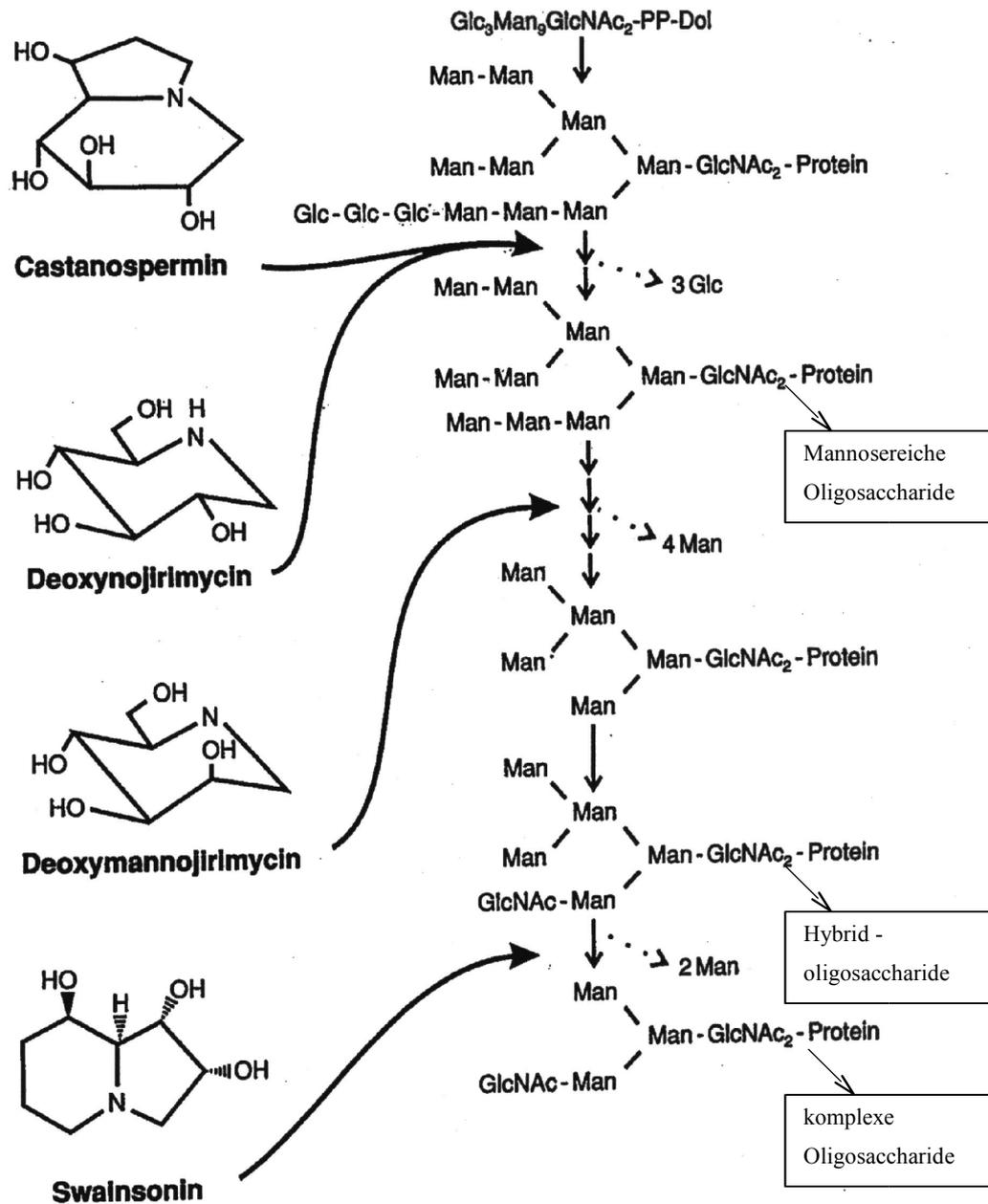
**N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide** haben ein unverwechselbares Grundgerüst gemeinsam (Abb. 1), das über eine  $\beta$ -N-glykosidische Bindung mit der freien Aminogruppe des Asparagins verbunden ist. Voraussetzung ist, dass folgende Aminosäuresequenz-Motive im Protein vorliegen: Asn-X-Thr oder Asn-X-Ser, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht, außer für Prolin und Asparagin.



**Abbildung 1:** *Pentasaccharid-Core der N-glykosidisch gebundenen Zucker von Glykoproteinen in der Zellmembran*

Die Synthese des Grundgerüsts beginnt im Endoplasmatischen Retikulum und wird im Golgi Apparat fortgesetzt. Als Donor für das Oligosaccharid fungiert eine Dolicholpyruvatverbindung, die mit dem hydrophoben Polyprenolrest in der ER-Membran verankert ist. Auf das Protein wird schließlich ein Tetrakaidekasaccharid, bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glukoseresten übertragen. Die Proteinoligosaccharyltransferase erkennt die entsprechende Aminosäuresequenz und überträgt die verzweigte Zuckerkette auf das Protein. Nach dem Abspalten von drei Glukosemolekülen gelangt das Glykoprotein in den Golgiapparat, wo weitere Modifikationen vorgenommen werden (Abb. 2). Im allgemeinen kann man drei verschiedene Arten von Oligosacchariden unterscheiden: mannosereiche Oligosaccharide (beinhalten 2 - 9 Mannosereste zusätzlich zum Pentasaccharid-Core), komplexe Oligosaccharide (unterschiedliche Anzahl an N-Acetyl-lactosamineinheiten, Sialinsäuren und/oder Fucose-Reste) und Hybridoligosaccharide, welche eine Kombination aus beiden vorhergehenden bilden.

In Abbildung 2 ist die Synthese dieser Glykoproteine und deren spezifische Hemmung durch unterschiedliche Biochemika schematisch dargestellt.



*Abbildung 2: Ansatzpunkte von Inhibitoren während der Synthese von Proteoglykanen mit N-glykosidisch gebundenem Zuckeranteil*



Das Nucleosidantibiotikum Tunicamycin (TM) blockiert die Anheftung von N-Acetylglukosamin an Dolicholphosphat, den ersten Schritt der Glykoproteinsynthese. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde diese Substanz in zahllosen Studien eingesetzt, wobei die verwendeten Konzentrationen je nach Zelllinie von 0,01 - 25 µg/ml Zellkulturmedium schwankten. Beispielsweise konnten FUMAGALLI et al. (1997) die Invasivität von *Klebsiella pneumoniae* in drei verschiedene Zelllinien mit Hilfe von Tunicamycin (1 µg/ml) um 95 % reduzieren. Für *Streptococcus pneumoniae* liegen ähnliche Erfahrungen vor (CUNDELL & TUOMANEN, 1994).

Auch bei der Aufklärung des Wirkungsmechanismus mikrobieller Toxine wurde häufig TM verwendet. KEUSCH et al. (1986) zeigten mittels TM, dass es sich bei dem Shigatoxin-Rezeptor um ein Glykokonjugat handelt (siehe auch 2.4.2). In einer anderen Studie konnte mittels TM ausgeschlossen werden, daß sich das hitzestabile Enterotoxin B von *Escherichia coli* an ein Glykoprotein bindet, da die Behandlung zweier humaner Epithel-Zelllinien mit TM zu keiner Reduktion des zytotoxischen Effekts führte (CHAO & DREYFUS, 1997).

Castanospermin (aus den Samen des *Castanospermum australe*) inhibiert hingegen Glykosidase I und II (SAUL et al., 1984). Dadurch wird unter anderem in der Glykoproteinbiosynthese das Abspalten der drei Glukosereste verhindert (siehe Abb. 2), so dass der Anteil mannosereicher Oligosaccharide auf der Zelloberfläche deutlich reduziert wird. Unter Verwendung radioaktiv markierter Aminosäuren konnten PAN et al. (1983) zeigen, dass eine Beeinflussung der Proteinbiosynthese durch Behandlung mit Castanospermin ausgeschlossen werden kann.

Swainsonin hingegen greift als Hemmer der Mannosidase II etwas später in die Produktionskette von N-glykosidisch gebundenen Glykoproteinen ein (Abb. 2). SANDVIG et al. (1986) behandelten Vero-Zellen und HeLa-Zellen mit Swainsonin und Tunicamycin, was in einer Zytotoxizitätssteigerung der beiden zugesetzten Lektine Abrin und Ricin resultierte. Diese Ergebnisse wurden folgendermaßen interpretiert: die Toxine werden üblicherweise nach ihrer Endozytose durch den Golgiapparat ins Cytosol transportiert; da im Golgiapparat aufgrund der TM- bzw. Swainsoninbehandlung eine verminderte Glykoproteinbiosynthese stattfindet, kommt es zu einem verstärkten Transport der beiden Lektine und damit zu einer Verstärkung des zytotoxischen Effekt.

**Tabelle 1: Beispiele für den Einsatz von Glykosidasen bzw. Sialidasen in pathogenetischen Studien zur Rezeptoridentifizierung**

verwendete Enzyme		Zellen	Ligand	Referenz
<b>Glykosidase</b>	<b>Sialidase</b>			
PNGase F: 0,5 U/ml, 12 h	8-160 mU/ml	Vero, HeLa	Lymphozytäres Chorio- meningitis Virus	BORROW & OLDSTONE (1992)
PNGase F: 1 U /ml, 5h	0,1 U/ml, 2h	humane Epithelzellen	hitze stabiles Enterotoxin B von <i>Escherichia coli</i>	CHAO & DREYFUS (1997)
PNGase F: 5 U/ml, 12h	100 mU/ml, 90 min	humane Epithelzellen	<i>Haemophilus influenzae</i> HMW 1 Adhesin	GEME (1994)
PNGase F: 1 U/ml	1 U/ml, 30 min	HeLa	Shigella Toxin	KEUSCH et al. (1986)
andere Glykosidasen	0,01-0,1 U/ml	Vero	Hepatitis B Virus	KOMAI et al. (1988)
-	bis zu 150 U/ml	KB Zellen	Diphtheria Toxin	MOEHERING & CRISPELL (1974)
Endoglykosidase H: 10 mU/ml, 12h	0,15 U/ml, 1h	Neuroblastom	Dengue Virus	RAMOS-CASTANEDA et al. (1997)
andere Glykosidasen 2,5 mg/ml, 30 min	2,5 mg/ml, 30 min	Vero u.a.	<i>C. perfringens</i> Iota Toxin	STILES et al. (2000)



### 2.3.1.2 Modifizierung der Lipidzusammensetzung

Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) ist nicht nur ein bekanntes Fusarientoxin, sondern auch als Sphinganin-Analog (siehe Abb. 3) ein effektiver, kompetitiver Inhibitor der Ceramidsynthase (WANG et al., 1991), die die Acylierung von Sphinganin in der *de novo* Biosynthese von Sphingolipiden katalysiert. Dadurch kommt es in der Zellmembran zu einer Verringerung von Glukosylceramiden, Lactosylceramiden und mehreren Gangliosiden (unter anderem GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, GQ<sub>1b</sub>, usw.), jedoch zu einem Ansteigen von Sphinganin und Sphingosin (MERRILL et al., 1993) *in situ*. Die so modifizierte Zusammensetzung der Lipidkomponenten von Zellmembranen kann genutzt werden, um die Wirkungsmechanismen von Rezeptoren genauer zu charakterisieren. Beispielsweise beobachteten STEVENS & TANG (1997) den vollständigen Aufnahmestopp von 5-Methyltetrahydrofolat nach Fumonisinbehandlung von Caco-Zellen, obwohl die Anzahl der Vitaminrezeptoren sich nur um 50 % verringert hatte.

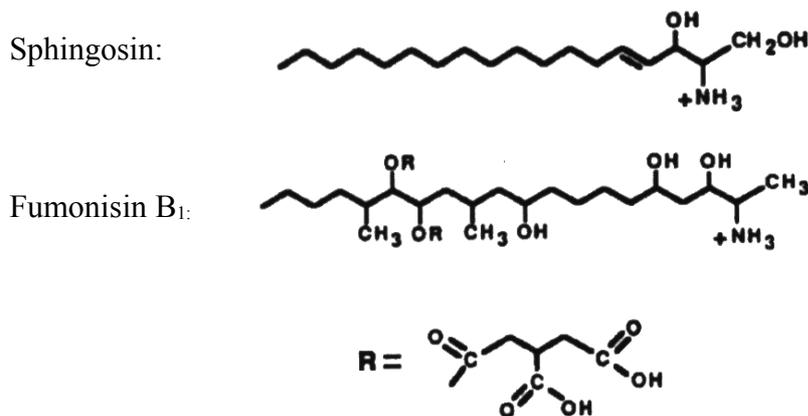


Abbildung 3: Chemische Struktur von Sphingosin und Fumonisin B<sub>1</sub>

### 2.3.1.3 Osmoprotektive Substanzen

Der Wirkungsmechanismus von sog. „pore-forming“ Toxinen besteht darin, dass es durch die Bildung von Poren in der Zellmembran aufgrund des kolloidosmotischen Gradienten zum Einstrom von Elektrolyten und Wassermolekülen in die Zelle kommt; dies resultiert in einem Anschwellen der Zellen und schlussendlich in deren Lyse. Moleküle, die einen größeren hydrodynamischen Durchmesser als die Poren aufweisen, können diese Lyse verhindern bzw. verzögern, indem sie im extrazellulären Raum ebenfalls einen kolloidosmotischen Druck

aufbauen, und dadurch den Einstrom ins Zellinnere verhindern (osmoprotektiver Effekt). Bei Verwendung von Zuckern unterschiedlicher Größe können somit experimentell Rückschlüsse auf die Größe der nach Toxinkontakt gebildeten Poren gezogen werden.

ZITZER et al. (1995) beschäftigten sich mit den zytolytischen Eigenschaften des von *Vibrio cholerae* gebildeten EI-Tor Hämolytins (siehe Tab. 2). Mit Hilfe hochmolekularer Verbindungen wie PEG 600, 1000 und 2000 konnte die Lyse von Erythrozyten verhindert werden, wohingegen PEG 400 nur teilweise (40 % Hemmung) einen protektiven Effekt zeigte. Zucker mit einem kleineren Radius - wie zum Beispiel Saccharose - beeinflussten die Toxinaktivität nicht. Die Autoren schätzen aufgrund dieser Ergebnisse den Durchmesser der durch EI-Tor Hämolytins gebildeten Pore auf maximal 1,5 nm. Ähnliche Untersuchungen wurden von CLINKENBREAD et al. (1989) mit dem von *Pasteurella haemolytica* produzierten Leukotoxin durchgeführt, hierbei ergab sich ein Porendurchmesser von 0,9 nm.

Dass bei diesen Untersuchungen der Einfluß von Toxinkonzentration, Inkubationszeit und Temperatur nicht übersehen werden darf, geben MOAYERI & WELCH (1994) zu bedenken. Sie beschäftigen sich mit der durch *Escherichia coli* Hämolytine verursachten Porenbildung. Während bei Toxinkonzentrationen von 10 ng/ml einige der eingesetzten Zuckerlösungen osmoprotektive Wirkung zeigten, konnte ab einer Toxinkonzentration von 20 ng/ml keine der verwendeten Zuckerlösungen die Erythrozyten vor Lyse schützen.

## **2.4 Wirkungsmechanismen bakterieller Toxine**

Im folgenden sollen kurz die mittlerweile bekannten Wirkungsmechanismen verschiedener bakterieller Toxine dargestellt werden. In Hinblick auf die von *B. cereus* produzierten Diarrhoe-Toxine gilt die „pore-forming“ Aktivität des Cyt K als gesichert (HARDY et al., 2001). Auch für den HBL-Toxinkomplex postulierten BEECHER & WONG (1997) entsprechende Aktivitäten, die Porengröße soll weniger als 1,2 nm betragen. Da die Einzelkomponenten des Nhe-Komplexes denen von HBL ähneln, wird der gleiche Wirkmechanismus vermutet (GRANUM, pers. Mitteilung).

**Tabelle 2: Einteilung und Vergleich cytolytischer Porenbildner**

<b>Toxingruppe</b>	<b>Prototyp</b>	<b>Toxingröße</b>	<b>Porengröße</b>	<b>andere Beispiele</b>	<b>Referenz</b>
$\beta$ -barrel Typ	$\alpha$ -Toxin von <i>S. aureus</i>	33 kDa	1-2 nm	$\beta$ -Toxin von <i>C. perfringens</i> , Cyt K von <i>B. cereus</i>	MENESTRINA et al. (2001)
Cholesterin-bindende Cytolysine	Streptolysin O von <i>Strep. pyogenes</i>	60 kDa	30 nm	Perfringolysin O von <i>Cl. perfringens</i> , Pneumolysin O von <i>Strep. pneumoniae</i>	TWETEN et al. (2001)
RTX	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ -Hämolysin	105 kDa	0,9-3 nm	Hämolysin von <i>Actinobacillus suis</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	LOBO & WELCH (1994)
Sauerstoff stabile Streptolysine	Streptolysin S von <i>Strep. pyogenes</i>	< 8 kDa	25-30 nm	Hämolysin von <i>Strep. agalactiae</i> , <i>Serpulina hyodysenteriae</i>	ALOUF (2003)
Protoxine	Aerolysin von <i>Aeromonas hydrophila</i>	52 kDa (Protoxin)	2-3 nm	El-Tor Hämolysin von <i>Vibrio cholerae</i> , $\alpha$ -Toxin von <i>Cl. septicum</i>	FIVAZ et al. (2001)



Die größte Gruppe unter den cytolytischen Toxinen bilden die Cholesterin-bindenden Cytolysine, früher auch unter dem Begriff "sauerstofflabile Toxine" bekannt, da deren hämolytische Eigenschaften durch längeren Kontakt mit Luft inaktiviert werden. Mittlerweile gilt gesichert, dass die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten ursächlich für den Aktivitätsverlust ist. Die zur Zeit 21 bekannten Proteine sind antigenetisch miteinander verwandt und stark lytisch. Zu ihnen gehören unter anderem Toxine von einigen *Streptokokken* (Streptolysin O, Pneumolysin, Intermedilysin usw.), *Clostridien* (Tetanolysin, Botulinolysin, Septicolysin usw.), *Listerien* (Listeriolysin, Ivanolysin usw.) und viele mehr. Cholesterin in der Zellmembran scheint die Bindungsstelle dieser Toxine zu sein. Doch handelt es sich dabei wahrscheinlich nicht um ein Rezeptormolekül im engeren Sinn, sondern um eine bestimmte Anordnung bzw. punktuell erhöhte Konzentrationen von Cholesterin ("lipid rafts") (TWETEN et al., 2001).

LOBO & WELCH (1994) beschrieben die Familie der sogenannten RTX-Cytolysine (für repeats in toxin). Dies sind calciumabhängige Toxine, die durch repetitive Aminosäuresequenzen charakterisiert sind. Die Grundstruktur aus neun Aminosäuren (GGXGXDXUX, wobei X eine beliebige und U eine hydrophobe Aminosäure darstellen) wiederholt sich vier bis 14 mal (CORTAJARENA et al., 2002). Als Prototyp dieser Familie ist das *Escherichia coli* Hämolysin zu nennen. Die meisten RTX-Cytolysine fungieren als Porenbildner, aber auch einige von *Erwinia chrysanthemi* bzw. *Serratia marcescens* gebildete Proteasen werden aufgrund ihrer Struktur zu dieser Familie gezählt.

Die Hämolyse um Kolonien von *Streptococcus pyogenes* auf Blutagar sind auf das Streptolysin S zurückzuführen. Dies ist der Prototyp der sogenannten "sauerstoffstabilen Toxine" (ALOUF, 2003), welche im Verhältnis zu ihrer Molekülmasse (<8 kDa) zu den stärksten Toxinen zählen. Dieser Gruppe ist gemeinsam, dass sie nur in Anwesenheit eines "Carriers" (wie zum Beispiel Hefe, Albumin oder verschiedenen Farbstoffen), welche dem Medium zugegeben werden müssen und als Stabilisatoren dienen, lytisch wirken.

Protoxine, zu welchen das Aerolysin von *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas sobria* sowie das *Clostridium septicum*  $\alpha$ -Toxin und verschiedene *Vibrio* Hämolysine zählen, werden in den Bakterien aus ihren Pre-Protoxinen gebildet. Dieses Pre-Protoxin wird aufgrund einer Signalsequenz beim Ausschleusen durch die Bakterienmembran zum Protoxin verkürzt,

welches in das extrazelluläre Medium abgegeben wird und inaktiv ist. Die Bildung des eigentlichen Toxins erfolgt mittels Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Furin) im extrazellulären Raum oder durch an die Zielmembran gebundene Proteine. Als Bindungsstelle für das Protoxin Aerolysin fungieren die Zuckerketten des GPI-Ankers, die wie auch GM<sub>1</sub> und Cholesterin gehäuft in den sog. "lipid rafts" vorkommen. Durch Oligomerisierung bildet sich ein äußerst stabiles Heptamer des Toxins, welches weder durch Harnstoff (8 mol/l) noch durch Kochen mit SDS zerstört werden kann.

#### **2.4.2 Intrazellulär wirkende Exotoxine**

Hierbei handelt es sich meist um Proteine, deren enzymatische Aktivität die Funktion intrazellulärer Regulatorproteine verändert. Sie setzen sich aus einer enzymatisch aktiven Komponente (A, Enzymdomäne) und einer Bindungskomponente (B, bestehend aus Bindungsdomäne und Translokationsdomäne) zusammen. Zunächst bindet das Toxin mit der Bindungsdomäne an einem Zellmembranrezeptor. Anschließend erfolgt eine rezeptorvermittelte Endozytose in ein Endosomen-Kompartiment, wo es zu einer Strukturveränderung in der Translokationsdomäne des Toxins kommt, wodurch das Freiwerden ins Cytosol ermöglicht wird.

Shigatoxin (Stx) ist bekannt als klassisches AB<sub>5</sub>-Toxin, das von *Shigella dysenteriae* und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* produziert wird. Diese Toxinfamilie besteht aus zwei Isoformen, Stx 1 und Stx 2. NAKAJIMA et al. (2001) untersuchten das Bindungsverhalten der beiden Isoformen und kamen zu dem Schluss, dass deren Kinetik einem "bivalent analyte" Modell am nächsten kommt, wobei Stx 2 langsamer an das Gangliosid GB<sub>3</sub> bindet, aber auch schwerer davon zu lösen ist. Schon in frühen Untersuchungen wurde von KEUSCH & JACEWICZ (1977) eine Zuckerstruktur als Rezeptor vermutet. Spätere Untersuchungen, in denen bei Verwendung von mit Tunicamycin bzw. Trypsin vorbehandelten Zellen eine deutliche Reduktion der Toxizität beobachtet werden konnte, grenzten die Suche auf Glykoproteine ein (KEUSCH et al., 1986). Allerdings wurde auch die Möglichkeit eines Glykolipidrezeptors diskutiert, da Tunicamycin in hohen Konzentrationen (5 µg/ml, GUARNACCIA et al., 1983) auch den Transport von Zuckernukleotiden durch den Golgiapparat behindert, mit der Folge, dass die Dichte der Glykolipide an der Zelloberfläche

abnimmt. Von MOBASSALEH et al. (1988) sowie KANDEL et al. (1989) konnte schlussendlich GB<sub>3</sub> (ausschlaggebend hierbei die Sequenz: Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ ) als Shigatoxinrezeptor identifiziert werden. Nach der rezeptorvermittelten Endozytose erfolgt der Transport der Shigatoxine in den Golgiapparat. Die A<sub>1</sub>-Untereinheit des Toxins spaltet einen einzelnen Adeninrest der 28S-rRNA des Ribosomenkomplexes ab. Diese Depurinierung führt zu einer Hemmung der Peptidelongation, was insgesamt zu einer Inaktivierung der Proteinsynthese führt.

Ebenfalls die Struktur AB<sub>5</sub> besitzt das Cholera toxin, bei dem die B-Untereinheit polyvalent mit hoher Affinität an das Monosialogangliosid GM<sub>1</sub> bindet. Der Wirkungsmechanismus innerhalb der Zelle wurde von POPPOFF (1998) folgendermaßen zusammengefasst: durch Proteolyse wird die A-Untereinheit aktiviert (Spaltung in A1 und A2). A1 stellt eine ADP-Ribosyltransferase dar (NAD wird hydrolysiert zu ADP-Ribose und Nikotinamid). Die entstehende ADP-Ribose wird auf einen Argininrest des G $\alpha$  Proteins übertragen, so daß dieses persistierend aktiviert wird. Dies resultiert wiederum in einer Daueraktivierung der Adenylcyclase, sowie einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. In den Krypten kommt es dadurch zu einem Anstieg der Cl<sup>-</sup> Sekretion, in den Zotten zu einer Verringerung der mit NaCl gekoppelten Absorption, was schließlich zu den bekannten Durchfallsymptomen führt. Das hitze labile Enterotoxin (LT-I) von *Escherichia coli* gleicht dem Cholera toxin in seiner Struktur (80 % Homologie) und seinen biologischen Eigenschaften (POPOFF, 1998).

Ein weiteres intrazellulär wirksames Toxin stellt das von *Corynebacterium diphtheriae* produzierte Diphtherietoxin (DT) dar. HRANITZKY et al. konnten 1985 zeigen, dass sowohl CHO-K1 als auch Vero-Zellen nach Behandlung mit Tunicamycin weitgehende Resistenz gegen das Toxin entwickelten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Glykoproteinstruktur des Rezeptors vorausgesagt, der später von NAGLICH et al. (1992) als heparinbindender EGF ähnlicher Wachstumsfaktor-Vorläufer (proHB-EGF) identifiziert werden konnte. Nach der rezeptorabhängigen Endozytose wird im Endosom bei niedrigem pH das katalytische A-Fragment abgespalten. Die Enzymkomponente tritt ins Cytosol über und ribolysiert den Elongationsfaktor 2, wodurch die Polypeptidkettenverlängerung am Ribosom blockiert wird.

## 3 Eigene Untersuchungen

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Ammoniumsulfat (Riedel-de-Haen, 31119) $\alpha$

Benzyl 2-Acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-Galactopyranosid (Sigma-Aldrich GmbH, B 4894)

Casein (Sigma-Aldrich GmbH, C-8654)

Caseinhydrolysat (Oxoid, L41)

Castanospermin (Sigma-Aldrich GmbH, C3784)

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 1 644 807)

Dikaliumhydrogenphosphat (Merck, 1.05104)

Dulbecco's MEM Zellkulturmedium (Biochrom AG, F 0435)

EDTA (Sigma-Aldrich GmbH, E 1644)

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

Fumonisin B<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich GmbH, F 1147)

D(+)-Glukose Monohydrat (Merck, 8342)

L-Glutamin (Sigma-Aldrich GmbH, G 5763)

Hefeextrakt (Oxoid, L21)

Hypoxanthin (Sigma-Aldrich GmbH, H 9636)

Kaliumhydrogenphosphat (Merck, 1.04871)

Magnesiumsulfat (Merck, 1.05886)

MEM-EARLE Zellkulturmedium (Biochrom AG, F 0325)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich GmbH, M 6250)

Neuraminidase (Sialidase) (Roche, 1585886)

N-Glykosidase F (Roche, 1 365 169)

Natriumcitrat (Merck 1.6448)

Natriumpyruvat-Lösung, 100 mmol/l (Biochrom AG, L 0473)

Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung (Biochrom, K 0293)

Penicillin/Streptomycin, 10 000 U/ml (Biochrom AG, A 2212)

Ringerlösung-Tabletten (Oxoid, BR 52 G)

RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, F 1215)  
Swainsonin (ICN, 154250)  
Thymidin (Sigma-Aldrich GmbH, T 1895)  
Tris (Sigma-Aldrich GmbH, T 1503)  
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, T 3924)  
Tunicamycin (Sigma-Aldrich GmbH, T 7765)

### 3.1.2 Bakterienstämme bzw. –isolate

#### Referenzstämme

- Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig:  
*B. cereus*-Stamm DSM 4384 bzw. DSM 4222 (für HBL-Enterotoxin)
- GRANUM et al. (1996): NHV 0075-95 (für Nhe-Enterotoxin)
- LUND et al. (2000): 391-98 (für Cyt K)

#### Sonstige Stämme

- 22 *B. cereus* Isolate aus der Stammsammlung des Institutes
- 15 Isolate unterschiedlicher Herkunft aus dem *Bacillus cereus* EU-Projekt QLK-2001-00854

### 3.1.3 Nährmedien

#### Flüssiges Anreicherungsmedium für *B. cereus*

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

#### Feste Nährmedien für *B. cereus*

Columbia Agar mit Schafblut<sup>Plus</sup> (Oxoid, PB 5039 A)

PEMBA: *Bacillus cereus* Agar base (Oxoid, CM 617) mit Supplement (Oxoid, SR 099 E) und Eigelb (Oxoid SR 047 C)

### **3.1.4 Puffer und Lösungen**

#### Lösungen für die Zellkultur

Glutamin-Lösung: 0,2 mol/l

Mercaptoethanol-Lösung: 0,005 mol/l

HT-Supplement-Lösung: Hypoxanthin 0,001 mol/l  
Thymidin 0,0016 mol/l

#### Enzymimmuntests

Bicarbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,01 mol/l Phosphatpuffer (pH 7,3) mit Zusatz von 0,12 mol/l NaCl

3 %ige Casein/PBS-Lösung (g/v)

Waschlösung: 0,15 mol/l NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20

Citratpuffer (0,21 mol/l; pH 3,95) mit Zusatz von 3,15 mmol/l Wasserstoffperoxid

Tetramethylbenzidinlösung : 1 mmol/l 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin in 45 ml Methanol und 5 ml Aceton

Substrat/Chromogenlösung nach GALLATI und PRACHT (1985):

20 Teile Citratpuffer und 1 Teil Tetramethylbenzidinlösung

#### Immunaffinitätschromatographie

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

PBS mit Zusatz von 0,01 % NaN<sub>3</sub>

### **3.1.5 Zellkultur**

#### Zelllinien

African green monkey kidney cells: Vero-Zellen (Bio Whittaker, Katalognr. 76-108B), Passagerate 189 - 329

Maus-Neuroblastomzellen: Neuro2A-Zellen (DSM, ACC 148)

Humane T-Leukämiezellen: Jurkatzellen (DSM, ACC 282)

Hybridom-Zelllinien: 3-AcDON-BSA II (5B2) bzw. Citrinin-KLH VIII (7H11)  
(Stammsammlung des Instituts)

#### Zellmedien

Allen Medien wurden 1 % Natriumpyruvat, 2 % L-Glutaminlösung und 0,2 % Pencillin/Streptomycin-Lösung hinzugefügt.

Zelllinie	Medium	FCS	N. ess. As.*	Mercaptoethanol- lösung	HT-Supplement- lösung
Vero	MEM-EARLE	1 %	-	-	-
Neuro2A	Dulbecco's MEM	10 %	1 %	-	-
Jurkat	RPMI 1640 Medium	10 %	-	-	-
Hybridom	Dulbecco's MEM	10 %	-	1 %	1 %

\* N. ess. As. = Nicht essentielle Aminosäuren

### **3.1.6 Immunreagenzien**

Anti-Maus-IgG-alkalische Phosphatase (Chemicon, AP308A)

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

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

Toxinkomplex	Exoprotein bzw. Antigen	monoklonaler Antikörper
HBL	B-Komponente	39 I 2A3
	L <sub>2</sub> -Komponente	45 II 1A12 bzw. 45 I 8B12
	L <sub>1</sub> -Komponente	39 I 1C2*
Nhe	Nhe A-Komponente	45 kD II 1A8
	Nhe B-Komponente	45 kD III 1E11, 1A5, 2C3

\* besitzt Kreuzreaktivität mit Nhe B

### **3.1.7 Sonstige Materialien**

#### B. cereus Exoprotein-Produktion

Cryo-Tubes, 1,8 ml (Nunc GmbH, Wiesbaden, 363401)

Sterilfilter Millex GV, 0,22 µm (Millipore, SLGV 025 LS)

#### Zellkultur

Centricon-30 Konzentratoren (Amicon, Witten, 4208)

Dispenser mit 0,6 ml Spitzen (LKB Instrument GmbH, Bromma, Schweden)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, 3810)

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

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

Variable Achtkanalpipette 50 - 250 µl (Eppendorf, Hamburg)

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm<sup>2</sup> (Nunc GmbH, Wiesbaden, 156502)

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 25 cm<sup>2</sup> (Nunc GmbH, Wiesbaden, 63371)

Zählkammer nach Thomas

#### Säulenmaterialien

MobiCol-Säulen, 1 ml (MoBiTec, M 1002)

Fritten, 90 µm Poren (MoBiTec, M 2190 bzw. M2290)

### **3.1.8 Geräte**

#### Messgeräte

Mikrotiterplatten-Messgerät: SLT-ATC (SLT-Labinstruments)

pH-Messgerät: pH 537 (Indolab WTW GmbH)

#### sonstige Geräte

Brutschrank (Memmert)

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

Kühlzentrifuge, Minifuge RF (Heraeus, Osterode)

Schüttelwasserbad, GFL 1083 (Ges. für Labortechnik, Burgwedel)

Taumelgerät (Heidolph GmbH)

## **3.2 Allgemeine Methodik**

### **3.2.1 Anzucht von *B. cereus* in CGY-Bouillon**

Zur Produktion der Enterotoxine wurde *B. cereus* standardmäßig in CGY-Bouillon (modifiziert nach BEECHER & WONG, 1994) angereichert. Zur Voranreicherung wurden zuerst 20 ml Medium mit *B. cereus* Keimmaterial beimpft und dann für 17 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad (84 Zyklen/min) inkubiert. Anschließend wurden Erlenmeyerkolben, in denen 20 ml CGY-Bouillon vorgelegt waren, im Verhältnis 1:100 mit der Voranreicherung beimpft, und erneut für 6 Stunden bei 32 °C im Schüttelwasserbad bebrütet. Nach Abzentrifugation des Keimmaterials wurde der erhaltene Kulturüberstand sterilfiltriert und mit 1 mmol/l EDTA versetzt, um *B. cereus* eigene Proteasen zu inaktivieren. Anschließend wurde der Kulturüberstand portioniert und bei -18°C eingefroren.

### **3.2.2 Enzymimmuntests**

Der semiquantitative Nachweis der *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten in Kulturüberständen oder sonstigen Präparationen erfolgte mittels Enzymimmuntests, wobei bei den verwendeten Varianten (indirekter bzw. Sandwich-EIA) das Messsignal direkt proportional zur Toxinkonzentration in der Probe ist. Zur Berechnung des in der Probe nachweisbaren Antigentiters wurde diejenige Verdünnungsstufe herangezogen, deren Extinktion im Bereich von 1,0 lag. Der Titer wurde definiert als das Multiplikationsprodukt aus dieser Extinktion und der dazugehörigen reziproken Verdünnung.

### **3.2.2.1 Indirekter Enzymimmuntest**

Diese EIA-Variante wurde zum Nachweis von Nhe B und der B-Komponente des HBL-Komplexes verwendet. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit seriellen Verdünnungsreihen (Ausgangsverdünnung 1:5) der in PBS bzw. Bicarbonatpuffer verdünnten Proben über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer beschichtet. Freie Bindungsstellen wurden danach mit 3 % Casein/PBS (150 µl/Kavität) 45 min blockiert. Nach einem Waschschrift wurden die spezifischen monoklonalen Antikörper (siehe 3.1.6) in einer Konzentration von 2 µg/ml PBS (100 µl/Kavität) zugegeben, und für 1 h inkubiert. Danach wurde die Platte gewaschen, Kaninchen-anti-Maus-Ig-Peroxidase-Konjugat (1:3000 in 1 % Casein/PBS, 100 µl/Kavität) auf die Platte gegeben und wieder eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen, die Substrat/Chromogen-Lösung (100 µl/Kavität) zugegeben und nach einer Inkubationszeit von 20 min die Reaktion durch Zugabe von 1 mol/l Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 450 nm mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät.

### **3.2.2.2 Sandwich-Enzymimmuntest**

Zum Nachweis der L<sub>2</sub>-Komponente des HBL stand ein Sandwich-EIA zur Verfügung (FELLA, 1999). Mikrotiterplatten wurden zunächst mit dem mAk 1A12 in Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität) in einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht bei RT beschichtet. Nach dem Ausschlagen der Platte wurden die freien Bindungsstellen mit 3 %iger Casein/PBS-Lösung (150 µl/Kavität) für 45 min bei RT abgesättigt. Das Auftragen der Proben (100 µl/Kavität) in 1:2 Verdünnungsreihen mit PBS/0,5 % Tween 20 folgte nach einem weiteren Waschschrift. Die Anfangsverdünnung der Proben betrug 1:5. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Proben mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Platte viermal gewaschen und das Nachweisantikörper-Enzymkonjugat (peroxidasemarkierter mAk 8B12; 100 µl/Kavität) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation und erneutem Waschen erfolgte die Zugabe der Substratlösung. Die Farbreaktion wurde nach exakt 20 min durch 1 molare Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt und die Extinktion photometrisch bei 450 nm bestimmt.

### 3.2.3 Zytotoxizitätstest

Zum Nachweis der in den Proben vorhandenen zytotoxischen Aktivität wurde der von FELLA (1999) entwickelte und auf Vero-Zellen basierende WST-Zellkulturtest verwendet.

Dazu wurde in einer 96-Loch-Zellkulturplatte eine log-2 Verdünnungsreihe mit sterilfiltrierten *B. cereus*-Kulturüberständen und Medium hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Medium/Kavität beschickt, wobei die äußeren Reihen A und H frei gelassen wurden, um Randeffekte zu vermeiden. Alle Proben wurden im Doppelansatz getestet. Die Reihen 11 und 12 enthielten keine Probe und wurden als Zellkontrolle verwendet. Anschließend wurde zu den Ansätzen 100 µl Zellsuspension ( $10^4$  Vero-Zellen/Kavität) zugegeben und die Mikrotiterplatte bei 37 °C in 7 % CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde nach Abheben von 100 µl Medium WST-Reagenz (10 µl/Kavität) zugegeben, für 1 h inkubiert und abschließend die Farbintensität photometrisch bei 450 nm gemessen. Als Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe der Kulturüberstände definiert, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer 50 %-igen Reduktion der Spaltungsaktivität der Zellen führte.

### 3.3 Ergebnisse

Für die beabsichtigten Arbeiten zur Wirkungsweise der beiden *B. cereus* Enterotoxin-Komplexe Nhe und HBL standen als analytische Werkzeuge im wesentlichen ein bereits etablierter und intensiv validierter Vero-Zellkulturtest und verschiedene spezifische monoklonale Antikörper für die Toxin-Einzelkomponenten zur Verfügung. Da ein zentraler Bestandteil der gesamten Versuchsplanung auf diesen beiden analytischen Werkzeugen basierte, wurden in einem ersten Schritt einige wesentliche Aspekte der Verfahren - wie die Empfindlichkeit der Zellen bzw. die neutralisierenden Eigenschaften der mAk's - überprüft.

#### 3.3.1 Sensitivität verschiedener Zelllinien

Ziel dieser Untersuchungen war es, verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Herkunft und mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten auf ihre Sensitivität gegenüber *B. cereus* Toxinen zu überprüfen. Neben den routinemäßig eingesetzten Vero-Zellen (adhärent wachsende Nierenzellen) wurde noch die Eignung von Neuro2A-Zellen (adhärent wachsende Neuroblastom-Zellen), Hybridom- (adhäsiv wachsend) und Jurkat-Zellen (Suspensionskultur) überprüft.

Da beim etablierten Zytotoxizitätstest der Anteil lebender Zellen photometrisch nach Zugabe des WST-Reagenz (3.2.3) bestimmt wird, mußte zuerst in orientierenden Vorversuchen für die neu etablierten Zelllinien diejenige Zelldichte ermittelt werden, mit der bei üblicher Testdurchführung eine Extinktion von ca. 1,0 im Mikrotiterplatten-Lesegerät erreicht werden konnte. Dazu wurden jeweils sechs verschiedene Konzentrationen (zwischen  $5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^4$ ) der Zellen im Zehnfach-Ansatz in Mikrotiterplatten für 24 h inkubiert. Anschließend wurde für 1 h WST-Reagenz zugegeben und schließlich die Extinktion mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt.

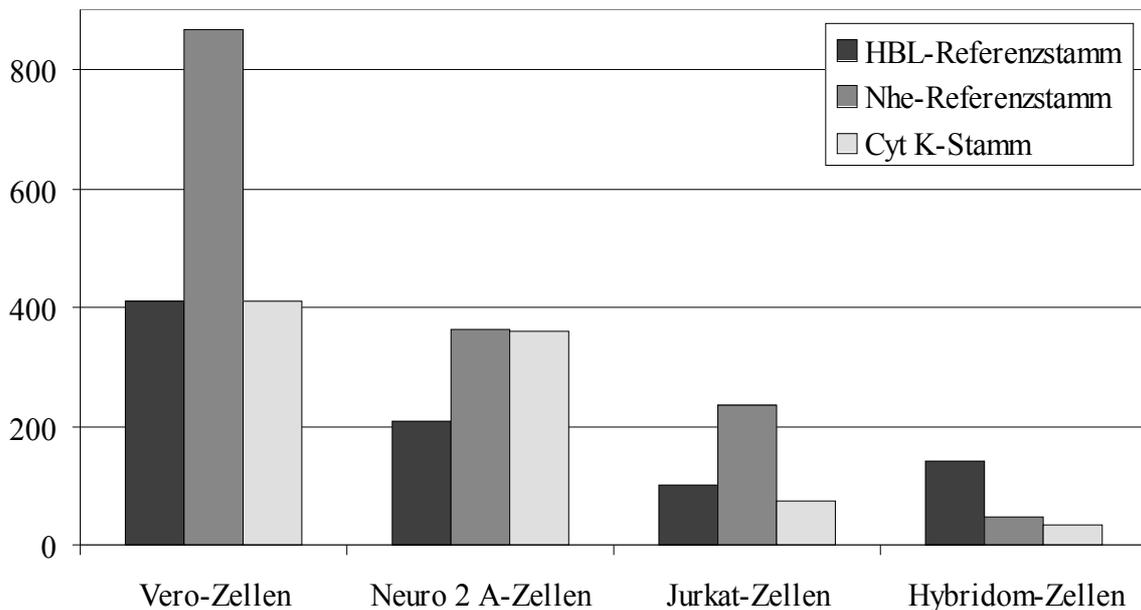
Dabei zeigte sich, dass bei den in Suspension wachsenden Jurkat-Zellen die Einzelmesswerte stark streuten (20 - 30 %), bedingt durch die vor WST-Zugabe übliche Abnahme von 100µl Medium. Durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt (5 min bei 135 xg) konnte diese

Fehlerquelle behoben werden, die Varationskoeffizienten für den toxfreien Kontrollansatz lagen dann wie bei den anderen Zelllinien bei  $< 12\%$ .

Aufgrund der Ergebnisse dieser Vorversuche wurden Neuro2A-Zellen in derselben Dichte wie Vero-Zellen - nämlich  $1 \times 10^4$ /Kavität - eingesetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte wäre diese Zelldichte auch für die beiden anderen Zelllinien wünschenswert gewesen; unter identischen Testbedingungen wurden jedoch von den Hybridom- und Jurkat-Zellen nur Extinktionen von  $0,4 \pm 0,08$  erreicht. Deshalb wurden für alle weiteren Versuche diese Zelllinien in Konzentrationen von  $4 \times 10^4$ /Kavität eingesetzt.

Zur Überprüfung der Sensitivität der vier Zelllinien wurden zuerst Kulturüberstände der Referenzstämme mittels Zellkulturtest untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 zusammengefaßt. Wie aufgrund früherer Ergebnisse erwartet, erwiesen sich die Vero-Zellen für alle drei Referenzstämme als sensitivste Zelllinie.

reziproker Zytotoxizitätstiter



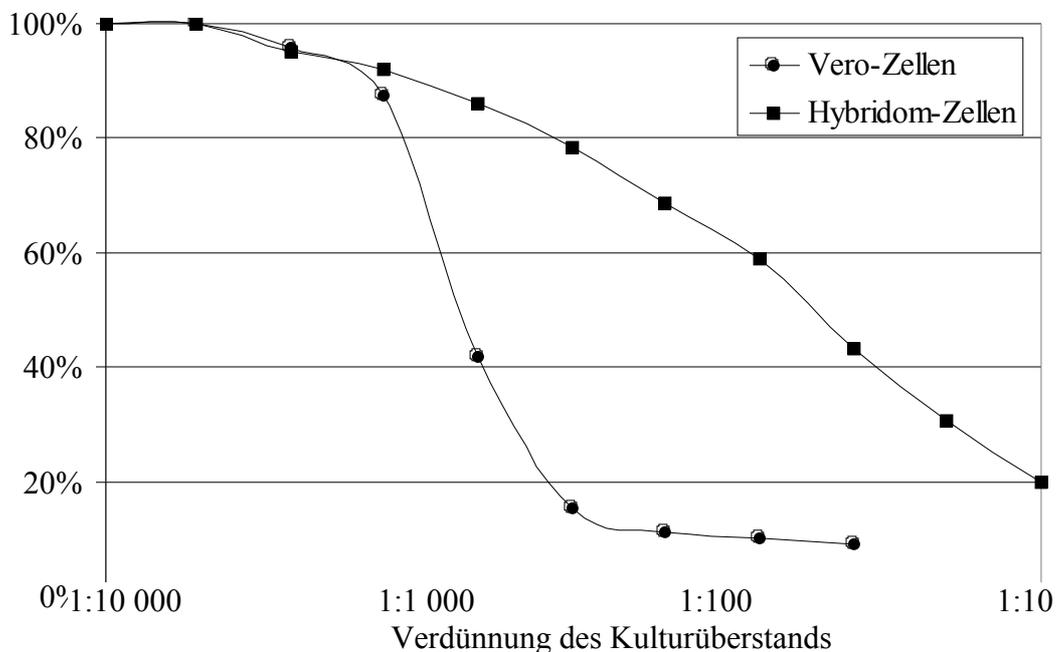
**Abbildung 4:** Durchschnittlich nachweisbare ( $n = 4$ ) zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen von *B. cereus* Referenzstämmen bei Verwendung verschiedener Zelllinien

Besonders hohe Werte wurden beim Nhe-Referenzstamm erhalten. Ein ähnliches Sensitivitätsmuster, wenn auch auf weit geringerem Niveau (ca. Faktor 4), zeigten die Jurkat-Zellen, während die Neuro2A-Zellen vergleichsweise empfindlich auf Cyt K reagierten. Der Cyt K-Referenzstamm produziert keinen der beiden anderen Enterotoxin-Komplexe (Nhe bzw. HBL), während der HBL-Referenzstamm auch Nhe produziert. Dies gilt im übrigen für alle bislang isolierten HBL-positiven *B. cereus* Stämme.

Auffällig war die außergewöhnlich niedrige Empfindlichkeit der eingesetzten Hybridom-Zellen gegenüber Nhe- und Cyt K-haltigen Überständen. Kulturüberstände der HBL-Produzenten hatten hingegen einen vergleichsweise hohen toxischen Effekt. Dieses Empfindlichkeitsmuster wurde bislang auch in früheren Untersuchungen bei keiner anderen Zelllinie gesehen.

Auch die Dosis-Wirkungskurven zeigten bei den Hybridom-Zellen im Vergleich zu den Vero-Zellen einen völlig anderen Verlauf (Abb. 5). Typischerweise resultierte die Überprüfung von Nhe-Produzenten im Vero-Zytotoxizitätstest in einem sehr steilen sigmoiden Kurvenverlauf, bei Hybridom-Zellen wurde hingegen ein extrem flacher Verlauf beobachtet.

relative Extinktion



**Abbildung 5:** *Dosis-Wirkungskurven von Nhe-haltigen B. cereus Kulturüberständen bei Verwendung verschiedener Zelllinien. Die im WST-Test erhaltenen Extinktionen des toxinfreien Kontrollansatzes wurden gleich 100 % gesetzt.*

Abschließend wurde anhand von 22 repräsentativ ausgewählten *B. cereus* Isolaten aus der Stammsammlung des Instituts überprüft, inwieweit die bei der Untersuchung der Referenzstämme festzustellenden Tendenzen bestätigt werden können (Tab. 3). Aufgrund der äußerst geringen Empfindlichkeit wurde auf den Einsatz der Hybridom-Zellen verzichtet. Im auf Vero-Zellen basierenden Referenztest waren Zytotoxizitätstiter zwischen 1:45 bis zu 1:1.250 nachzuweisen, der Durchschnittswert für alle untersuchten Isolate betrug 1:545. Bei Verwendung der Neuro2A- bzw. Jurkat-Zellen konnten wie aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse zu erwarten zwar deutlich niedrigere Durchschnittswerte von 1:295 bzw. 1:89 festgestellt werden, eine eindeutige Korrelation der mit den verschiedenen Zelllinien erhaltenen Ergebnisse war aber nicht festzustellen :

Vero-/Neuro2A-Zellen	$r^2 = 0,512$
Vero-/Jurkat-Zellen	$r^2 = 0,495$
Neuro2A/Jurkat-Zellen	$r^2 = 0,643$

**Tabelle 3:** Untersuchung von 22 *B. cereus* Isolaten im Zytotoxizitätstest mittels Vero-, Neuro2A- und Jurkat-Zellen

<i>B. cereus</i> Isolat	HBL*	reziproker Zytotoxizitätstiter		
		Vero-Zellen	Neuro2A-Zellen	Jurkat-Zellen
MHI 7	+	476	127	38
MHI 11	-	1250	385	91
MHI 14	-	45	25	11
MHI 17	-	1000	714	185
MHI 19	+	262	120	53
MHI 26	+	371	144	63
MHI 29	+	400	180	67
MHI 46	+	358	174	50
MHI 54	+	453	179	83
MHI 60	+	101	44	43
MHI 66	-	812	329	77
MHI 75	+	152	64	101
MHI 88	+	435	294	115
MHI 97	-	1250	286	137
MHI 108	-	1048	1111	221
MHI 200	+	833	526	107
MHI 1307	-	434	345	67
MHI 1313	+	882	625	145
MHI 1315	+	377	333	105
MHI 1316	+	306	244	83
MHI 1368	+	293	103	53
MHI 1413	+	444	135	71

\* die HBL-Produktivität der Stämme wurde mittels EIA basierend auf spezifischen mAk's ermittelt (3.2.2.2)

### 3.3.2 Neutralisationstest

Inwieweit die am Lehrstuhl verfügbaren mAk gegen *B. cereus* über neutralisierende Eigenschaften verfügen, war bislang im Rahmen der Charakterisierungsstudien nicht detailliert überprüft worden. Dazu wurden die in 3.1.6 aufgeführten mittels Protein A-Affinitätschromatographie gereinigten monoklonalen Antikörper unter Verwendung von Centricon-30 Konzentratoren auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Nach Anlegen einer log-2 Verdünnungsreihe von Kulturüberständen des HBL- bzw. Nhe-Referenzstammes wurden jeweils 10 µl Antikörper/Kavität zugegeben. Darauf folgte die Zugabe von 90 µl Vero-Zellen. Der weitere Ablauf des Zytotoxizitätstests erfolgte wie in 3.2.3 beschrieben. Bei positiven Ergebnissen wurden die Versuche bis zu dreimal wiederholt.

Als Kontrollen wurden einerseits mit einem irrelevanten mAk (3-AcDon-BSA II 5B2) versetzte und andererseits ohne mAk-Zusatz angelegte Verdünnungsreihen parallel untersucht. Unterschiede zwischen den beiden Kontrollansätzen konnten nicht beobachtet werden. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Neutralisationsversuche zusammengefaßt. Eindeutig neutralisierende Eigenschaften konnten nur bei den mAk gegen Nhe B nachgewiesen werden. Die mAk 1E11 und 2C3 bewirkten eine nahezu vollständige Hemmung der zytotoxischen Aktivität des Nhe-Referenzstammes (Reduktion des reziproken Zytotoxizitäts-titers von 1:911 auf 1:14). Zu einer 87 %-igen Hemmung führte der mAk 1A5, der auch gegen die Nhe B Komponente, aber anscheinend gegen ein anderes Epiotop gerichtet ist. Auch beim HBL-Referenzstamm, der bekanntermaßen neben HBL auch das Nhe-Enterotoxin produziert, konnte durch den Einsatz des mAk 1E11 die zytotoxische Aktivität deutlich reduziert werden (Restaktivität 42 %). Die mAk gegen die verschiedenen HBL-Komponenten, sowie Nhe A besitzen hingegen keine bzw. nur geringe neutralisierende Eigenschaften.

**Table 4:** *Relative Neutralisation (in %) der zytotoxischen Aktivität von B. cereus Kulturüberständen durch monoklonale Antikörper, spezifisch für verschiedene Enterotoxin-Komponenten. Ergebnisse des Vero-Zellkulturtests.*

<b>Hemmung der zytotoxischen Aktivität</b>			
<b>mAk</b>	<b>Zielantigen</b>	<b>HBL-Referenzstamm</b>	<b>Nhe-Referenzstamm</b>
2A3	HBL-B	<10	n. d.
8B12	HBL-L <sub>2</sub>	16,6*	n. d.
1A12	HBL-L <sub>2</sub>	<10	n. d.
1C2	HBL-L <sub>1</sub> /Nhe B	8,9	4,1
1A8	Nhe A	<10	15,4
1E11	Nhe B	58,0	<b>98,2</b>
1A5	Nhe B	n. d.	<b>87,0</b>
2C3	Nhe B	n. d.	<b>98,1</b>

\* bei Untersuchungen eines Nhe B negativen Überstandes des HBL-Referenzstammes (siehe 3.3.4.1) konnten geringgradig höhere Werte (23,6 %) erzielt werden

n. d. = nicht durchgeführt

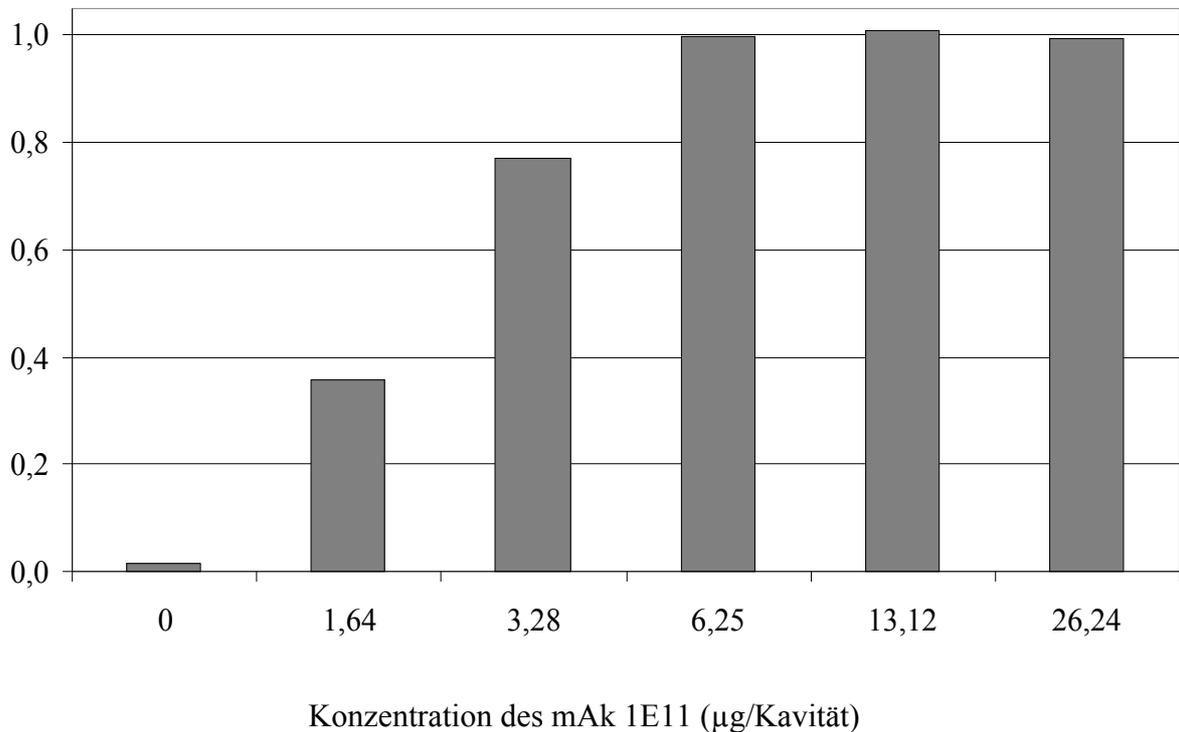
Anschließend wurden auch unter der Verwendung der drei anderen Zelllinien (Neuro2A-, Jurkat-, Hybridom-Zellen) die neutralisierenden Eigenschaften des mAk 1E11 überprüft. Dabei zeigten alle Zelllinien, bis auf die Hybridom-Zellen, das gleiche Muster: Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes wurden vollständig neutralisiert, während beim HBL-Stamm nur teilweise eine Neutralisation (39 - 47 % Restaktivität) stattfand. Bei den Hybridom-Zellen hingegen wurden für den HBL-Referenzstamm Restaktivitäten von bis zu 77 % beobachtet. Kulturüberstände, die nur Nhe enthielten wurden hingegen wie bei den anderen Zelllinien vollständig neutralisiert.

### 3.3.3 Toxische Aktivität des HBL

Wie eingangs erwähnt, exprimieren alle *B. cereus* HBL-Produzenten auch einen zweiten Enterotoxin-Komplex, nämlich Nhe, wodurch Studien zur Aktivität des HBL-Komplexes erschwert werden. Durch die neutralisierenden Eigenschaften des mAk gegen die Nhe B-Komponente eröffneten sich neue methodische Möglichkeiten. So schien es möglich, zu überprüfen, ob die in *B. cereus* Kulturüberständen nachweisbare zytotoxische Aktivität exklusiv auf der Wirkung des Nhe bzw. HBL beruht, oder ob noch andere Toxine hierbei eine Rolle spielen. Des Weiteren war es erstmals möglich, bei HBL-Produzenten durch Neutralisation der Nhe B-Komponente Daten zur zytotoxischen Aktivität des HBL-Enterotoxins in ungereinigten Kulturüberständen von *B. cereus* zu erhalten. Zur semiquantitativen Bestimmung der in den Kulturüberständen enthaltenen HBL-Konzentrationen wurde ein Sandwich EIA zum Nachweis der L<sub>2</sub>-Komponente verwendet. Hierfür wurden aus der Stammsammlung des Instituts gezielt Stämme mit unterschiedlicher HBL-Produktivität ausgewählt.

Bei den oben beschriebenen Neutralisations-Versuchen wurden anhand stöchiometrischer Berechnungen (mol Bindungsstellen des mAk, geschätzte Toxinkonzentration im Kulturüberstand  $\geq 1$ ) alle mAk immer in einer fixen Konzentration (10  $\mu\text{g/Kavität}$ ) eingesetzt. Um sicherzustellen, dass die zugesetzte mAk-Menge für die geplanten Untersuchungen ausreichten, wurde dieser Parameter in einem weiteren Vorversuch überprüft. Dazu wurde eine konstante Verdünnung des Nhe-Referenzstammes (1:20) mit einer 1:2 Verdünnungsreihe des mAk 1E11 inkubiert. Bei mAk-Konzentrationen von  $> 6,25 \mu\text{g/Kavität}$  kam es zu einer vollständigen Neutralisation, was sich mikroskopisch in einem geschlossenen Zellrasen und im WST-Test durch eine Extinktion von 1,0 (Abb. 6) zeigte.

## Extinktion



**Abbildung 6:** Neutralisation der zytotoxischen Aktivität des Nhe-Referenzstammes durch unterschiedliche Konzentrationen des mAk 1E11

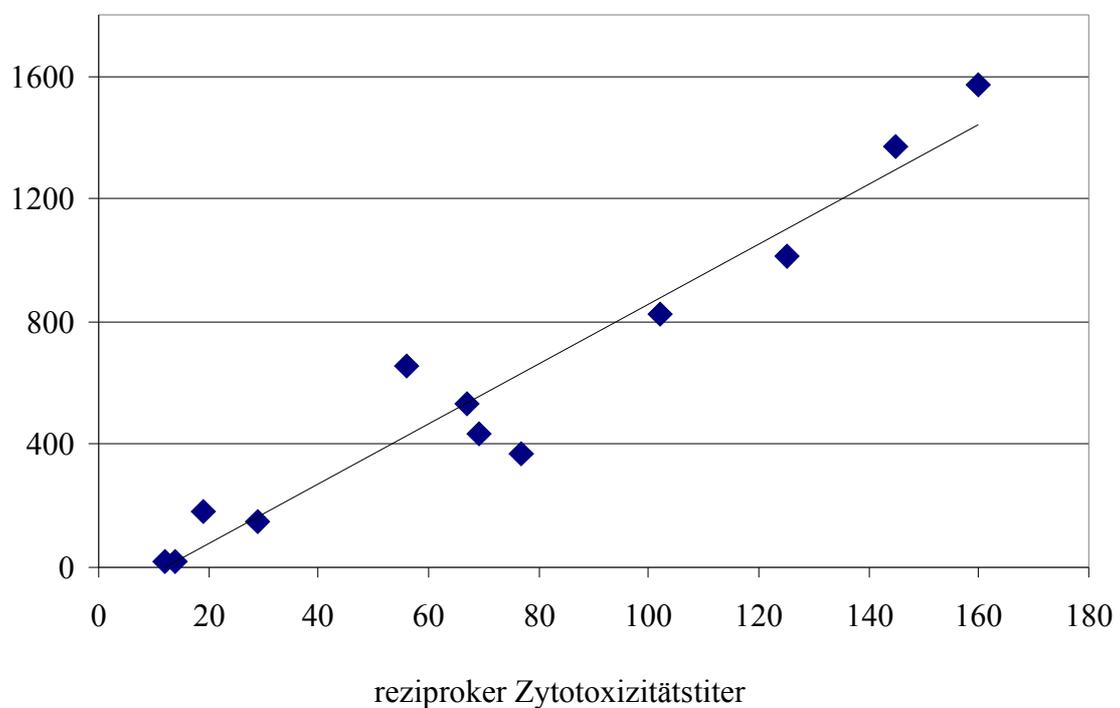
Eine Auswahl von mehreren Stämmen ( $n = 18$ ) wurde zur Überprüfung der Aktivität von HBL getestet (Tab. 5). Die hier getesteten Stämme, welche HBL und Nhe produzierten, hatten einen Zytotoxizitätstiter der im Bereich von 1:240 bis 1:1.563 lag. Der reziproke Zytotoxizitätstiter der Nhe-produzierenden Stämme betrug ohne Neutralisation durchschnittlich 1:758, bei HBL- und Nhe-produzierenden Stämmen 1:599. Die Restaktivität nach Neutralisation mit dem mAk 1E11 war bei reinen Nhe-Produzenten vernachlässigbar, bei den HBL-Produzenten lag sie zwischen 1:12 und 1:239.

**Tabelle 5:** Zytotoxische Restaktivität mehrerer *B. cereus*-Stämme mit unterschiedlichem Zytotoxizitäts- und L<sub>2</sub>-Antigentiter nach Neutralisation mit mAk 1E11

<b>Toxinprofil</b>	<b>Stamm</b>	<b>Toxizität der Kulturüberstände</b>	<b>L<sub>2</sub>-Antigentiter</b>	<b>zytotoxische Restaktivität (%)</b>
+ / -	MHI 241	921	–	1,8
	MHI 1477	826	–	3,4
	MHI 1479	31	–	0
	MHI 1494	1299	–	5
	MHI 1515	694	–	3,2
	MHI 1522	775	–	4,4
+ / +	MHI 162	500	534	20,4
	MHI 163	397	1574	40,3
	MHI 1475	313	438	26,1
	MHI 1492	769	372	20,9
	MHI 1495	641	1011	26,9
	MHI 1497	588	179	22,8
	MHI 1499	641	654	14,3
	MHI 1500	437	150	11,3
	MHI 1501	699	823	39,2
	MHI 1505	1563	1373	15,1
	MHI 1511	240	19	8,7
	MHI 1530	400	18	4,7

Neben den Enterotoxin-Komplexen Nhe und HBL werden von *B. cereus* eventuell auch noch andere Toxine produziert. Daher stellte sich die Frage, woher die resultierende Restaktivität nach Neutralisation mit dem mAk 1E11 rührt. In der Abbildung 7 ist die Beziehung zwischen Zytotoxizitätstiter nach Zugabe von mAk 1E11 und Extinktion im L<sub>2</sub>-Sandwich EIA dargestellt. Es zeigte sich, dass eine deutliche Korrelation ( $r^2 = 0,9379$ ) zwischen den Ergebnissen bei der Neutralisation der Nhe-B Komponente im Zellkulturtest und dem immunologischen Nachweis der L<sub>2</sub>-Komponente mittels EIA besteht, womit ein Einfluß anderer Toxine, wie zum Beispiel BcET, auf die Ergebnisse nahezu ausgeschlossen werden kann.

reziproker L<sub>2</sub>-Antigentiter



**Abbildung 7:** Korrelation zwischen reziproken Zytotoxizitätstitern und L<sub>2</sub>-Sandwich EIA bei der Untersuchung von verschiedenen *B. cereus* Kulturüberständen deren Nhe-Toxin mittels mAk 1E11 neutralisiert worden war.

### 3.3.4 Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Nhe B-Komponente die zytotoxische Aktivität von *B. cereus* Kulturüberständen deutlich zu dominieren scheint. Da bei der Neutralisation von HBL-produzierenden Stämmen eine Interaktion des mAk 1E11 aufgrund bekannter Sequenzhomologien mit anderen Komponenten ( $L_1$  des HBL-Komplexes) nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, wurde im folgenden versucht, mittels subtraktiver Immunaффinitätschromatographie einen Nhe B-negativen/HBL-positiven Kulturüberstand ( $Nhe^-/HBL^+$ -Kulturüberstand) herzustellen. Dieser methodische Ansatz diente auch dazu, die in 3.3.3 erhaltenen Ergebnisse zur zytotoxischen Aktivität von HBL zu verifizieren.

Die monoklonalen Antikörper 1A12 gegen die  $L_2$ -Komponente des HBL-Komplexes und 1E11 gegen die Nhe B-Komponente wurden nach einem vom Hersteller empfohlenen Protokoll an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (10 mg mAk/g Gel) gekoppelt und das erhaltene Immunosorbens zur Herstellung von Säulen verwendet. Die Säulen bzw. das Gel wurden bis zur Verwendung in PBS mit Zusatz von 0,01 %  $NaN_3$  bei 4 °C gelagert. Zur Aufreinigung der Toxinkomponenten wurden *B. cereus* Kulturüberstände 1:10 bzw. 1:5 in PBS verdünnt. Nach dem Auftrag der Probe auf die Säule (die dabei aufgefangene Flüssigkeit wird im weiteren als Probendurchlauf 1 bezeichnet) wurde mit PBS-Puffer (5 ml) gespült (entsprechend als Spüldurchlauf bezeichnet), um ungebundene Bestandteile aus dem Säulenbett zu entfernen. Danach erfolgte entweder ein nochmaliges Auftragen des Probendurchlaufes (entsprechend als Probendurchlauf 2 bezeichnet) oder gebundenes Protein wurde mittels 5 ml Glycin/HCl (pH 2,5) eluiert. Jeder der so hergestellten Probendurchläufe, Spüldurchläufe und Eluate wurden im EIA analysiert, um die Elimination des Antigens zu protokollieren.

Um zu überprüfen, ob die Aktivität der Antikörper durch die Kopplung an das Gel beeinträchtigt wurde bzw. um eine grobe Schätzung der antigenbindenden Kapazität der Säule zu erhalten, wurden 1 ml Kulturüberstand (1:3 in PBS verdünnt) der Referenzstämmen (HBL bzw. Nhe) über die entsprechende Säule aufgereinigt. Wie in Tabelle 6 dargestellt, waren beide Säulen in der Lage, das Antigen (Nhe B im 1. Probendurchlauf bzw.  $L_2$  im 2.

Probendurchlauf) effektiv zu binden. Die mittels EIA im entsprechenden Probendurchlauf nachweisbaren Antigentiter betragen weniger als 1 % (Nhe B) bzw. 2 % (L<sub>2</sub>).

**Tabelle 6:** Funktionsüberprüfung der Immunaффinitätschromatographiesäulen

mAk	Komponente	Toxinprofil des Kulturüberstandes Nhe/HBL	Antigentiter im EIA	
			Kulturüberstand	Probendurchlauf
1A12	L <sub>2</sub> -Komponente (HBL)	+ / +	920	17
1E11	B-Komponente (Nhe)	+ / -	2716	26

### 3.3.4.1 Subtraktive IAC der Nhe B-Komponente

Das in Tabelle 6 beschriebene Ergebnis wurde in weiteren Versuchen vielfach bestätigt, und der resultierende Nhe B-negative Kulturüberstand anschließend im Zellkulturtest überprüft, wobei sich der Probendurchlauf reiner Nhe-Produzenten stets als atoxisch erwies (n = 7). Versuche zur Wiederherstellung der toxischen Aktivität durch Kombination des Eluats mit dem Probendurchlauf zeigten jedoch nicht das gewünschte Ergebnis, mehr als 6 % der Ausgangstoxizität konnten nicht erreicht werden.

Durch die Entfernung der Nhe B-Komponente beim Kulturüberstand des HBL-Referenzstamms (NheB<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberstand) verringerte sich der Wert des reziproken Zytotoxizitätstiters um 63 % (Mittelwert aus 2 Experimenten). Dies entspricht weitgehend dem Ergebnis des Neutralisations-Tests, bei dem eine Reduktion des Zytotoxizitätstiters um 58 % auftrat (siehe Tab. 4).

Mit dem so kreierte NheB<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberstand wurden anschließend die in 3.3.2 beschriebenen Neutralisationstest wiederholt. Wiederum konnte bei den mAk gegen die HBL-Komponenten nur bei Verwendung des mAk 8B12 eine geringgradige Neutralisation (23,6 %) beobachtet werden.

### 3.3.4.2 Subtraktive IAC der L<sub>2</sub>-Komponente

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der subtraktiven Immunaффinitätschromatographie für L<sub>2</sub> durch unspezifische Bindung der Nhe B-Komponente an das Gelmaterial beeinflusst werden, wurden zur Kontrolle Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes über die Säule gegeben. Eine Reduktion der zytotoxischen Aktivität trat hierbei nicht auf (Tab. 7). Der HBL-Referenzstamm wurde zweimal über die 1A12-IAS gegeben, da im 1. Probendurchlauf noch Spuren von L<sub>2</sub> mittels EIA nachweisbar waren.

**Tabelle 7:** Effektivität der L<sub>2</sub>-Immunaффinitätssäule (IAS): Entfernen der L<sub>2</sub>-Komponente, sowie Ergebnisse des Kontrollansatzes (n = 3)

Toxinprofil der Kulturüberstände NHE/HBL	Original		nach 1. IAS		nach 2. IAS	
	Zyto- toxizität	L <sub>2</sub> -Antigentiter	Restzyto- toxizität	L <sub>2</sub> - Antigentiter	Restzyto- toxizität	L <sub>2</sub> - Antigentiter
+ / +	100 %	100 %	69 %	6 %	57 %	1,3 %
+ / -	100 %	-	> 98 %	-	-	-

Durchschnittlich (n = 3) verringerte sich die zytotoxische Aktivität nach Entfernen der L<sub>2</sub>-Komponente auf 57 % des Ausgangswertes, bei einem Schwankungsbereich von 52-68 %. Ähnliche Werte wurden auch im Zellkulturtest basierend auf Neuro2A- bzw. Jurkat-Zellen erhalten. Die Hybridomzellen zeigten wiederum ein anderes Bild: die Zytotoxizitätstiter des L<sub>2</sub> negativen Kulturüberstandes sanken deutlich von 1:152 auf 1:36. Dies bedeutet, dass bei Hybridom-Zellen ca. 77 % der nachweisbaren Toxizität in den Kulturüberständen auf HBL zurückzuführen ist, bei den anderen Zellen hingegen nur ca. 43 %.

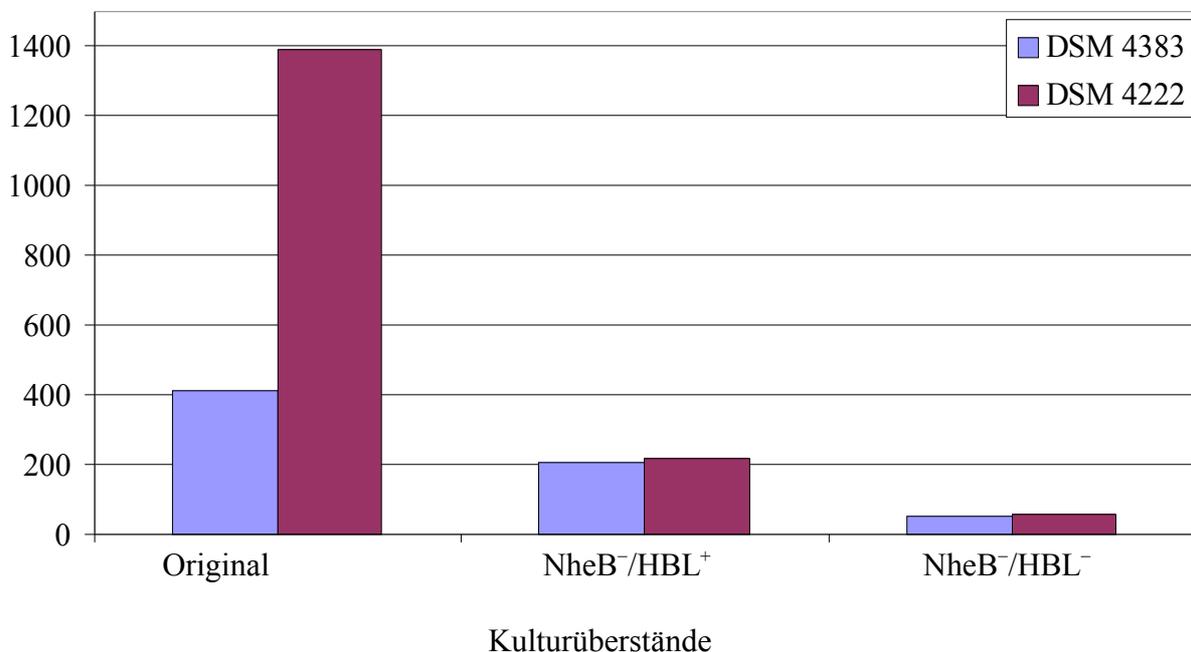
### 3.3.4.3 Kombination der beiden IAC-Varianten

Durch die IAC bestand nun die Möglichkeit, beide Enterotoxin-Komplexe durch Entfernen essentieller Komponenten gezielt zu inaktiveren. Von BEECHER & WONG (2000 a) wurde

die Hypothese aufgestellt, dass es – verursacht durch Variationen in der Aminosäure-Sequenz - unterschiedlich aktive HBL-Varianten gäbe. Deswegen wurden Kulturüberstände von zwei HBL-positiven Stämmen mit annähernd gleicher  $L_2$ -Produktivität (Antigentiter 1:1574 bei DSM 4384 bzw. 1:1373 bei DSM 4222) aber sehr unterschiedlichem reziproken Zytotoxizitätstiter (1:411 für DSM 4384 bzw. 1:1390 für DSM 4222) sequentiell über die beiden IAS gegeben, wobei innerhalb der Ansätze ( $n = 4$ ) die Reihenfolge der Säule variiert wurde.

Nach Entfernen der Nhe B-Komponente kam es bei beiden Stämmen zu einem starken Rückgang der Toxizität von 49 % (bei DSM 4384) bis 88 % (DSM 4222). Da wie erwähnt, beide Stämme annähernd die gleiche HBL-Produktivität aufwiesen, lagen wie erwartet in diesen NheB<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberständen die Zytotoxizitätstiter (1:205 bei MHI 163, 1:217 bei MHI 1505) sehr eng beieinander. Da die Kulturüberstände bei dieser Versuchsanordnung nur einmal über die 1A12-IAS gereinigt wurden (unvollständige Entfernung der  $L_2$ -Komponente, siehe Tab. 7), blieb eine geringe Restaktivität von 1:54 bzw. 1:57 (Abb. 8).

reziproker Zytotoxizitätstiter



**Abbildung 8:** Zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen zweier HBL-Produzenten nach Entfernen von Toxinkomponenten (Nhe B, anschließend  $L_2$ )



### 3.3.5 Beeinflussung der diskontinuierlichen Hämolyse durch Enterotoxin-Komponenten

Wie vielfach in der Literatur beschrieben, tritt bei HBL-positiven *B. cereus* das Phänomen der diskontinuierlichen Hämolyse auf. Dabei bildet sich auf schafbluthaltigem Nähragar zwischen der inneren und äußeren Hämolyse ein ahämolytischer Ring, dieser Effekt wird auf Wechselwirkungen der HBL-Einzelkomponenten zurückgeführt. Im folgenden wurde überprüft, ob mit Hilfe der neu entwickelten Methoden (Neutralisationstest bzw. IAS) dieses Wechselspiel näher beleuchtet werden kann. Alle Versuche mit dem HBL-Referenzstamm wurden auf Columbia-Agar mit Schafblut durchgeführt.

Die Vorbereitung der Schafblutplatten erfolgte durch Ausstanzen von 3 mm großen Löchern. Diese lagen je nach Versuchsanordnung in einem definierten Abstand zueinander oder alleine auf einer Platte. Als Proben wurden entweder sterilfiltrierte Bakterienüberstände, gereinigte mAk oder deren Mischung eingesetzt. Nach Befüllen der Stanzlöcher mit 10 µl Probe wurden die Blutplatten für ca. 8 h im Brutschrank (32 °C) inkubiert.

Die Neutralisation erfolgte auf zwei Arten, einerseits durch das Mischen des Überstandes mit den in 3.3.2 aufgeführten mAk (reaktiv mit verschiedenen Enterotoxin-Komponenten), andererseits durch Diffusion der mAk in den Agar.

Variante A: *B. cereus* Kulturüberstand wurden im Verhältnis 1:1 mit PBS (Kontrolle) bzw. dem mAk (Konzentration: 1 mg/ml) gemischt (je 5 µl).

Variante B: 10 µl Kulturüberstand wurden in eine Kavität pipettiert; in angrenzende Kavitäten (Abstand ca. 5 mm) wurden 10 µl eines irrelevanten mAk (3-AcDon BSA II 5B2, Kontrolle) bzw. des untersuchten mAk in einer Konzentration von 1 mg/ml gegeben.

Die subtraktive IAS zur Herstellung L<sub>2</sub>- bzw. Nhe B-negativer Überstände wurde wie in 3.3.4 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt die beiden Hämolyseformen, die durch Kulturüberstände des HBL- bzw. Nhe-Referenzstammes hervorgerufen werden.



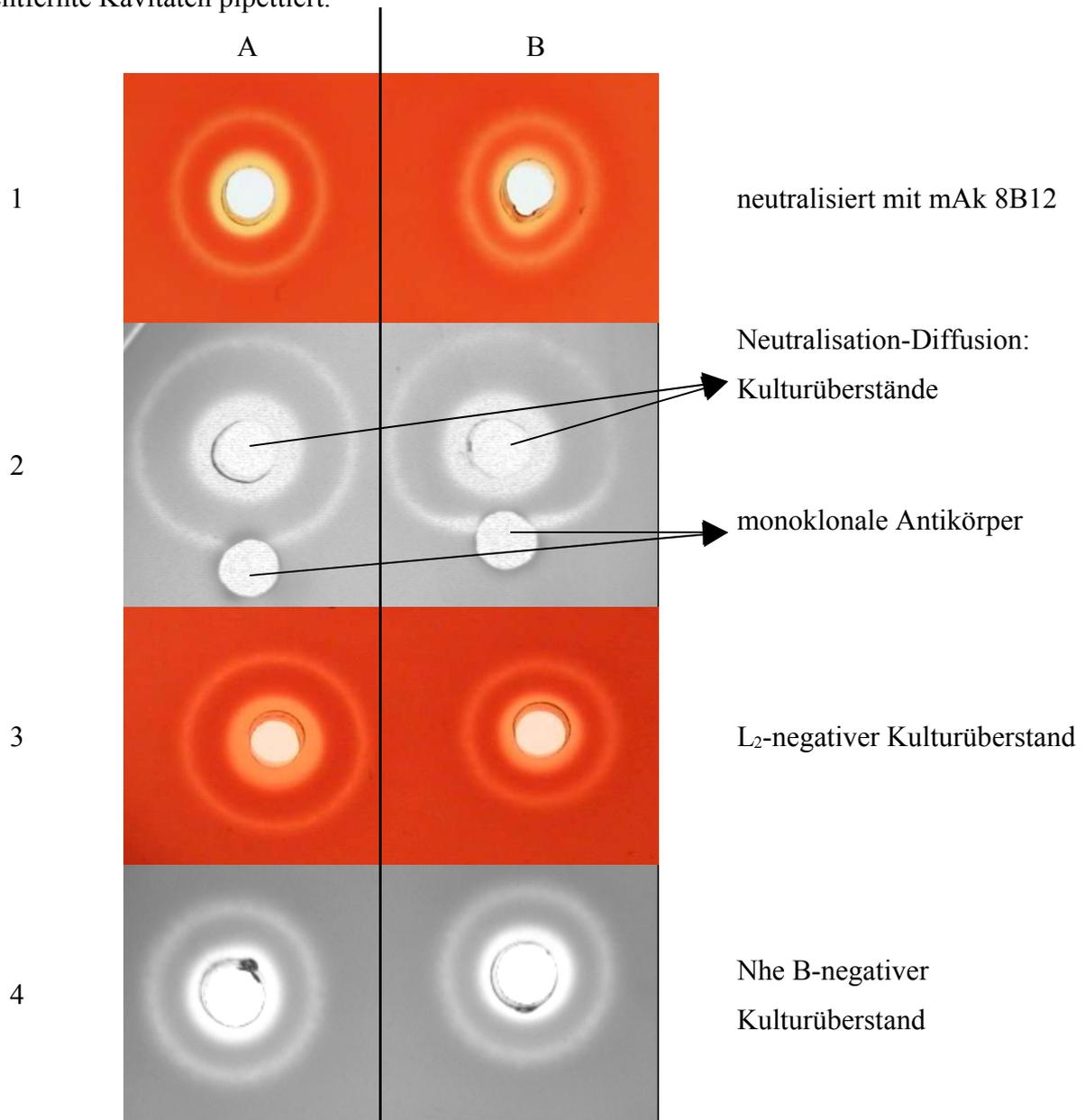
**Abbildung 9:** Hämolysemuster von dem HBL- bzw. Nhe-Referenzstamm nach 8 h Inkubation bei 32 °C auf Schafblutagar

In Abbildung 10 sind die Effekte, die durch die oben beschriebenen Manipulationen des HBL-haltigen Kulturüberstandes hervorgerufen wurden, dokumentiert. Die Verwendung der verschiedenen mAk gegen die Enterotoxin-Komponenten B, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> (HBL) bzw. Nhe A und Nhe B im Neutralisationstest führten mit Ausnahme des gegen die L<sub>2</sub>-Komponenten gerichteten mAk 8B12 zu keiner Veränderung des Hämolysemusters.

Bei gleichzeitiger Inkubation von mAk 8B12 und Überstand verringerte sich der Radius und der äußere Hämolysering erschien weniger diskret. Auch bei der Diffusionsmethode konnte nur der mAk 8B12 ein verändertes Hämolysemuster hervorrufen. Es ergab sich eine schmalere ahämolytische aber dafür eine leichte Verstärkung der äußeren hämolytischen Zone (Delleneffekt). Auch bei Einsatz L<sub>2</sub>-negativen Überstandes wurde eine diskontinuierlichen Hämolyse ausgebildet, der Durchmesser war um einiges geringer als im Kontrollansatz. Demgegenüber führte das Entfernen der Nhe B-Komponente weder beim HBL-Referenzstamm noch beim Nhe-Referenzstamm zu einer Veränderung im Hämolyseverhalten.

Die Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen den zwei Enterotoxinkomplexen erfolgten auf die gleiche Weise wie die oben beschriebenen Neutralisationsversuche. Bei simultaner Inkubation wurden 5 µl PBS (Kontrolle) bzw. 5 µl Überstand des Nhe-Referenzstammes mit 5 µl des HBL-Referenzstammes gemischt. Jeweils 10 µl der einzelnen

Proben (Referenzstämme) wurden bei der Diffusionsmethode in zwei ca. 5 mm voneinander entfernte Kavitäten pipettiert.



**Abbildung 10:** Veränderung des diskontinuierlichen Hämolysemusters des HBL- Referenzstammes

Reihe A: Kontrollansätze

Reihe B: Versuchsansätze mit veränderten Kulturüberständen

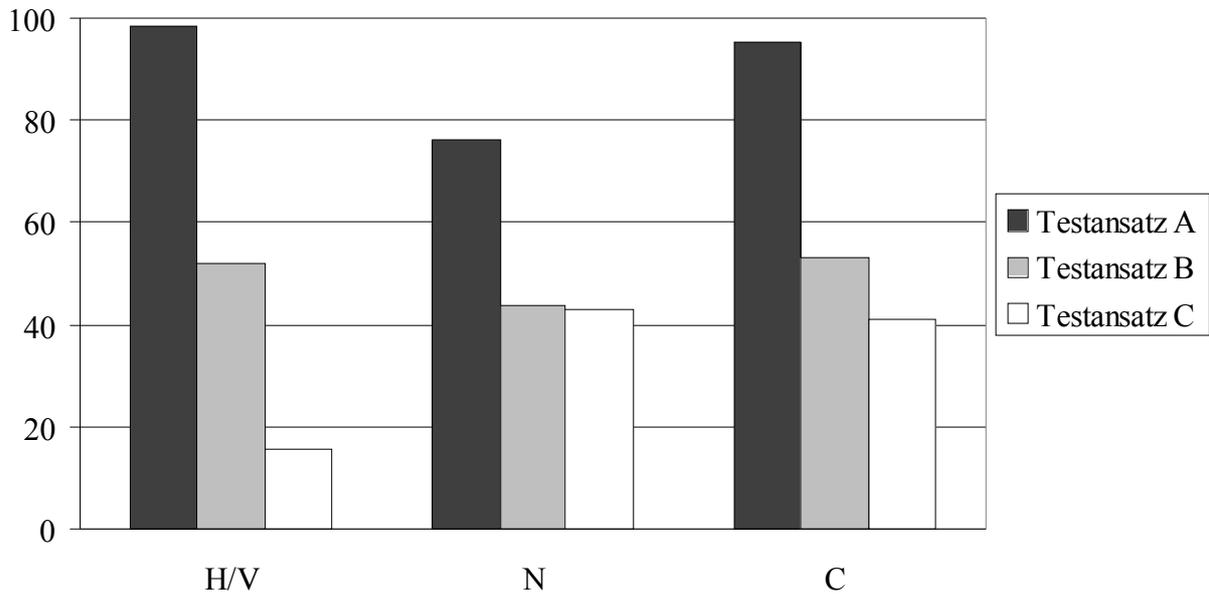
1B: simultane Inkubation des Kulturüberstandes mit mAk 8B12 gegen die L<sub>2</sub>-Komponente

2B: Diffusion des mAk 8B12 gegen den Kulturüberstand des HBL-Referenzstammes

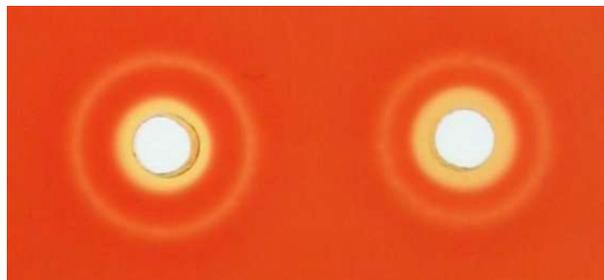
3B: Einsatz eines L<sub>2</sub>-negativen Kulturüberstands (hergestellt mittels subtraktiver IAS)

*4B: Nhe<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberstand*

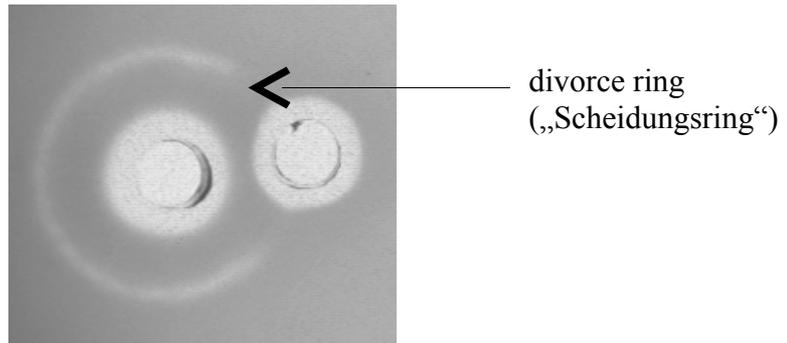
Der Durchmesser des äußeren Hämolyserings verringerte sich bei simultaner Inkubation der



beiden Referenzstämmen (Abb. 11). Ein bislang unbekanntes Phänomen wurde allerdings bei der Diffusionsmethode beobachtet. Im überlappenden Bereich der beiden Diffusionszonen war der für HBL-Produzenten typische Hämolysering unterbrochen (Abb. 12).



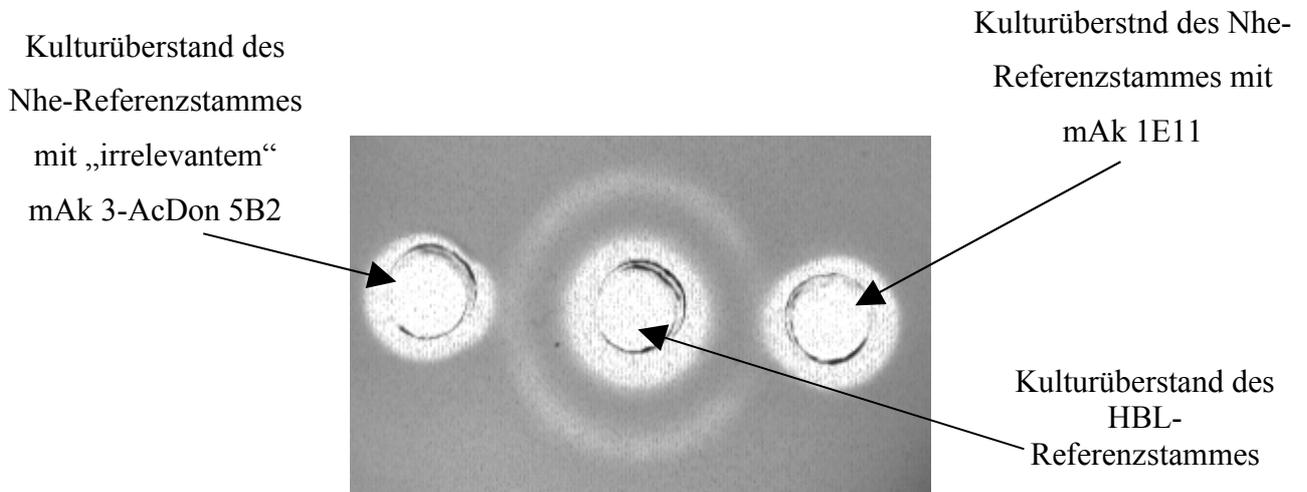
**Abbildung 11:** *Simultane Inkubation von HBL und Nhe-Referenzstamm*  
*links: HBL-Referenzstamm mit PBS (Kontrolle);*  
*rechts: HBL-Referenzstamm mit Nhe-Referenzstamm;*



**Abbildung 12:** *Beeinflussung der diskontinuierlichen Hämolyse durch Nhe*  
*links: HBL-Referenzstamm;*  
*rechts: Nhe-Referenzstamm;*

Um abzuklären, ob die Komponenten des Nhe-Komplexes diesen Effekt hervorrufen, wurde folgende Versuchsanordnung angelegt: in drei benachbarten Kavitäten wurden nebeneinander Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes, des HBL-Referenzstammes, sowie ein mit mAk 1E11 neutralisierter Nhe-Überstand verbracht.

Dabei zeigte sich, daß der neutralisierte Überstand den äußeren Hämolysering von HBL nicht mehr beeinflusste (Abb. 13). Ein Kontrollansatz, bei dem ein irrelevanter mAk verwendet wurde, bestätigte, daß dieses „Scheidungsring-Phänomen“ durch Nhe B hervorgerufen wird.



**Abbildung 13:** Beeinflussung der diskontinuierlichen Hämolyse durch Nhe B positiven und negativen Nhe-Referenzstamm

### 3.3.6 Untersuchung der Toxinwirkung auf sensibilisierte Zellmembranen

Zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von Toxinen können verschiedene Techniken verwendet werden (siehe auch 2.3.1). Mehrere Biochemika führen zu spezifischen Veränderungen an der Zellmembran. Einige (z. B. Antibiotika, Fusarientoxine) greifen in den Stoffwechsel der Zellen ein und ändern die Zusammensetzung der Zellmembran, andere (z. B. Enzyme) entfernen bestimmte Moleküle an der Membranoberfläche. Um Hinweise darauf zu erhalten, welche Zellstrukturen für die Bindung von *B. cereus* Enterotoxinen besonders wichtig sind, wurden im folgenden lebende Zellen und deren Zellmembranen mittels verschiedener Biochemika modifiziert und dann mit toxinhaltigen *B. cereus* Präparationen versetzt. Jurkat- und Hybridom-Zellen wurden in dieser Versuchsreihe nicht eingesetzt, da sie nur eine geringe Sensitivität gegenüber *B. cereus* Enterotoxinen aufwiesen (siehe 3.3.1) und sich zudem als sehr empfindlich gegenüber den eingesetzten Biochemika erwiesen.

#### 3.3.6.1 Veränderung der Zuckerstruktur

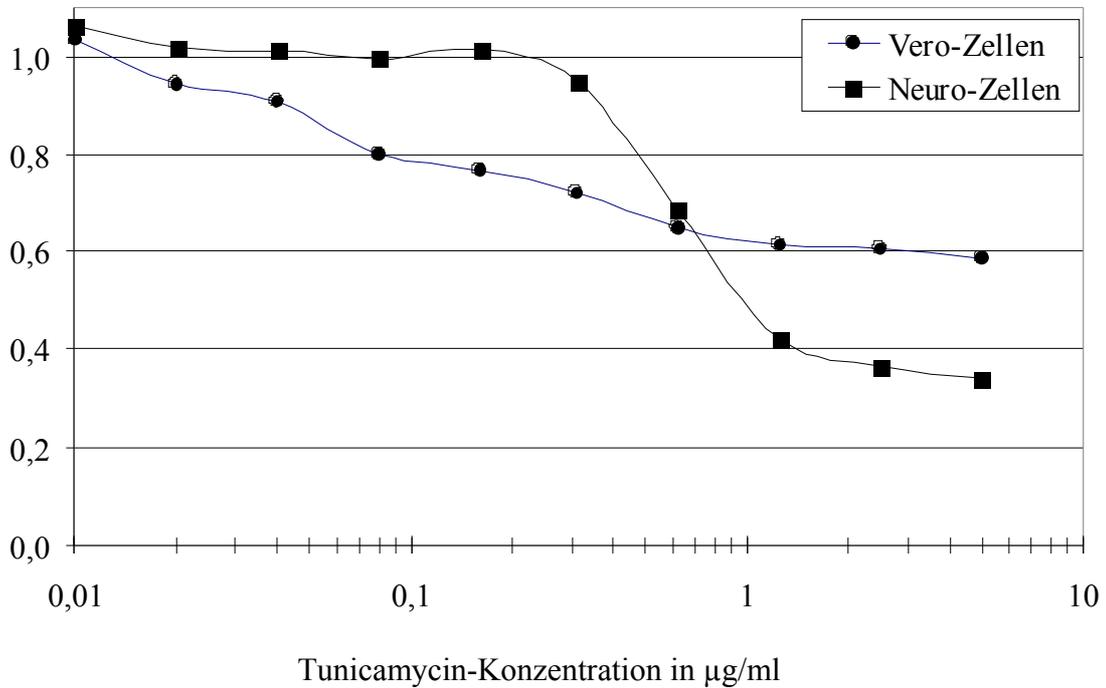
##### 3.3.6.1.1 Einsatz von Inhibitoren

###### 3.3.6.1.1.1 Tunicamycin

Da in den verfügbaren Studien zur Modifizierung von Zellen mittels Tunicamycin (TM) ein sehr weiter Konzentrationsbereich angegeben wird (siehe 2.3.1.1), wurde in Vorversuchen überprüft, bis zu welcher TM-Konzentration die verwendeten Vero- bzw. Neuroblastom-Zellen noch stoffwechselaktiv sind. Dazu wurde von TM eine log-2 Verdünnungsreihe in Zellkulturmedium angelegt, die Ausgangskonzentration betrug 5 µg/ml. Nach Zugabe der Zellen ( $10^4$ /Kavität) wurde der Ansatz für insgesamt 72 h inkubiert. Alle 24 h wurde die Mikrotiterplatte mikroskopisch beurteilt, wobei weder bei Vero- noch bei Neuro2A-Zellen eine Schädigung des Monolayers nach 24 h zu erkennen war. Nach weiteren 24 h konnte nur noch bei TM-Konzentrationen von  $\leq 0,08$  µg/ml ein vollständiger Zellrasen beobachtet werden, ein ähnliches Bild zeigte sich nach 72 h. Zu diesem Zeitpunkt wurde die photometrische Auswertung nach Zugabe von WST-Reagenz mittels Mikrotiterplatten-Messgerät durchgeführt, wobei das optische Ergebnis bestätigt werden konnte. Aufgrund dieser

Resultate (Abb. 14) wurden für die weiteren Versuche eine Konzentration von 0,05 TM  $\mu\text{g/ml}$  Medium eingesetzt.

Extinktion



**Abbildung 14:** Restaktivität im WST-Zellkulturtest von Vero- bzw. Neuro2A-Zellen, die 72 h mit Tunicamycin inkubiert waren

Da TM in den Stoffwechsel der Zellen eingreift, wurde kontrolliert, wie die Dauer der Tunicamycineinwirkung auf die Zellen die Ergebnisse beeinflusst, außerdem sollte ein eventuell auftretender kumulativer Effekt des TM durch unterschiedliche Versuchsanordnungen ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Zellen entweder 72 h mit bzw. ohne Zusatz von 0,05  $\mu\text{g/ml}$  TM bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert und dann mit bzw. ohne Tunicamycin in den Zellkulturtest eingesetzt. Aus diesem Ansatz ergeben sich somit vier verschiedene Versuchsanordnungen (A – D; siehe Legende Abb. 15), in denen jeweils die Kulturüberstände aller drei Referenzstämme bis zu fünfmal getestet wurden.

Prozent Zytotoxizitätssteigerung

**Tabelle 8:** *Einfluß der Behandlung von Vero-Zellen mit Castanospermin, Swainsonin, PNGase F und Sialidase auf die zytotoxische Aktivität von B. cereus Kulturüberständen als reziproke Zytotoxizitätstiter)*

Toxinprofil der eingesetzten Kulturüberstände	Enzym				zellulärer Enzyminhibitor					
	Sialidase		PNGase F		Castanospermin		Swainsonin			
HBL	Nhe B	Cyt K	0,1 U/ml für 3h	Kontroll- Ansatz für 5 h	2 U/ml	Kontro	50 µg/ml	Kontroll- Ansatz	4 µg/ml	Kontroll- Ansatz
+	+	-	385	400	352	345	269	265	472	485
+	-	-	233	204	125	115	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
-	+	-	769	833	769	765	787	771	855	917
-	-	+	370	380	417	400	382	402	370	400

\* Kulturüberstand eines HBL-Produzenten nach Entfernen der Nhe B-Kor e mittels subtraktiver Immunaффinitätschromatographie

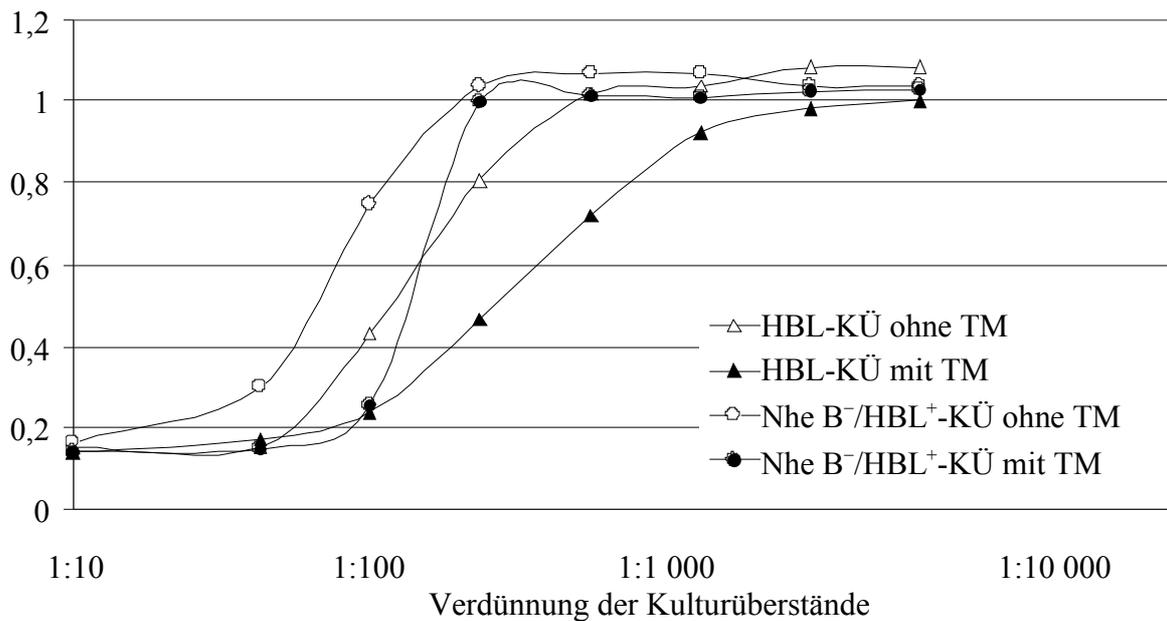
Die Mittelwerte der Ergebnisse sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der Kontrollansätze (Testansatz D, ohne TM) wurden hierbei gleich 0 % gesetzt. Die Behandlung der Zellen mit TM resultierte durchwegs in einer Steigerung der Toxizität der Kulturüberstände. Der Testansatz A, bei dem das Kulturmedium während der Kultivierung (72 h) und während des Zytotoxizitätstests (24 h) mit Tunicamycin versetzt war, führte bei allen Stämmen zu der stärksten Toxizitätssteigerung. Diese betrug im Mittel bis zu 98 % (HBL-Referenzstamm), wobei zwischen den Kulturüberständen der verschiedenen Referenzstämme keine eindeutigen Unterschiede zu beobachten waren. Der Schwankungsbereich der Zytotoxizitätssteigerung lag bei den verschiedenen Ansätzen für den HBL-Referenzstamm zwischen 63 - 136 %. Auch bei dem Nhe- bzw. Cyt K-Referenzstamm schwankten die reziproken Titer im Zytotoxizitätstest unter TM-Einfluß in ähnlichen Größenordnungen (50 - 132 % bzw. 53 - 145 %).

Zellen, denen nur während des Versuchszeitraums (24 h) Tunicamycin zugesetzt wurde, zeigten immer noch eine Steigerung der Toxizität von bis zu 53 % (Testansatz B). Wenn die mit TM vorbehandelten Zellen mit dem Toxin, aber im weiteren ohne TM behandelt wurden (Testansatz C), konnte nur noch eine Abweichung von 30 - 43 % im Vergleich zum Kontrollansatz (D) festgestellt werden.

Dieselben Tests wurden auch bei den Neuroblastom-Zellen durchgeführt. Im Testansatz A zeigte sich tendenziell eine leichte Steigerung (im Durchschnitt 16 %) der Zytotoxizität bei drei Wiederholungen, diese lag jedoch nur knapp über bzw. im üblichen Schwankungsbereich des Zytotoxizitätstests. In den Testansätzen B und C konnte diese Tendenz nicht bestätigt werden.

Im weiteren wurde auch der – wie in 3.3.4.1 beschrieben - Nhe B<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberstände in diesem System getestet. Der Wert für die 50 %-Hemmung unterschied sich nicht vom unbehandelten Kulturüberstand, auffällig war aber der deutlich veränderte Verlauf der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 16). Ohne Tunicamycineinfluß zeigten beide Präparationen hingegen einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf.

Absorbtion bei 450 nm



**Abbildung 16:** Unterschiede in der Dosis-Wirkungskurve von Tunicamycin-behandelten bzw. unbehandelten Zellen mit dem Kulturüberstand des HBL-Referenzstammes ( $Nhe^+/HBL^+$ ) im Vergleich mit dem  $Nhe B^-/HBL^+$ -Kulturüberstand  
KÜ : Kulturüberstand

Da wie in 3.2.3 beschrieben beim Zellkulturtest üblicherweise Toxinpräparation und Zellsuspension (frisch trypsinisiert) simultan eingesetzt werden, wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob die beobachteten Effekte durch die Kombination von TM und Trypsinbehandlung verursacht wurden. Dazu wurden  $1 \times 10^4$  Zellen/Kavität in einer Mikrotiterplatte für 24 h im Brutschrank mit und ohne TM (Kontrollansatz) inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Medium abgehoben und die zuvor angelegte 1:2 Verdünnungsreihe der sterilfiltrierten Bakterienüberstände zugegeben. Nach weiteren 24 h konnte das Ergebnis mittels WST-Reagenz photometrisch ausgewertet werden.

Auch in diesem konsekutiven Testansatz wurde unter TM-Einfluß eine durchschnittliche Steigerung der Zytotoxizität um 99 % beobachtet. So lagen zum Beispiel bei dem Cyt K-Referenzstamm die Titer ohne TM bei 1:345 und mit TM-Behandlung bei 1:667.

#### 3.3.6.1.1.2 Andere Inhibitoren

Um abschätzen zu können, inwieweit Zuckerreste mit den Enterotoxinen interagieren, wurden in den folgenden Untersuchungen spezifische Inhibitoren der weiteren Entstehungs-kaskade von Glykoproteinen verwendet, nämlich Swainsonin und Castanospermin (siehe 2.3.1.1).

Da in der Literatur relevante Konzentrationsbereiche zwischen 30 - 100 µg Castanospermin/ml Medium angegeben sind (PAN et al., 1983; HORI et al., 1984), wurden die für Tunicamycin beschriebenen Vorversuche (siehe 3.3.6.1.1.1) entsprechend mit unterschied-lichen Castanospermin-Konzentrationen durchgeführt. Diese Vorversuche zeigten, daß bei 50 µg Castanospermin/ml Zellkulturmedium die Vero-Zellen unverändertes Zellwachstum zeigten. Für Swainsonin sind in der Literatur hemmende Effekte auf die Synthese von komplexen Oligosacchariden schon bei Konzentrationen von < 2 µg/ml beschrieben worden (PANG et al., 1999; El BATTARI et al., 1991). Da in den eigenen Versuchen die Vero-Zellen auch noch bei 4 µg/ml einen vollständigen Monolayer ausbildeten, wurde diese Konzentration bei den Zytotoxizitätstests eingesetzt.

Weder bei Castanospermin- noch bei Swainsonin-Behandlung der Zellen konnte eine Änderung in der zytotoxischen Aktivität der *B. cereus* Kulturüberstände nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammen mit den Ergebnissen der enzymatischen Vorbehandlung der Zellen dargestellt.

#### 3.3.6.1.2 Einsatz von Glykosidasen

Neben den metabolischen Inhibitoren wurde auch die Auswirkung zweier Zucker- abspaltender Enzyme getestet. Bei der Ermittlung der erforderlichen Sialidase Konzentration stellte sich heraus, dass bis zu 0,3 U/ml kein zytotoxischer Effekt des Enzyms erkennbar war, für N-Glykosidase F wurde eine atoxische Dosis von 5 U/ml Medium ermittelt. Die in den Vorversuchen erzielten Ergebnisse stimmten weitgehend mit den Literaturangaben überein (JOLLY et al., 2001).

Die trypsinisierten Zellen ( $1,5 \times 10^6$  Zellen in 0,4 ml) wurden mit dem jeweiligen Enzym für definierte Zeitspannen behandelt und anschließend wie üblich zur Durchführung des Zytotoxizitätstests (3.2.3) verwendet. Dazu wurden die Zellen nach Zentrifugation in Medium ohne Glykosidase-Zusatz ( $10^5$  Zellen/ml) aufgenommen.

Weder das Verfahren mit Sialidase noch mit N-Glykosidase F führten zu einer Toxizitätsänderung. Die reziproken Zytotoxizitätstiter sind zusammen mit den Ergebnissen der mit Castanospermin und Swainsonin modifizierten Zellen in Tabelle 8 aufgeführt. Auch die Vorbehandlung der Neuro2A-Zellen mit Swainsonin führt zu keinem meßbaren Effekt.



### 3.3.6.1.3 Einsatz eines Arylglykosids

Die Bedeutung von O-glykosidisch gebundenen Zuckern auf der Membranoberfläche wurde mit Hilfe von Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (BenzylGalNAc) untersucht. Es verhindert die Verlängerung von diesen Zuckern und führt zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -GalNAc auf der Zelloberfläche. KUAN et al. (1989) wiesen für BenzylGalNAc bei Konzentrationen von 1 - 2 mM eine inhibitorische Wirkung nach.

Wiederum wurde zur Feststellung der höchsten Konzentration, welche die Zellen unbeschadet überleben, eine log-2 Verdünnungsreihe von BenzylGalNAc angelegt. Bei einer Konzentration von 5 bzw. 2,5 mM konnte ein reduziertes Wachstum der Vero-Zellen (um 20 %) festgestellt werden. Für die folgenden Versuche wurden die Zellen in Medium mit Zusatz von 1,25 mM BenzylGalNAc inkubiert.

Nach 48 stündiger Inkubation mit bzw. ohne Zusatz des Arylglykosids und anschließendem Einsetzen in den Zytotoxizitätstest (in Anwesenheit von 1,25 mM BenzylGalNAc) konnte nur bei den langzeitbehandelten Zellen eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität von ca. 92 % beobachtet werden. Dieser Effekt war bei allen Stämmen (HBL-, Nhe-Referenzstamm und Cyt K) zu sehen. Der Schwankungsbereich der Toxizitätssteigerung lag bei den einzelnen Referenzstämmen zwischen 77 - 109 % (siehe Tab. 9).

**Tabelle 9:** *Zytotoxizitätstiter der drei Referenzstämmen mit bzw. ohne Inkubation der Vero-Zellen mit BenzylGalNAc (n = 4)*

Kulturüberstände	Kontrollansatz	Vorinkubation in BenzylGalNAc	
		keine	für 48 h
HBL-Referenzstamm	416	400	868
Nhe-Referenzstamm	921	906	1625
Cyt K-Referenzstamm	373	387	711

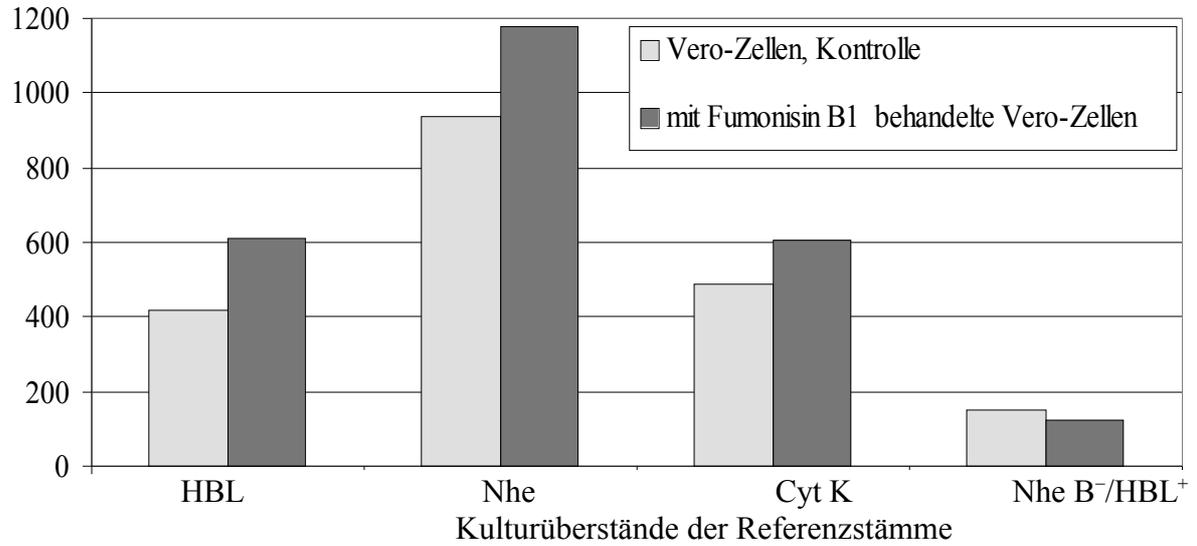
### 3.3.7 Veränderung der Lipidzusammensetzung mittels Fumonisin B<sub>1</sub>

Fumonisin B<sub>1</sub> ist ein Ceramid-Synthase Hemmer und vermindert den Gehalt an Sphingomyelin und Gangliosiden GM<sub>1</sub> bei Zellen um bis zu 50 %. Damit verändert es die Lipidzusammensetzung der Zellmembranen drastisch.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen für 48 Stunden mit 25 µg/ml Fumonisin B<sub>1</sub> in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) vermehrt. Dieselbe Zellzahl wurde ohne Fumonisin in gleicher Weise kultiviert. Die log-2 Verdünnungsreihe der Proben wurde entweder in Medium mit oder ohne Fumonisin angelegt. 24 h später wurde nach Abheben des Mediums (wie bei 3.1.5 beschrieben) 10 µl WST zugegeben und nach ca. 1 h erfolgte die photometrische Auswertung.

In Abbildung 17 wird deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit Fumonisin B<sub>1</sub> bei den Referenzstämmen eine Steigerung der Zytotoxizität zur Folge hat. Beim HBL- und Nhe-Referenzstamm stieg der reziproke Zytotoxizitätstiter um 52 – 57 %, jedoch beim Cyt K-Referenzstamm betrug die Schwankungsbreite 24 – 68 %. Beim Nhe B<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberstand zeichnete sich hingegen eher eine Verminderung der Zytotoxizität ab. Die festgestellten Werte von 13 – 24 % waren jedoch zu niedrig um eindeutige Aussagen treffen zu können.

reziproker Zytotoxizitätstiter



**Abbildung 17:** Auswirkung von Fumonisin B<sub>1</sub> Behandlung der Vero-Zellen auf die Zytotoxizität von *B. cereus* Kulturüberständen. (Mittelwerte aus drei Versuchen)

## 4 Diskussion

Bei *B. cereus* Stämmen konnten im Laufe der letzten Jahre mehrere Enterotoxinkomplexe (HBL, Nhe) und Einzeltoxine (*BcET*, Cyt K) isoliert werden. Fundierte Daten über deren Relevanz bei Lebensmittelinfektionen sind jedoch bislang nur teilweise vorhanden; ebenso ist deren Wirkungsweise auf zellulärer Ebene in weiten Bereichen unklar. Bei dem *B. cereus* Enterotoxin T (*BcET*) zeigten neueste Untersuchungen, dass es sich entweder um ein Zufallsprodukt aus vier Fragmenten oder um einen von *B. anthracis* produzierten Virulenzfaktor handelt (HANSEN et al., 2003). Bei Cyt K wiesen HARDY et al. (2001) porenbildende Eigenschaften nach, wie aufgrund der hohen Ähnlichkeit mit dem *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Hämolyisin (LUND et al., 2000) erwartet worden war. Für die Toxinkomplexe HBL und Nhe existieren hingegen zum Teil nur vage Theorien über den Wirkungsmechanismus, porenbildende Eigenschaften wurden mehrfach diskutiert (BEECHER & WONG, 1997; LUND & GRANUM, 1997). Ein für die Bindung an die Zelle verantwortlicher Rezeptor konnte bislang nicht identifiziert werden, ebensowenig wurde eine toxinresistente Zelllinie beschrieben.

Üblicherweise werden im Rahmen von Untersuchungen zur Wirkungsweise von mikrobiellen Toxinen gereinigte Toxinpräparationen oder rekombinant hergestellte Toxinfragmente eingesetzt. RYAN et al. (1997) versuchten im Rahmen der Sequenzierung des HBL-Operons auch rekombinant die L<sub>1</sub>- bzw. L<sub>2</sub>-Komponenten herzustellen. Dies scheiterte jedoch an deren Toxizität gegenüber den eingesetzten *E. coli*. Weitere Versuche zur Herstellung von rekombinanten Einzelkomponenten wurden bislang nicht beschrieben. Auch die Reinigung der *B. cereus* Enterotoxin-Komplexe gilt als problematisch. Da beide Toxine aus drei Einzelkomponenten bestehen, müssten für eine vergleichende Studie insgesamt sechs Proteine in einem sehr arbeitsaufwendigen Verfahren (BEECHER & WONG, 1995; LUND & GRANUM, 1996) parallel aufgereinigt werden. Die dafür notwendigen Manipulationen des Kulturüberstandes verringern die resultierende Restaktivität dieser Proteine – allein der erste Schritt, die Fällung mit Ammoniumsulfat resultiert üblicherweise in einem 30 %-igen Aktivitätsverlust (GLATZ et al., 1974; SHINAGAWA, 1990) - und auch die Stabilität der so gewonnenen Einzelkomponenten ist stark limitiert (MAUERSBERGER, 1997). Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderes methodisches Konzept gewählt. Durch den

Einsatz von sterilfiltrierten, ungereinigten Kulturüberständen wurde die Stabilität der Enterotoxin-Komplexe sichergestellt und mögliche Artefakte verursacht durch denaturierte Toxinkomponenten vermieden. Um die Aktivität des HBL-Toxins einschätzen zu können -HBL-positive Stämme produzieren auch Nhe - wurden mittels Immunaффinitätschromatographie die L<sub>2</sub>-Komponente des HBL-Komplexes bzw. die Nhe B-Komponente aus den Kulturüberständen entfernt. Dieses Verfahren bedingt nur eine geringe Manipulation der Proben. Der zweite Eckpfeiler des Konzepts basiert auf den neutralisierenden Eigenschaften des mAk 1E11 reaktiv mit der Nhe B-Komponente. Bei den anderen zur Verfügung stehenden mAk gegen die HBL- und Nhe-Einzelkomponenten konnte im Zellkulturtest hingegen kein neutralisierender Effekt nachgewiesen werden. Dies galt auch für den mAk 1C2 (gegen Nhe B und L<sub>1</sub> von HBL), der in Untersuchungen von CHOMA et al. (2002) zur Inaktivierung von Nhe B verwendet wurde.

Unter Verwendung der oben skizzierten Methodik konnte erstmals bei HBL/Nhe-Produzenten in Original-Kulturüberständen, die relative Zytotoxizität der beiden Enterotoxin-Komplexe bestimmt werden. In allen Versuchen zur Entfernung der Nhe B-Komponente mittels subtraktiver IAC bzw. Inaktivierung mittels Neutralisation konnten dieselben Ergebnisse erhalten werden. Ein Hinweis darauf, dass zum einen in der IAC keine unspezifische Bindungen der Toxine an das Immunosorbens auftreten, zum anderen dass der verwendete mAk gegen Nhe B trotz der Aminosäuresequenzhomologie keine Kreuzreaktion mit der L<sub>1</sub>-Komponente aufweist. Bei beiden theoretisch möglichen Varianten wäre eine Verzerrung der Ergebnisse aufgetreten, die zu Unstimmigkeiten mit den Ergebnissen der L<sub>2</sub>-IAC geführt hätten, was nicht der Fall war.

Bei zwei Kulturüberständen von HBL-, „high-producers“ wurde mittels IAC die Nhe B-Komponente entfernt, in diesen Nhe B<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberständen konnten übereinstimmend reziproke Zytotoxizitätstiter von 1:200 festgestellt werden. Dies ist ein relativ niedriger Wert, wenn man bedenkt, dass reine Nhe-Produzenten üblicherweise Titer von > 1:1.000 („high-producer“) aufweisen können. Beim HBL-Referenzstamm (DSM 4384) ist aus früheren Untersuchungen (STRICH, 1999) bekannt, dass die entsprechenden Kulturüberstände etwa 5 - 7 µg L<sub>2</sub>/ml enthalten, neuere Untersuchungen (MORAVEK, 2003) weisen darauf hin, dass Nhe B vom Nhe-Referenzstamm (NVH 0075-95) in ähnlichen Größenordnungen (6 - 10 µg

Nhe B/ml) exprimiert wird. Zwischen beiden Referenzstämmen besteht aber ein Unterschied in der Toxizität auf Vero-Zellen von etwa Faktor 2 - 3, bei Vergleich der Toxizität, die allein durch HBL induziert wird (Titer 1:200, siehe oben), sogar ein Faktor von 4 - 6. Da die Molekulargewichte aller Toxinkomponenten etwa im gleichen Größenbereich liegen, folgt aus diesen Daten, dass Nhe etwa fünfmal zytotoxischer ist als HBL und nicht etwa die gleiche Zytotoxizität hat, wie von LUND & GRANUM (1997) postuliert. Da in der erwähnten Untersuchung gereinigte Toxinpräparationen verwendet wurden, ist das auch ein Hinweis darauf, dass vor allem bei den Nhe-Komponenten während der Reinigung hohe Aktivitätsverluste auftraten, ein Fakt, der auch in früheren Untersuchungen am Lehrstuhl beobachtet wurde (FELLA, 1999).

Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete unterschiedliche Toxizität der beiden Enterotoxin-Komplexe könnte aber auch dadurch bedingt sein, dass die HBL-Aktivität durch die anderen zwei Nhe Komponenten antagonistisch beeinflusst wird. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien könnten die Nhe A Komponente mit der L<sub>2</sub>-Komponente bzw. die Nhe C Komponente mit HBL B um die Bindungsstellen konkurrieren bzw. diese blockieren. Um diese Theorie zu bestätigen oder zu widerlegen, müsste entweder auch für diese Nhe-Komponente eine IAC etabliert werden, oder - was den schnelleren Weg darstellen dürfte - Nhe-Knock out Mutanten hergestellt werden. Bei diesen theoretischen Erwägungen darf aber nicht vergessen werden, dass unter praktischen Gesichtspunkten bei einer Lebensmittel-Vergiftung im Darm wahrscheinlich wie *in vitro* auch beide Toxinkomplexe produziert werden, und somit in der Pathogenese der Erkrankung eine Konkurrenz der Toxine um die Rezeptoren zum tragen kommt.

Bei der Untersuchung von 18 *B. cereus*-Isolaten konnte 5 – 40 % der in den Kulturüberständen nachweisbaren toxischen Wirkung auf HBL zurückgeführt werden, wobei sich eine deutliche Korrelation zwischen dem reziproken Rest-Zytotoxizitätstiter und der L<sub>2</sub>-Konzentration zeigte. Diese Korrelation belegt, dass der zytotoxische Effekt anderer Toxine (wie z. B. BcET) zu vernachlässigen ist. Bei reinen Nhe-Produzenten ist die Frage nach zytotoxisch aktiven Exoproteinen einfach zu beantworten. Nach Neutralisation bzw. Entfernung der Nhe B-Komponente konnte weder beim Referenzstamm noch bei den untersuchten Isolaten ausgeprägte zytotoxische Restaktivitäten (< 4,4 %) festgestellt werden. Dies ist im übrigen ein Beleg für die Spezifität des Verfahrens, da unter den gewählten

Bedingungen andere von *B. cereus* produzierte Exoproteine wie Cereolysin, Phospholipase, Sphingomyelinase den Nachweis offensichtlich nicht beeinflussen.

Im Rahmen der oben diskutierten Untersuchungen wurden zum Nachweis der zytotoxischen Aktivität von *B. cereus* Stämmen wie auch von anderen Autoren (CHOMA & GRANUM, 2002; RIVERA et al., 2000) Vero-Zellen verwendet. Da diese Zelllinie auch für andere Toxine sensitiv ist, wird sie häufig zu deren Nachweis genutzt, wie zum Beispiel beim Shigatoxin (SANDVIG et al., 1986), *Cl. perfringens* Iota Toxin (STILES et al., 2000) und Diphtheriatoxin (HRANITZKY et al., 1985). Neben den Vero-Zellen wurden in den vorliegenden Untersuchung z. T. auch andere Zelllinien (Neuroblastom-, Jurkat- und Hybridom-Zellen) eingesetzt, die deutliche Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber den Kulturüberständen der Referenzstämmen für HBL und Nhe aufwiesen. Die ebenfalls adhärenzwachsenden Neuroblastom-Zellen waren um ca. 50 % weniger empfindlich als die Vero-Zellen, die wie in früheren Untersuchungen die sensitivste Zelllinie darstellte. Ein Grund für den geringeren Effekt der Toxine auf Neuroblastom-Zellen könnte einerseits darin liegen, daß vorhandene Bindungsstellen durch den höheren Gehalt an Gangliosiden in neuronalem Gewebe (ANDO, 1983) überlagert werden. Diese These konnte jedoch durch den Einsatz von Tunicamycin nicht erhärtet werden.

Noch weniger empfindlich reagierten die in Suspension wachsenden Jurkat-Zellen. JÄÄSKELÄINEN et al. (2003) führten den ebenfalls bei Einsatz adhärenzwachsender Zellen deutlich ausgeprägteren zytotoxischen Effekt des von *B. cereus* produzierten emetischen Toxins auf dessen Hydrophobizität zurück. Da hydrophobe Substanzen, zu denen auch die Enterotoxine von *B. cereus* gehören, zum Anheften an Oberflächen neigen, könnten die Interaktionen zwischen Toxin und in Suspension wachsenden Zellen grundsätzlich geringer ausgeprägt sein.

Für die Hybridom-Zellen, die generell die geringste Sensitivität aufwiesen, konnte durch weitere Untersuchungen eine gewisse Resistenz gegenüber dem Nhe-Toxinkomplex nachgewiesen werden. So führte der HBL-Referenzstamm bei den Hybridom-Zellen zu einem höheren reziproken Titer (1:151) als der Nhe-Referenzstamm (1:33), was bei allen anderen Zelllinien nicht der Fall war. Insbesondere folgende Ergebnisse lassen auf eine Resistenz der Hybridom-Zellen gegen Nhe schließen: nach Entfernung der L<sub>2</sub>-Komponente zeigten die Hybridom-Zellen eine niedrigere Rest-Zytotoxizität als die Vero-Zellen (Hybridom-Zellen 23

%, Vero-Zellen 57 %) und nach Inaktivierung der Nhe B-Komponente (Nhe<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberstand) war ein ausgeprägter Effekt bei Vero-Zellen im Gegensatz zu den Hybridom-Zellen zu erkennen. Auffallend war unter anderem, die veränderte Dosis-Wirkungskurve: so hatte diese bei den Hybridom-Zellen eine deutlich geringere Steigung als bei Vero-Zellen. Unter Berücksichtigung der HBL-Aktivität, die wie oben beschrieben in der Zellkultur einen Zytotoxizitätstiter von etwa 1:200 entspricht bedeutet dies, dass im Vergleich zu den Vero-Zellen die Hybridom-Zellen gegen HBL eine etwa 40 % niedrige Empfindlichkeit haben; beim Nhe beträgt dieser Prozentsatz aber 90 - 95 %. Sollten diese Ergebnisse auch bei den Myelomzellen verifiziert sein, wäre dies die erste Zelllinie, bei der eine ausgeprägte Resistenz gegen Nhe-Toxin nachgewiesen wurde. Dies würde die Suche nach einem eventuell existierenden Nhe-Rezeptor auf Zellmembranen deutlich erleichtern.

Zum Wirkungsmechanismus eines Toxins gehört unter anderem auch die Interaktion des Toxins mit der Zielzelle, wobei Glykokonjugate eine wichtige Rolle spielen (ALOUF, 2003). Um die Eigenschaft eines eventuell vorhandenen Rezeptors für *B. cereus* Enterotoxine ansatzweise charakterisieren zu können, wurden Inhibitoren der Glykoprotein-Synthese und zuckerabspaltende Enzyme eingesetzt, mit dem Ziel, ähnlich wie bei der Identifizierung von Rezeptoren anderer mikrobieller Toxine (FUMAGALLI et al., 1997; HRANITZKY et al., 1985), eine Resistenz der Zellen zu induzieren.

Überraschenderweise kam es jedoch bei Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, das die Synthese von N-glykosidischen Glykoproteinen hemmt (PAN & ELBEIN, 1995), zum gegenteiligen Effekt, nämlich zur Verdoppelung der zytotoxischen Aktivitäten im Vero-Zellkulturtest. Bei Neuroblastom-Zellen konnten hingegen keine Veränderungen festgestellt werden. Auch bei Änderungen in der Versuchsanordnung und Verwendung eines Nhe B/HBL<sup>+</sup>-Kulturüberstandes konnten diese Ergebnisse reproduziert werden. Die Verringerung des Anteils an O-glykosidisch gebundenen Zuckerketten mittels BenzylGalNAc (KUAN et al., 1989) resultierte ebenfalls in einer Steigerung der Zytotoxizität. Die erste Arbeitshypothese, dass dieser Effekt auf einer stärkeren Exposition der Rezeptoren im Vergleich zu Zellen mit hoher Glykosylierungsdichte beruht, konnte bei weiteren Experimenten mit PNGase F – ein Enzym, das an N-glykosidischen Glykoproteinen die Zuckerketten abspaltet – nicht untermauert werden. Zur weiteren Abklärung dieses Phänomens wurden

Untersuchungen mit dem Glykosidaseinhibitor Castanospermin, dem Mannosidaseinhibitor Swainsonin und dem Enzym Sialidase durchgeführt.

Die erhaltenen Ergebnisse - nämlich das Ausbleiben eines Effektes nach Behandlung der Zellen mit diesen Substanzen - unterstreicht die Theorie, dass die Konformation der membranständigen Glykoproteine keine entscheidende Rolle bei der Anlagerung der *B. cereus* Komponenten an die Zelle spielt. Somit wäre als Ursache der durch Tunicamycin und BenzylGalNAc induzierten Toxizitätssteigerungen neben einer allgemeinen Reduktion der Membranstabilität nur mehr ein intrazellulärer Wirkungsmechanismus von HBL und Nhe denkbar, auch wenn bislang v. a. über die porenbildenden Eigenschaften der beiden Toxine diskutiert wurde (BEECHER & WONG, 1997; LUND & GRANUM, 1997). Hierbei stellt sich aber die grundsätzliche Frage warum Nhe als Porenbildner nicht in der Lage ist, Erythrozyten zu lysieren. SANDVIG et al. (1986) beobachteten in ihren Untersuchungen zur Wirkung von Ricin und Abrin auf mit Tunicamycin sensibilisierten Zellmembranen ebenfalls eine Steigerung der Toxizität bei Vero-Zellen. Sie führten diesen Effekt auf einen veränderten Transport der Lektine innerhalb der Zelle zurück, was die Angriffsmöglichkeit der Toxine innerhalb der Zelle verbessern würde. Um genaueres über den eventuellen Wirkungsmechanismus von Nhe und HBL innerhalb der Zelle festzustellen, wären deshalb Untersuchungen mit Transportinhibitoren, wie z. B. Brefeldin B, vorstellbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich die weiteren Versuche auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembranen. Das Fusarientoxin Fumonisin B<sub>1</sub> verhindert durch Hemmung der Ceramidsynthese die Bildung von Sphingolipiden (MERRILL et al., 1993), und verändert somit die Zusammensetzung der „lipid rafts“. Nach Behandlung von Vero-Zellen mit dem Mykotoxin konnte ebenfalls eine Steigerung des zytotoxischen Effektes der *B. cereus* Referenzstämme beobachtet werden, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei Tunicamycin-Zugabe. Durch das Entfernen der Nhe B-Komponente beim HBL-Referenzstamm blieb jedoch der Zytotoxizitätstiter trotz Fumonisin B<sub>1</sub>-Behandlung auf gleichem Niveau. Dieses Resultat impliziert, dass die Reaktivität des Nhe-Komplexes stark mit der Zusammensetzung der „lipid rafts“ im Zusammenhang steht, während für die Interaktion der HBL-Komponenten mit der Zellmembran dieses Kriterium eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Auch BEECHER & WONG (2000) konnten trotz tierartspezifischer Unterschiede in der hämolytischen Wirkung von HBL keine Korrelation

zwischen der Membranzusammensetzung, insbesondere dem Phosphatidylcholin/Sphingomyelin-Verhältnis bei den Erythrozyten und der lytischen Aktivität von HBL feststellen.

Die Theorie von BEECHER & WONG (1997) über die diskontinuierliche Hämolyse basiert auf der Annahme, dass aufgrund von unterschiedlichem Diffusionsverhalten in Schafblutagar auch Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Komponenten an der Zellmembran der Erythrozyten existieren. Nach einer Sensibilisierung der Erythrozyten durch die Bindung der B-Komponente, sollten sie mit den L-Komponenten lysiert werden. Für die ahämolytische Zone sei eine inhibitorisch hohe Konzentration der L<sub>1</sub>-Komponente verantwortlich, welche weiter entfernt von der Kolonie nicht mehr existierte. Sie wiesen außerdem auf eine untergeordnete Rolle der L<sub>2</sub>-Komponente bei diesem Phänomen hin. Interessanterweise konnte in den eigenen Untersuchungen nach Entfernen der L<sub>2</sub>-Komponente mittels subtraktiver IAC eine Hämolysezone mit deutlich kleinerem Durchmesser festgestellt werden. Selbst wenn in der Präparation noch Spuren von L<sub>2</sub> existierten, dürfte bei dieser Theorie der äußere hämolytische Ring keinen kleineren Durchmesser aufweisen, da die inhibitorische Konzentration der L<sub>1</sub>-Komponente durch die Präparation nicht beeinflusst wurde. Zu dieser Verkleinerung kam bei simultaner Inkubation mit dem mAk 8B12 (spezifisch für die L<sub>2</sub>-Komponente) noch eine weniger diskrete Ausprägung des äußeren Hämolyserings hinzu. In weiteren Experimenten stellte sich heraus, dass eine Interaktion zwischen dem Nhe- und dem HBL-Komplex besteht. So kann einerseits der Durchmesser des äußeren Rings der diskontinuierlichen Hämolyse durch simultane Inkubation der Referenzstämme verringert werden, andererseits verhindert Nhe B in seinem Diffusionsbereich das Entstehen dieses Ringes. Aufgrund der Sequenzhomologie (LUND & GRANUM, 1997) ist eine Konkurrenz von Nhe B mit der L<sub>1</sub>-Komponente des HBL-Komplexes um Bindungsstellen an Erythrozyten am wahrscheinlichsten.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse müssen somit viele der von der Arbeitsgruppe um BEECHER und WONG (1997, 2000a) aufgestellten Modelle zur Wirkungsweise des HBL überdacht werden, da die zentrale Hypothese - die drei HBL-Komponenten stellen die monokausale Ursache für das Phänomen der diskontinuierlichen Hämolyse dar - damit als hinfällig zu betrachten ist. Die in der eigenen Arbeiten enthaltenen, z. T. auch widersprüchlichen Ergebnisse deuten an, daß durch Nhe B die Bindungsstelle des HBL-Komplexes an der Erythrozyten blockiert werden. Die vorliegenden Daten reichen jedoch

derzeit nicht aus, ein neues Modell zum Wirkungsmechanismus von HBL zu erstellen, prinzipiell wurde aber eine hervorragende Ausgangssituation geschaffen, die zukünftige, detailliertere Arbeiten zu diesem Thema deutlich vereinfachen dürfte.

Auch für weitere Untersuchungen zum Nhe-Toxinkomplex eröffnen sich durch die Identifizierung der neutralisierenden Eigenschaften des mit der Nhe B-Komponente reaktiven mAk 1E11 eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten. Da der mAk 1E11 an ein konformatios-unabhängiges Epitop bindet, könnte durch eine detaillierte Epitop-Analyse, z.B. unter Verwendung vorhandener Peptidbibliotheken oder durch Synthese von NheB spezifischen Oligopeptiden, Hinweise auf das aktive Zentrum des Proteins gewonnen werden. Dieses Wissen, sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigte hohe Resistenz von Hybridom-Zellen gegen Nhe sollten die Aufklärung des Wirkungsmechanismus dieses hochpotenten Toxins deutlich erleichtern.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der *in vitro* Aktivität der *B. cereus* Enterotoxin-Komplexe Hämolyysin BL (HBL) und Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) auf zellulärer Ebene. Dazu wurden die zytotoxische und hämolytische Aktivität ungereinigter Kulturüberstände von *B. cereus* in Zellkultur und auf Blutplatte überprüft. Der Nachweis der einzelnen Toxin-Komponenten erfolgte mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk). Die gezielte Inaktivierung der Toxinkomplexe in ungereinigten *B. cereus* Kulturüberständen wurde mittels Neutralisation bzw. subtraktiver Immunaффinitätschromatographie erreicht.

Bei der Überprüfung der Sensitivität verschiedener Zelllinien von Vero-, Neuro2A-, Jurkat- und Hybridom-Zellen gegen toxinhaltige *B. cereus* Kulturüberstände erwiesen sich Vero-Zellen als die sensitivste Zelllinie. Hybridom-Zellen zeigten im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien ein verändertes Sensitivitätsmuster insofern als HBL-haltige Überstände höhere Toxizitäten zeigten als Überstände reiner Nhe Produzenten. Bei der Untersuchung von 18 *B. cereus* Isolaten zeigte sich, dass HBL für 5 – 40 % der in den Kulturüberständen nachweisbare zytotoxischen Aktivität verantwortlich ist. Es bestand eine hohe Korrelation ( $r^2 = 0,938$ ) mit den nachweisbaren L<sub>2</sub>-Antigentitern.

Die Ergebnisse aus den Neutralisationsversuchen konnten mittels subtraktiver Immunaффinitätschromatographie (IAC) von Nhe B und den so gewonnenen Nhe B negativen Kulturüberständen von HBL-Produzenten (Nhe B<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>) bestätigt werden. Außerdem konnte demonstriert werden, dass Nhe B bei der Entstehung der für HBL-Produzenten typischen diskontinuierlichen Hämolyse eine wichtige Rolle spielt, was bislang unbekannt war.

Die Sensibilisierung von Zellen mit Tunicamycin führte bei HBL- und Nhe-haltigen Überständen zu einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität von 63 - 132%. Ebenfalls eine Steigerung konnte bei einer Fumonisin B<sub>1</sub> Vorbehandlung beobachtet werden. Mit Nhe B<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>-haltigen Überständen wurde dieser Effekt jedoch nicht erzielt. Weder die Behandlung der Zellen mit Swainsonin, Castanospermin noch die enzymatische Behandlung mit Sialidase und N-Glykosidase F resultierte in einer Änderung der Toxizität.

## Summary

### Studies on *Bacillus cereus* enterotoxin-complexes at the cellular level

This paper deals with the *in vitro* activity of the *B. cereus* enterotoxin-complexes Hemolysin BL (HBL) and non-hemolytic enterotoxin (Nhe) on cells. For that purpose the cytotoxic and hemolytic activity of crude *B. cereus* culture supernatants was analyzed in cell culture assays and on blood agar plates. Specific monoclonal antibodies were used for the detection of single components. By using neutralisation assays and subtractive immoaffinity chromatography the inactivation of the specific toxin complexes could be achieved.

When testing different cell lines (Vero-, Neuro2A-, Jurkat-, hybridoma cells) for their sensibility against culture supernatants of toxic *B. cereus* isolates, Vero cells proved to be the most sensitive. The sensitivity pattern of hybridoma cells differed from the other cell lines, as HBL containing supernatants showed higher cytotoxicity than supernatants of single Nhe-producers. Analyses of 18 *B. cereus* isolates revealed that the 5 - 40 % of the cytotoxic activity measurable in culture supernatants could be attributed to HBL. A strong correlation ( $r^2 = 0,938$ ) could be found between remaining cytotoxic activity and the detectable  $L_2$  concentrations.

The results of the neutralisation assays could be verified by subtractive immunoaffinity chromatography of Nhe B and testing the Nhe B negative, HBL positive *B. cereus* culture supernatants (Nhe B<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup>). Furthermore it could be demonstrated for the first time that Nhe B plays a major part in the appearance of the discontinuous hemolytic pattern typical for HBL producers.

After sensibilisation with tunicamycin Vero cells showed a substantial increased cytotoxic activity (63 – 132 %). The same effect could be observed in Fumonisin B pretreated cells for crude supernatants, but not for the Nhe B<sup>-</sup>/HBL<sup>+</sup> preparation. Neither treatment with swainsonine, castanospermine nor enzymatic treatment with sialidase and N-glycosidase F resulted in an alteration of toxicity.

## 6 Literaturverzeichnis

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

The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein

Microbiol. 141, 983-988

ALOUF, J. E. (2003):

Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins

Folia Microbiol. 48, 5-16

ANDO, S. (1983):

Gangliosides in the nervous system

Neurochem. Int. 5, 507-537

BAIDA, G., Z. I. BUDARINA, N. P. KUZMIN & A. S. SOLONIN (1999):

Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*

FEMS Microbiol. Lett. 180, 7-14

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

A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*

Infect. Immun. 58, 2220-2227

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

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

Infect. Immun. 59, 1778-1784

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

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

Infect. Immun. 62, 980-986



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

Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*

J. Biol. Chem. 272, 233-239

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

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

Microbiol. 146, 1371-1380

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

Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*

Microbiol. 146, 3033-3039

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

Enterotoxic activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*

Infect. Immun. 63, 4423-4428

BIRD, M. M. (1999):

The effect of castanospermine on embryonic mouse cerebellar neurons in culture

J. of Electron Microsc. 48, 261-266

BORCHARD, U. (2001):

Untersuchungen zur Enterotoxizität von *Bacillus cereus* Lebensmittelisolaten

Diss. med. vet., München

BORROW, P. & M. B. A. OLDSTONE (1992):

Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus

J. Virol. 66, 7270-7281

BUCK, F. (2002):

Molekularbiologische Charakterisierung von *Bacillus cereus* Lebensmittelisolaten (und Typstämmen)

Diss. med. vet., München

CHAO, K. L. & L. A. DREYFUS (1997):

Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells

Infect. Immun. 65, 3209-3217

CHOMA, C. & P. E. GRANUM (2002):

The enterotoxin T (*BcET*) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning

FEMS Microbiol. Lett. 217, 115-119

CHU, F. K. (1986):

Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide *N*-glycosidase F

J. Biol. Chem. 261, 172-177

CLINKENBEARD, K. S., D. A. MOSIER & A. W. CONFER (1989):

Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin

Infect. Immun. 57, 420-425

CORTAJARENA, A. L., F. M. GONI & OSTOLAZA (2002):

His-859 is an essential residue for the activity and pH dependence of *Escherichia coli* RTX Toxin  $\alpha$ -Hemolysin

J. Biol. Chem. 277, 23223-23229

CUNDELL, D. R. & E. I. TUOMANEN (1994):

Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocyte and vascular endothelial cells in vitro

Microb. Pathog. 17, 361-374

- DIETRICH, R., C. FELLA, S. STRICH & E. MÄRTLBAUER (1999):  
Production and characterisation of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*  
Appl. Environ. Microbiol. 65, 4470-4474
- EL BATTARI, A., P. FORGET, F. FOUCHIER & P. PIC (1991):  
Effect of inhibiting N-glycosylation or oligosaccharide processing on vasoactive intestinal peptide receptor binding activity and structure  
Biochem. J. 278, 527-533
- FEHRENBACH, F. J. & D. JÜRGENS (1991):  
Cooperative membrane-active (lytic) processes  
in: ALOUF, J. E. und FREER J. H. (Hrsg.): Sourcebook of bacterial protein toxins,  
p. 187-214  
Academic Press, London
- FELLA, C. (1999):  
Nachweis von *Bacillus cereus* Enterotoxinen mittels monoklonaler Antikörper  
Diss. med. vet., München
- FIVAZ, M., L. ABRAMI, Y. TSITRIN & F. G. van der GOOT (2001):  
Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* and related toxins  
in: F. G. van der GOOT (Hrsg.): Current topics in microbiology and immunology 257, 35-52  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- FUMAGALLI, O., B. D. TALL, C. SCHIPPER & T. A. OELSCHLAEGER (1997):  
N-glycosylated proteins are involved in efficient internalization of *Klebsiella pneumoniae* by cultured human epithelial cells  
Infect. Immun. 65, 4445-4451
- GALLATI, H. & I. PRACHT (1985):  
Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitäts-

bestimmung mit den Substanzen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin  
J. Clin Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GEME, J. W. ST. III (1994):

The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells

Infect. Immun. 62, 3881-3889

GLATZ, B. A., W. M. SPIRA & J. M. GOEPFERT (1974):

Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species

Infect. Immun. 10, 229-303

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 177, 225-229

GRANUM, P. E., A. ANDERSSON, C. GAYTHER, M. TE GIFFEL, H. LARSEN, T.

LUND & K. O'SULLIVAN (1996):

Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*

FEMS Microbiol. Lett. 141, 145-149

GUARNACCIA, S. P., J. H. SHAPER & R. L. SCHNAAR (1983):

Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in neuronal cells

Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1551-1555

HANSEN, B. M. & N. B. HENDRIKSEN (2001):

Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis

Appl. Environ. Microbiol. 67, 185-189

HANSEN, B. M., P. E. HOIBY, G. B. JENSEN & N. B. HENDRIKSEN (2003):

The *Bacillus cereus* *bceT* enterotoxin sequence reappraised

FEMS Microbiol. Lett. 223, 21-24

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 197, 47-51

HORI, H., Y. T. PAN, R. J. MOLYNEUX & A. D. ELBEIN (1984):

Inhibition of processing of plant N-linked oligosaccharides by castanospermine

Arch. Biochem Biophys. 228, 525-533

HRANITZKY, K. W., D. L. DURHAM, D. A. HART & L. EIDELS (1985):

Role of glycosylation in expression of functional diphtheria toxin receptors

Infect. Immun. 49, 336-343

JÄÄSKELÄINEN, E. L., V. TEPLOVA, M. A. ANDERSSON, L. C. ANDERSSON, P.

TAMMELA, M. C. ANDERSSON, T. I. PIRHONEN, N.-E. L. SARIS, P. VUORELA & M.

S. SALKINOJA-SALONEN (2003):

In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*

Toxicol. in Vitro 17, 737-744

JANES, P. W., S. C. LEY & A. I. MAGEE (1999):

Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T-cell antigen receptor

J. Cell Biol. 147, 447-461

JOLLY, C. L., B. M. BEISNER, E. OZSER & I. H. HOLMES (2001):

Non-lytic extraction and characterisation of receptors for multiple strains of rotavirus

Arch. Virol 146, 1307-1323

KANDEL, G., A. DONOHUE-ROLFE, M. DONOWITZ & G. T. KEUSCH (1989):

Pathogenesis of *Shigella diarrhea* XVI. Selective targeting of Shiga toxin to villus cells of rabbit jejunum explains the effect of the toxin on intestinal electrolyte transport

J. Clin. Invest. 84, 1509-1517

KEUSCH, G. T. & M. JACEWICZ (1977):

Pathogenesis of Shigella diarrhea VII. Evidence for a cell membrane toxin receptor involving  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 linked N-acetyl-D-glucosamine oligomers

J. Exp. Med. 146, 535-546

KEUSCH, G. T., M. J. JACEWICZ & A. DONOHUE-ROLFE (1986):

Pathogenesis of shigella diarrhea: evidence for an N-linked glycoprotein shigella toxin receptor and receptor modulation by  $\beta$ -galactosidase

J. Infect. Dis. 153, 238-248

KOMAI, K., M. KAPLAN & M. E. PEEPLES (1988):

The Vero cell receptor for the hepatitis B virus small S protein is a sialoglycoprotein

Virology. 163, 629-634

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

*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species

in DOYLE M. P. (Hrsg.): Foodborne bacterial pathogens, p. 21-70

Dekker, New York

KUAN, S., J. C. BYRD, C. BASBAUM & Y. S. KIM (1989):

Inhibition of mucin glycosylation by aryl-N-acetyl- $\alpha$ -galactosaminides in human colon cancer cells

J. Biol. Chem. 264, 19271-19277

LECHNER, S., R. MAYR, K. P. FRANCIS, B. M. PRUESS, T. KAPLAN, E. WIESSNER-GUNKEL, G. S. STEWART & S. SCHERER (1989):

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

Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1373-1382

LINDBÄCK, T., O. A. OKSTAD, A. L. RISHOVD & A.-B. KOLSTO (1999):  
Insertional inactivation of hblC encoding the L<sub>2</sub> component of *Bacillus cereus* ATCC 14579  
haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity  
against human erythrocytes  
Microbiol. 145, 3139-3146

LOBO, A. L. & R. A. WELCH (1994):  
Identification and assay of RTX family of cytolysins  
Methods in enzymology, 235, 667-678

LUND, T. & P. E. GRANUM (1996):  
Characterisation of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a  
foodborne outbreak  
FEMS Microbiol. Lett. 141, 151-156

LUND, T. & P. E. GRANUM (1997):  
Comparison of biological effect of two different enterotoxin complexes isolated from three  
different strains of *Bacillus cereus*  
Microbiol. 143, 3329-3336

LUND, T., M.-L. DE BUYSER & P. E. GRANUM (2000):  
A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis  
Mol. Microbiol. 38, 254-261

MAHLER, H., A. PASI, J.-M. KRAMER, P. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BAR & S.  
KRAHENBUEHL (1997):  
Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*  
N. Engl. J. Med. 336, 1142-1148

MAUERSBERGER, K. (1997):  
Zur Anwendbarkeit des MTT-Zytotoxizitätstests zum Nachweis von *Bacillus cereus* Entero-  
toxin  
Diss. med. vet., München

- MENESTRINA, G., M. D. SERRA & G. PREVOST (2001):  
Mode of action of  $\beta$ -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin family  
*Toxicon* 39, 1661-1672
- MERRILL, A. H., G. van ECHTEN, E. WANG & K. SANDHOFF (1993):  
Fumonisin B<sub>1</sub> inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and *de novo* sphingolipid  
biosynthesis in cultured neurons in situ  
*J. Biol. Chem.* 268, 27299-27306
- MOAYERI, M. & R. A. WELCH (1994):  
Effects of temperature, time and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin  
*Infect. Immun.* 62, 4124-4134
- MOBASSALEH, M., S. K. GROSS, R. H. McCLUER, A. DONOHUE-ROLFE & G.T. KEUSCH (1989):  
Quantitation of the rabbit intestinal glycolipid receptor for Shiga toxin. Further evidence for  
the developmental regulation of globotriaosylceramide in microvillus membranes  
*Gastroenterology* 97, 384-391
- MOEHRING, T. J. & J. P. CRISPELL (1974):  
Enzyme treatment of KB cells: the altered effect of diphtheria toxin  
*Biochem. Biophys. Res. Co.* 60, 1446-1452
- MORAVEK, M. (2003):  
Dissertation in Vorbereitung, München
- NAGLICH, J. G., J. E. METHERALI, D. W. RUSSEL & L. EIDELS (1992):  
Expression cloning of diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like  
growth factor precursor  
*Cell* 69, 1051-1061

NAKAJIMA, H., N. KIYOKAWA, A. U. KATAGIRI, T. TAGUCHI, T. SUZUKI, T. SEKINO, K. MIMORI, T. EBATA, M. SAITO, H. NAKAO, T. TAKEDA & J FUJIMOTO (2001):

Kinetic analysis of binding between shiga toxin and receptor glycolipid Gb<sub>3</sub> Cer by surface plasmon resonance

J. Biol. Chem. 276, 42915-42922

PAN, Y. T. & A. D. ELBEIN (1995):

How can N-linked glycosylation and processing inhibitors be used to study carbohydrate synthesis and function

In: MONTREUIL J., H. SCHACHTER & J. F. G. Vliegenthart: Glycoproteins  
Elsevier Science B. V.

PAN, Y. T., H. HORI, R. SAUL, B. A. SANFORD, R. J. MOLYNEUX & A. D. ELBEIN (1983):

Castanospermine inhibits the processing of the oligosaccharide portion of the influenza viral hemagglutinin

Biochem. 22, 3975-3984

PANG, R. T., S. SAI-MING, C. H. CHENG, M. H. HOLTSMANN; L. J. MILLER & B. K. CHOW (1999):

Role of N-linked glycosylation on the function and expression of the human secretin receptor  
Endocrinology 140, 5102-5111

POPOFF, M. R. (1998):

Interactions between bacterial toxins and intestinal cells

Toxicon 36, 665-685

PRÜSS, B. M., R. DIETRICH, B. NIBLER, E. MÄRTLBAUER & S. SCHERER (1999):

The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group

Appl. Environ. Microbiol. 65; 5436-5442.

- RAMOS-CASTANEDA, J., J. L. IMBERT, B. L. BARRON & C. RAMOS (1997):  
A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells  
*J. Neurovirol.* 3, 435-440
- RIVERA, A. M. G, P. E. GRANUM & F. G. PRIEST (2000):  
Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*  
*FEMS Microbiol. Lett.* 180, 151-155
- ROWAN, N. J., K. DEANS, J. G. ANDERSON, C. G. GEMMELL, I. S. HUNTER & T. CHAITHONG (2001):  
Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae  
*Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3873-3881
- RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN & B. A. ZILINSKAS (1997):  
Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*  
*J. Bact.* 179; 2551-2556
- SANDVIG, K., T. I. TONNESSEN & S. OLSNES (1986):  
Ability of inhibitors of glycosylation and protein synthesis to sensitize cells to abrin, ricin, *Shigella* toxin and *Pseudomonas* toxin  
*Cancer Res.* 46, 6418-6422
- SAUL, R., R. J. MOLYNEUX & A. D. ELBEIN (1984):  
Studies on the mechanism of castanospermine inhibition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases  
*Arch. Biochem. Biophys.* 230, 668-675
- SCHAUER, R. (1982):  
Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids  
*Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* 40, 132-234

SCHULZ, A. (2004):

Zum Nachweis des emetischen Toxins von *Bacillus cereus*

Diss. med. vet., München

SHINAGAWA, K. (1990):

Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus species*

Int. J. Food Microbiol. 10, 125-142

SHINAGAWA, K., N. MATSUSAKA, H. KONUMA & H. KURATA (1985):

The relation between the diarrheal and other biological activities of *Bacillus cereus* involved in food poisoning outbreaks

Jpn. J. Vet. Sci. 47, 557-565

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

Psychrotolerant species from the *B. cereus* group are not necessarily *B. weihenstephanensis*

FEMS Microbiol. Lett. 197, 223-228

STENFORS, L. P., R. MAYR, S. SCHERER & P. E. GRANUM (2002):

Pathogenic potential of fifty *B. weihenstephanensis* strains

FEMS Microbiol. Lett. 215, 47-51

STEVENS, V. L. & J. TANG (1997):

Fumonisin B<sub>1</sub>-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor

J. Biol. Chem. 272, 18020-18025

STILES, B. G., M. L. HALE, J. MARVAUD & M. R. POPOFF (2000):

*Clostridium perfringens* iota toxin: binding studies and characterization of cell surface receptor by fluorescence-activated cytometry

Infect. Immun. 68, 3475-3484

STRICH, S. (1999):

Untersuchungen zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung von *Bacillus cereus* Exoproteinen

Diss. med. vet., München

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

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

Infect. Immun. 43, 887-894

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

The cholesterol-dependent cytolysins

in: F. G. van der GOOT (Hrsg.): Current topics in microbiology and immunology 257, 15-34

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

VELD, P. H., W. S. RITMEESTER, E. H. M. DELFGOU-VAN ASCH, J. B. DUFRENNE;

K. WERNARS, E. SMIT & F. M. VAN LEUSDEN (2001):

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

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

WANG, E., W. P. NORRED, C. W. BACON, R. T. RILEY & A. H. MERRILL (1991):

Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins

J. Biol. Chem. 266, 14486-14490

ZITZER, A., I. WALEV, M. PALMER & S. BHAKDI (1995):

Characterization of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin as an oligomerizing pore-forming toxin

Med. Microbiol. Immunol. 184, 37-44

## **Danksagung:**

Herrn Professor Dr. E. Märtlbauer danke ich für die Überlassung des Themas und die stets freundliche und großzügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Dietrich für seine hervorragende Betreuung, die zahlreichen Anregungen und die sorgfältige Durchsicht, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken, insbesondere bei Frau B. Minich und Frau J. März für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch den Kollegen Frau A. Schulz , Frau M. Boesen und Herrn M. Moravek für die moralische Unterstützung und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Weiterhin danke ich meinen Eltern sowie Herrn Joachim Matt für lange Telefonate und die passenden Worte zur richtigen Zeit.

## Lebenslauf

Monika Wegscheider

Geburtsdatum	18.2.1977 in Innsbruck
Eltern	Wegscheider Ulrike, geb. Sottner Wegscheider Albin
1983-1987	Volksschule Neu-Arztl
1987-1995	Wirtschaftskundliches Realgymnasium Ursulinen in Innsbruck
10.6.1995	Matura
1995-1996	Biologie und Mathematikstudium an der Leopold-Franzens- Universität Innsbruck
1996- 2001	Tiermedizinstudium an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität München
17.12.2001	Staatsexamen
20.02.2002	Approbation
ab Feber 2002	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Universität München