

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

Nachweis der Einzelkomponenten B, L1 und L2 des
Bacillus cereus Enterotoxin-Komplexes Hämolysin BL:
Entwicklung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern

von Franziska Friederike Tausch
aus Landshut

München 2016

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

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

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

Mitbetreuung durch: Dr. Richard Dietrich

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

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

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Allgemeines	3
1.1	Taxonomische Stellung	3
1.2	Historischer Überblick	4
2	Pathogene Relevanz.....	5
2.1	Häufigkeit von <i>B. cereus</i> verursachten Lebensmittelvergiftungen	5
2.2	Gastrointestinale Krankheitsbilder	6
3	<i>Bacillus cereus</i> Enterotoxine.....	8
3.1	Cytotoxin K	8
3.2	Nicht-hämolytisches Enterotoxin	9
3.3	Hämolysin BL (HBL).....	10
3.4	Regulation der Toxinexpression.....	13
3.5	Toxinsekretion.....	16
3.6	Nachweisverfahren	16
III	MATERIAL UND METHODEN.....	18
1	Materialien und Geräte.....	18
1.1	Chemikalien.....	18
1.2	<i>Bacillus cereus</i> Stämme	19
1.3	Zelllinien	21
1.4	Nährmedien	21
1.5	Puffer und Lösungen	22
1.6	Immunreagenzien	25
1.6.1	Monoklonale Antikörper (mAk)	25
1.6.2	Polyklonale Antikörper	25
1.7	Verbrauchsmaterialien.....	26
1.8	Geräte	27
1.9	Software.....	27
2	Methodik	28
2.1	Kultivierung von <i>Bacillus cereus</i>	28

2.2	Immunochemische Verfahren	28
2.2.1	Immunaффinitätschromatographie	28
2.2.2	Indirekte Enzymimmuntest (EIA)-Verfahren.....	29
2.2.3	Sandwich-EIA-Verfahren.....	30
2.2.4	Herstellung von Peroxidase-markierten Antikörpern.....	30
2.2.5	Immunoblot	31
2.2.6	Dot Blot Assay	32
2.3	SDS-Gelelektrophorese und SYPRO Ruby-Protein-Färbung.....	32
2.4	Generierung und Selektion von Hybridomzelllinien.....	33
2.5	WST-Zellkulturtest.....	34
IV	ERGEBNISSE	35
1	Generierung monoklonaler Antikörper	35
1.1	Herstellung des Immunogens	35
1.1.1	Auswahl eines geeigneten <i>B. cereus</i> Stamms.....	35
1.1.2	Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von HBL-B und L1	36
1.1.3	Bilanzierung der Aufreinigung.....	37
1.1.4	Quantifizierung der Toxinmenge	40
1.2	Immunisierung von Mäusen	42
2	Charakterisierung der polyklonalen Mausantiseren	43
2.1	Antikörper-Titer	43
2.2	Relative Affinität	43
2.3	WST-Zellkulturtest.....	45
3	Charakterisierung monoklonaler Antikörper	46
3.1	Produktivität der Hybridomzelllinien.....	46
3.2	Relative Affinität	49
3.3	Kompetitive Hemmung	50
3.4	Sandwich-EIA	52
3.5	Immunoblot	55
3.6	Neutralisierende Eigenschaften	56
4	Etablierung von mAk-basierten Sandwich-EIAs	60
4.1	Massenproduktion und Herstellung Peroxidase-markierter Antikörper	60
4.2	Sandwich-EIAs zum Nachweis der Einzelkomponenten von HBL	60
4.2.1	HBL-B-spezifischer Sandwich-EIA.....	61

4.2.2	HBL-L1-spezifischer Sandwich-EIA	63
4.2.3	HBL-L2-spezifischer Sandwich-EIA	64
4.2.4	Relative Toxinproduktivität verschiedener <i>Bacillus cereus</i> Stämme.....	65
5	Komplexbildung von HBL.....	68
5.1	Immunaффinitätschromatographie	68
5.2	Hybrid-Sandwich-EIA zum Nachweis von HBL-Komplexen	72
5.3	Interaktion von HBL-L1 und HBL-L2	74
5.3.1	Nachweis mittels Sandwich-EIA.....	74
5.3.2	Nachweis mittels Dot Blot Assay.....	76
V	DISKUSSION	78
1	Generierung der Antikörper	79
2	Charakterisierung der Antikörper und Etablierung von EIAs	81
3	Komplexbildung von HBL.....	86
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
VII	SUMMARY	90
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	91
IX	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	108
X	TABELLENVERZEICHNIS	111
XI	DANKSAGUNG	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serum Albumin
CGY	Casein-Glucose-Hefe (casein-glucose-yeast)
CytK	Cytotoxin K
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmuntest (enzyme immunoassay)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
HAT-Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HBL	Hämolysin BL
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HT-Medium	Hypoxanthin/Thymidin-Medium
IAC	Immunaффinitätschromatographie
KÜ	Kulturiüberstand
<i>Lnn. axillares</i>	<i>Lymphonodi axillares</i>
mAk	Monoklonaler Antikörper
MHI	Präfix für Stämme aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch
Nhe	Nicht-hämolytisches Enterotoxin
OD	Optische Dichte (optical density)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol

rHBL	Rekombinantes Hämolysin BL
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
WST	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz (watersoluble tetrazolium salt)
ZKÜ	Zellkulturüberstand

I EINLEITUNG

Bacillus (B.) cereus ist ein Gram-positiver, ubiquitärer Sporenbildner. Aufgrund seiner Hitzeresistenz ist er regelmäßig in hitzebehandelten Produkten, insbesondere Milch nachweisbar. Durch die hohe Prävalenz des Keims in der Lebensmittelkette und seiner Fähigkeit hitzelabile und -stabile Toxine zu produzieren, spielt er eine wichtige Rolle als Erreger lebensmittelassoziierter Krankheiten. So geht aus dem aktuellen Bericht der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit über lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche hervor, dass im Jahr 2014 in 5,5 % der gemeldeten lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüche *B. cereus* als das kausale Agens ermittelt werden konnte (EFSA, 2015).

Bei der Pathogenese der Diarrhoe-Form spielen nach heutigem Kenntnisstand drei relevante Enterotoxine eine maßgebliche Rolle. Dazu zählen das nur bei wenigen Stämmen nachweisbare Cytotoxin K (CytK) (Lund *et al.*, 2000) sowie die beiden regelmäßig bei *B. cereus* zu findenden, aus jeweils drei Einzelkomponenten bestehenden Enterotoxin-Komplexe Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) (Lund & Granum, 1996) sowie Hämolysin BL (HBL) (Beecher & Macmillan, 1991).

Im Hinblick auf eine fundierte Analytik des Toxinbildungsvermögens von *B. cereus* Isolaten gelang es in den letzten Jahren am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Nhe-Komponenten-spezifische monoklonale Antikörper (mAk) zu generieren und Sandwich-Enzymimmuntests (EIAs) zum sensitiven und spezifischen Nachweis von NheB und NheC zu etablieren (Heilkenbrinker *et al.*, 2013, Moravek *et al.*, 2006). Zudem konnte mit den hergestellten mAk gezeigt werden, dass in Lösung eine Komplexbildung zwischen NheB und NheC stattfindet (Heilkenbrinker *et al.*, 2013), sowie dass NheA eine essentielle Rolle bei der Porenbildung spielt (Didier *et al.*, 2012). Durch Kombination von Antikörper-basierten Techniken und Zellkultur-Assays war es letztlich möglich, ein Modell zur Wirkungsweise von Nhe auf zellulärer Ebene aufzustellen.

Teile dieser Arbeit wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 13N12611 gefördert.

Untersuchungen zum HBL-Komplex werden zum einen dadurch erschwert, dass alle HBL-positiven *B. cereus* Stämme immer parallel auch Nhe produzieren. Andererseits bestehen aber auch analytische Lücken. So stehen robuste Sandwich-EIAs nur für den Nachweis von HBL-L2 zur Verfügung. Auch der Wirkungsmechanismus von HBL auf zellulärer Ebene ist bislang weitgehend unbekannt. Aufgrund der Sequenzhomologien zwischen den HBL- und Nhe-Komponenten, insbesondere zwischen HBL-B und NheC bzw. HBL-L1 und NheB, liegt allerdings die Vermutung nahe, dass HBL-B und HBL-L1 in Lösung ebenfalls interagieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mAk gegen HBL-B und HBL-L1 zu generieren und diese umfassend zu charakterisieren. Im Anschluss sollten die hergestellten mAk zur Etablierung von Sandwich-EIA-Systemen genutzt werden, um damit den spezifischen und sensitiven Nachweis aller HBL-Komponenten zu ermöglichen. Des Weiteren sollten die HBL-Komponenten-spezifischen mAk dazu genutzt werden, ähnlich wie bereits bei Nhe, Untersuchungen zur Interaktion der HBL-Einzelkomponenten durchzuführen, um damit weitere Erkenntnisse zum zellulären Wirkmechanismus von HBL zu gewinnen.

Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß §10a des Tierschutzgesetzes angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54.2532.6-2-12 genehmigt.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Allgemeines

1.1 Taxonomische Stellung

Bacillus cereus ist ein ubiquitäres, Gram-positives, fakultativ anaerobes, bewegliches, endosporenbildendes Stäbchen des Genus *Bacillus*. Zusammen mit *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* und der neu definierten Spezies *B. cytotoxicus* (Guinebretière *et al.*, 2013) gehört *B. cereus* (*B. cereus* sensu stricto) zur sogenannten *B. cereus*-Gruppe (*B. cereus* sensu lato), welche zusammen mit *B. megaterium* die morphologische Gruppe 1A bildet (Gibson & Gordon, 1974). Prinzipiell ist die taxonomische Einteilung der *B. cereus*-Gruppe schwierig. Trotz phänotypischer Unterschiede, wie beispielsweise der Bildung von parasporalen Kristallen durch *B. thuringiensis*, ergaben Genomsequenzierungen, dass die Spezies *B. cereus*, *B. thuringiensis* und *B. anthracis* eng miteinander verwandt sind (Helgason *et al.*, 2000, Rasko *et al.*, 2004). Daher wurde auch bereits mehrmals die Zusammenfassung dieser drei Spezies angeregt (Helgason *et al.*, 2000, Kotiranta *et al.*, 2000).

Mithilfe von Multilocus Sequence Typing (MLST) verschiedener Haushalts-Gene, lässt sich die *B. cereus*-Gruppe in drei monophyletische Gruppen, sog. Clades, einteilen (Didelot *et al.*, 2009, Helgason *et al.*, 2004). In Clade I finden sich *B. anthracis*, zahlreiche *B. cereus*, und wenige *B. thuringiensis* Stämme, in Clade II überwiegend *B. thuringiensis* und einige *B. cereus* Stämme, in Clade III *B. mycooides* und *B. weihenstephanensis* Stämme. Guinebretière *et al.* (2008) unterteilte die *B. cereus*-Gruppe anhand genetischer und phänotypischer Eigenschaften in sieben phylogenetische Gruppen, für die charakteristische Wachstums-Temperaturbereiche postuliert wurden. Eine weitere Studie von Guinebretière *et al.* (2010) zur zytotoxischen Aktivität von Spezies aus der *B. cereus*-Gruppe zeigte zudem, dass die Zugehörigkeit zu einer dieser phylogenetischen Gruppen mehr über die Pathogenität eines Stamms aussagt, als die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Spezies.

Im Jahr 2013 wurde eine weitere Spezies aufgrund geno- und phänotypischer Eigenschaften in die *B. cereus*-Gruppe aufgenommen (Guinebretière *et al.*, 2013). Ihr Name *B. cytotoxicus* leitet sich von der Fähigkeit Cytotoxin K zu produzieren ab. Innerhalb der *B. cereus*-Gruppe lässt sich *B. cytotoxicus* sowohl durch Unterschiede in der 16S rRNA, als auch durch seine Thermotoleranz, der nicht vorhandenen Fähigkeit zur Stärkehydrolyse und

Bildung parasporaler Kristalle, nur schwacher Reaktion im Voges-Proskauer-Test sowie das fehlende Wachstum auf künstlich hergestellten Nährmedien ohne Tryptophanzugabe, von den anderen Spezies abgrenzen (Guinebretière *et al.*, 2013).

1.2 Historischer Überblick

B. cereus wurde 1887 erstmals von Frankland & Frankland (1887) beschrieben, die den Keim aus einer in einem Kuhstall gewonnenen Luftprobe isoliert hatten. Seinen Namen erhielt er aufgrund seiner wächsern (lat. *cereus*) erscheinenden Morphologie auf Blutplatten. Als Verursacher gastrointestinaler Erkrankungen spielt *B. cereus* vor allem im Lebensmittelbereich eine große Rolle. Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen können die Folge der Aufnahme von mit *B. cereus* kontaminierten Lebensmitteln sein. Erste Hinweise darauf, dass *B. cereus* als Erreger gastrointestinaler Erkrankungen anzusehen ist, ergaben sich aus einer Studie von Lubenau (1906) über „*Bacillus peptonificans*“, in der das Auftreten einer Lebensmittelvergiftung nach dem Verzehr von Königsberger Kloppen in einer Lungenheilanstalt beschrieben wurde. Die Eigenschaften dieses Keims, nämlich die typische Kolonimorphologie, starke Hämolyse, rasche Versporung, Gelatineverflüssigung, Abbau von Glucose ohne Gasbildung und Eiweißabbau in Milch, lassen retrospektiv vermuten, dass es sich dabei um *B. cereus* handelte (Becker *et. al.*, 2005).

In den Folgejahren wurde zwar immer wieder von aeroben Sporenbildnern als Verursacher gastrointestinaler Erkrankungen berichtet, einen wissenschaftlich gesicherten Nachweis erbrachten aber erst eine Studie über den Ausbruch einer durch *B. cereus* hervorgerufenen Durchfallerkrankung (Diarrhoe-Form) in einem Krankenhaus in Norwegen, bei der zahlreiche Patienten und Klinikmitarbeiter nach dem Verzehr von Vanillesauce erkrankten, sowie ein anschließend von Hauge (1955) beschriebener Selbstversuch.

Das von *B. cereus* verursachte Krankheitsbild mit dem Leitsymptom Erbrechen (emetische Form) wurde erstmals Anfang der 1970er Jahre in Großbritannien dokumentiert (Melling *et al.*, 1976), nachdem dort einige Lebensmittelvergiftungsfälle nach dem Konsum von gekochtem Reis aus chinesischen und Take-away-Restaurants aufgetreten waren.

2 Pathogene Relevanz

Bacillus cereus ist ein in der Umwelt weitverbreitetes Bakterium und kann häufig aus Erdböden isoliert werden. Aufgrund seiner Fähigkeit widerstandsfähige Endosporen auszubilden, ist es sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen, wie extremen Temperaturen, Strahlung oder Trockenheit (Setlow, 2014). In dieser Dauerform wird der Eintrag in die Lebensmittelkette erleichtert. In Lebensmittel verarbeitenden Betrieben bereitet insbesondere die Tenazität der Sporen sowie die Ausbildung von Biofilmen, die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen erschwert und die passive Verbreitung der Sporen ermöglicht (Ryu & Beuchat, 2005), Probleme. *Bacillus cereus* ist vor allem als Verursacher gastrointestinaler Erkrankungen durch Produktion von Toxinen bekannt. Daneben ist er aber auch aufgrund seiner proteo- und lipolytischen Eigenschaften als Verderbserreger von Bedeutung (Lücking *et al.*, 2013). Hierbei spielen insbesondere psychrotrophe Stämme, die sich auch bei Kühlschranktemperaturen vermehren können, insbesondere bei Fehlern in der Zubereitung und Kühlung der Lebensmittel, eine große Rolle.

2.1 Häufigkeit von *B. cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen

Obwohl *B. cereus* häufig in Lebensmitteln nachgewiesen werden kann, ist über die tatsächliche Inzidenz von durch *B. cereus* verursachten, lebensmittelassoziierten Krankheitsausbrüchen auf nationaler Ebene nur schwer eine Aussage zu treffen. Zum einen kommt es nicht selten zu Fehldiagnosen aufgrund der entsprechenden Symptomatik – so können Lebensmittelvergiftungen mit dem Leitsymptom Durchfall auch durch *Clostridium perfringens* Typ A verursacht werden, wohingegen die emetische Form in ihrer Symptomatik einer Lebensmittelintoxikation mit Staphylokokken-Enterotoxinen ähnelt. Zum anderen zählt *B. cereus* nach § 7 des Infektionsschutzgesetzes nicht zu den meldepflichtigen bakteriellen Erregern. Außerdem suchen Erkrankte, aufgrund des kurzen und meist milden Verlaufs der Erkrankung, oftmals keinen Arzt auf. Dennoch lassen die jährlichen Berichte der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) über lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche erahnen, dass *B. cereus* mittlerweile zu den wichtigen Erregern lebensmittelassoziiierter Krankheiten zählt. Lag der prozentuale Anteil der gemeldeten, durch *B. cereus* verursachten Krankheitsausbrüche an allen lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in der Europäischen Union (EU) 2004 noch bei

0,1 %, betrug er 2014 5,5 %. Im Jahr 2011 hat sich die Anzahl der *B. cereus* bedingten Krankheitsausbrüche im Vergleich zum Vorjahr mehr als verdoppelt (122 %) und die Tendenz ist weiter steigend, so zeigt sich im aktuellen Bericht von 2014 ein Anstieg der Krankheitsausbrüche um 30 % im Vergleich zu 2011 (Tab. 1).

2.2 Gastrointestinale Krankheitsbilder

Als kausales Agens von gastrointestinalen Erkrankungen ist *B. cereus* dafür bekannt, zwei Formen von Lebensmittelvergiftungen unterschiedlicher Genese auszulösen. Man unterscheidet dabei zwischen der emetischen und der Diarrhoe-Form, beide werden durch Toxine verursacht. Erstere wird durch das sogenannte Cereulid, einem Dodekadepeptid, hervorgerufen und gilt als klassische Lebensmittelintoxikation, bei der das Toxin präformiert im Lebensmittel vorliegt (Agata *et al.*, 1995). Neuere Untersuchungen zeigen, dass von Cereulid bis zu 18 verschiedene Varianten existieren, darunter auch hochtoxische Kongenere (Marxen *et al.*, 2015). Nach der Aufnahme kontaminierter Lebensmittel treten nach einer Inkubationszeit von 0,5 bis 6 h erste Symptome, wie Nausea und Erbrechen, in seltenen Fällen auch Durchfall, auf. Diese klingen meist nach kurzer Krankheitsdauer von 6 bis 24 h ohne bleibende Schäden wieder ab (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Vereinzelt gibt es aber auch Berichte über schwerwiegendere Fälle, vor allem bei Kindern und Jugendlichen, mit Leber- bzw. Multiorganversagen und teils letalem Ausgang (Dierick *et al.*, 2005, Naranjo *et al.*, 2011, Tschiedel *et al.*, 2015). In einer Studie von Yokoyama *et al.* (1999) waren nach intraperitonealer Applikation von synthetischem Cereulid bei BALB/c Mäusen pathologische und histopathologische Veränderungen der Leber feststellbar. Die stärksten Veränderungen waren dabei zwei bis drei Tage nach der Injektion erkennbar. Dosen von über 20 µg pro Maus waren sogar tödlich. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass sich Leber und Leberenzyme vier Wochen nach Cereulid-Gabe fast vollständig regeneriert hatten.

Die Diarrhoe-Form zählt zu den Lebensmittelinfektionen und wird durch verschiedene Enterotoxine verursacht (II.3). Diese werden erst nach der Aufnahme von *B. cereus* Keimen oder Sporen in toxischer Dosis im Dünndarm gebildet (Clavel *et al.*, 2004) und führen nach einer Inkubationszeit von 8 bis 16 h zu abdominalen Schmerzen und profusem Durchfall. Auch hier ist die Erkrankungsdauer mit 12 bis 24 h verhältnismäßig kurz (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Tabelle 1: Lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche verursacht durch *B. cereus* in der EU und in Deutschland (2004-2014), *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks*, EFSA.

Jahr	Anzahl gemeldeter Ausbrüche gesamt				Anzahl Ausbrüche mit hoher Evidenz ¹				Anzahl Ausbrüche mit niedriger Evidenz ¹				Anteil an allen lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen (%)	
	EU		D		EU		D		EU		D		EU	D
	N ²	Fälle ³	N	Fälle	N	Fälle	N	Fälle	N	Fälle	N	Fälle		
2004	6	96	- ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1 %	-
2005	73	1.177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1 %	-
2006	77	941	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3 %	-
2007	102	1.062	5	74	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8 %	0,4 %
2008	124	2.121	0	0	45	1.132	0	0	79	989	0	0	2,3 %	0,0 %
2009	124	1.619	4	6	59	929	4	6	65	690	0	0	1,8 %	0,7 %
2010	99	1.242	3	3	26	561	3	3	73	681	0	0	2,4 %	0,7 %
2011	220	2.307	6	35	47	658	6	35	173	1.649	0	0	3,9 %	1,4 %
2012⁵	259	2.518	5	22	38	712	4	22	221	1.806	1	-	4,8 %	2,8 %
2013	278	1.860	4	31	54	83	3	12	224	1.777	1	19	5,4 %	1,0 %
2014	287	3.073	2	9	35	779	2	9	252	2.294	0	0	5,5 %	0,5 %

¹ Einteilung „hoch“/ „niedrig“ anhand epidemiologischer und mikrobiologischer Beurteilungskriterien, vgl. EFSA (2015)

² 'N': Anzahl der gemeldeten Ausbrüche

³ 'Fälle': Anzahl der erkrankten Personen

⁴ '-': keine Daten vorhanden

⁵ Bei Ausbrüchen mit hoher Evidenz ist die Anzahl der erkrankten Personen nur bei zwei von vier Ausbrüchen bekannt

3 *Bacillus cereus* Enterotoxine

Nach heutigem Kenntnisstand spielen bei der Pathogenese der Diarrhoe-Form drei relevante Toxin(komplex)e, nämlich Cytotoxin K, Nicht-hämolytisches Enterotoxin und Hämolysin BL, eine wesentliche Rolle und werden deshalb im Folgenden näher erläutert. Erwähnenswert ist allerdings, dass es neben diesen klassischen Toxinen eine Reihe weiterer Proteine gibt, die ebenfalls als potentielle Virulenzfaktoren diskutiert werden. Dazu zählen unter anderem die Proteine EntA, EntB und EntC (Clair *et al.*, 2010), Hämolysin II (Baida *et al.*, 1999), Enterotoxin FM (Asano *et al.*, 1997) und Cereolysin O (Kreft *et al.*, 1983), sowie verschiedene Proteasen, Adhäsine und Flagelline (Clair *et al.*, 2010).

3.1 Cytotoxin K

Cytotoxin K (CytK) ist ein Einzelprotein mit dermonekrotischen, zytotoxischen und hämolytischen Eigenschaften und einem Molekulargewicht von 34 kDa (Hardy *et al.*, 2001, Lund *et al.*, 2000). Es weist Sequenzhomologien zu *S. aureus* Leukozidin, dessen α - und γ -Hämolysin, *C. perfringens* β -Toxin (Lund *et al.*, 2000) und *B. cereus* Hämolysin II (Hly II) (Baida *et al.*, 1999) auf und gehört mit diesen zur Gruppe der „ β -barrel pore forming toxins“. Erstmals wurde CytK aus dem *B. cereus* Stamm NVH 391/98 isoliert, welcher 1998 für eine Lebensmittelinfektion in einem französischen Pflegeheim, bei der mehrere Personen an blutigem Durchfall erkrankten und drei Menschen starben, verantwortlich war (Lund *et al.*, 2000). Nachdem zu diesem Zeitpunkt weder HBL noch Nhe in diesem *B. cereus* Stamm gefunden werden konnten, galt CytK als Auslöser dieser Lebensmittelvergiftung. Später konnte eine modifizierte Form des *nhe*-Operons, welches eine 80 % Übereinstimmung mit der Originalsequenz aufweist, sowie die Expression von NheB in NVH 391/98, nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung von Nhe an der Pathogenität des Stammes nicht ausgeschlossen werden kann (Lapidus *et al.*, 2008). Zudem gelang Tsilia *et al.* (2012) mithilfe von MALDI-TOF/MS der Nachweis von NheA in *B. cereus* NVH 391/98.

Es gibt zwei Varianten von CytK, die eine Sequenzhomologie von 89 % aufweisen und als CytK-1, dem originären CytK entsprechend und CytK-2, bezeichnet werden (Fagerlund *et al.*, 2004). Die toxische Aktivität von CytK-2, das sich ebenfalls als zytotoxisch, hämolytisch und porenbildend erwies, ist im Vergleich zum Typ-Stamm NVH 391/98 um 80 % reduziert (Fagerlund *et al.*, 2004). Bei der Sequenzierung von 70 CytK-2 positiven Stämmen

unterschiedlicher Herkunft ließen sich potentiell toxische Stämme keiner gemeinsamen Gruppe zuordnen. Daraus schlussfolgern Castiaux *et al.* (2015), dass CytK-2 möglicherweise keine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der Diarrhoe-Form spielt. Während CytK-2 in HBL-und/oder Nhe-produzierenden Stämmen relativ häufig gefunden wird (Guinebretière *et al.*, 2006), konnte CytK-1 nur in einigen wenigen Stämmen, die alle auch das modifizierte *nhe*-Operon besitzen, nachgewiesen werden (Auger *et al.*, 2008). Diese Stämme wurden 2013 einer neuen, thermotoleranten Spezies innerhalb der *B. cereus*-Gruppe, nämlich *B. cytotoxicus*, zugeordnet (Guinebretière *et al.*, 2013). In einer kürzlich publizierten Studie zum Vorkommen von *B. cytotoxicus* in verschiedenen Kartoffelprodukten waren 35 % der 151 getesteten Proben positiv, die höchste Prävalenz wurde bei getrockneten Produkten festgestellt (Contzen *et al.*, 2014).

3.2 Nicht-hämolytisches Enterotoxin

Bei einer 1995 in Norwegen aufgetretenen Lebensmittelinfektion wurde das Drei-Komponenten-Protein Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) erstmals aus dem HBL-negativen Stamm NVH 0075/95 isoliert (Lund & Granum, 1996). Nhe besteht aus den Proteinen NheA (41 kDa), NheB (39,8 kDa) und NheC (36,5 kDa), deren Gene alle auf dem gleichen Operon liegen (Granum *et al.*, 1999). In molekularbiologischen Studien trugen nahezu 100 % der *B. cereus* Stämme die Gene für Nhe (Ehling-Schulz *et al.*, 2006, Guinebretière *et al.*, 2002, Hwang & Park, 2015, Moravek *et al.*, 2006, Ouoba *et al.*, 2008).

Seinen Namen erhielt Nhe, weil es im Gegensatz zu HBL nicht in der Lage ist, auf Rinderblutagar eine Hämolyse hervorzurufen (Lund & Granum, 1996). Später konnte in Suspensionsassays allerdings neben einer zytolytischen, auch eine hämolytische Wirkung auf Erythrozyten verschiedener Säugetierspezies gezeigt werden (Fagerlund *et al.*, 2008). Nhe ist ein porenbildendes Toxin und besitzt sowohl funktionelle als auch strukturelle Ähnlichkeiten zu dem von *E. coli* produzierten Cytolysin A (ClyA), einem homo-oligomeren Porenbildner (Tab. 2) (Fagerlund *et al.*, 2008).

Die Nhe-Komponenten sind einzeln atoxisch und müssen zum Erzielen der maximalen biologischen Aktivität im molaren Verhältnis von 10:10:1 (NheA:NheB:NheC) vorliegen. Ein stöchiometrischer Überschuss von NheC von mehr als 10 % wirkt hemmend auf die zytotoxische Aktivität von Nhe (Lindbäck *et al.*, 2004). Die individuelle Rolle der

Nhe-Komponenten ist nicht endgültig erforscht, allerdings konnte demonstriert werden, dass für die Zytotoxizität eine bestimmte Bindungsreihenfolge der Proteine nötig ist. Sowohl NheC als auch NheB sind, im Gegensatz zu NheA, in der Lage, einzeln direkt an die Oberfläche eukaryotischer Zellen zu binden. Ein zytotoxischer Effekt kann aber nur dann beobachtet werden, wenn im ersten Inkubationsschritt NheC vorhanden ist (Lindbäck *et al.*, 2010). Nach aktuellem Kenntnisstand geht man davon aus, dass NheC und NheB in Lösung Komplexe bilden und zusammen an die Zelloberfläche binden. Dadurch kommt es zu Konformationsänderungen, woraufhin weiteres freies NheB bindet und eine ringförmige Struktur entsteht. Im letzten, ebenfalls obligatorischen Schritt bindet NheA schließlich an das zellgebundene NheB, es kommt zur Zelllyse (Didier *et al.*, 2012, Heilkenbrinker *et al.*, 2013, Lindbäck *et al.*, 2010). Mit dem NheB-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) 1E11 konnte in Zellkulturtests deutlich gemacht werden, dass NheA eine zentrale Rolle bei der Porenbildung zu spielen scheint. Der mAk, dessen Epitop im C-terminalen Bereich von NheB liegt, kann die Bindung von NheA verhindern und neutralisiert dadurch die zytotoxische Aktivität von Nhe (Didier *et al.*, 2012).

In einer aktuellen Studie von Zhu *et al.* (2016) war nach der Applikation von NheB/NheC-Komplexen in Lipiddoppelmembranen eine NheA-unabhängige „Präpore“ erkennbar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die NheB/NheC-Oligomere die Morphologie und die Zellmembran von Vero-Zellen in Abwesenheit von NheA zu beeinflussen scheinen, dieser Zustand war allerdings reversibel.

3.3 Hämolyisin BL

Hämolyisin BL (HBL) wurde erstmals im *B. cereus* Stamm F837/76, der 1976 aus einer postoperativen Wunde isoliert wurde, gefunden (Turnbull *et al.*, 1979). Zunächst glaubte man, dass es nur aus einer bindenden (B) und einer lytischen (L) Komponente besteht (Beecher & MacMillan, 1990). Erst weitere Untersuchungen zeigten, dass sich das Toxin aus den drei Proteinen HBL-B (37,8 kDa), HBL-L1 (38,5 kDa) und HBL-L2 (43,2 kDa) zusammensetzt (Beecher & Macmillan, 1991).

Wie auch die Gene für Nhe, liegen die *hbl*-Gene alle auf dem gleichen Operon (Abb. 1) und werden in der Reihenfolge *hblC* (L2), *hblD* (L1) und *hblA* (B) in eine mRNA transkribiert (Lindbäck *et al.*, 1999, Ryan *et al.*, 1997). Daneben gibt es noch ein Gen, *hblB*, welches

unterhalb von *hblCDA* lokalisiert ist und Sequenzhomologien von 73 % zu *hblA* aufweist (Granum & Lund, 1997). Lange ging man davon aus, dass *hblB* ein Pseudogen ist, weil es nicht in nachweisbaren Mengen transkribiert wurde (Lindbäck *et al.*, 1999, Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Eine Studie von Clair *et al.* (2010) zum Sekretom des Typstamms ATCC 14579 zeigte allerdings, dass auch die vierte HBL-Komponente HBL-B', das Genprodukt von *hblB*, exprimiert wird. Das *hblB*-Gen wird als monocistronisches Gen, unabhängig vom PlcR-regulierten *hblCDA* transkribiert. Aufgrund der Ähnlichkeit von *hblA* und *hblB* vermuteten die Autoren, dass Hbl-B' dieselbe Funktion wie HBL-B erfüllen könnte und unter bestimmten Wachstumsbedingungen oder in bestimmten Wachstumsstadien die Funktion von HBL-B verstärken oder ergänzen könnte. In molekularbiologischen Studien besaßen 40 – 80 % der untersuchten Stämme die Gene für HBL (Hwang & Park, 2015, Kim *et al.*, 2015, Krause *et al.*, 2010, Reis *et al.*, 2013, Tallent *et al.*, 2015, Wehrle *et al.*, 2009).

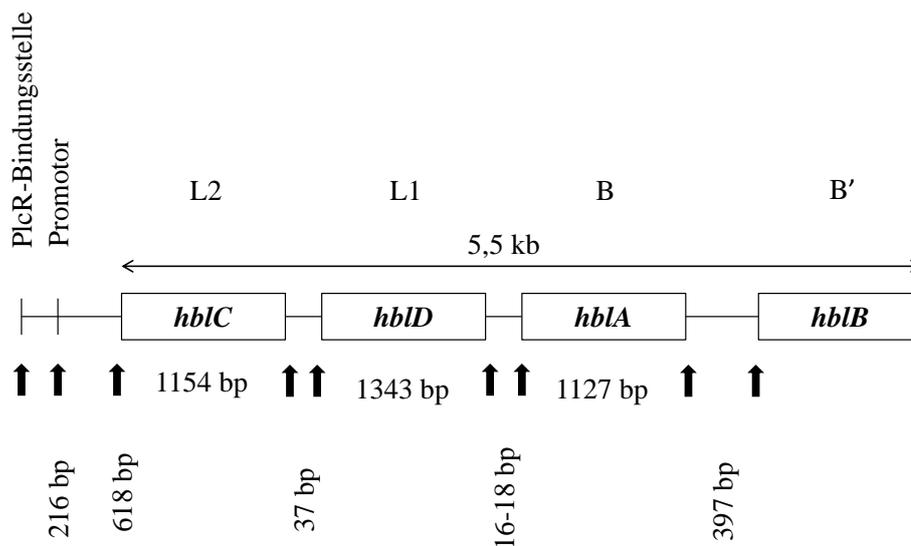


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *hbl*-Operons (nach Ryan *et al.*, 1997; Lindbäck *et al.*, 1999)

Tabelle 2 zeigt, dass die Aminosäuresequenzen der HBL-Komponenten sowohl untereinander als auch im Vergleich zu denen der Nhe-Komponenten große Ähnlichkeiten aufweisen. Von allen sechs Komponenten sind sich NheB und NheC am ähnlichsten, zwischen den Komplexen gleichen sich vor allem HBL-B und NheC und HBL-L1 und NheB (Fagerlund *et al.*, 2008, Granum *et al.*, 1999, Ryan *et al.*, 1997). Trotz dieser Ähnlichkeiten zeigte eine Studie von Sastalla *et al.* (2013), dass sich weder die Nhe- noch die

HBL-Komponenten gegenseitig ersetzen können. In Zellkulturtests mit CHO-Zellen, bei denen alle 20 möglichen Kombinationen getestet wurden, führte nur die Applikation aller drei Nhe- bzw. aller drei HBL-Komponenten zum nahezu vollständigen Zelltod, während die anderen 18 Kombinationen atoxisch waren.

Tabelle 2: Sequenzhomologien der von *B. cereus* ATCC 14579 produzierten HBL- und Nhe-Komponenten bzw. im Vergleich zu *E. coli* ClyA (nach Fagerlund *et al.*, 2008)

	HBL-L2	HBL-L1	HBL-B	NheA	NheB	NheC
ClyA	18 %	20 %	20 %	19 %	19 %	20 %
HBL-L2		18 %	23 %	23 %	21 %	19 %
HBL-L1			25 %	18 %	40 %	32 %
HBL-B				20 %	27 %	25 %
NheA					22 %	22 %
NheB						44 %

Eine Röntgenstrukturanalyse von HBL-B zeigte zudem eine große Strukturähnlichkeit der Tertiärstruktur zu dem von *E. coli* produzierten ClyA (Madegowda *et al.*, 2008). Diese äußert sich in einer gleichartigen Ausrichtung der vier langen α -Helices und der bei diesen Proteinen einzigartigen Subdomäne, die eine β -Haarnadelstruktur besitzt, welche von zwei kurzen α -Helices flankiert wird und aus hydrophoben Aminosäuren besteht. Diese Sequenzhomologien weisen auf eine gleichartige Wirkungsweise der Bindungsdomäne und ein analoges Porenbildungsverhalten hin. Auch die anhand der Röntgenstrukturanalyse von HBL-B am Computer generierten, hypothetischen Strukturmodelle für NheC und NheB zeigen diese Übereinstimmungen (Fagerlund *et al.*, 2008). Daher wurde 2008 von Fagerlund *et al.* postuliert, dass HBL, Nhe und ClyA einer neuen Superfamilie porenbildender Toxine angehören.

Die HBL-Komponenten sind, wie auch die Nhe-Komponenten, einzeln atoxisch und erzielen ihre maximale biologische Aktivität, wenn sie im molaren Verhältnis von 1:1:1 vorliegen (Beecher *et al.*, 1995). Die Enteropathogenität von HBL konnte mithilfe von verschiedenen Tierversuchen wie Darmschlingenligationstest oder Erhöhung der Kapillarpermeabilität

dargestellt werden (Beecher *et al.*, 1995). Zudem ist HBL dermonekrotisch, hat zytotoxisches Potential gegenüber Vero-Zellen und zeigt hämolytische Aktivität gegenüber Erythrozyten verschiedener Spezies (Beecher & MacMillan, 1990). Auf Schafblutagar kann eine ringförmige diskontinuierliche Hämolyse beobachtet werden, welche zunächst einige Millimeter entfernt von der Diffusionsstelle beginnt, während der Ring unmittelbar um die Auftragestelle erst später hämolysiert (Beecher & Macmillan, 1991). Als phänotypisches Unterscheidungsmerkmal ist dieses Phänomen allerdings nur bedingt geeignet, da es nicht von allen *hbl*-positiven Stämme gezeigt wird (In't Veld *et al.*, 2001). Zur Wirkung von HBL auf zellulärer Ebene ist bisher wenig bekannt. In einem frühen Modell ging man davon aus, dass HBL-B an die Zelloberfläche bindet und anschließend die beiden L-Komponenten in die Zelle eingeschleust werden und die Lyse bewirken (Beecher & Macmillan, 1991). Spätere Untersuchungen kamen zu der Annahme, dass alle drei HBL-Komponenten unabhängig voneinander an die Zelloberfläche binden und sich dort zu einem Membranangriffskomplex (membrane attack complex) oligomerisieren, wodurch transmembranäre Poren entstehen, was letztlich zur osmotischen Zelllyse führt (Beecher & Wong, 1997). In einer Studie von Sastalla *et al.* (2013) konnte allerdings nur HBL-B an die Membran eukaryotischer Zellen binden und an HBL-B wiederum nur HBL-L1. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ähnlich wie bei Nhe auch beim HBL-Komplex eine feste Bindungsreihenfolge, nämlich HBL-B gefolgt von HBL-L1 und schließlich HBL-L2 benötigt wird.

3.4 Regulation der Toxinexpression

Die Enterotoxinexpression und die damit verbundene toxische Aktivität von *B. cereus* wird maßgeblich durch Umgebungsfaktoren beeinflusst, miteinander interagierende Regulatoren gesteuert. Zu den Umgebungsfaktoren zählen beispielsweise pH-Wert, Temperatur, Nährstoffangebot, Sauerstoffgehalt und Redoxpotential; zusätzlich spielen auch Wachstumsphase und -zyklus eine Rolle (Ceuppens *et al.*, 2011, Ouhib-Jacobs *et al.*, 2009, Thomassin *et al.*, 2006, van der Voort & Abee, 2009). In Abbildung 2 ist die Regulation der Gentranskription von *B. cereus* Toxinen und potentiellen Virulenzfaktoren dargestellt. Zahlreiche *B. cereus* Virulenzgene, darunter auch die Gene, die für die Diarrhoe-Form verantwortlichen Enterotoxine CytK, Nhe und HBL, gehören zu einem Regulon, das vom pleiotropen Transkriptionsregulator Phospholipase C-Regulator (PlcR) kontrolliert wird. PlcR

ist Teil eines Quorum-Sensing-Systems, das *B. cereus* erlaubt, die Virulenzgene abhängig von der erforderlichen Zelldichte zu regulieren und wird über den Autoinduktor PapR aktiviert. Dieses Signalpeptid erleichtert die Bindung von PlcR an konservierte, palindrome DNA-Sequenzen, die sogenannten PlcR-Boxen, die im Bereich der Promotorregion der Zielgene liegen und deren Transkription aktivieren. Die Expression von PlcR ist positiv autoinduziert, beginnt im Übergang zur stationären Phase und wird durch den Transkriptionsregulator Spo0A gehemmt (Agaisse *et al.*, 1999, Gohar *et al.*, 2008, Grenha *et al.*, 2013). Zusätzlich zu diesen Regulatoren wird die Enterotoxinexpression bei Vorherrschen eines niedrigen Redoxpotentials durch den Fumarat/Nitrat-Reduktions-Regulator (Fnr) (Esbelin *et al.*, 2012, Zigha *et al.*, 2007) und ResDE, ein Zwei-Komponenten-System (Esbelin *et al.*, 2009) beeinflusst. Beide können die Expression von HBL und Nhe hochregulieren. Fnr agiert dabei unabhängig vom Sauerstoffgehalt, wohingegen ResDE anaerobe Verhältnisse benötigt.

Kürzlich wurde von Omer *et al.* (2015) im Sekretom von ATCC 14579 ein weiteres Protein, nämlich EntD, gefunden, das eine wichtige Rolle als Regulatorprotein spielen könnte. Anhand einer EntD-Deletionsmutante konnte die Funktion von EntD näher untersucht werden. Es scheint, als würde EntD die Expression der Enterotoxine CytK, Nhe und HBL beeinflussen. Diese waren im Exoproteom der Deletionsmutante wenig (CytK und HBL) bis gar nicht zu finden (Nhe). Auf Grund der Sequenzhomologien von EntD zu den Proteinen EntA, EntB und EntC (Clair *et al.*, 2010) wurde von Omer *et al.* (2015) auch für diese drei Proteine ein ähnliches Wirkungsspektrum postuliert.

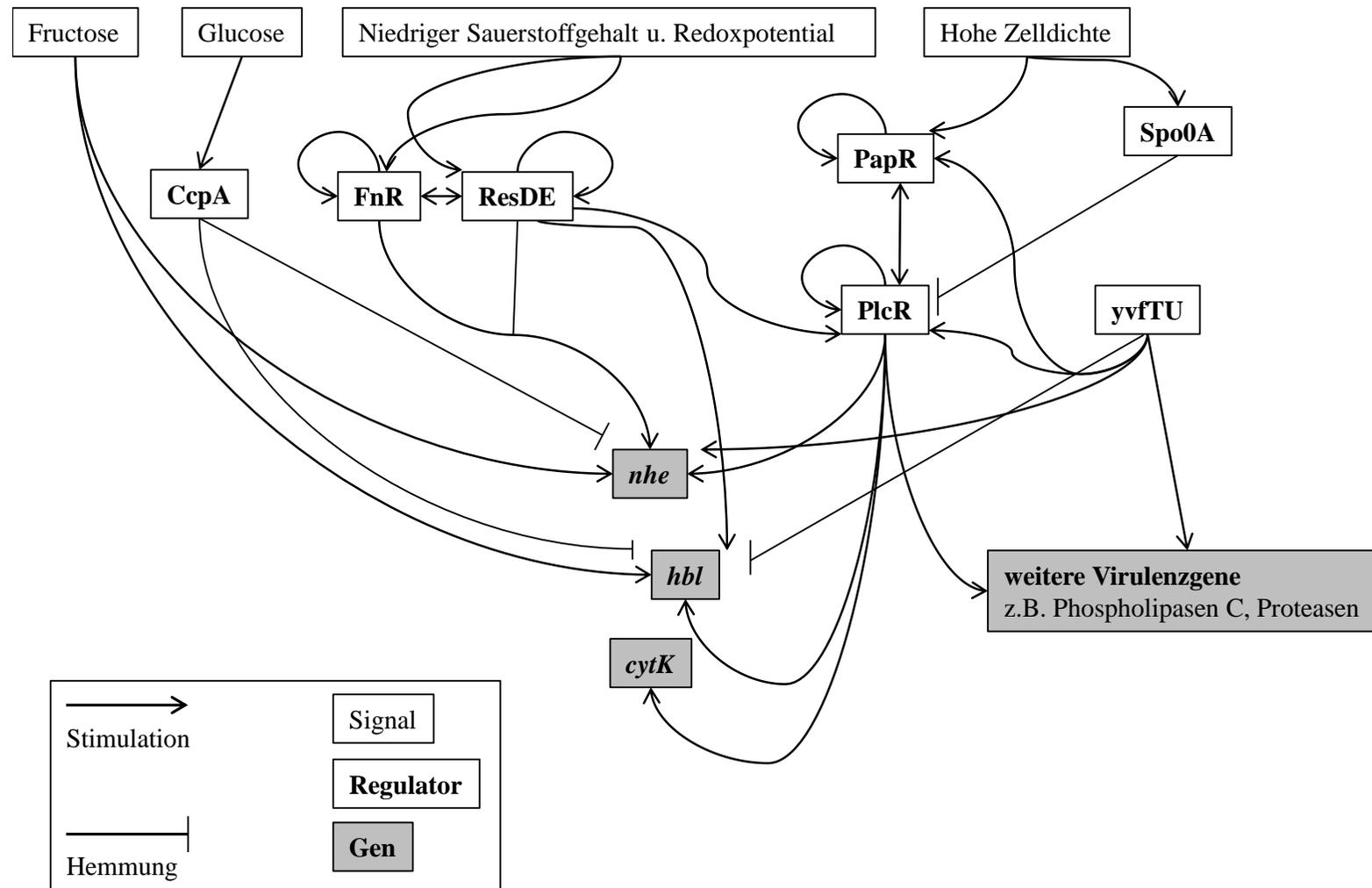


Abbildung 2: Regulation der Gentranskription von *B. cereus* Toxinen und potentiellen Virulenzfaktoren (modifiziert nach Ceuppens *et al.*, 2011)

3.5 Toxinsekretion

Die *B. cereus* Enterotoxine sind klassische Exoproteine, sie werden anders als zytoplasmatische Proteine aus der Bakterienzelle ausgeschleust. Heute geht man davon aus, dass die Ausschleusung über den Sec-Translokations-Weg erfolgt (Fagerlund *et al.*, 2010), welcher bei Gram-positiven Bakterien im Wesentlichen aus dem heterotrimeren Proteinkomplex SecYEG, der einen Membrankanal bildet und der ATPase SecA, die durch die ATP-Hydrolyse die Energie für die Translokation liefert, besteht. Exoproteine besitzen ein Signalpeptid, welches sich an der Verlängerung des N-terminalen Endes des Präproteins befindet. Alle Proteinkomponenten der *B. cereus* Enterotoxine HBL, Nhe und CytK besitzen ein solches Signalpeptid. Dieses wird von SecA erkannt und das Protein dadurch an den SecYEG-Komplex angelagert. Da eine Ausbildung der Tertiärstruktur im Zytoplasma die Ausschleusung der Proteine unmöglich machen würde, binden Chaperone an das Präprotein und verhindern so dessen vorzeitige Faltung. Nach Translokation des Präproteins wird das Signalpeptid abgespalten (van Wely *et al.*, 2001). Fagerlund *et al.* (2010) zeigte, dass HBL-B bei veränderter Signalpeptidsequenz bzw. nach Zugabe von Natriumazid, welches SecA hemmt, nicht mehr bzw. reduziert sekretiert wird und es zu einer intrazellulären Akkumulation der Proteinkomponente kommt. Außerdem konnte deutlich gemacht werden, dass die Sekretion von HBL-B nicht, wie von Ghelardi *et al.* (2007) behauptet, vom Flagellen-Export-Apparat abhängig ist. Bei Expression von HBL-B in einem nicht flagellierten *B. thuringiensis* Stamm waren zwar Toxinexpression und Zytotoxizität reduziert, dennoch wurde das exprimierte HBL-B sekretiert.

3.6 Nachweisverfahren

Früher erfolgte der Nachweis von *B. cereus* Enterotoxinen üblicherweise *in vivo*, anhand verschiedener Tiermodellversuche, wie Darmschlingenligationstest (Spira & Goepfert, 1972), oder Gefäßpermeabilitäts-Reaktion (Glatz *et al.*, 1974). Mittlerweile wurden diese Verfahren weitgehend durch *in vitro*-Bioassays abgelöst. Zum Nachweis der biologischen Aktivität von Diarrhoe-Stämmen wurden WST- und MTT-Zellkulturtests unter Verwendung verschiedener Zelllinien, wie Caco-2-, CHO-, McCoy- und Vero-Zellen etabliert (Beattie & Williams, 1999, Dietrich *et al.*, 1999, Fletcher & Logan, 1999, Ngamwongsatit *et al.*, 2008, Rowan *et al.*, 2001). Allerdings dienen diese Zellkulturtests, die zumeist auf der Messung der

mitochondrialen Spaltungsaktivität beruhen, nur zur Bestimmung der Gesamtoxität eines *B. cereus* Stammes und nicht zum spezifischen Nachweis eines bestimmten *B. cereus* Enterotoxins.

Zur Detektion von *B. cereus* Enterotoxinen auf Proteinebene sind derzeit zwei immunchemische Nachweisverfahren, die auf polyklonalen Antikörpern basieren, erhältlich. Der reverse Latexagglutinationstest, BCET-RPLA Toxin Assay (Oxoid), dient zum Nachweis von HBL-L2 (Beecher & Wong, 1994a), wohingegen mit dem BDE-VIATM (Tecra), einem Sandwich-Enzymimmuntest (enzyme immunoassay, EIA), NheA nachgewiesen werden kann (Beecher & Wong, 1994a, Lund & Granum, 1996). Zudem ist mit dem Duopath[®]-System (Merck), einem Kapillarmigrationstest, erstmals ein auf monoklonalen Antikörpern basierender Schnelltest für *B. cereus* kommerziell verfügbar. Mit diesem ist gleichzeitig der sensitive und schnelle Nachweis einer HBL- (HBL-L2) und einer Nhe-Komponente (NheB) möglich (Krause *et al.*, 2010). Mit keinem dieser kommerziell erhältlichen Kits kann allerdings die tatsächliche biologische Aktivität der beiden *B. cereus* Enterotoxin-Komplexe gemessen werden, da jeweils nur eine der drei für die Aktivität benötigten Toxinkomponenten detektiert wird.

Durch die vollständige Sequenzierung der Enterotoxin-Gene gewannen in den letzten Jahren auch vermehrt molekularbiologische Methoden beruhend auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) an Bedeutung (Ehling-Schulz *et al.*, 2006, Wehrle *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2007). Allerdings ist beim PCR-Nachweis nur eine Aussage über das Vorhandensein der Toxin-Gene, aber nicht über die tatsächlich produzierte Toxinmenge möglich.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Materialien und Geräte

1.1 Chemikalien

Amersham™ LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare, 17-0446-01)

Casein (Natriumsalz) aus Kuhmilch (Sigma-Aldrich, C8654)

Caseinhydrolysat (Merck, 1.02245.0500)

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11644807001)

CNBr-aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare, 17-0430-01)

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

Dulbecco's MEM (Biochrom GmbH, F0435)

Fetales Kälberserum (Biochrom GmbH, S 0115)

Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)

L-Glutamin (Biochrom GmbH, K 0282)

MEM Earle's (Biochrom GmbH, FG 0325)

Natriumdodecylsulfat (Sigma-Aldrich, L4390)

Natrium-Pyruvat (Biochrom GmbH, L0473)

PBS Dulbecco (Biochrom GmbH, L 1825)

Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, A2212)

Peroxidase, aktiviert (HRP; Roche, 11 428 861 001)

Polyethylenglycol 1.500 (Roche, 1078641001)

Polyethylenglycol 20.000 (Sigma-Aldrich, 81300)

Sigma Adjuvant System® (Sigma-Aldrich, S6322)

Super Signal™ ELISA Femto Substrate (Thermo Fisher, 37075)

SYPRO[®] Ruby Protein Gel Stain (Thermo Fisher, S-12000)

Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503)

Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, T3924)

Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)

Alle weiteren, nicht separat aufgeführten Reagenzien wurden in pro analysi-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich bzw. Merck KGaA bezogen.

1.2 *Bacillus cereus* Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *B. cereus* Stämme stammten entweder aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ) oder aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch (Präfix: MHI). Die Stämme wurden auf Columbia-Agar mit Schafblut angezüchtet, wöchentlich passagiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung toxinhaltiger Kulturüberstände wurden die Stämme in CGY-Bouillon angezüchtet. In Tabelle 3 sind die Charakteristika der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten *B. cereus* Stämme sowie deren Toxinproduktivität – dargestellt als die in Sandwich-Enzymimmuntests ermittelten durchschnittlichen reziproken Antigen-Titer – und deren zytotoxische Aktivität auf Vero-Zellen – dargestellt als die in WST-Zellkulturtests ermittelten durchschnittlichen reziproken Zyotoxizitätstiter – aufgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Nhe-Deletionsmutante wurde von Frau Dr. Kristina Schauer zur Verfügung gestellt (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, unveröffentlichte Daten).

Tabelle 3: Charakteristika der verwendeten *B. cereus* Stämme

<i>B. cereus</i> Stämme				Toxinproduktivität						
			Genotyp	Toxinprofil				Antigen-Titer im EIA ¹		Zytotoxizität ²
MHI	Original-bezeichnung	Herkunft	Clade/Gruppe	<i>ces</i>	<i>hbl</i>	<i>nhe</i>	<i>cytK</i>	HBL-L2	Nhe-B	Vero
162	F837/76, DSM 4222	postoperative Infektion	I / III	-	+	+	-	250	8.600	2.100
163	F4430/73, DSM 4384	Erbsensuppe	II / IV	-	+	+	+	440	2.900	470
1502	INRA C3	Pasteurisierte Karotten	II / IV	-	+	+	+	490	4.500	750
1513	SDA KA96	Rohmilch	I/III	-	+	+	+	370	6.500	1.200
1532	F352/90	Chow Mein	II / IV	-	+	+	+	540	3.060	570

¹ Die Werte repräsentieren denjenigen reziproken Antigen-Titer, bei dem im Sandwich-EIA noch eine Signalintensität von 1,0 erreicht wurde

² Die Werte repräsentieren denjenigen reziproken Zytotoxizitätstiter, bei dem im Vergleich zur Zellkontrolle eine 50 %ige Reduktion der Spaltungsaktivität der Zellen beobachtet wurde

1.3 Zelllinien

Die in Tabelle 4 aufgeführten Zelllinien wurden in dieser Arbeit zur Überprüfung der zytotoxischen Aktivität von *B. cereus* Kulturüberständen und zur Beurteilung möglicher neutralisierender Eigenschaften der generierten monoklonalen Antikörper im Rahmen von WST-Zellkulturtests (III.2.6) eingesetzt.

Tabelle 4: Charakteristika verwendeter Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Morphologie	Wachstum	Herkunft
A549	Humane Lungenkarzinomzellen	epithelial	adhärent	DSMZ (ACC 43)
RAW 264.7	Maus-Makrophagen	Monozyt/Makrophage	semi-adhärent	Sigma Aldrich (ECACC 91062702)
Vero	Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze	epithelial	adhärent	BioWhittaker (ATCC-CCL-81)

1.4 Nährmedien

Bacillus cereus

Festes Nährmedium

- Columbia-Agar mit Schafblut (Oxoid, PB 5039A)

Flüssiges Anreicherungsmedium

- Caseinhydrolysat-Bouillon mit 1 % Glucosezusatz (CGY) in Anlehnung an BEECHER & WONG (1994b): 20 g Caseinhydrolysat, 6 g Hefeextrakt, 2 g Ammoniumsulfat, 14 g K₂HPO₄, 6 g KH₂PO₄, 1 g Natriumcitrat, 2 g Magnesiumsulfat, 950 ml A. dest.; nach Autoklavieren Zugabe von 50 ml steriler 20 % (g/v) Glucose, um eine Endkonzentration von 1 % (g/v) Glucose im Medium zu erhalten.

Zellkultur

Hybridomzellen

- HT-Zellkulturmedium: 500 ml Dulbecco's MEM Medium, 100 ml Fetales Kälberserum (FCS), 5 ml Natriumpyruvat (100 mmol/l), 10 ml L-Glutamin (200 mmol/l), 5 ml Mercaptoethanol (5 mmol/l), 5 ml Hypoxanthin/Thymidin-Mischung (10 mmol/l bzw. 1,6 mmol/l)
- HAT-Selektivmedium: HT-Zellkulturmedium + Aminopterin (0,4 µmol/l)

A549-Zellen

- 500 ml Dulbecco's MEM Medium, 50 ml FCS, 10 ml Natriumpyruvat (100 mmol/l), 10 ml L-Glutamin (200 mmol/l)

RAW 264.7-Zellen

- 500 ml Dulbecco's MEM Medium, 50 ml FCS, 10 ml L-Glutamin (200 mmol/l)

Vero-Zellen

- 500 ml MEM Earle's Medium, 5 ml FCS, 5 ml Natriumpyruvat (100 mmol/l), 1 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

1.5 Puffer und Lösungen

Enzymimmuntest (EIA)

- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS; pH 7,3): 6,79 g NaCl, 1,47 g Na₂HPO₄, 0,43 g KH₂PO₄, 1 l A. dest.
- Absättigungslösung: PBS mit Zusatz von 3 % (g/v) Casein
- Waschlösung: 8,55 g NaCl, 2,5 ml Tween 20, 10 l A. dest.
- Probenverdünnungspuffer: PBS bzw. PBS mit Zusatz von 0,5 % (v/v) Tween 20
- Lösung zum Verdünnen des Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers: PBS mit Zusatz von 1 % (g/v) Casein

- Citratpuffer (0,23 mol/l): 44,13 g Citronensäure-Monohydrat, 800 ml A. dest.; durch Zugabe von KOH (1 mol/l) auf pH 3,95 einstellen; 336 µl H₂O₂ zusetzen
- Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung: 45 ml Methanol, 5 ml Aceton, 252 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
- Chromogen/Substratlösung: 20 Teile Citratpuffer + 1 Teil TMB-Lösung
- Lösung zum Abstoppen: H₂SO₄ (1 mol/l)

Herstellung von Peroxidase (HRP)-markierten Konjugaten

- Kopplungspuffer: Kaliumphosphatpuffer (10 mmol/l; pH 8,0): (A) 8,71 g K₂HPO₄, 5 l A. dest., (B) 1,36 g KH₂PO₄, 1 l A. dest.; durch Zugabe von B zu A auf pH 8,0 einstellen, dann NaCl (50 mmol/l) zusetzen
- Natriumcarbonatpuffer (0,5 mol/l; pH 9,5): (A) 2,1 g NaHCO₃, 50 ml A. dest., (B) 2,65 g Na₂CO₃, 50 ml A. dest.; durch Zugabe von B zu A auf pH 9,5 einstellen
- Triethanolaminlösung (2 mol/l; pH 8,0): 2,66 ml Triethanolamin, 3 ml A. dest.; mit HCl (5 mol/l) auf pH 8,0 einstellen, dann Zugabe von A. dest. ad 10 ml
- Natriumborhydridlösung (200 mmol/l): 8 mg NaBH₄, 1 ml A. dest.; frisch herstellen, auf Eis lagern
- Glycin-Lösung (1 mol/l; pH 7,0): 0,75 g Glycin, 6 ml A. dest.; mit NaOH (0,1 mol/l) auf pH 7,0 einstellen, dann Zugabe von A. dest. ad 10 ml

Immunaффinitätschromatographie

- Elutionspuffer (Glycin-HCl, pH 2,5): 2,25 g Glycin, 300 ml A. dest.; mit HCl (0,2 mol/l) auf pH 2,5 einstellen
- Konservierungspuffer: PBS mit Zusatz von 0,1 % (g/v) Natriumazid

Immunoblot

- Anodenpuffer I: 37,20 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1 l
- Anodenpuffer II: 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1 l

- Kathodenpuffer: 5,24 g 6-Amino-n-Caprönsäure, 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, A. dest. ad 1 l
- Lösung zum Absättigen und Verdünnen der Antikörper: PBS mit Zusatz von 3 % (g/v) Casein und 0,025 % (v/v) Tween 20
- Waschlösung: PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Tris/HCl-Puffer (0,3 mol/l, pH 8,0): 0,73 g Tris, 100 ml A. dest., mit HCl (1 mol/l) auf pH 8,0 einstellen
- SDS-Puffer: 0,2 g EDTA, 15 g SDS, 200 ml Tris/HCl-Puffer
- Bromphenolblau-Lösung: 0,3 % (g/v) Bromphenolblau in A. dest.

SYPRO Ruby-Protein-Färbung

- Fixierlösung: 500 ml Methanol, 70 ml Eisessig, A. dest. ad 1 l
- Waschlösung: 100 ml Methanol, 70 ml Eisessig, A. dest. ad 1 l
- BSA-Standard zur Quantifizierung von Proteinbanden: 1 mg BSA/ml PBS

1.6 Immunreagenzien

1.6.1 Monoklonale Antikörper

Die in Tabelle 5 aufgeführten monoklonalen Antikörper wurden in früheren Arbeiten am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch etabliert (Dietrich *et al.*, 1999, Dietrich *et al.*, 2005) und zum Nachweis der HBL-Komponenten (bzw. NheB) in indirekten (HBL-B und HBL-L1) bzw. Sandwich-EIAs (HBL-L2 und NheB) beschrieben. Die HBL-Komponenten-spezifischen mAk wurden im Rahmen dieser Arbeit insbesondere bei der Überprüfung der HBL-Toxinproduktivität von *B. cereus* Stämmen, der immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung von HBL-Toxinkomponenten und bei der Entwicklung von Sandwich-EIAs eingesetzt.

Tabelle 5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper gegen *B. cereus* Enterotoxinkomponenten

mAk	Zielantigen	Ig-Isotyp	EIA	eingesetzte Ak-Konzentration
1B8	HBL-B	IgG _{2a}	indirekt	2 µg/ml
1E9	HBL-L1	IgG _{2b}	indirekt	1 µg/ml
1A12	HBL-L2	IgG ₁	Sandwich	10 µg/ml
8B12	HBL-L2	IgG ₁	Sandwich	1:2.000 ¹
2B11	NheB	IgG _{2b}	Sandwich	5 µg/ml
1E11	NheB	IgG ₁	Sandwich	1:3.000 ¹

¹ Peroxidase-markierte Antikörper-Präparation

1.6.2 Polyklonale Antikörper

Pferd Anti-Maus IgG-HRP (H&L) (Cell Signaling, #7076)

Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich, ISO2)

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

Ziege Anti-Maus IgG (Fc-spezifisch) (Sigma-Aldrich, M4280)

1.7 Verbrauchsmaterialien

B. cereus Exoprotein Produktion

Cryotubes 1,8 ml, 4,5 ml (Thermo Fisher, 375418 bzw. 379146)

Einmalspritzen 5 ml, 20 ml (Braun, 4606051V bzw. 4606205V)

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

Gelelektrophorese und Immunoblot

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

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

PhastGel™ Gradient 10-15 (GE Healthcare, 17-0540-01)

PhastGel™ Probenauftragskämme 8/1 µl (GE Healthcare, 18-1618-01)

PhastGel™ SDS Pufferstreifen (GE Healthcare, 17-0516-01)

Zellkultur

CELLline™ CL 1.000 (integra biosciences, 90005)

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

miniPERM® Bioreaktor (Sarstedt, 94.6001.059)

Zellkulturflaschen 80 cm² (Thermo Fisher, 178905)

Sonstiges

Amicon® Ultra Zentrifugalfilter 30 k 4 ml, 15 ml (Millipore, UFC803024 bzw. UFC903024)

CELLSTAR® PP-Röhrchen, steril, 15 ml, 50 ml (Greiner bio-one, 188261 bzw. 227261)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, 0030.120.086)

Mikrotiterplatten, 96 Loch (Nunc GmbH, 439454)

Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl (Brand, 732024, 732028 bzw. 732032)

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

Zählkammer nach Thoma (Brand)

1.8 Geräte

Heracell 240i CO₂-Inkubator (Thermo Scientific)

Kodak Image Station 200 MM (Biostep)

Mikrotiterplatten-Lesegerät Sunrise Remote Control Reader (Tecan)

NovaBlot Multiphor II (GE Healthcare)

PhastSystem Separation and Control Unit (Pharmacia)

Photometer Specord 200 Plus (Analytik Jena)

1.9 Software

KODAK 1D 3.6. Software (Eastman Kodak Company)

Ridawin Win.net (R-Biopharm AG)

TotalLab Nonlinear Dynamics Image Analysis Software (TotalLab)

2 Methodik

2.1 Kultivierung von *Bacillus cereus*

Die Anzucht von *B. cereus* zur Enterotoxinproduktion erfolgte standardmäßig in CGY-Bouillon (III.1.4). Zur Voranreicherung wurden 20 ml Medium mit einer auf Blutagar gewachsenen Einzelkolonie eines *B. cereus* Stammes beimpft und für 17 h im Schüttelwasserbad bei 32 °C inkubiert. Mit dieser Voranreicherung wurden 20 ml CGY-Medium entsprechend einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,2 angeimpft und für 6 h im Schüttelwasserbad bei 32 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (3500 rpm, 20 min, 4 °C) wurde der so gewonnene Kulturüberstand (KÜ) sterilfiltriert, mit 1 mmol/l EDTA versetzt, um die von *B. cereus* produzierten Metalloproteasen zu inaktivieren, und portioniert in Cryotubes bei -20 °C tiefgefroren.

2.2 Immunchemische Verfahren

2.2.1 Immunaффinitätschromatographie

Zur Herstellung der Immunaффinitätssäule (IA-Säule), die bereits im Vorfeld dieser Arbeit erfolgte, wurde der HBL-B-spezifische mAk 1B8 (10 mg) nach Herstellerangaben an 1 g Cyanogenbromid (CnBr)-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt. Dieses Immunosorbens (3,5 ml Gel) wurde für die Reinigung von HBL aus KÜ des *B. cereus* Isolates MHI 1532 verwendet. Dazu wurde die IA-Säule zunächst mit 20 ml PBS gespült, um den Konservierungspuffer (PBS mit Zusatz von 0,1 % NaN₃) zu entfernen. Dann wurde toxinhaltiger *B. cereus* KÜ (1:3 in PBS verdünnt) über die Säule gegeben, so dass das Toxin an die kovalent gebundenen Antikörper binden konnte. Nach einem Waschschrift (20 ml PBS) zur Entfernung ungebundener Komponenten wurde das an die Säule gebundene Toxin durch Zugabe von 16 ml Glycin/HCl-Lösung (pH 2,5) eluiert und durch sofortige Zugabe von Tris (1 mol/l) neutralisiert (pH 7,0). Das Eluat wurde anschließend dreimal über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Nach der Elution wurde die IA-Säule zunächst mit 20 ml PBS, dann mit 30 ml Konservierungspuffer gespült und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Flussrate wurde während der gesamten Durchführung konstant bei 1 ml/min gehalten.

2.2.2 Indirekte EIA-Verfahren

Im indirekten EIA bindet ein spezifischer Antikörper an ein immobilisiertes Antigen. Diese Antigen-Antikörperreaktion kann durch einen mit Merrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) markierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Nach Zugabe einer Chromogen/Substratlösung und Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure (1 mol/l), kann die Absorption bei 450 nm gemessen und dadurch der Anteil gebundener Antikörper quantifiziert werden. Dieses EIA-Verfahren kann somit auch durchgeführt werden, wenn nur ein spezifischer monoklonaler Antikörper zur Verfügung steht.

Als Antigen dienten *B. cereus* KÜ oder rekombinante HBL-Komponenten (rHBL; entsprechende Expressionszelllinien wurden von Frau Dr. Nadja Jeßberger vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch zur Verfügung gestellt, unveröffentlichte Daten). Diese Präparationen wurden abhängig von der Fragestellung entweder in gleichbleibender Konzentration zur Bestimmung der Antikörper-Titer oder als serielle Verdünnungsreihe zur Bestimmung der relativen Affinität der mAk in PBS (100 µl/Kavität) eingesetzt. Die beschichteten Mikrotiterplatten wurden bei Raumtemperatur (RT) über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde durch Absaugen mit einer Vakuumpumpe entfernt. Danach wurden die Mikrotiterplatten mit 3 % (g/v) Casein/PBS-Lösung (150 µl/Kavität) für mindestens 30 min inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschlösung wurde der Primärantikörper aufgetragen. Dabei handelte es sich entweder um Maus-Antiseren, antikörperhaltige Zellkulturüberstände (ZKÜ) oder monoklonale Antikörper, die ebenfalls entweder in gleichbleibender Konzentration (relative Affinität) oder als serielle Verdünnungsreihen (Antikörper-Titer bzw. Produktivität von Hybridomzelllinien) in PBS (100 µl/Kavität) verwendet wurden. Nach einstündiger Inkubationszeit und erneutem Waschschrift (4x) wurde der Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Maus Antikörper) 1:2.000 verdünnt in 1 % (g/v) Casein/PBS-Lösung (100 µl/Kavität) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach Waschen (5x) wurde die Mikrotiterplatte 20 min mit Chromogen/Substratlösung (100 µl/Kavität) inkubiert. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 mol/l; 100 µl/Kavität) wurde die Absorption bei 450 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Ridasoft Win-Software (R-Biopharm AG). Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer auf einem Taumelschüttler bei RT durchgeführt. Die Waschschrift dienten zum Entfernen

von überschüssigem Antigen bzw. Antikörper, danach wurde die Platte jeweils sorgfältig auf Zellstoff ausgeklopft.

2.2.3 Sandwich-EIA-Verfahren

Im Unterschied zum indirekten EIA-Verfahren wird das zu detektierende Antigen beim Sandwich-EIA durch einen an die Mikrotiterplatte gebundenen, spezifischen Antikörper (Fangantikörper) immobilisiert. Mit Hilfe eines enzymmarkierten Detektionsantikörper kann das Antigen nach Zugabe von Chromogen/Substrat-Lösung analog zum indirekten EIA nachgewiesen und quantifiziert werden.

Als Fangantikörper wurden antikörperhaltige ZKÜ oder gereinigte Antikörper (100 µl/Kavität) in gleichbleibender Konzentration verwendet. Bei der Verwendung von ZKÜ wurden die Mikrotiterplatten zunächst über Nacht mit einem Sekundärantikörper (Anti-Maus Antikörper) beschichtet, erst im Anschluss erfolgte die einstündige Inkubation mit den ZKÜ. Freie Bindungsstellen wurden analog zum indirekten EIA mit 3 % (g/v) Casein/PBS (150 µl/Kavität) blockiert. Das Antigen (*B. cereus* KÜ bzw. rekombinante HBL-Komponenten) wurde in PBS bzw. PBS unter Zusatz von 0,5 % (v/v) Tween 20 verdünnt und in gleichbleibender Konzentration zum Screening der Antikörper-produzierenden Hybridomzelllinien oder als serielle Verdünnungsreihe zur Ermittlung der Testsensitivität, aufgetragen (100 µl/Kavität). Nach einstündiger Inkubation wurde überschüssiges Antigen abgesaugt und die Platte gewaschen. Zur Detektion wurden Peroxidase-markierte HBL-Komponenten-spezifische mAk verwendet, die verdünnt in 1 % (g/v) Casein/PBS (100 µl/Kavität) eingesetzt wurden. Das weitere Vorgehen sowie alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten analog zu dem unter III.2.2.2 beschriebenen indirekten EIA.

2.2.4 Herstellung von Peroxidase-markierten Antikörpern

Zur Herstellung der enzymmarkierten Antikörperkonjugate wurden die mAk zunächst über Nacht bei 4 °C gegen Kaliumphosphatpuffer (10 mmol/l) dialysiert und dann mit der aktivierten Peroxidase (HRP) im molaren Verhältnis von 4,5:1 (HRP:mAk) versetzt.

Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung sofort mit Natriumcarbonatpuffer (0,5 mol/l) auf 8,5 eingestellt und der Ansatz für 2 h bei RT unter Lichtabschluss und leichtem Rühren inkubiert. Im nächsten Schritt wurde zunächst Triethanolamin-Lösung, dann zum Stoppen der Reaktion Natriumborhydrid-Lösung zugegeben. Nach einem kurzen Inkubationsschritt (30 min, 4 °C) erfolgte die erneute Zugabe von Triethanolamin-Lösung. Im Anschluss wurde der Ansatz für weitere 2 h bei 4 °C inkubiert, das Konjugat dann mit Glycin-Lösung versetzt und dreimal über Nacht bei 4 °C gegen PBS mit Zusatz von 10 mmol/l Glycin dialysiert. Zum Schluss wurde das Konjugat mit 1 % (g/v) BSA und StabilZyme[®] HRP Conjugate Stabilizer (SurModics) stabilisiert und mit 0,01 % (g/v) Thimerosal konserviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.5 Immunoblot

Um die Reaktivität der gewonnenen Antikörper mit den HBL-Komponenten zu überprüfen, wurden die Proteine zunächst über SDS-PAGE (III.2.3) aufgetrennt und dann mittels Semidry Blotting Verfahren in einer NovaBlot Multiphor II Blottingkammer von den Polyacrylamidgelen auf eine Immobilon-P Membran transferiert (1 h, 600 V, 17 mA, 30 W).

Anschließend wurde die PVDF-Membran zur Markierung der Eichproteine mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Freie Bindungsstellen wurden mit Absättigungslösung entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C blockiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper (polyklonales Mäuseantiserum, ZKÜ oder mAk) verdünnt in Absättigungslösung für 1 h bei RT auf die Membran aufgetragen. Zum Entfernen von ungebundenem Antikörper, wurde die Membran 3x10 min in PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20 auf dem Taumelschüttler gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper (Pferd Anti-Maus-HRP, 1:2.000 in Absättigungslösung) wurde die Membran erneut 3x10 min gewaschen und zusätzlich 2x10 min mit reinem PBS gespült. Zuletzt wurde die Membran für 3 min im Dunkeln mit Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal[®] ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate) inkubiert und die Lumineszenzentwicklung über eine Kodak Image Station 200 MM detektiert.

2.2.6 Dot Blot Assay

Um die Interaktion von HBL-L1 und HBL-L2 zu testen, wurde ein Dot Blot Assay durchgeführt. Bei diesem Blotting-Verfahren werden Proteine direkt ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung punktförmig auf eine Membran aufgetragen. Nach dem Blotten wird die Membran analog zum Immunoblot (III.2.2.5) weiterbehandelt.

Eine in Methanol aktivierte Immobilon-P Membran wurde zunächst jeweils 5 min in A. dest. und PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran zusammen mit in PBS getränkten Filterpapieren (Electrode Paper Novablot) in eine Dot Blot-Kammer gelegt, diese fest verschlossen und ein Vakuum angeschlossen. Die Kavitäten wurden einige Male mit PBS gespült, danach wurde in PBS verdünntes rekombinantes HBL-L1 (rHBL-L1) in gleichbleibender oder ansteigender Konzentration (100 µl/Kavität) auf die Membran aufgetragen. Im nächsten Schritt wurden die Kavitäten erneut mit PBS gewaschen. Während des gesamten Beschichtungsvorgangs wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, ein Trockenlaufen der Membran zu vermeiden. Nach Entfernen der beschichteten Membran aus der Dot Blot-Kammer wurden freie Bindungsstellen über Nacht bei 4 °C mit Absättigungslösung blockiert. Im Anschluss wurde die Membran mit in PBS verdünntem HBL-L2 (rekombinant oder IA-gereinigt) in gleichbleibender oder ansteigender Konzentration überschichtet und für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschriff (3x10 min) in PBS mit Zusatz von 0,1 % Tween 20 zur Entfernung von überschüssigem Protein, wurde gebundenes HBL-L2 mit dem spezifischen Primärantikörper mAk 1H9 sowie Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern analog zu dem unter III.2.2.5 beschriebenen Verfahren nachgewiesen.

2.3 SDS-Gelelektrophorese und SYPRO Ruby-Protein-Färbung

Die elektrophoretische Auftrennung von proteinhaltigen Proben erfolgte mittels Flachbett-Gelelektrophorese (PhastSystem von Pharmacia) auf Gradienten-Polyacrylamidgelen (10 - 15 %). Die Proben (20 µl) wurden dazu zunächst mit 10 µl SDS-Puffer und 3 µl Bromphenolblau-Lösung gemischt und für 10 min im Wasserbad gekocht. Je Ansatz wurde 1 µl auf die Gele aufgetragen und elektrophoretisch bei 250 V, 10 mA, 3 W, 65 Vh und 15 °C für ca. 25 min aufgetrennt.

Nach der Auftrennung wurden die Proteine entweder mittels Semidry-Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen (III.2.2.5) oder die Gele zur Quantifizierung der Proteinmenge mittels SYPRO[®] Ruby Protein Gel Stain (Thermo Fisher) angefärbt. SYPRO Ruby ist ein hochsensitiver Fluoreszenzfarbstoff vom Ruthenium-Chelatkomplex-Typ der zur Proteincharakterisierung und -quantifizierung verwendet wird.

Dabei wurden die Gele nach elektrophoretischer Auftrennung zunächst 2x30 min mit Fixierlösung auf dem Taumelschüttler inkubiert und dann über Nacht bei RT mit dem Fluoreszenzfarbstoff überschichtet. Nach Spülen mit Waschlösung (2x20 min) und A. dest. (2x5 min) wurde die Intensität der Fluoreszenz-markierten Proteinbanden über eine Kodak Image Station 200 MM detektiert. Im Anschluss wurde eine densitometrische Proteinquantifizierung mit der TotalLab Nonlinear Dynamics Image Analysis Software (TotalLab) durchgeführt. Als Referenz wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

2.4 Generierung und Selektion von Hybridomzelllinien

Zur Etablierung monoklonaler Antikörper zum Nachweis der Hämolyisin BL-Komponenten wurden unter Verwendung der Hybridom-Technik Hybridomzelllinien generiert. Dazu wurden die *Lnn. axillares* und die Milzen ausgewählter Mäuse steril entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Unter Einwirkung von Polyethylenglykol 1.500 wurden diese mit murinen Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 (DSMZ) fusioniert. Die resultierenden Fusionsprodukte wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und für 10 d bei 37 °C in einem Brutschrank mit 7 % CO₂-Atmosphäre auf mit murinen Peritonealmakrophagen beschichteten Mikrotiterplatten vermehrt oder für eine spätere Verwendung bei -80 °C kryokonserviert.

Nach zehn Tagen wurde ein Screening der ZKÜ auf Produktion von Antikörpern gegen die Einzelkomponenten von HBL durchgeführt. Dieses erfolgte unter Verwendung von indirekten EIAs bzw. zum Screening auf HBL-B-spezifische Antikörper auch mit Sandwich-EIAs. Positive Zelllinien wurden mindestens dreimal mittels Endpunktverdünnung kloniert und weiter vermehrt. Ausgewählte Zelllinien wurden in Bioreaktoren (miniPerm[®] oder CELLline[™] CL 1.000) massenproduziert und anschließend die antikörperhaltigen ZKÜ mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, über Protein A affinitätschromatographisch aufgereinigt und unter Zusatz von 0,1 % (g/v) Natriumazid bei 4 °C gelagert.

2.5 WST-Zellkulturtest

Zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität der *B. cereus* Kulturüberstände wurden diese in WST-Zellkulturtests unter Verwendung von A549-, RAW 264.7- bzw. Vero-Zellen analysiert. Zunächst wurde in den Spalten 1 - 10 einer Mikrotiterplatte eine log₂-Verdünnungsreihe der in Zellkulturmedium verdünnten *B. cereus* KÜ angelegt (100 µl/Kavität), die Spalten 11 und 12 wurden als toxfreie Kontrollansätze verwendet. Die Reihen A und H wurden zur Vermeidung von Randeffekten nicht belegt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zugegeben (100 µl/Kavität). Die optimale Zellzahl beträgt dabei für A549- und RAW 264.7-Zellen 2×10^4 pro Kavität und für Vero-Zellen 1×10^4 Zellen pro Kavität. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C im CO₂-Brutschrank (7 % CO₂-Atmosphäre) wurde die Zellschädigung zunächst mikroskopisch beurteilt, dann pro Kavität 100 µl Medium entnommen, 10 µl WST-1 Reagenz zugegeben und erneut im CO₂-Brutschrank bis zur Entwicklung einer ausreichenden Farbintensität inkubiert. Metabolisch aktive Zellen reduzieren hierbei das Tetrazoliumsalz WST zum Farbstoff Formazan, dessen Intensität photometrisch in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm gemessen werden kann. Zur Ermittlung der Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe gewählt, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer 50 %igen Reduktion der Spaltungsaktivität der Zellen führte.

Zur Ermittlung möglicher neutralisierender Eigenschaften der gegen die HBL-Komponenten gerichteten Antikörper (polyklonale Mausantiseren oder mAk) wurden die Antikörper simultan mit dem KÜ einer Nhe-Deletionsmutante in den Zytotoxizitätstest eingesetzt. Dazu wurde nach Anlegen einer log₂-Verdünnungsreihe der toxinhaltigen *B. cereus* Überstände in jede Kavität (auch toxfreier Kontrollansatz) zusätzlich 10 µl Antikörper (Antiseren, einzelne mAk oder mAk-Kombinationen) pipettiert. Als Kontrolle wurden parallel Ansätze mit Zusatz von irrelevanten mAk vom gleichem Ig-Isotyp bzw. Verdünnungen von *B. cereus* KÜ ohne Zugabe von mAk angelegt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension (100 µl/Kavität) zugegeben, das weitere Verfahren erfolgte analog zum oben beschriebenen Zytotoxizitätstest. Zur vergleichenden Darstellung der Neutralisationskapazität der untersuchten Antikörper wurde die Abnahme der Zytotoxizitätstiter bei Zugabe HBL-Komponenten-spezifischer Antikörper im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Antikörper bzw. mit irrelevanten Antikörpern (100 %ige Zytotoxizität) prozentual berechnet.

IV ERGEBNISSE

1 Generierung monoklonaler Antikörper

Als Marker für die Produktion des Enterotoxins Hämolyysin BL bei *B. cereus* Isolaten wurde bislang fast ausschließlich ein HBL-L2-spezifischer Sandwich-EIA eingesetzt. Der alleinige Nachweis dieser HBL-Komponente ist aber zum einen nicht ausreichend, um eine Aussage über die tatsächliche biologische Aktivität des Toxins zu treffen, da es hierfür das Vorhandensein aller HBL-Komponenten benötigt. Zum anderen zeigten neuere Daten (Jeßberger *et al.*, 2014), dass die Aktivität von HBL vielmehr durch die HBL-L1-Komponente determiniert wird, weswegen dieses Protein das geeignetere Markerprotein darstellen könnte. Die Detektion von HBL-B und HBL-L1 war bislang nur in indirekten EIAs möglich. Ziel der Arbeit war es deshalb, monoklonale Antikörper gegen diese beiden HBL-Komponenten zu entwickeln, um den spezifischen und sensitiven Nachweis aller Einzelkomponenten in auf mAk basierenden Sandwich-EIA-Systemen zu ermöglichen.

1.1 Herstellung des Immunogens

1.1.1 Auswahl eines geeigneten *B. cereus* Stamms

Die Aminosäuresequenzen der HBL-Komponenten sind innerhalb der *B. cereus*-Gruppe hoch konserviert, weshalb für die Immunogen-Herstellung nur ein einzelner *B. cereus* Stamm zur Toxinproduktion ausgewählt wurde. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf einer hohen HBL-Produktivität, welche in indirekten (HBL-B und HBL-L1) bzw. Sandwich-EIAs (HBL-L2) mit den aus früheren Arbeiten stammenden mAk ermittelt wurde. Anhand bereits vorhandener EIA-Daten zur HBL-L2-Produktivität wurden die *B. cereus* Stämme MHI 162, MHI 1502, MHI 1513 und MHI 1532 aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch ausgewählt und ihre relative HBL-Produktivität in indirekten (III.2.2.2) bzw. Sandwich-EIAs (III.2.2.3) verglichen. In Tabelle 6 ist die durchschnittliche HBL-Produktivität der ausgewählten Stämme anhand der reziproken Antigen-Titer dargestellt. Die Titer wurden definiert als diejenige Verdünnung der *B. cereus* KÜ, bei der im EIA noch eine Signalintensität von 1,0 erreicht wurde.

Zur Affinitätschromatographischen Aufreinigung des HBL-B sollte der spezifische mAk 1B8 verwendet werden, daher war eine hohe HBL-B-Produktivität wichtig. MHI 1532 zeigte in den orientierenden Untersuchungen im indirekten EIA die höchsten HBL-B-Titer und wurde deshalb ausgewählt, um größere Toxinmengen zur Herstellung des Immunogens zu produzieren. In drei Anzuchten wurden insgesamt 300 ml toxinhaltiger *B. cereus* KÜ hergestellt, jede Anzucht wurde in den HBL-spezifischen EIAs getestet. Bis zur Weiterverwendung wurden die KÜ bei -20 °C tiefgefroren.

Tabelle 6: HBL-Produktivität verschiedener *B. cereus* Stämme

<i>B. cereus</i> Stamm	Relative HBL-Produktivität (Antigen-Titer) ¹		
	HBL-B	HBL-L1	HBL-L2
MHI 162	25	510	250
MHI 1502	30	390	490
MHI 1513	30	240	370
MHI 1532	90 ± 20 ²	220 ± 60 ²	540

¹ Die angegebenen Antigen-Titer wurden in indirekten (HBL-B und HBL-L1) bzw. Sandwich-EIAs (HBL-L2) ermittelt

² Mittelwert ± Standardabweichung von drei unterschiedlichen Anzuchten

1.1.2 Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von HBL-B und L1

Aus verschiedenen Studien zur Wirkungsweise des Nhe-Komplexes (Didier *et al.*, 2012, Heilkenbrinker *et al.*, 2013) ist bekannt, dass NheB und NheC in Lösung miteinander interagieren. Die bekannten Sequenzhomologien, mit besonders hohen Ähnlichkeiten zwischen HBL-B und NheC bzw. HBL-L1 und NheB, ließen vermuten, dass auch HBL-B und HBL-L1 in Lösung Komplexe bilden. Deswegen wurden bei der immunaффinitätschromatographischen (IA) Reinigung des HBL-B mit dem spezifischen mAk 1B8 die jeweiligen Durchläufe bzw. Eluate parallel auch auf HBL-L1 unter Verwendung des L1-spezifischen mAk 1E9 untersucht. Die in IV.1.1.3 dargestellten Ergebnisse bestätigten eine Interaktion zwischen der B- und L1-Komponente, beide Proteine konnten im Eluat nachgewiesen werden. Für die Herstellung des Immunogens wurde daher auf eine zusätzliche spezielle L1-spezifische IA-Reinigung verzichtet.

Zur Immunogenherstellung wurde die Immunaффinitätschromatographie wie unter III.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Reinigung erfolgte dabei jeweils kurz vor der Immunisierung, um möglichst frische Präparationen des Immunogens zu erhalten. Dabei wurde 45 - 50 ml toxischer KÜ des Stammes MHI 1532, der vor dem Auftragen 1:3 in PBS verdünnt wurde, als Probe aufgetragen. In sechs Läufen konnten so insgesamt 312,0 µg gereinigtes Toxin gewonnen werden. Die Läufe wurden teilweise gepoolt und für jede Immunisierung mittels Polyethylenglykol 20.000 (PEG) auf 0,5 – 1,0 ml konzentriert.

1.1.3 Bilanzierung der Aufreinigung

Zur Überprüfung der Effizienz des IA-Verfahrens wurden die unterschiedlichen Fraktionen, wie unter III.2.2.2 bzw. 2.2.3 beschrieben, als serielle Verdünnungsreihen in indirekten (HBL-B u. HBL-L1) bzw. Sandwich-EIAs (HBL-L2) zum spezifischen Nachweis der jeweiligen Komponente eingesetzt. Das Eluat wurde dabei vorher nicht in PBS dialysiert, sondern direkt nach dem Neutralisieren mit Tris (1 mol/l) verwendet. Anhand des reziproken Antigen-Titers und dem Volumen der Fraktion konnte eine Bilanzierung vorgenommen werden, die Werte für die *B. cereus* KÜ vor dem Auftrag wurden hierbei als 100 %-Wert gesetzt. Die für die einzelnen Komponenten ermittelten Rückhaltequoten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Bilanzierung der IA-Reinigung der HBL-Einzelkomponenten B, L1 und L2 mittels HBL-B-spezifischen mAk 1B8 (n=6). Die für NheB angegebenen Werte wurden zur Kontrolle ermittelt, um eine unspezifische Bindung der Proteine an das Immunosorbens auszuschließen.

Fraktion	HBL-Komponente			Nhe-Komponente
	HBL-B	HBL-L1	HBL-L2 ¹	NheB ¹
Proben-durchlauf	19 % ± 5 %	55 % ± 12 %	70 %	95 %
Wasch-durchlauf	1 % ± 0,8 %	3 % ± 1 %	10 %	2 %
Bindung an die IA-Säule	80 % ± 5 %	42 % ± 12 %	20 %	3 %

¹ Für HBL-L2 und NheB liegen nur orientierende Daten (n=2) vor

Es zeigte sich, dass durchschnittlich 80 % des im *B. cereus* KÜ enthaltenen HBL-B bzw. 42 % des enthaltenen HBL-L1 an die IA-Säule gebunden wurden, obwohl der verwendete mAk 1B8 hochspezifisch für HBL-B ist (Abb. 3B). Ein als Kontrollansatz durchgeführter Sandwich-EIA (Moravek *et al.*, 2006) zum spezifischen Nachweis von NheB zeigte, dass die Bindung der HBL-Komponenten an die IA-Säule nicht auf eine unspezifische Bindung der Proteine an die Gelmatrix zurückzuführen war. Nur 3 % des im *B. cereus* KÜ enthaltenen NheB konnte im Probendurchlauf detektiert werden, wohingegen 97 % im Durchlauf wiedergefunden werden konnten.

Eine Bestätigung der EIA-Resultate für HBL-B und HBL-L1 erfolgte mittels Immunoblot, wie unter III.2.2.5 beschrieben, mit den spezifischen mAk 1B8 und mAk 1E9. Wie in Abbildung 3A dargestellt, konnte auch mit diesem Verfahren sowohl HBL-B als auch HBL-L1 im Eluat nach Immunaффinitätschromatographie detektiert werden. Überraschenderweise war auch ein geringer Anteil des HBL-L2 (ca. 20 %) im Eluat nachweisbar, weitere in Tabelle 7 dargestellte EIA-Analysen bestätigten diese Größenordnung.

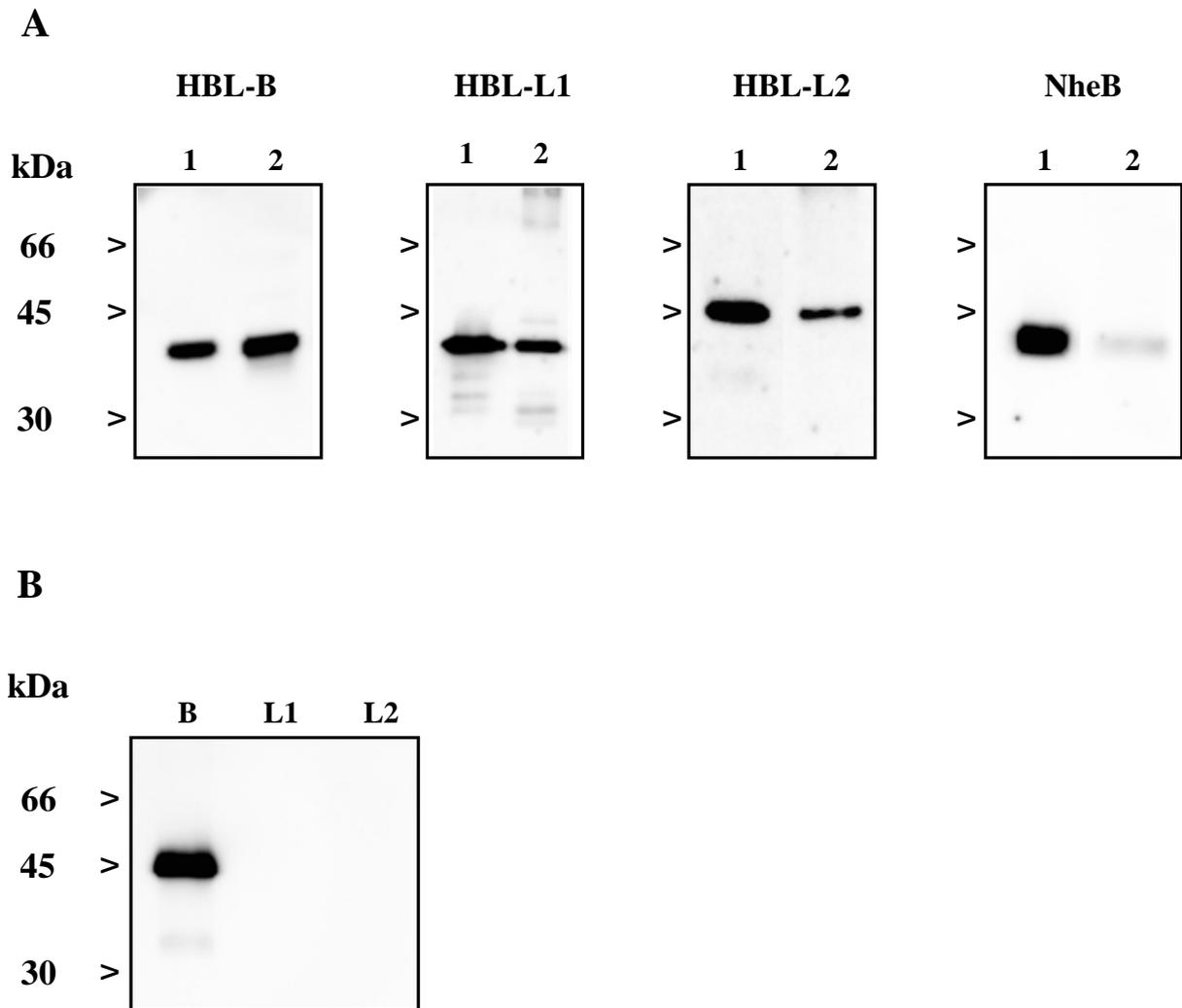


Abbildung 3: (A) Analyse der IA-Reinigung mittels Immunoblot. Zum Nachweis wurden die HBL-Komponenten-spezifischen mAk 1B8 (HBL-B), mAk 1E9 (HBL-L1) und mAk 8B12 (HBL-L2) bzw. der NheB-spezifische mAk 1E11 eingesetzt, dargestellt ist jeweils der Probenauftrag (Spur 1) bzw. das Eluat (Spur 2); (B) Reaktivität von mAk 1B8 im Immunoblot mit rekombinanten HBL-Komponenten.

1.1.4 Quantifizierung der Toxinmenge

Zur Bestimmung der Konzentration von HBL-B bzw. HBL-L1 in der Toxinpräparation wurden die proteinhaltigen Proben, wie unter III.2.3 beschrieben, zunächst mittels Flachbett-Gelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt, dann mit dem Farbstoff SYPRO Ruby angefärbt, die Proteinbanden über eine Kodak Image Station 200 MM detektiert und schließlich mithilfe der TotalLab Nonlinear Dynamics Image Analysis Software (TotalLab) densitometrisch quantifiziert (Abb. 4). Da vorzugsweise mAk gegen HBL-B und HBL-L1 generiert werden sollten, wurde zur Quantifizierung nur die Bande bei 38-39 kDa herangezogen, diese entspricht HBL-B bzw. HBL-L1. Aufgrund des sehr ähnlichen Molekulargewichts konnten die beiden Komponenten durch die Verwendung von SDS-Minigelen nicht als einzelne Banden dargestellt werden. Die Bande bei 43 kDa entspricht HBL-L2 und wurde nicht quantifiziert. Mithilfe verschiedener BSA-Konzentrationen (20 µg/ml, 10 µg/ml bzw. 5 µg/ml) als Referenz konnten Toxinmengen zwischen 1,2 und 8,3 µg/ml in den hochreinen Präparationen ermittelt werden. Pro Reinigungsansatz wurden 19,2 – 132,8 µg des HBL-B/HBL-L1 erhalten (Tab. 8). Das Eluat von Lauf 6 wurde ohne vorherige PEG-Konzentrierung eingesetzt, die deutlich höhere Toxinkonzentration, die dabei ermittelt werden konnte, weist darauf hin, dass die Aufkonzentrierung mit PEG zu deutlichen Verlusten führte.

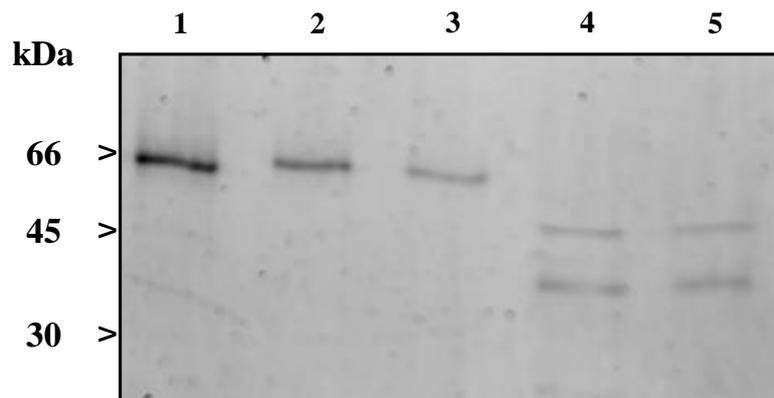


Abbildung 4: SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Quantifizierung der HBL-Konzentration in IA-gereinigten Toxinpräparationen. Spur 1 - 3: BSA (20 µg/ml, 10 µg/ml bzw. 5 µg/ml), Spur 4 und 5: IA-Eluate. Die Bande bei 38 - 39 kDa entspricht HBL-B/HBL-L1, die Bande bei 43 kDa HBL-L2.

Tabelle 8: Mittels SYPRO Ruby-Protein-Färbung ermittelte Konzentrationen von HBL-B/-L1 im Eluat (16 ml) der IAC-Läufe 1 - 6

HBL-B/HBL-L1		
Lauf	Konzentration im Eluat (µg/ml)	Toxinmenge (µg)
1	3,5	56,0
2	3,1	49,6
3	1,7	27,2
4	1,7	27,2
5	1,2	19,2
6¹	8,3	132,8
Mittelwert	$3,5 \pm 3,0$	$52,0 \pm 42,0$

¹Das Eluat wurde im Gegensatz zu Lauf 1 - 5 zur Quantifizierung mittels SYPRO Ruby nicht mit PEG aufkonzentriert

1.2 Immunisierung von Mäusen

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Komponenten des *B. cereus* Enterotoxins Hämolysin BL wurden unter Verwendung des in IV.1.1. beschriebenen Immunogens fünf Mäuse (Zuchtlinien BALB/c bzw. Hybridlinie BALB/c x [NZW x NZB]) immunisiert (Tab. 9). Den Mäusen wurden jeweils 15 µg gereinigtes HBL/Maus (Grundimmunisierung und 1. Restimulierung) bzw. 12 µg gereinigtes HBL/Maus (2. Restimulierung) appliziert. Nach einer Grundimmunisierung wurde zweimal restimuliert. Dazu wurde die gereinigte und mittels PEG konzentrierte Toxinpräparation in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) verdünnt und im Verhältnis 1+1 in Sigma-Adjuvans (gelöst in 1ml NaCl) emulgiert. Bei diesem Adjuvans handelt es sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion, die eine schonendere Alternative zum häufig verwendeten Freund'schen Adjuvans darstellt. Die erste Restimulierung in Woche 9 nach Immunisierungsbeginn erfolgte, wie auch die Grundimmunisierung, intraperitoneal. In Woche 15 nach Immunisierungsbeginn wurde eine zweite Restimulierung, bei der das Immunogen subkutan appliziert wurde, durchgeführt. Zur Kontrolle des Immunisierungserfolgs wurde jeweils vier Wochen nach der ersten bzw. zweiten Restimulierung Blut entnommen. Drei Tage vor der geplanten Zellfusion wurde den ausgewählten Mäusen 20 µg gereinigtes HBL/Maus, verdünnt in NaCl, appliziert.

Tabelle 9: Immunisierung von Mäusen mit IA-gereinigtem HBL

Woche	Maßnahme	Adjuvans/Puffer	Applikation	Toxinmenge
0	Grund-immunisierung	Sigma/NaCl	i.p.	15 µg/Maus
9	1. Restimulierung	Sigma/NaCl	i.p.	15 µg/Maus
13	1. Blutentnahme			
15	2. Restimulierung	Sigma/NaCl	s.c.	12 µg/Maus
19	2. Blutentnahme			
22/23	3. Restimulierung	-/NaCl	i.p., s.c.	20 µg/Maus

2 Charakterisierung der polyklonalen Mausantiseren

Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurden die polyklonalen Antiseren in indirekten und Sandwich-EIAs zur Ermittlung der Antikörper-Titer bzw. der relativen Affinität sowie in Zellkulturtests mit Vero-Zellen zur Ermittlung möglicher neutralisierender Eigenschaften eingesetzt. Basierend auf den dabei erzielten Ergebnissen wurden drei Mäuse für die Zellfusionen zur Generierung von mAk ausgewählt.

2.1 Antikörper-Titer

Die von den Versuchstieren entnommenen Blutproben wurden zur Überprüfung des Immunisierungserfolgs, wie unter III.2.2.2 beschrieben, in indirekte EIAs eingesetzt. Dazu wurden serielle Verdünnungsreihen der Seren auf den mit konstanten Antigen-Konzentrationen beschichteten Mikrotiterplatten angelegt und die reziproken Titer ermittelt. Als Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe eines Antiserums definiert, bei der eine Signalintensität von 1,0 erzielt wurde. Als Antigen-Beschichtung dienten *B. cereus* KÜ des Immunogenstamms MHI 1532, die dazu 1:10 in PBS verdünnt wurden.

Bereits die nach der ersten Restimulierung entnommenen Seren wiesen hohe Antikörper-Titer im Bereich von 1:54.000 (Maus V) bis > 1:128.000 (Maus I - IV) auf, ein zur Kontrolle untersuchtes Antiserum eines nicht mit *B. cereus* Enterotoxin Hämolyysin BL immunisierten Tieres (Null-Serum) zeigte Titer von < 1:100. Nach der zweiten Restimulierung konnte kein ausgeprägter Booster-Effekt beobachtet werden, die Titer der Seren bewegten sich im Vergleich zur ersten Blutentnahme in etwa auf dem gleichen Niveau. Prinzipiell bestätigten die Untersuchungen die Effizienz des verwendeten Adjuvans und die hohe Immunogenität der hergestellten Toxinpräparation.

2.2 Relative Affinität

Zur Bestimmung der relativen Affinität wurden die Mäuseseren ebenfalls im indirekten EIA (III.2.2.2) untersucht. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit seriellen Verdünnungsreihen des Antigens beschichtet und die Antiseren im Überschuss mit einer konstanten Verdünnung von

1:1.000 (*B. cereus* KÜ) bzw. 1:2.000 (rekombinante HBL-Komponenten) aufgetragen. Die Affinität eines spezifischen Serums ist umso höher, je höher die Verdünnungsstufe des Antigens ist, bei der noch eine Absorption von 1,0 erzielt werden kann. In dieser Weise wurden die relativen Affinitäten der Mäuseseren für KÜ des Immunogenstamms MHI 1532 sowie rekombinante HBL-Komponenten ermittelt (Abb. 5). Auf eine Quantifizierung der rekombinanten Toxinkomponenten wurde verzichtet, da in diesen orientierenden Versuchen zunächst nur getestet werden sollte, ob mit dem verwendeten Immunogen eine Immunantwort gegen die beiden HBL-Komponenten B und L1 induziert werden konnte.

Prinzipiell korrelierten die relative Affinität der Mäuseseren und die Höhe der Antikörper-Titer. So zeigte Maus I sowohl die höchsten Antikörper-Titer als auch die höchsten relativen Affinitäten für den *B. cereus* KÜ, wohingegen Maus V die niedrigsten Antikörper-Titer und Affinitäten aller immunisierten Mäuse aufwies. Alle Antiseren reagierten sowohl mit rHBL-B als auch rHBL-L1, wobei die Affinitäten für beide Komponenten bei Maus I und Maus II am höchsten waren. Aufgrund der ausgeprägten Affinität für rHBL-B und rHBL-L1 sowie der zuvor ermittelten hohen Antikörper-Titer wurde Maus II für die Zellfusion ausgewählt.

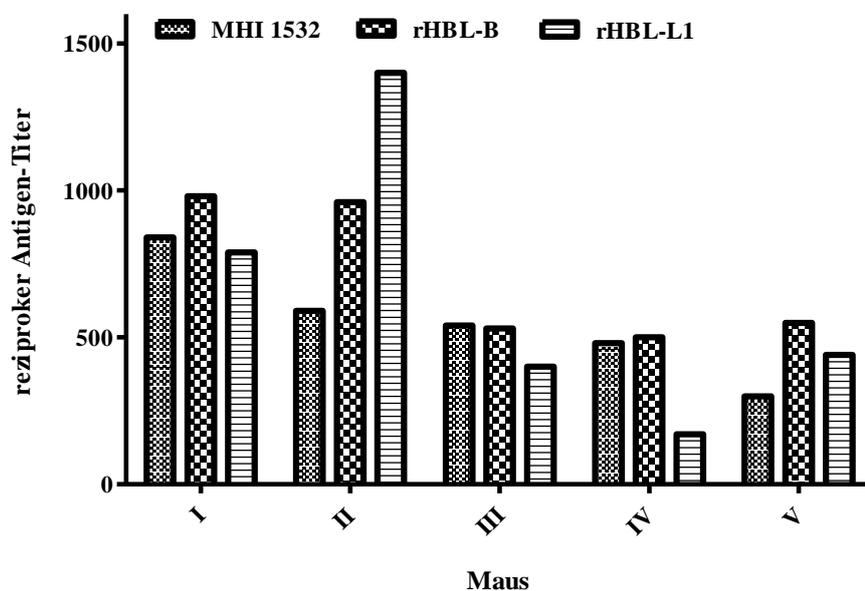


Abbildung 5: Relative Affinität der Mäuseseren I - V für KÜ von MHI 1532 bzw. rekombinante HBL-Komponenten B und L1

2.3 WST-Zellkulturtest

Um zu testen, ob die Antiseren neutralisierende Eigenschaften gegenüber dem *B. cereus* Enterotoxin Hämolysin BL besitzen, wurden Kulturüberstände einer Nhe-Deletionsmutante mit den Seren (Endverdünnung 1:100) versetzt und im WST-Test mit Vero-Zellen analysiert (III.2.6). Als Kontrolle wurde der KÜ ohne Zugabe von Antiserum bzw. unter Zusatz von Null-Serum mitgeführt. Zur Bestimmung der Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe gewählt, die im Vergleich zur toxinfreien Zellkontrolle zu einer 50 %igen Reduktion der Spaltungsaktivität der Zellen führte. Die Zugabe von Null-Serum resultierte in einer geringfügigen Steigerung der Zytotoxizität. Durch Zugabe der HBL-spezifischen Mäuseantiseren konnte hingegen die Zytotoxizität des KÜ um 75 - 90 % reduziert werden (Abb. 6).

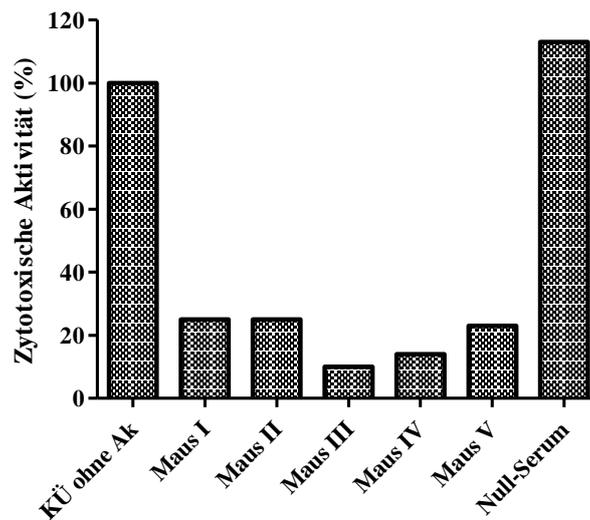


Abbildung 6: Zytotoxische Restaktivität von KÜ einer *B. cereus* Nhe-Deletionsmutante im WST-Zellkulturtest mit Vero-Zellen nach Vorinkubation mit HBL-spezifischen Mäuseantiseren

Besonders ausgeprägte neutralisierende Eigenschaften konnten für die Antiseren der Mäuse III und IV beobachtet werden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sowie der Resultate im EIA und Immunoblot wurden Maus III und Maus IV ebenfalls für die Zellfusionsexperimente ausgewählt.

3 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden drei Zellfusionen unter Verwendung der Hybridom-Technik durchgeführt (III.2.4). Basierend auf den Selektionskriterien hohe Antikörper-Titer, ausgeprägte Affinitäten für HBL-B und HBL-L1 sowie neutralisierende Eigenschaften der Antiseren im Zellkulturtest wurden die Mäuse II, III und IV (entspricht Fusion I, II bzw. III) ausgewählt. Das Screening des Zellmaterials auf Produktion von Antikörpern gegen die *B. cereus* Enterotoxin Hämolysin BL-Komponenten B und L1 erfolgte vor allem mittels indirekter EIAs, HBL-B-reaktive Klone wurden zusätzlich auch in einer zu diesem Zweck etablierten Sandwich-EIA-Variante identifiziert (IV.3.4). Als Antigen dienten sowohl natürliche *B. cereus* KÜ als auch rekombinant hergestellte HBL-Komponenten. Im Verlauf der Untersuchungen konnten so 35 mAk-produzierende Hybridomzelllinien selektiert und etabliert werden.

Die Überprüfung der Antikörperproduktivität der generierten Hybridomzelllinien sowie die Bestimmung der relativen Affinität erfolgte mit indirekten EIAs. Für HBL-B-spezifische Antikörper wurde die relative Affinität auch im oben genannten Sandwich-EIA ermittelt. Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurden acht mAk für die Massenproduktion bzw. vier mAk zur Herstellung von Antikörper-Enzymkonjugaten ausgewählt.

3.1 Produktivität der Hybridomzelllinien

Zur Abschätzung der Produktivität der etablierten Hybridomzelllinien wurden indirekte EIAs wie unter III.2.2.2 sowie IV.2.1 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit KÜ von *B. cereus* MHI 1532 (1:10 in PBS) beschichtet sowie anschließend mit seriellen Verdünnungsreihen der zu überprüfenden Zellkulturüberstände (ZKÜ) inkubiert. Als Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe eines ZKÜ definiert, bei der eine Signalintensität von 1,0 erreicht wurde (Tab. 10). Es zeigte sich, dass die Produktivität der Hybridomzelllinien teilweise deutlich variierte. So konnten reziproke Titer von 70 (mAk 1E8) bis > 21.900 nachgewiesen werden (mAk 12D9, mAk 1E2, mAk 1E10 und mAk 2H10).

Tabelle 10: Übersicht zu den wesentlichen Charakteristika der etablierten Hybridomzelllinien bzw. monoklonalen Antikörpern

Fusion	Zelllinie	Ig-Subtyp	Spezifität	reziproke Antikörper-Titer	indirekter EIA		kompetitive Hemmung	Sandwich-EIA ¹
					Relative Affinität ²			Nachweisgrenze
					<i>B. cereus</i> KÜ (MHI 163)	rekombinante HBL-Komponenten		<i>B. cereus</i> KÜ (MHI 1532)
I	1B3	IgG ₁	HBL-B	7.000	60	800	(+)	1:160
I	1C10	IgG ₁	HBL-B	15.400	140	760	(+)	
I	1C11	IgG _{2b}	HBL-B	16.200	50	450	(+)	1:320
I	1D12	IgG _{2a}	HBL-B	13.900	100	480	-	1:360
I	1E7	IgG ₁	HBL-B	6.300	120	620	+	1:100
I	1E8	- ³	HBL-B	70	30	100	+	
I	1K9	IgG ₁	HBL-B	6.000	80	490	-	1:100
I	2G4	IgG ₁	HBL-B	12.700	120	690	++	
I	2H7	IgM	HBL-B	3.400	80	540	-	
I	11A5	IgG ₁	HBL-B	9.000	170	900	+	
I	1G8	IgG ₁	HBL-B/HBL-L1	850	130	900/610	+	
I	11H5	IgG ₁	HBL-B/HBL-L1	20.500	230	410/680	++	
I	12D9	IgG ₁	HBL-B/HBL-L1	> 21.900	340	580/890	+	
I	12D12	IgG _{2a}	HBL-B/HBL-L1	15.900	70	180/440	-	
II	1B10	IgG ₁	HBL-B	580	30	< 10	-	
II	1D7	IgG ₁	HBL-B	6.300	110	270	-	1:200
II	1D9	-	HBL-B	250	60	310	-	

Fortsetzung Tabelle 10

Fusion	Zelllinie	Ig-Subtyp	Spezifität	reziproker Antikörper-Titer	indirekter EIA		kompetitive Hemmung	Sandwich-EIA ¹
					Relative Affinität ²			Nachweisgrenze
					<i>B. cereus</i> KÜ (MHI 163)	rekombinante HBL-Komponenten		<i>B. cereus</i> KÜ (MHI 1532)
II	1E1	IgG _{2b}	HBL-B	6.400	40	330	+	1:280
II	1E4	- ³	HBL-B	2.900	60	370	-	
II	1E5	-	HBL-B	6.700	60	200	-	
II	1E7	-	HBL-B	3.500	50	250	-	
II	1F6	IgG ₁	HBL-B	1.800	30	370	-	1:80
II	2H3	IgG ₁	HBL-B	720	20	390	-	1:80
II	1D8	IgG _{2a}	HBL-L2	4.800	580	4.700	-	
III	1A10	IgG ₁	HBL-B	80	20	< 10	+	1:90
III	1B10	-	HBL-B	600	80	130	+	
III	1C9	-	HBL-B	13.700	40	360	++	
III	1C12	IgG _{2b}	HBL-B	1.400	60	140	+	1:360
III	1E2	IgG ₁	HBL-B	> 21.900	60	780	+	
III	1E10	IgG ₁	HBL-B	> 21.900	80	390	+	
III	1F9	IgG ₁	HBL-B	4.000	60	270	+	1:110
III	1H1	-	HBL-B	17.900	80	550	++	
III	2G10	IgG ₁	HBL-B	18.400	90	580	(+)	1:140
III	2H10	IgG ₁	HBL-B	> 21.900	20	230	-	1:120
III	1H9	IgG ₁	HBL-L2	820	1.500	8.400	++	

¹ Unter Verwendung eines 1B8-F(ab)-HRPs als Detektions-Ak² Dargestellt sind reziproke Antigen-Titer³ '-': Ig-Isotypisierung führte zu keinem eindeutigen Ergebnis

3.2 Relative Affinität

Zur Bestimmung der relativen Affinitäten der mAk im indirekten EIA (III.2.2.2 und IV.2.2) wurden KÜ verschiedener *B. cereus* Stämme und rekombinant hergestellte HBL-Komponenten eingesetzt. Dazu wurden Mikrotiterplatten zunächst mit seriellen Verdünnungsreihen des Antigens beschichtet und anschließend die zu untersuchenden ZKÜ im Überschuss in konstanter Konzentration (1:20 in PBS) appliziert. Die relative Affinität (reziproker Antigen-Titer) entsprach derjenigen Verdünnungsstufe, bei der eine Signalintensität von 1,0 erreicht wurde (Tab. 10).

Durch die Verwendung rekombinanter HBL-Komponenten konnte das Zielantigen der hergestellten mAk identifiziert werden. Ein Großteil der Klone, nämlich 29 Hybridomzelllinien, produzierte HBL-B-spezifische Antikörper. Vier Hybridomzelllinien produzierten Antikörper, die sowohl mit HBL-B als auch HBL-L1 reaktiv waren (Tab. 10). Zelllinien, die HBL-L1-spezifische mAk produzierten, konnten hingegen nicht selektiert werden. Für zwei ZKÜ (1D8 und 1H9), die deutlich höhere Affinitäten für *B. cereus* KÜ (MHI 163) als die restlichen ZKÜ aufwiesen (580 bzw. 1500), konnte als Zielantigen die dritte HBL-Komponente L2 identifiziert werden. Die höhere Affinität dieser beiden Antikörper (1D8 und 1H9) im Vergleich zu dem in früheren Untersuchungen etablierten L2-spezifischen mAk 8B12 (Dietrich *et al.*, 1999) konnte durch die Analyse von KÜ verschiedener *B. cereus* Isolate verifiziert werden (Abb. 7). Die gemessenen relativen Affinitäten lagen für die beiden neuen mAk jeweils um ca. Faktor 3 - 6 höher.

Aufgrund der ausgeprägten Affinitäten wurde mAk 2G4 (HBL-B-spezifisch) sowie mAk 1G8 (reaktiv mit HBL-B und HBL-L1) zur Massenproduktion ausgewählt. Zusätzlich wurde der ebenfalls mit HBL-B und HBL-L1-reaktive mAk 12D12 massenproduziert, da seine Affinität für HBL-L1 um ca. Faktor 2,5 höher war als für HBL-B. Angesichts der deutlich höheren Affinitäten von mAk 1D8 und mAk 1H9 für HBL-L2 im Vergleich zum bereits etablierten mAk 8B12, wurden im Hinblick auf eine mögliche Verbesserung des HBL-L2-Nachweissystems auch diese beiden mAk zur Massenproduktion ausgewählt.

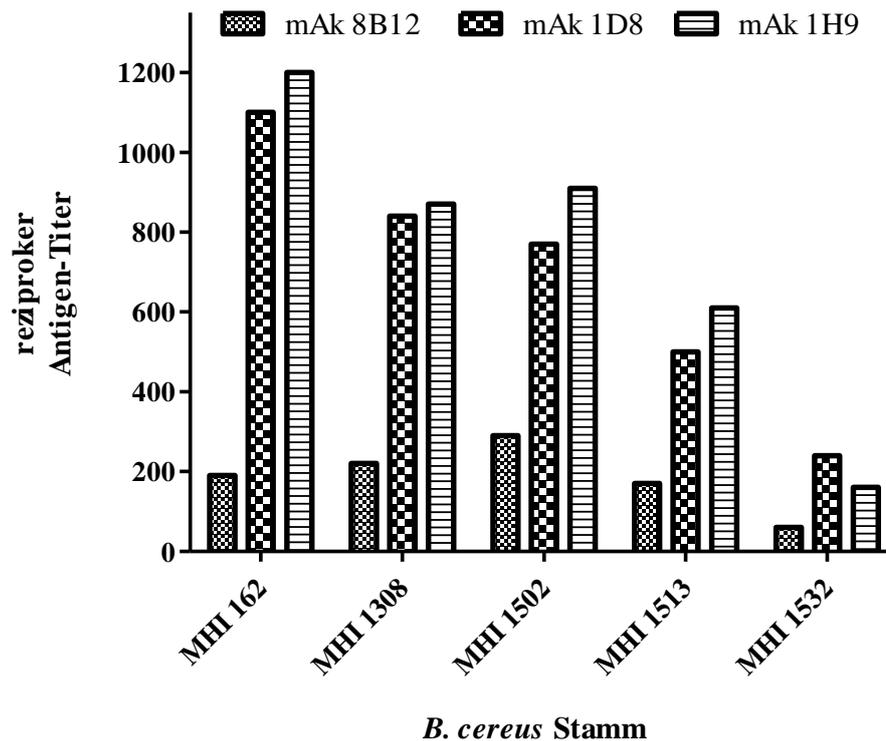


Abbildung 7: Vergleich der relativen Affinitäten HBL-L2-spezifischer mAk für KÜ verschiedener *B. cereus* Stämme

3.3 Kompetitive Hemmung

Im Hinblick auf die Etablierung von Sandwich-EIAs, bei denen im Unterschied zum indirekten EIA der Primärantikörper an die feste Phase der Mikrotiterplatte gebunden und so das in Lösung vorliegende Antigen immobilisiert wird, wurde die Reaktivität der Antikörper mit in Lösung befindlichen HBL-Komponenten überprüft. Dazu wurde ein indirekter EIA (III.2.2.2) unter kompetitiven Bedingungen durchgeführt. Mit seriellen Verdünnungsreihen des *B. cereus* KÜ MHI 1532 beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit den antikörperhaltigen ZKÜ beprobt, wobei simultan *B. cereus* KÜ (1:20 in PBS verdünnt) in die jeweiligen Kavitäten vorgelegt wurde. Als Kontrollansatz wurde parallel eine Verdünnungsreihe, die nur den zu überprüfenden ZKÜ enthielt, mitgeführt. Die Reaktivität des Antikörpers mit dem in Lösung befindlichen Antigen (HBL-Komponenten) äußerte sich in einer Hemmung der Bindung an die Festphase des EIA, d. h. nach Zugabe des Peroxidase-markierten Detektionsantikörpers wurde eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich

niedrigere Extinktion gemessen. Ähnliche Extinktionswerte im Vergleich zur Kontrolle bedeuteten hingegen, dass das freie Antigen die Bindung des Antikörpers an das immobilisierte Antigen nicht inhibieren konnte. Es zeigte sich allerdings, dass der verwendete *B. cereus* KÜ (freies Antigen) unter diesen EIA-Bedingungen eine relativ starke Tendenz zeigte, sich unspezifisch an die Mikrotiterplatte zu binden. Dadurch konnten in diesem Screening-EIA nicht immer eindeutige Ergebnisse ermittelt werden.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse derjenigen antikörperhaltigen ZKÜ aufgeführt, bei denen nach Zugabe von freiem Antigen eine deutliche Reduktion der gemessenen Extinktionswerte im Vergleich zum Kontrollansatz beobachtet werden konnte. Vor allem beim HBL-B-spezifischen mAk 1H1 und dem HBL-L2-spezifischen mAk 1H9 konnte die Bindung an immobilisiertes Antigen durch die Zugabe von freiem Antigen fast vollständig inhibiert werden. Bei nicht aufgeführten ZKÜ (Tab. 10) resultierte die Zugabe von freiem Antigen in keiner bzw. nur einer sehr geringen Reduktion der gemessenen Extinktionswerte im Vergleich zum Kontrollansatz.

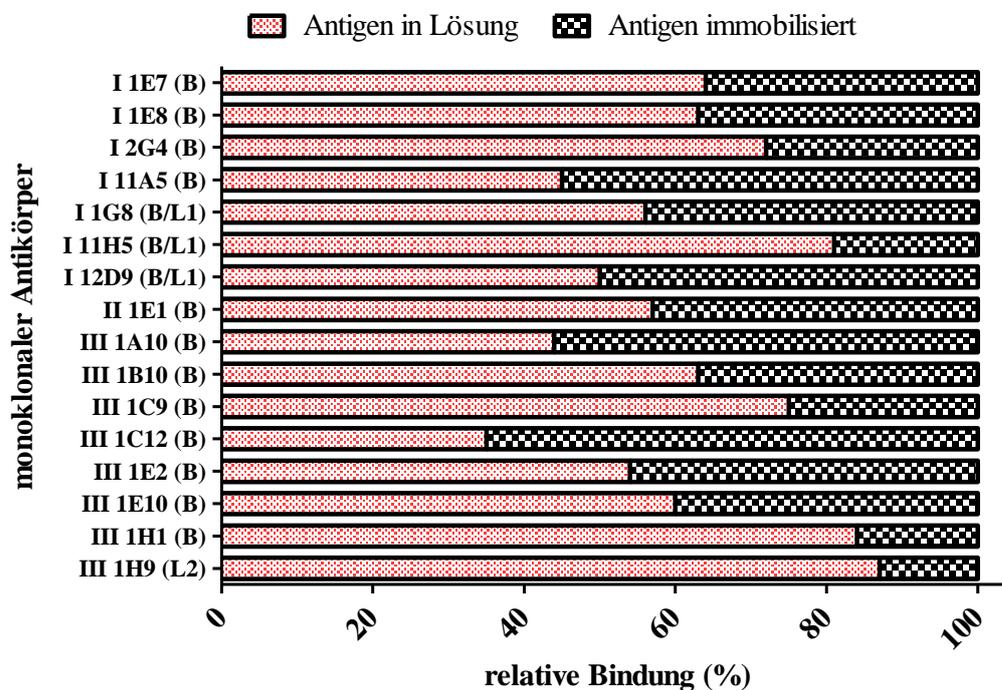


Abbildung 8: Relative Reaktivität verschiedener ZKÜ in einem indirekten EIA unter kompetitiven Bedingungen

3.4 Sandwich-EIA

Im Hinblick auf die Etablierung von nur auf monoklonalen Antikörpern basierenden Sandwich-EIAs sind vor allem zwei Eigenschaften der zu prüfenden mAk bedeutsam: zum einen die Reaktivität des mAk mit dem in Lösung befindlichen Antigen und zum anderen die Kombinierbarkeit mit den als Detektionsantikörper verwendeten zweiten mAk. Letzteres wird bedingt durch die Epitop-Spezifität der jeweiligen mAk. Um diese Eigenschaften bereits in einem frühen Stadium der Antikörper-Entwicklung, in dem noch kein gereinigtes Antikörper-Material in größeren Mengen zur Verfügung steht, überprüfen zu können, wurde ein modifiziertes Sandwich-EIA-System, basierend auf einem Peroxidase-markierten 1B8-F(ab)-Konjugat (Abb. 9), parallel zu den indirekten EIAs eingesetzt.

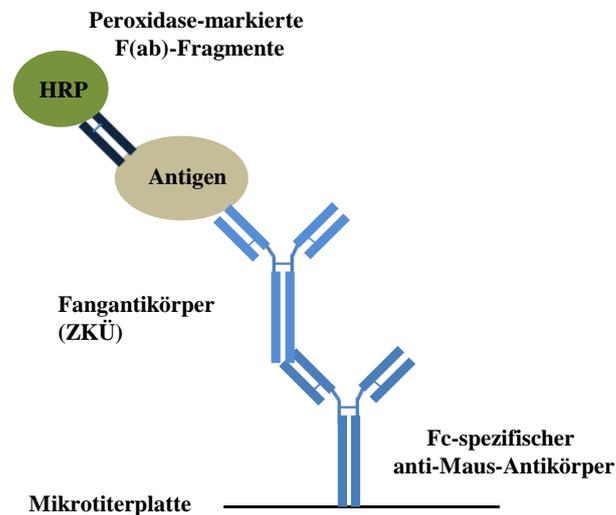


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Sandwich-EIA-Systems mit Peroxidase-markiertem F(ab)-Antikörper

Zur Herstellung des enzymmarkierten F(ab)-Antikörpers wurde zunächst der bereits etablierte HBL-B-spezifische mAk 1B8 mit Hilfe der Cysteinprotease Papain (Sigma Aldrich) in zwei monovalente F(ab)-Fragmente und den Fc-Teil gespalten. Die im Reaktionsansatz neben den F(ab)-Fragmenten enthaltenen Fc-Fragmente, Reste von intakten Immunglobulinmolekülen und andere niedermolekulare Fragmente wurden im Anschluss mittels Protein A entfernt und die 1B8-F(ab)-Fragmente an aktivierte Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) gekoppelt (III.2.2.4). Der Erfolg des Kopplungsansatzes wurde mittels indirektem EIA überprüft. Dadurch zeigte sich, dass durch die Spaltung und anschließende

Peroxidase-Markierung die Antikörper-Aktivität erhalten blieb, die Titer des markierten und des nicht markierten 1B8-F(ab) waren nahezu identisch.

Auch mit dem bereits vorhandenen mAk 1E9 (HBL-L1) sollte ein derartiges Sandwich-EIA-System zum spezifischen Screening der Hybridomzelllinien auf HBL-L1-reaktive Antikörper entwickelt werden. Die Überprüfung des Kopplungserfolgs im indirekten EIA zeigte jedoch, dass die Enzymmarkierung des 1E9-F(ab) zum nahezu vollständigen Verlust der Antikörper-Aktivität geführt hatte.

Die Durchführung des Sandwich-EIA erfolgte wie unter III.2.2.3 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Mikrotiterplatten zunächst über Nacht bei RT mit einem in Bicarbonatpuffer verdünnten Fc-spezifischen Ziege Anti-Maus Antikörper (2 µg/ml) beschichtet (100 µl/Kavität) wurden. Erst im Anschluss wurden, nach Blockieren der freien Bindungsstellen mit 3 % (v/v) Casein/PBS, die ZKÜ aufgetragen. Für das Screening der Hybridomzelllinien wurden diese unverdünnt eingesetzt, zur Bestimmung der relativen Affinität 1:20 in PBS verdünnt. Als Antigen dienten natürliche *B. cereus* KÜ bzw. rekombinantes HBL-B. Das 1B8-F(ab)-HRP wurde 1:500 in 1 % (v/v) Casein/PBS verdünnt aufgetragen. Durch die Kombination der Fc-spezifischen Festphase mit dem Peroxidase-markierten Fab-Fragmenten war es zum einen möglich, ungereinigte ZKÜ als Fangantikörper einzusetzen und zum anderen einen nur auf Maus-Antikörpern basierenden Sandwich-EIA zu etablieren.

Mithilfe dieses Screening-Verfahrens konnten 14 Hybridomzelllinien, die HBL-B-spezifische mAk produzieren, identifiziert werden. Die relative Affinität dieser HBL-B-spezifischen mAk für *B. cereus* KÜ (MHI 1532) wurde anhand von Standardkurven ermittelt. In Abbildung 10 sind beispielhaft die unter Einsatz von mAk 1A10, mAk 1B3, mAk 1C12, mAk 1D7, mAk 1D12 und mAk 2H3 erhaltenen Standardkurven dargestellt. In Tabelle 10 sind zudem die Nachweisgrenzen angegeben, diese lagen zwischen 1:80 (mAk 1F6 und mAk 2H3) und 1:360 (mAk 1C12 und mAk 1D12). Als Nachweisgrenze wurde dabei diejenige Verdünnungsstufe definiert, bei der im EIA die Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes plus der dreifachen Standardabweichung erreicht wurde.

Aufgrund der hohen Affinitäten verbunden mit niedrigen Extinktionswerten der antigenfreien Kontrollansätze wurden mAk 1C12, mAk 1D7 und mAk 1D12 zur Massenproduktion ausgewählt.

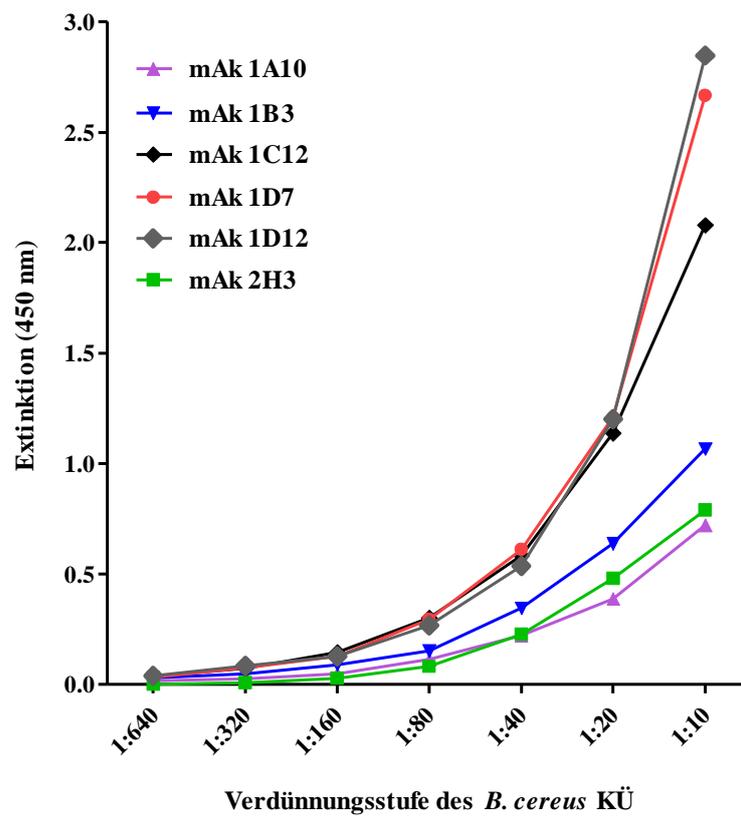


Abbildung 10: Standardkurven für *B. cereus* KÜ (MHI 1532) unter Verwendung HBL-B-spezifischer mAk als Fangantikörper und dem 1B8-F(ab)-HRP als Detektionsantikörper. Für die vergleichende Darstellung wurde bei allen Messwerten die Extinktion des antigenfreien Ansatzes (Background) abgezogen.

3.5 Immunoblot

Die Reaktivität der zur Massenproduktion ausgewählten mAk wurde im Weiteren mittels Immunoblot überprüft (III.2.2.5 bzw. III.2.3). Die antikörperhaltigen ZKÜ wurden in Verdünnungen von 1:10 in PBS, die gereinigten mAk in einer Konzentration von 3 µg/ml eingesetzt. Als Antigen dienten, neben den KÜ eines HBL-positiven *B. cereus* Isolates (MHI 1532), auch rekombinante HBL-Komponenten.

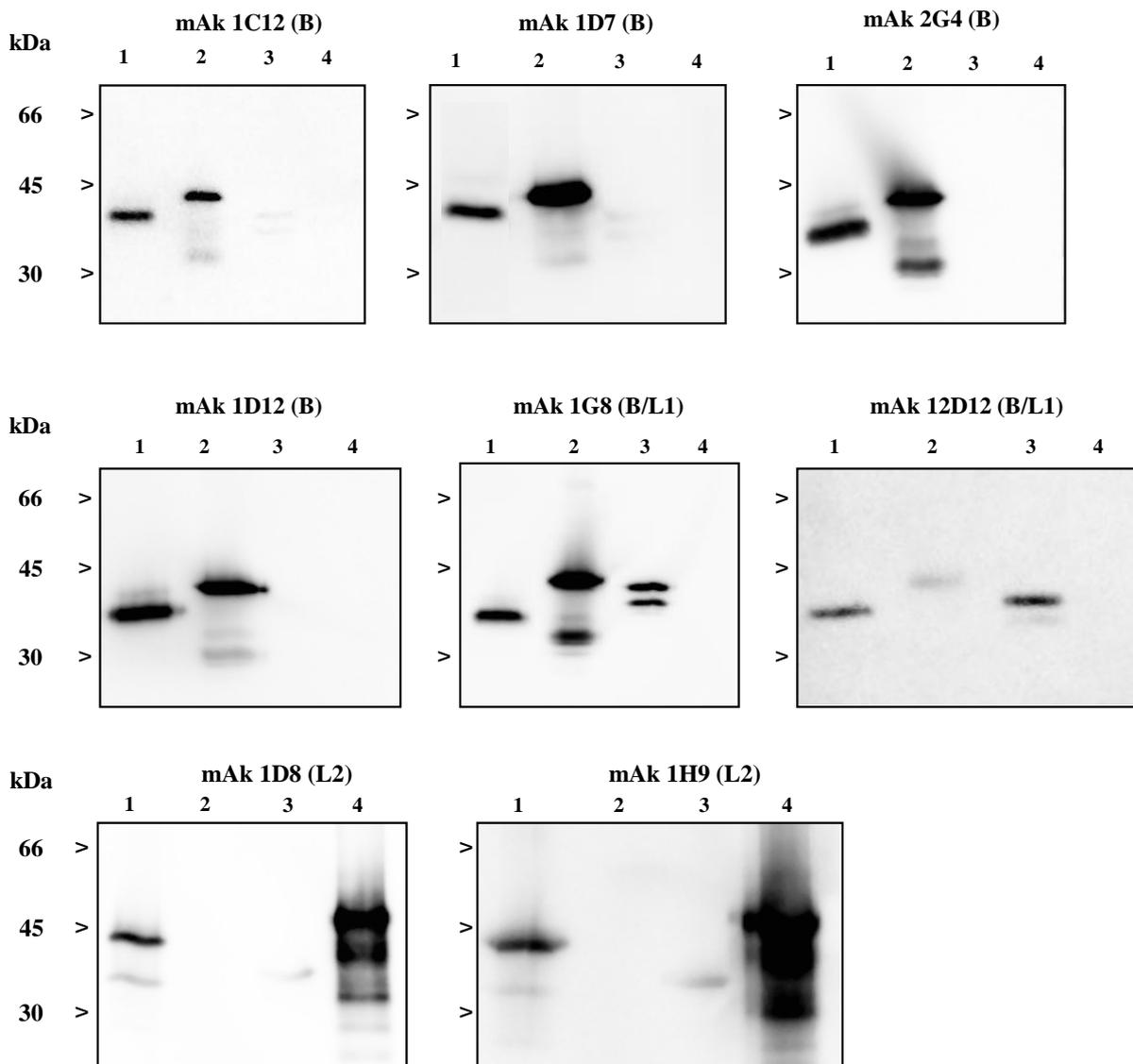


Abbildung 11: Reaktivität der massenproduzierten mAk im Immunoblot mit (Spur 1) KÜ des *B. cereus* Isolates MHI 1532 bzw. (Spur 2) rHBL-B, (Spur 3) rHBL-L1 und (Spur 4) rHBL-L2

Alle mAk reagierten mit dem natürlichen *B. cereus* KÜ und je nach Spezifität mit den rekombinanten Proteinen (Abb. 11): mAk 1C12, mAk 1D7, mAk 1D12 sowie mAk 2G4 mit rHBL-B, mAk 12D12 und mAk 1G8 mit rHBL-B/rHBL-L1 sowie mAk 1D8 und mAk 1H9 mit rHBL-L2. Diese Ergebnisse deckten sich mit dem im indirekten EIA ermittelten Spezifitätsmuster. Da die rekombinanten HBL-Komponenten mit Strep Tag II exprimiert wurden, lagen die Banden von rHBL-B, rHBL-L1 und rHBL-L2 entsprechend höher (44,0 kDa, 42,4 kDa bzw. 48,7 kDa) als bei natürlichen *B. cereus* KÜ. Bei rekombinantem HBL-L1 war eine Doppelbande sichtbar, die auf eine posttranslationale Modifikation des Proteins hinweisen könnte.

3.6 Neutralisierende Eigenschaften

Um zu testen, ob die massenproduzierten mAk neutralisierende Eigenschaften gegenüber dem *B. cereus* Enterotoxin Hämolysin BL besitzen, wurden die gereinigten Antikörper in einer Endkonzentration von 50 µg/ml simultan mit Kulturüberständen einer Nhe-Deletionsmutante im WST-Zellkulturtest mit Vero-Zellen eingesetzt (III.2.6). Als Kontrollansatz wurden *B. cereus* KÜ ohne Zugabe von Antikörper bzw. unter Zusatz eines mAk gleichen Ig-Isotyps (irrelevanter mAk) mitgeführt. Hierzu wurde ein mAk gegen Tylosin als IgG₁-Kontrolle (mAk 2E8) bzw. mAk gegen Cephapirin als IgG_{2a}- und IgG_{2b}-Kontrolle (mAk 2F10 bzw. mAk 4E8) verwendet. Zur Bestimmung der Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe gewählt, die im Vergleich zur toxisfreien Zellkontrolle zu einer 50 %igen Reduktion der Spaltungsaktivität der Zellen führte. Nicht gereinigte mAk, die nur als antikörperhaltige ZKÜ zur Verfügung standen, konnten nicht getestet werden, da die Zytotoxizität von *B. cereus* KÜ durch den im Zellkulturmedium (HT-Medium) enthaltenen hohen FCS-Gehalt (20 %) deutlich verringert wurde. So konnte in Vorversuchen mit KÜ der Nhe-Deletionsmutante unter Zusatz von HT-Medium eine Reduktion der Zytoxizität um ca. zwei Verdünnungsstufen im Vergleich zum Kontrollansatz ohne HT-Medium beobachtet werden (entspricht einer zytotoxischen Restaktivität von 25 %).

Die Zytotoxizitätstiter der eingesetzten *B. cereus* KÜ lagen im Zellkulturtest mit Vero-Zellen zwischen 1:260 und 1:400. Wie in Abbildung 12 dargestellt, besitzen die HBL-B-spezifischen mAk 1C12 und mAk 2G4 bzw. der HBL-B/HBL-L1 kreuzreaktive mAk 1G8 keine neutralisierenden Eigenschaften, die Ansätze zeigten ähnliche Titer (105 - 110 % Restaktivität) wie die entsprechenden Isotyp-Kontrollen. Mit den beiden

HBL-L2-spezifischen mAk 1D8 und mAk 1H9 konnte die zytotoxische Aktivität des *B. cereus* KÜ hingegen im Vergleich zur antikörperfreien Kontrolle um durchschnittlich 60 % reduziert werden. Im Gegensatz hierzu wurde nach Zusatz von mAk 1D7 (HBL-B), mAk 1D12 (HBL-B) und mAk 12D12 (HBL-B/-L1) eine Verstärkung der Zytotoxizität um durchschnittlich 220 %, 75 % bzw. 165 % beobachtet. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch unter modifizierten Versuchsbedingungen auftritt, wurden in einem weiteren Versuch die Vero-Zellen zunächst auf Zellkulturplatten ausgesät (8×10^3 Zellen/Kavität) und für 24 h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Erst im Anschluss wurde der entstandene Zell-Monolayer mit toxinhaltigen *B. cereus* KÜ sowie mAk 1D7 für 24 h inkubiert. Auch unter diesen Bedingungen konnte der verstärkende Zytotoxizitäts-Effekt von mAk 1D7 (die zytotoxische Aktivität des *B. cereus* KÜ lag bei 310 %) beobachtet werden.

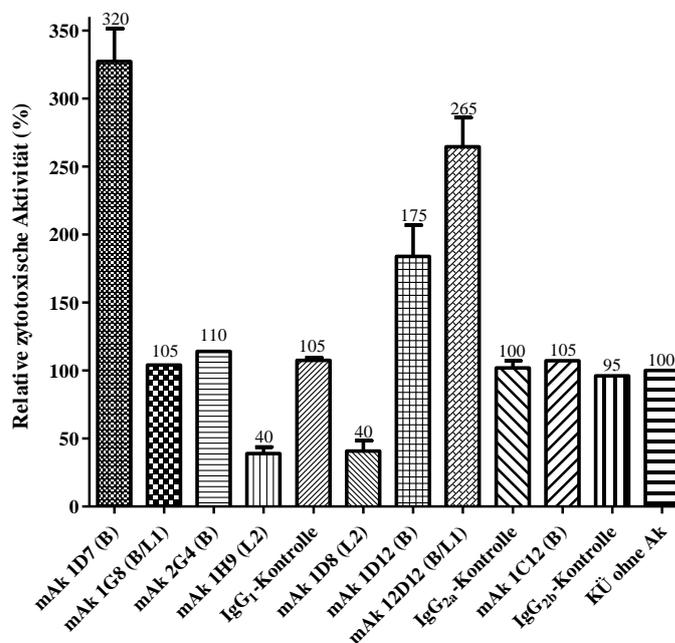


Abbildung 12: Einfluss von HBL-Komponenten-spezifischen mAk auf die messbare zytotoxische Aktivität eines toxinhaltigen *B. cereus* KÜ. Die verwendete Nhe-Deletionsmutante sekretiert außer HBL keine weiteren zytotoxisch wirksamen Exotoxine. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen, für mAk 1C12, mAk 1G8, mAk 2G4 lagen allerdings nur orientierende Daten vor (n=2).

Der im Weiteren überprüfte gleichzeitige Einsatz verschiedener mAk zeigte, dass die Kombination der beiden HBL-L2-spezifischen mAk 1D8 und mAk 1H9 in keiner Verstärkung der neutralisierenden Eigenschaften resultierte. Ebenso führte auch die Kombination der HBL-B-spezifischen mAk 1D7 und mAk 1D12 zu keiner weiteren Verstärkung der Zytotoxizität. Der verstärkende Effekt von mAk 1D7 konnte allerdings bei Kombination mit dem HBL-L2-spezifischen mAk 1D8 bzw. mAk 1H9 vollständig aufgehoben werden (Abb. 13).

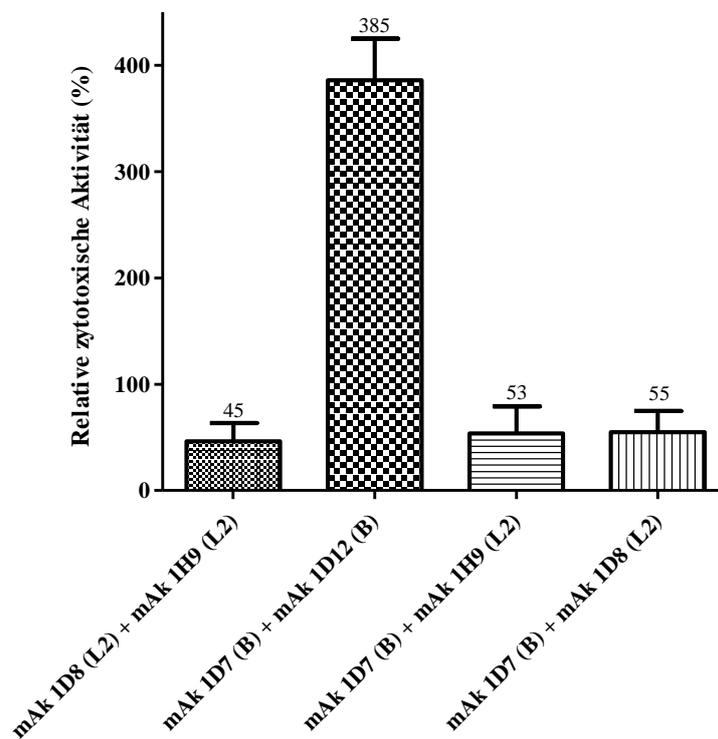


Abbildung 13: Wirkung von mAk-Kombinationen auf die zytotoxische Aktivität einer Nhe-Deletionsmutante. Die Aktivität eines antikörperfreien Kontrollansatzes entspricht dem 100 %-Wert. Dargestellt sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Da sich in den oben beschriebenen Versuchen mit Vero-Zellen ein sehr heterogenes Bild zu den neutralisierenden Eigenschaften der generierten mAk abzeichnete, wurden analoge Ansätze auch mit anderen Zelllinien untersucht. Dazu wurden zwei weitere Zelllinien, nämlich A549, welche sich in früheren Arbeiten als besonders empfindlich für HBL herausgestellt hatten (Jeßberger *et al.*, 2014) und RAW 264.7, in orientierenden Versuchen eingesetzt. Tabelle 11 zeigt, dass auch bei diesen beiden Zelllinien eine Neutralisation der Zytotoxizität durch die Zugabe der HBL-L2-spezifischen mAk 1D8 und mAk 1H9 erreicht werden konnte, während der HBL-B-spezifische mAk 1D7 wiederum sowohl bei A549- als auch bei RAW 264.7-Zellen einen verstärkenden Effekt auf die Zytotoxizität der Nhe-Deletionsmutante hatte. Die Kontrollansätze mit irrelevanten mAk führten hingegen zu keiner bzw. nur einer sehr geringen Änderung des Zytotoxizitätstiters.

Tabelle 11: Wirkung von HBL-Komponenten-spezifischen mAk auf die zytotoxische Aktivität eines toxinhaltigen *B. cereus* KÜ auf A549- bzw. RAW 264.7-Zellen (n=2)

Ansatz des <i>B. cereus</i> KÜ	Ig- Isotyp	Relative zytotoxische Aktivität			
		A549-Zellen		RAW 264.7-Zellen	
		Titer	%	Titer	%
ohne Ak	-	1:1.285	100	1:751	100
+ mAk 1D7 (B)		1:2.315	180	1:1.450	207
+ mAk 1H9 (L2)	IgG ₁	1:174	14	1:152	20
+ Isotyp- Kontrolle ¹		1:1.277	100	1:754	100
+ mAk 1D8 (L2)	IgG _{2a}	1:250	20	1:193	26
+ Isotyp- Kontrolle ²		1:1.225	95	1:864	115

¹ mAk 2E8 gegen Tylosin

² mAk 2F10 gegen Cephapirin

4 Etablierung von mAk-basierten Sandwich-EIAs

4.1 Massenproduktion und Herstellung Peroxidase-markierter Antikörper

Im Hinblick auf die Erstellung toxinspezifischer Sandwich-EIAs wurden basierend auf den in IV.3 dargestellten Ergebnissen acht mAk für die Massenproduktion ausgewählt. Dabei handelte es sich um die vier HBL-B-spezifischen mAk 1C12, mAk 1D7, mAk 1D12 und mAk 2G4, sowie die zwei HBL-L2-spezifischen mAk 1D8 und mAk 1H9. Zwei weitere mAk, nämlich mAk 12D12 und mAk 1G8, reagieren mit HBL-B und HBL-L1. Die Massenproduktion der mAk erfolgte in CELLLine™ CL 1.000- bzw. MiniPerm®-Bioreaktoren. Die massenproduzierten Antikörper wurden mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und anschließend über Protein A affinitätschromatographisch gereinigt.

Zur Entwicklung von auf mAk basierenden Sandwich-EIA-Systemen zum Nachweis der Einzelkomponenten des *B. cereus* Enterotoxins HBL wurden vier der gereinigten, neu etablierten mAk (mAk 1D7, mAk 1G8, mAk 2G4 und mAk 1H9) und der aus früheren Immunisierungen stammende mAk 1B8 (HBL-B) an aktivierte Meerrettichperoxidase gekoppelt. Bei der Überprüfung des Kopplungserfolgs im indirekten EIA zeigte sich, dass die Peroxidase-Markierung von mAk 1B8, mAk 2G4 (HBL-B) sowie mAk 1G8 (HBL-B/-L1) zu keiner Reduktion der Antikörper-Aktivität geführt hatte, sowohl die markierten als auch nicht markierten mAk wiesen ähnlich hohe Reaktivitäten auf. Bei dem Peroxidase-markierten mAk 1H9 (HBL-L2) war die Aktivität reduziert, der Titer unterschied sich um zwei Verdünnungsstufen (entspricht einer Restaktivität von 25 %) von dem des nicht markierten mAk. Bei dem enzymmarkierten mAk 1D7 fand hingegen eine deutliche Reduktion der Antikörper-Aktivität statt, der Titer des Konjugats unterschied sich dabei um vier Verdünnungsstufen (entspricht einer Restaktivität von 6,25 %) von den Titern der nicht markierten mAk.

4.2 Sandwich-EIAs zum Nachweis der Einzelkomponenten von HBL

Die Durchführung der Sandwich-EIA-Verfahren zum spezifischen und sensitiven Nachweis aller Komponenten des *B. cereus* Enterotoxins Hämolyysin BL erfolgte wie unter III.2.2.3 beschrieben. Zur Etablierung wurden zunächst verschiedene Verdünnungen der Fang- und Detektionsantikörper getestet und deren Einfluss auf die Sensitivität des Nachweisverfahrens

überprüft. Das Antigen (KÜ von *B. cereus* MHI 1532) wurde dazu in gleichbleibender Konzentration (1:10 in PBS) eingesetzt. Ziel war es, hohe Extinktionswerte bei antigenhaltigen Ansätzen verbunden mit möglichst geringen Extinktionswerten bei antigenfreien Kontrollansätzen (Background) zu erhalten. Bei der Verwendung von 3 % (v/v) Casein/PBS-Lösung als Blockierungspuffer und 1 % (v/v) Casein/PBS-Lösung als Verdünnungspuffer für die Enzymkonjugate wurden bei allen getesteten Sandwich-EIA-Systemen bereits optimale Ergebnisse erzielt (Background-Extinktionswerte lagen im Bereich von 0,02-0,1), so dass umfangreiche Versuche zur Optimierung dieser Testparameter nicht notwendig waren. Im nächsten Schritt wurden mithilfe der zuvor ermittelten optimalen Antikörper-Konzentrationen Standardkurven für *B. cereus* KÜ (MHI 1532) erstellt. Mit dem Zusatz von 0,5 % (v/v) Tween 20 zum Probenverdünnungspuffer PBS wurde untersucht, ob eine Steigerung der Signalintensitäten erreicht werden konnte. Zur Ermittlung der Nachweisgrenzen der etablierten Testsysteme wurden rekombinante HBL-Komponenten als serielle Verdünnungsreihen in die Sandwich-EIAs eingesetzt. Als Nachweisgrenze wurde diejenige Konzentration definiert, bei der im EIA der doppelte Extinktionswert der antigenfreien Kontrollansätze erreicht wurde.

4.2.1 HBL-B-spezifischer Sandwich-EIA

Zum Nachweis von HBL-B konnten verschiedene Sandwich-EIA-Systeme mit unterschiedlicher Empfindlichkeit etabliert werden. In Tabelle 12 sind die Nachweisgrenzen dieser Systeme für rHBL-B dargestellt.

Tabelle 12: Nachweisgrenzen (ng/ml) verschiedener Sandwich-EIA-Varianten zum Nachweis von rHBL-B

Fang- antikörper	Detektionsantikörper			
	mAk 1B8	mAk 1D7	mAk 1G8	mAk 2G4
mAk 1B8	-	0,66	0,88	0,62
mAk 1C12	0,68	3,08	1,44	1,39
mAk 1D7	0,14	-	0,07	0,10
mAk 1D12	0,04	0,80	0,20	0,15
mAk 2G4	1,09	1,27	1,06	-

Die Kombinationen mAk 1D12/mAk 1B8 (Variante A) und mAk 1D7/mAk 1G8 (Variante B) zeigten die höchsten Empfindlichkeiten. Die Fangantikörper werden hierbei in Konzentrationen von 5 µg/ml (mAk 1D12) bzw. 10 µg/ml (mAk 1D7) eingesetzt, die Verdünnung der Peroxidase-markierten Antikörper lag jeweils bei 1:2.000. Während der Zusatz von 0,5 % (v/v) Tween 20 zum Probenverdünnungspuffer bei Variante A zu keiner Steigerung der Signalintensitäten führte, konnte bei Variante B eine Verdopplung der Signalintensitäten erreicht werden. Bei Variante A können KÜ von *B. cereus* MHI 1532 bis zu einer Verdünnung von 1:25.600 zuverlässig nachgewiesen werden (Abb. 14), die Nachweisgrenze für rekombinantes HBL-B beträgt 0,04 ng/ml, der Background-Wert liegt bei 0,08. Bei Variante B können KÜ von *B. cereus* MHI 1532 bis zu einer Verdünnung von 1:12.800 nachgewiesen werden (Abb. 14). Die Nachweisgrenze für rHBL-B liegt bei 0,07 ng/ml, die Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes bei 0,01.

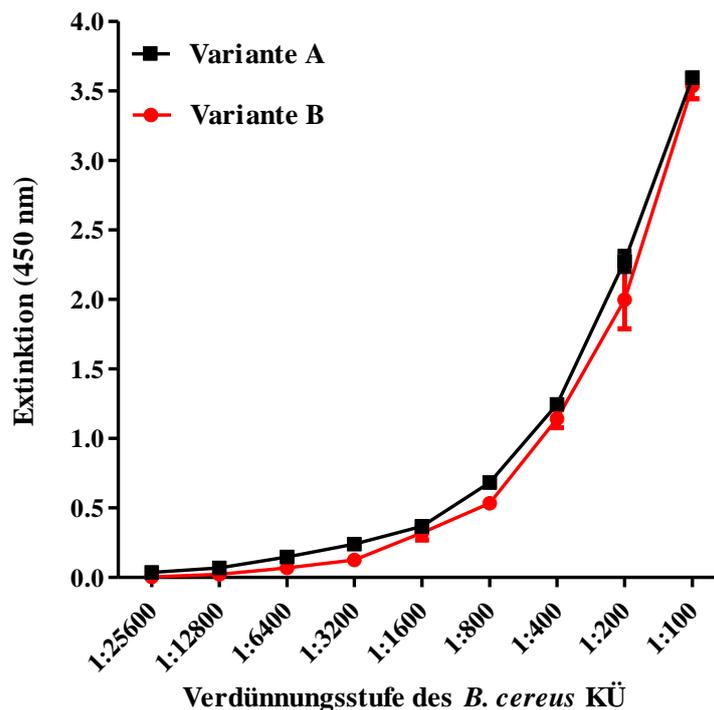


Abbildung 14: Vergleich der im Sandwich-EIA mit mAk 1D12/mAk 1B8 (Variante A) bzw. mAk 1D7/mAk 1G8 (Variante B) erhaltenen Antigen-Verdünnungskurven. Als Antigen wurden KÜ des *B. cereus* Stammes MHI 1532 eingesetzt.

4.2.2 HBL-L1-spezifischer Sandwich-EIA

Unter Verwendung des aus früheren Arbeiten stammenden HBL-L1-spezifischen mAk 1E9 als Fangantikörper (2,5 µg/ml) konnte in Kombination mit dem HBL-L1-reaktiven Peroxidase-markierten mAk 1G8 (1:2.000) ein Sandwich-EIA-System zum spezifischen und sensitiven Nachweis von HBL-L1 entwickelt werden. Im Gegensatz zu den HBL-B-spezifischen Sandwich-EIAs führte hier der Zusatz von 0,5 % (v/v) Tween 20 zum Probenverdünnungspuffer zu deutlich niedrigeren Signalintensitäten und ist vermutlich auf eine Denaturierung des mAk 1E9 durch das Detergens zurückzuführen. KÜ von *B. cereus* MHI 1532 kann in Verdünnungen bis zu 1:2.400 zuverlässig nachgewiesen werden (Abb. 15). Die antigenfreien Ansätze erreichen Extinktionswerte von 0,02, die Nachweisgrenze für rHBL-L1 liegt bei 4 ng/ml.

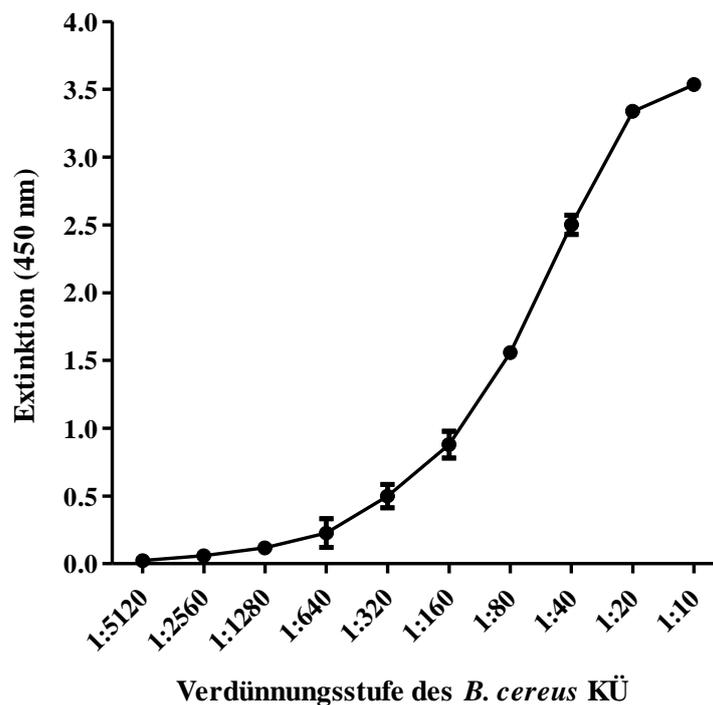


Abbildung 15: Im HBL-L1-spezifischen Sandwich-EIA – basierend auf mAk 1E9 und mAk 1G8 – erhaltene Antigen-Verdünnungskurve. Als Antigen wurden KÜ des *B. cereus* Stammes MHI 1532 eingesetzt.

4.2.3 HBL-L2-spezifischer Sandwich-EIA

Um zu testen, ob die Empfindlichkeit des bereits bestehenden HBL-L2-Nachweis-Systems (Fella, 1999) unter Verwendung der neu etablierten mAk (mAk 1D8, mAk 1H9) gesteigert werden kann, wurden Kombinationen von mAk 1A12, mAk 8B12, mAk 1D8 und mAk 1H9 im Sandwich-EIA eingesetzt. Dabei erwies sich die Kombination von mAk 1A12 (Fangantikörper; 10 µg/ml) und mAk 1H9 (Detektionsantikörper; 1:4.000) deutlich sensitiver als das bisher verwendete Sandwich-EIA-System basierend auf den mAk 1A12 und mAk 8B12 (Abb. 16).

Auch bei diesem Nachweis konnten durch die Zugabe von 0,5 % (v/v) Tween 20 zum Probenverdünnungspuffer die Signalintensitäten um bis zu Faktor 4 gesteigert werden. Die in seriellen Verdünnungsreihen ermittelte Nachweisgrenze für rHBL-L2 liegt bei 0,2 ng/ml (1A12/8B12: 1 ng/ml), KÜ von *B. cereus* MHI 1532 können bis zu einer Verdünnung von 1:25.600 zuverlässig nachgewiesen werden. Der Extinktionswert der antigenfreien Kontrollansätze liegt bei 0,02.

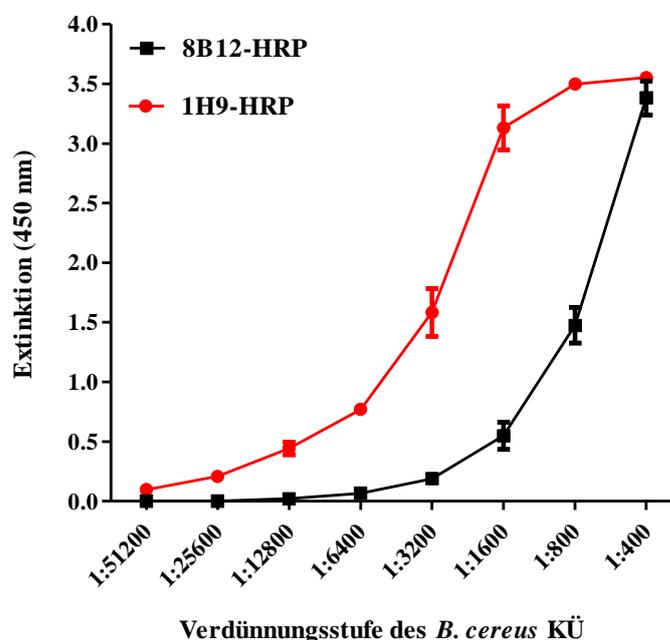


Abbildung 16: Vergleich der Sensitivität verschiedener Sandwich-EIA-Varianten zum Nachweis von HBL-L2. MAk 1A12 wurde jeweils als Fangantikörper eingesetzt, als Antigen diente *B. cereus* KÜ des Stammes MHI 1532

Alle weiteren getesteten Kombinationen resultierten entweder in nur geringen Signalintensitäten (mAk 1H9/mAk 8B12: max. Extinktion bei 1,5) oder waren deutlich weniger sensitiv (Nachweisgrenze von mAk 1D8/mAk 1H9 für *B. cereus* KÜ lag bei 1:5.120) (Tab. 13).

Tabelle 13: Relative Testempfindlichkeit verschiedener Sandwich-EIA-Varianten zum Nachweis von HBL-L2. Als Antigen wurden KÜ des *B. cereus* Stammes MHI 1532 verwendet.

Fang- antikörper	Detektionsantikörper			
	mAk 8B12		mAk 1H9	
	max. Extinktion	reziproker Antigen- Titer	max. Extinktion	reziproker Antigen- Titer
mAk 1A12	> 3,5	700	> 3,5	4.700
mAk 8B12	-	-	1,5	n. d. ¹
mAk 1D8	> 3,5	1.300	> 3,5	200

¹ 'n. d.': nicht durchgeführt

4.2.4 Relative Toxinproduktivität verschiedener *Bacillus cereus* Stämme

Mit den etablierten Sandwich-EIA-Systemen zum Nachweis der HBL-Komponenten wurde die relative HBL-Produktivität verschiedener *hbl*-positiver *B. cereus* Stämme ermittelt (Abb. 17, 18 und 19). Zur Überprüfung der HBL-B-Produktivität wurde die unter IV.4.3.1 beschriebene Variante A (mAk 1D12/mAk 1B8) verwendet.

Für die verschiedenen *B. cereus* KÜ konnte eine teils stark divergierende Expression der Toxin Komponenten demonstriert werden. So wurden im HBL-B-Sandwich-EIA Titer zwischen 1:360 und 1:8.100 erreicht. Im Sandwich-EIA zum Nachweis von HBL-L1 erreichten die Titer den Bereich von 1:10 bis 1:300, für HBL-L2 wurden Titer zwischen 1:180 und 1:1.900 ermittelt. Die Unterschiede in der Titerhöhe, die sich für die einzelnen HBL-Komponenten ergaben, sind grundsätzlich auf die variierenden Empfindlichkeiten der jeweiligen Testsysteme zurückzuführen: so ist das Sandwich-EIA-System zum Nachweis von HBL-L1 deutlich weniger sensitiv und folglich

auch die HBL-L1-Titer niedriger, als die der Nachweisverfahren für HBL-B und HBL-L2. Anhand der Antigen-Titer konnten die *B. cereus* Stämme in Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Produktivität eingeteilt werden. Wurden für die Einteilung die HBL-B-Titer zugrunde gelegt (Abb. 17), zeigt der Vergleich mit den für HBL-L1 (Abb. 18) bzw. HBL-L2 (Abb. 19) ermittelten Werten, dass die relative Produktivität der verschiedenen HBL-Komponenten bei den meisten Isolaten ein ähnliches Bild aufweist. Größere Abweichungen wurden nur für die HBL-L2-Produktivität der beiden Isolate MHI 3202 und MHI 3218 beobachtet, die tendenziell im Vergleich zur HBL-B-Produktivität deutlich höher (MHI 3202) bzw. niedriger (MHI 3218) lag.

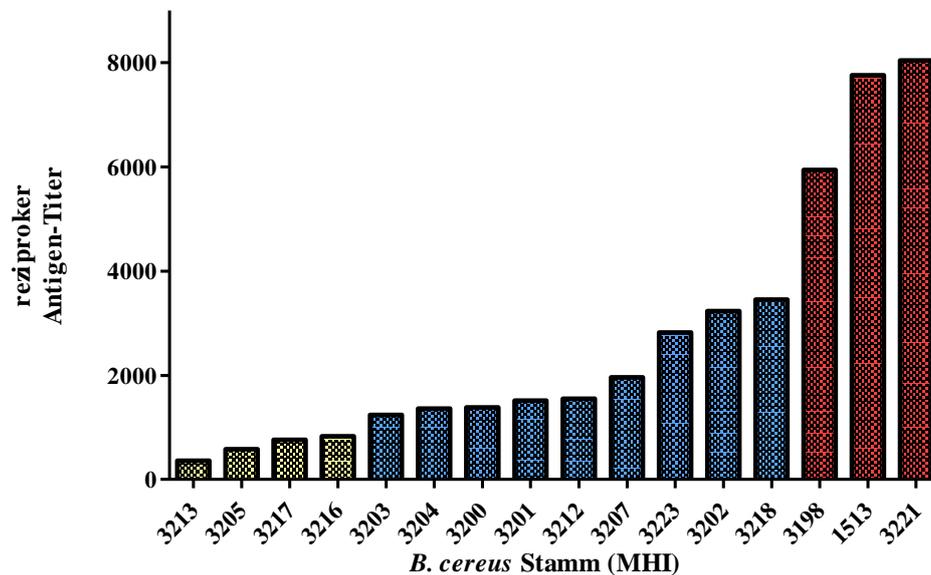


Abbildung 17: Relative mittels Sandwich-EIA ermittelte HBL-B-Produktivität verschiedener *B. cereus* Stämme. Die reziproken Antigen-Titer lagen im Bereich von 360 - 830 (in Gelb dargestellt), 1.200 - 3.500 (in Blau dargestellt) bzw. 5.900 - 8.100 (in Rot dargestellt).

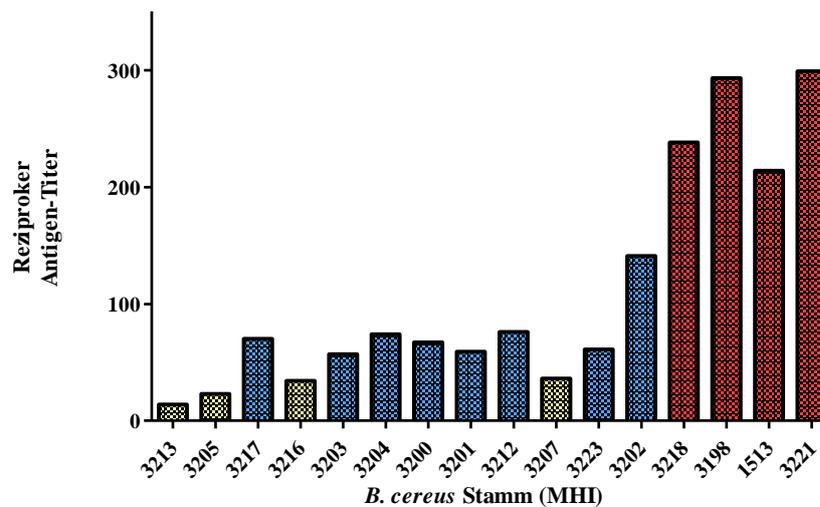


Abbildung 18: Relative HBL-L1-Produktivität verschiedener *B. cereus* Stämme. Die reziproken Antigen-Titer lagen im Bereich von 10 – 50 (in Gelb dargestellt), 60 - 140 (in Blau dargestellt) bzw. 210 – 300 (in Rot dargestellt).

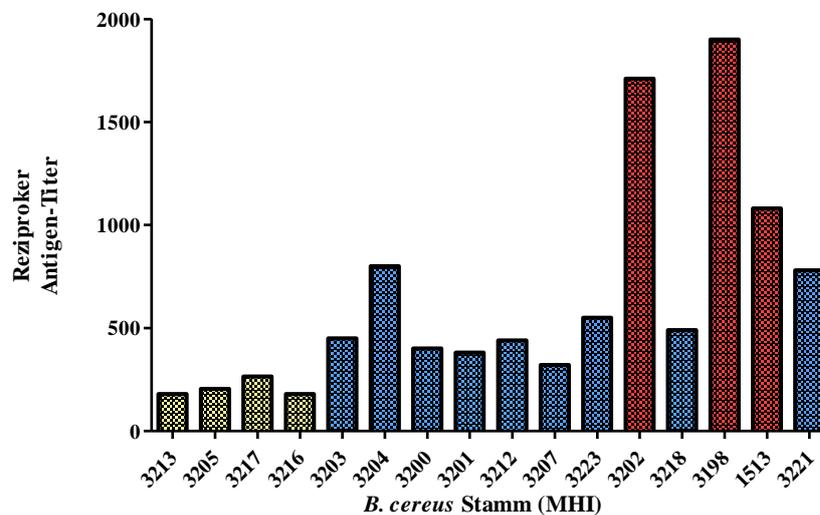


Abbildung 19: Relative HBL-L2-Produktivität verschiedener *B. cereus* Stämme. Die reziproken Antigen-Titer lagen im Bereich von 180 - 270 (in Gelb dargestellt), 320 - 800 (in Blau dargestellt) bzw. 1.000 – 1.900 (in Rot dargestellt).

5 Komplexbildung von HBL

5.1 Immunaффinitätschromatographie

Zum Nachweis der HBL-Komplexbildung wurden, ähnlich wie für die Immungenherstellung beschrieben, *B. cereus* KÜ (MHI 1532) aus unterschiedlichen Anzuchten in drei voneinander unabhängigen Versuchen mittels IAC mit dem HBL-B-spezifischen mAk 1B8 aufgereinigt (III.2.2.1). Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen (Probenauftrag, Probendurchlauf, Waschdurchlauf bzw. Eluat) in die neu etablierten Sandwich-EIAs eingesetzt und eine Bilanzierung vorgenommen. Prinzipiell konnte sowohl für HBL-B als auch HBL-L1 eine hohe Bindung an die IA-Säule beobachtet werden, dementsprechend waren $\leq 5\%$ des im Probenauftrag enthaltenen HBL-B bzw. HBL-L1 im Probendurchlauf und Waschdurchlauf nachweisbar. Bemerkenswerterweise lag in allen Ansätzen der detektierbare Anteil an HBL-B und HBL-L1 in den gereinigten Toxinpräparationen (Eluat) deutlich höher als im Probenauftrag, so dass die Wiederfindungsraten für die beiden Komponenten z. T. deutlich über 100 % betragen (Tab. 14). Der Nachweis der B-Komponente erfolgte mittels verschiedener Sandwich-EIA-Systeme, die Wiederfindungsraten waren dabei in allen Testsystemen erhöht. Die für HBL-L2 ermittelten Wiederfindungsraten von $\leq 100\%$ zeigten, dass es sich hierbei nicht um einen systematischen Fehler handeln konnte. So banden 29 % ($\pm 13\%$) des im KÜ enthaltenen HBL-L2 an die IA-Säule, wohingegen 51 % ($\pm 16\%$) im Probendurchlauf und 20 % ($\pm 7\%$) im Waschdurchlauf zu finden waren.

Die Überprüfung der EIA-Resultate erfolgte mittels Immunoblot, wie unter III.2.2.5 beschrieben, mit den spezifischen mAk 1B8, mAk 1E9 und mAk 1H9 zum Nachweis der Einzelkomponenten B, L1 bzw. L2. Wie in Abbildung 20 dargestellt, konnten auch mittels Immunoblot alle drei HBL-Komponenten im Eluat der Immunaффinitätschromatographie detektiert werden.

Als Kontrollansatz wurden die Fraktionen der IAC auch in den Sandwich-EIA zum Nachweis von NheB (mAk 2B11/mAk 1E11) eingesetzt bzw. im Immunoblot mit dem NheB-spezifischen mAk 1E11 analysiert. Sowohl im Immunoblot (Abb. 20D) als auch im Sandwich-EIA konnte gezeigt werden, dass sich NheB nahezu vollständig im Durchlauf befand (97 %), im Eluat waren nur durchschnittlich 3 % nachweisbar – ein Beleg dafür, dass eine unspezifische Bindung der Toxinkomponenten an das Immunosorbens nicht stattfand.

Tabelle 14: Im Sandwich-EIA ermittelter Anteil an HBL-B bzw. HBL-L1 im Probenauftrag, Probendurchlauf, Waschdurchlauf und Eluat nach IA-Aufreinigung eines HBL-positiven KÜ (MHI 1532). Für die IAC wurde der HBL-B-spezifische mAk 1B8 eingesetzt, die im Proben- bzw. Waschdurchlauf nachweisbare Toxinkonzentration lag bei $\leq 5\%$ der aufgetragenen Toxinmenge.

Lauf	Sandwich-EIA-System	Probenauftrag (<i>B. cereus</i> KÜ)				Eluat			
		reziproker Titer	ml	Units	%	reziproker Titer	ml	Units	%
Nachweis von HBL-B									
1	mAk 1D12/mAk 1B8	114	36	4.104	100	436	16	6.976	170
2	mAk 1D7/mAk 2G4	165	24	3.960	100	507	16	8.112	205
3	mAk 1D7/mAk 1G8	36	24	864	100	100	16	1.600	185
Nachweis von HBL-L1									
1		42	36	1.512	100	202	16	3.232	214
2	mAk 1E9/mAk 1G8	21	24	504	100	52	16	832	165
3		12	24	288	100	29	16	464	161

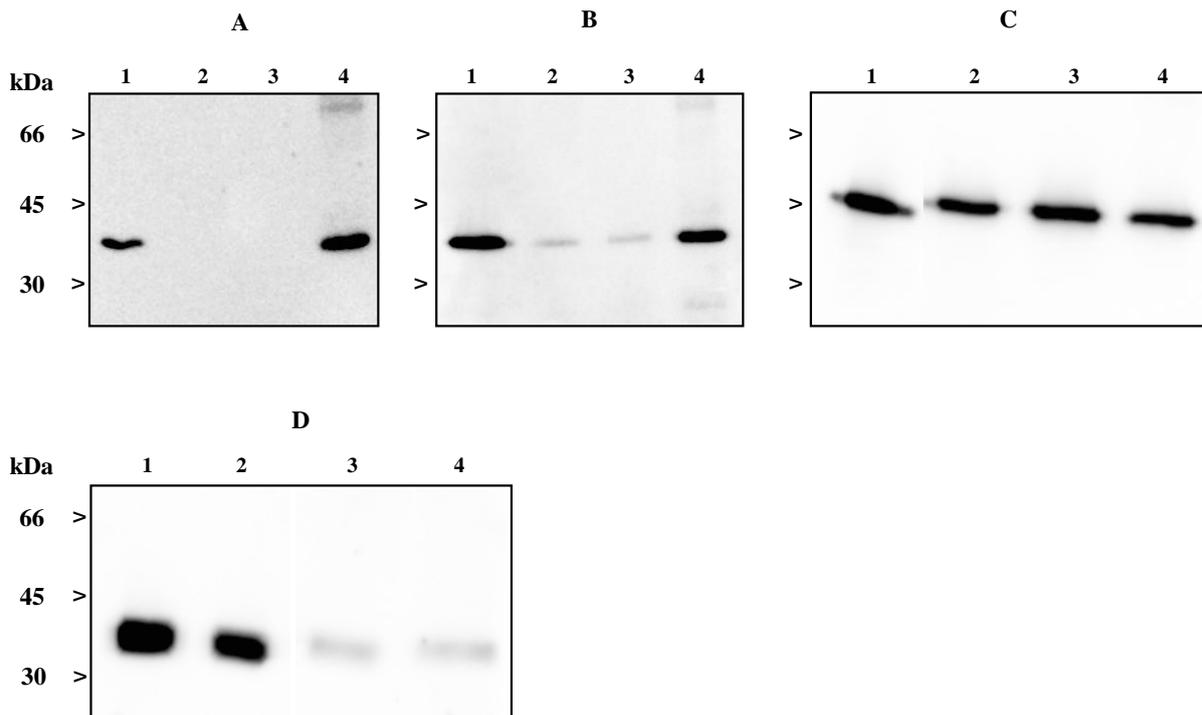


Abbildung 20: Analyse der IA-Reinigung (mAk 1B8) mittels Immunoblot. Zum Nachweis wurden die HBL-Komponenten-spezifischen mAk 1B8 (A; HBL-B), mAk 1E9 (B; HBL-L1) und mAk 1H9 (C; HBL-L2) bzw. zum Nachweis von NheB (D) der spezifische mAk 1E11 eingesetzt, dargestellt ist jeweils der Probenauftrag (Spur 1), der Probendurchlauf (Spur 2), der Waschdurchlauf (Spur 3) bzw. das Eluat (Spur 4).

Auch in orientierenden Versuchen mit KÜ eines anderen HBL-produzierenden *B. cereus* Stammes (MHI 163) konnten alle HBL-Einzelkomponenten im Eluat der IAC basierend auf mAk 1B8 detektiert werden, die Wiederfindungsraten für HBL-B und HBL-L1 im Sandwich-EIA lagen dabei ebenfalls > 100 % (Ergebnisse nicht dargestellt). Von dem in diesem *B. cereus* KÜ enthaltenen HBL-L2 wurden 66 % zurückgehalten, während 34 % im Durchlauf wiedergefunden werden konnten. Auch hier zeigte der Kontrollansatz mit NheB, dass dieses nahezu vollständig im Durchlauf wiedergefunden wird.

Um zu überprüfen, ob auch bei der IA-Reinigung mit einem mAk anderer Antigen-Spezifität alle HBL-Komponenten an die Säule gebunden wurden, wurde der HBL-L2-spezifische mAk 1H9 (10 mg) nach Herstellerangaben an 1g CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt. Im Anschluss wurde für orientierende Versuche eine Minisäule mit 200 µl Gel hergestellt. Die Durchführung der IAC erfolgte wie unter III.2.2.1 beschrieben, als Probe dienten *B. cereus* KÜ von MHI 1532 bzw. MHI 163. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit 5 ml PBS gespült, die Elution erfolgte mit 4 ml Glycin/HCl-Lösung (pH 2,5). Im Anschluss wurden die einzelnen Fraktionen in die etablierten Sandwich-EIAs eingesetzt und, wie bereits bei der IAC basierend auf mAk 1B8 beschrieben, eine Bilanzierung vorgenommen. Wie in Tabelle 15 dargestellt, konnten nur für HBL-L2 größere Mengen im Eluat detektiert werden, HBL-B bzw. HBL-L1 wurden hingegen nur in Spuren zurückgehalten (< 1 - 3 %). Interessanterweise war der Anteil an detektierbaren HBL-B im Durchlauf dabei höher, als die im Probenauftrag gemessenen Werte, so dass sich erneut Wiederfindungsraten von > 100 % ergaben. HBL-L1 konnte hingegen nur zu 67 % (MHI 163) bzw. 52 % (MHI 1532) in den Durchläufen wiedergefunden werden.

Tabelle 15: Im Sandwich-EIA ermittelter Anteil (%) der HBL-Komponenten in den Fraktionen der IAC basierend auf dem HBL-L2-spezifischen mAk 1H9. Als Probe wurde KÜ von (A) MHI 163 (n=2) bzw. (B) MHI 1532 (n=1) verwendet. Die für NheB angegebenen Werte wurden zur Kontrolle ermittelt, um eine unspezifische Bindung der Proteine an das Immunosorbens auszuschließen.

Fraktion	HBL-Komponente					
	HBL-B		HBL-L1		HBL-L2	
	A	B	A	B	A	B
Proben-durchlauf	110 %	110 %	62 %	48 %	9 %	9 %
Wasch-durchlauf	5 %	15 %	5 %	4 %	< 1 %	2 %
Bindung an die IA-Säule	2 %	< 1 %	3 %	< 1 %	90 %	89 %

Die Analyse der IAC-Fractionen im Immunoblot mit mAk 1B8 (HBL-B) bzw. mAk 1E9 (HBL-L1) zeigte ebenfalls, dass weder HBL-B noch HBL-L1 im Eluat enthalten waren (Abb. 21).

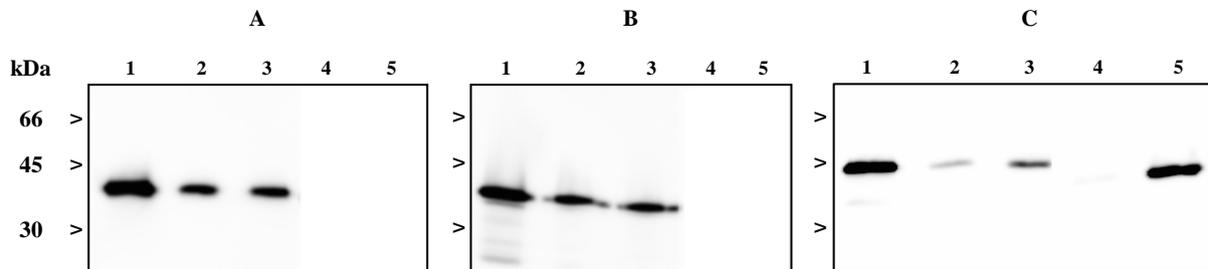


Abbildung 21: Analyse der IA-Reinigung (mAk 1H9) mittels Immunoblot. Zum Nachweis wurden die HBL-Komponenten-spezifischen mAk 1B8 (A; HBL-B), mAk 1E9 (B; HBL-L1) bzw. mAk 1D8 (C; HBL-L2) eingesetzt, dargestellt ist jeweils der Probenauftrag (Spur 1), der Probendurchlauf (1:3 in PBS verdünnt; Spur 2 und 3), der Waschdurchlauf (Spur 4) bzw. das Eluat (Spur 5).

5.2 Hybrid-Sandwich-EIA zum Nachweis von HBL-Komplexen

Zum einfacheren Nachweis potentieller Interaktionen der HBL-Komponenten sollten Hybrid-Sandwich-EIAs basierend auf zwei mAk, die verschiedene HBL-Proteine erkennen, etabliert werden. Zunächst wurden dazu mehrere Antikörperkombinationen getestet. Als Antigen wurden zwei bzw. drei rekombinante HBL-Komponenten im äquimolaren Verhältnis (12 nmol/l) für 30 min bei RT vorinkubiert und die Mischung dann als serielle Verdünnungsreihe auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Um unspezifische Bindungen der Toxin(komplex)e auszuschließen, wurden zur Kontrolle Ansätze ohne Fangantikörper bzw. Ansätze, die jeweils nur eine der rekombinanten HBL-Komponenten enthielten, mitgeführt.

Für rHBL-B konnte entgegen den Erwartungen mit keiner der getesteten Antikörperkombinationen eine Interaktion dieser Komponente mit einer der beiden anderen HBL-Komponenten detektiert werden. In einem Hybrid-Sandwich-EIA-System basierend auf einem HBL-L1-reaktiven Fangantikörper (mAk 12D12, mAk 1E9 bzw. mAk 1G8) und dem HBL-L2-spezifischen mAk 1H9 als Detektionsantikörper konnte hingegen eine Interaktion

von rHBL-L1 und rHBL-L2 nachgewiesen werden (Abb. 22). Die erreichten Antigen-Titer waren deutlich höher als die der Kontrollansätze, so dass unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden konnten.

Die Kombination aus mAk 1G8 (10 µg/ml in PBS) und mAk 1H9 (1:4.000 in 1 % (v/v) Casein/PBS) erwies sich am sensitivsten, eine Interaktion der beiden Komponenten ließ sich noch bei Konzentrationen von 0,19 nmol/l (entspricht 8 ng/ml rHBL-L1 bzw. 9 ng/ml rHBL-L2) nachweisen.

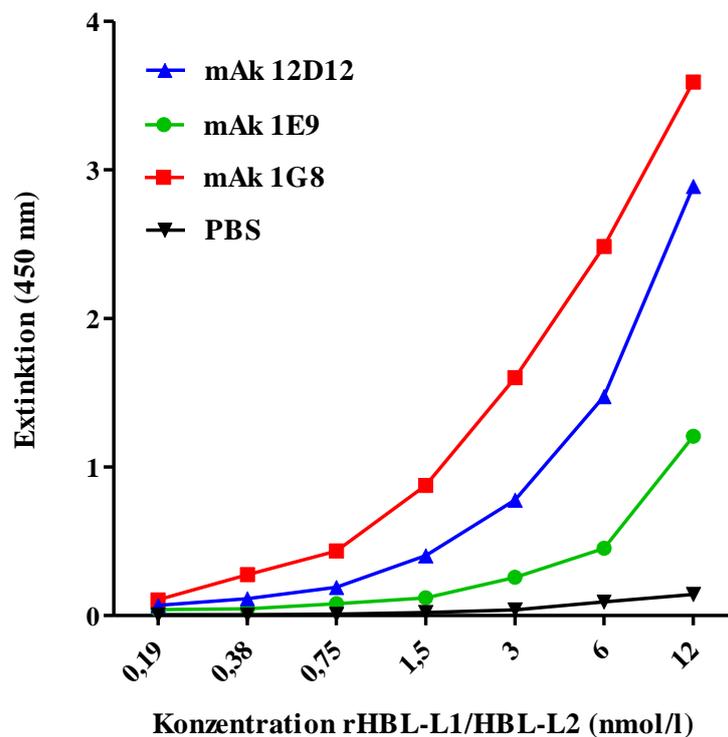


Abbildung 22: Im Hybrid-Sandwich-EIA messbare Interaktion von HBL-L1/HBL-L2 unter Verwendung verschiedener HBL-L1-reaktiver mAk als Fangantikörper bzw. antikörperfreier Kontrollansatz (PBS). Als Detektionsantikörper wurde mAk 1H9 (HBL-L2-spezifisch) verwendet. Die rekombinanten Toxinkomponenten wurden vor dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte im äquimolaren Verhältnis (12 nmol/l) für 30 min bei RT inkubiert. Die Extinktion des antigenfreien Kontrollansatzes lag je nach Antikörperkombination zwischen 0,01 und 0,03.

5.3 Interaktion von HBL-L1 und HBL-L2

5.3.1 Nachweis mittels Sandwich-EIA

Um zu überprüfen, ob rHBL-L1 auch mit natürlichem HBL-L2 interagiert, wurden KÜ von MHI 163 mit mAk 1H9 IA-gereinigt und die Konzentration des im Eluat enthaltenen HBL-L2 im Sandwich-EIA bestimmt. Dann wurde die gereinigte Toxinkomponente im äquimolaren Verhältnis (6 nmol/l) für 30 min bei RT mit rHBL-L1 inkubiert und im Anschluss als serielle Verdünnungsreihe in den etablierten Hybrid-Sandwich-EIA eingesetzt. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit rekombinanten HBL-L2 mitgeführt. Als Kontrollansätze dienten Reihen mit nur einer HBL-Komponente bzw. mit PBS-Beschichtung.

Es zeigte sich, dass sich auch mit der natürlichen HBL-Komponente eine Interaktion zwischen HBL-L1 und HBL-L2 im Hybrid-Sandwich-EIA nachweisen ließ. Die ermittelten Titerkurven für rHBL-L1/IA-gereinigtes HBL-L2 und rHBL-L1/rHBL-L2 waren dabei nahezu identisch (Abb. 23).

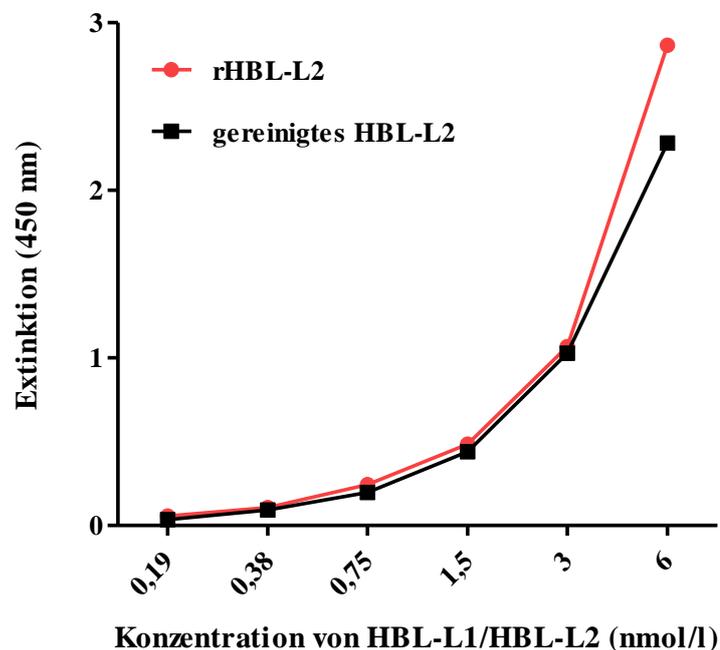


Abbildung 23: Interaktion von rHBL-L1 mit rekombinanten bzw. natürlichem HBL-L2. Zum Nachweis des Komplexes wurde der auf mAk 1G8 (reaktiv mit HBL-L1) und mAk 1H9 (HBL-L2-spezifisch) basierende Hybrid-Sandwich-EIA verwendet.

In einem weiteren Versuch wurden die HBL-Komponenten (rHBL-L1, IA-gereinigtes HBL-L2) vor dem Auftragen nicht miteinander vorinkubiert, sondern zunächst eine serielle Verdünnungsreihe der einen Komponente angefertigt und sofort im Anschluss die zweite Komponente in konstanter Konzentration (Endverdünnung: 2,5 nmol/l in PBS) in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich zum etablierten Hybrid-Sandwich-EIA wurde auch eine umgedrehte Variante des Systems, bei der mAk 1H9 als Fangantikörper und mAk 1G8 als Detektionsantikörper diente, durchgeführt.

Prinzipiell zeigten die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse, dass in beiden EIA-Varianten maximale Signalintensitäten dann erreicht werden, wenn HBL-L2 im Überschuss vorlag. Bei einem molaren Verhältnis von 1:4 (z.B. 10 nmol/l HBL-L2 und 2,5 nmol/l HBL-L1) konnten unter diesen Bedingungen in den EIAs im Vergleich zum äquimolaren Ansatz auch ca. vierfach höhere Extinktionswerte gemessen werden (Abb. 24A). HBL-L1 im Überschuss führte zwar auch zu einer gewissen Steigerung der EIA-Messwerte, die aber deutlich weniger ausgeprägt war (Abb. 24B). Die Extinktionen der Kontrollansätze mit PBS-Beschichtung waren deutlich niedriger (max. 0,3).

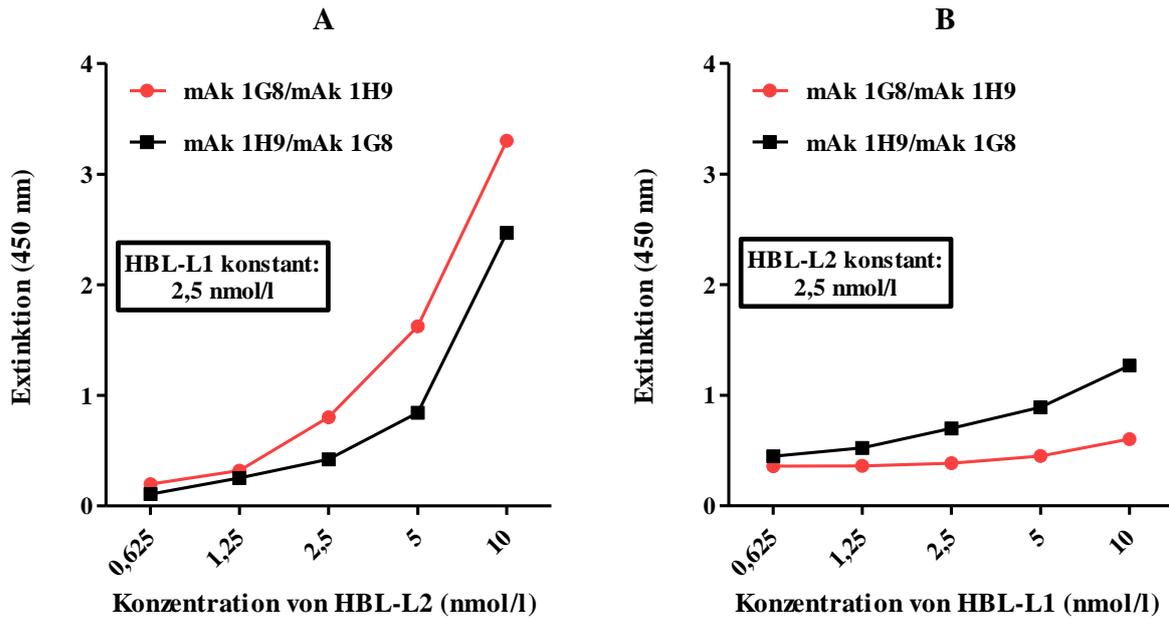


Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Bildung des HBL-L1/HBL-L2 Komplexes. Zur Überprüfung wurde jeweils eine der beiden Komponenten als serielle Verdünnungsreihe (Anfangskonzentration: 10 nmol/l), die andere in konstanter Konzentration (2,5 nmol/l) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen (A) HBL-L2 verdünnt, rHBL-L1 konstant bzw. (B) HBL-L2 konstant und rHBL-L1 verdünnt.

5.3.2 Nachweis mittels Dot Blot Assay

Zur Überprüfung der Interaktion von HBL-L1 und HBL-L2 wurde neben dem etablierten Hybrid-Sandwich-EIA ein Dot Blot Assay (III.2.2.5 und 2.2.6) durchgeführt. Bei diesem Blotting-Verfahren werden Proteine ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung direkt auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Der Vorteil dabei ist, dass, im Gegensatz zur SDS-PAGE mit nachfolgendem Immunoblot, die Tertiärstruktur der Toxine weitgehend erhalten bleibt, wodurch Protein-Protein-Interaktionen weiterhin möglich sind. Zunächst wurde rHBL-L1 punktförmig entweder in aufsteigender (12,5 - 200 ng/ml in PBS) oder konstanter Konzentration (50 ng/ml in PBS) auf die aktivierte PVDF-Membran appliziert. Nach Blockieren der freien Bindungsstellen wurde im nächsten Schritt rekombinantes bzw. IA-gereinigtes HBL-L2 in konstanter (200 ng/ml in PBS) bzw. aufsteigender Konzentration (5 - 500 ng/ml in PBS) auf die komplette Membran aufgetragen. Anschließend wurde die

Membran zunächst mit dem HBL-L2-spezifischen mAk 1H9 (3 µg/ml in PBS), dann mit einem enzymmarkierten Pferd Anti-Maus Antikörper (1:2.000 in 1 % (v/v) Casein/PBS) inkubiert und letztlich die Protein-Protein-Interaktion indirekt durch Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates über eine Kodak Image Station 200 MM detektiert. In Kontrollansätzen wurde statt HBL-L1 PBS auf die Membran aufgetragen.

Es zeigte sich, dass sowohl rekombinantes als auch IA-gereinigtes HBL-L2 an die mit rHBL-L1 beschichtete PVDF Membran band. Die Bindung von HBL-L2 war dabei von der an die Membran gebundenen HBL-L1-Konzentration abhängig. Maximale Bindung wurde entweder bei einem 1:1 Verhältnis der beiden Komponenten oder bei HBL-L2 im Überschuss erzielt (Abb. 25A). Eine unspezifische Bindung von HBL-L2 an die PVDF-Membran konnte durch den Kontrollansatz mit PBS ausgeschlossen werden (Abb. 25B). Auch in einem orientierenden Versuch bei dem zunächst HBL-L2 (IA-gereinigt bzw. rekombinant) punktförmig aufgetragen, dann die Membran mit rHBL-L1 überschichtet und der HBL-L1-reaktive mAk 1G8 als Primärantikörper verwendet wurde, konnte eine Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

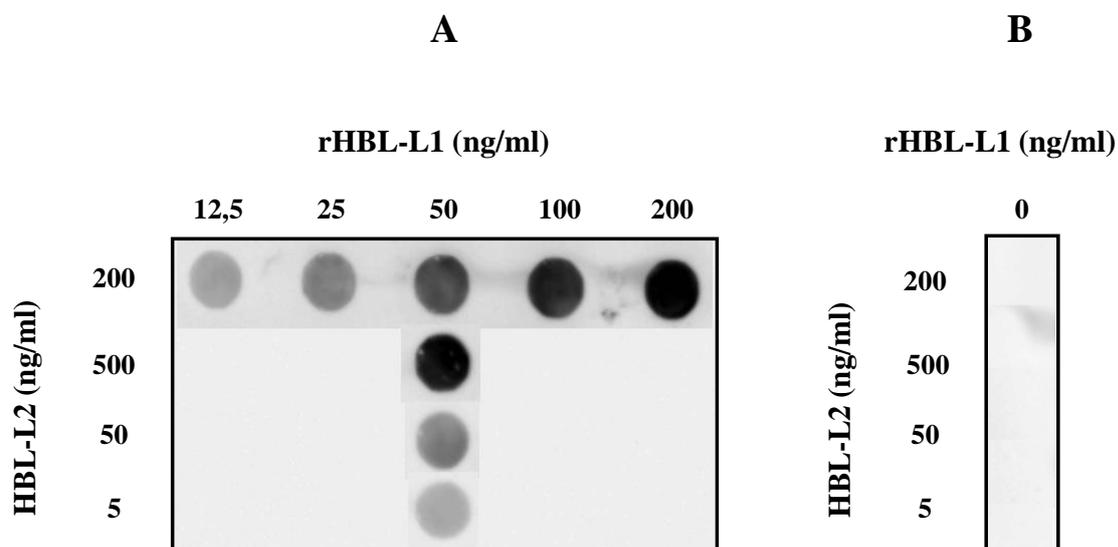


Abbildung 25: (A) Nachweis der Interaktion von rHBL-L1 und IA-gereinigten HBL-L2 im Dot Blot Assay. Zur Detektion des gebundenen HBL-L2 wurde der mAk 1H9 (HBL-L2-spezifisch) verwendet; (B) Kontrollansatz (anstelle von rHBL-L1 wurde PBS auf die Membran aufgetragen).

V DISKUSSION

Die zunehmende Bedeutung von *B. cereus* als Lebensmittelinfektionserreger (EFSA, 2015) ist unumstritten, ebenso wie die hohe pathogenetische Relevanz der beiden aus jeweils drei Einzelkomponenten bestehenden Enterotoxin-Komplexe Nhe (Lund & Granum, 1996) und HBL (Beecher & Macmillan, 1991). Da die maximale biologische Aktivität des HBL- bzw. Nhe-Komplexes nur bei der Kombination aller drei Toxinkomponenten erreicht wird, liefert der alleinige Nachweis nur einer der jeweiligen Toxinkomponenten prinzipiell ein unvollständiges Bild zum Toxinbildungsvermögen eines verdächtigen Isolates. Weitergehende Analysen sind allerdings mit den derzeit kommerziell erhältlichen Nachweisverfahren nicht möglich. Die zwei für das HBL-Toxin erhältlichen Kits – der auf polyklonalen Antiseren basierende BCET-RPLA Toxin Assay der Fa. Oxoid (Beecher & Wong, 1994a), sowie das von der Fa. Merck vertriebene, auf dem Prinzip der Kapillarmigration basierende Duopath[®]-System – beruhen beide auf dem Nachweis der HBL-L2 Komponente. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation wird allerdings darauf hingewiesen, dass die zytotoxische Aktivität eines HBL-produzierenden Isolates vielmehr durch die Menge der exprimierten L1-Komponente determiniert zu werden scheint (Jeßberger *et al.*, 2014). Dieses Beispiel unterstreicht zum einen die Wichtigkeit einer umfassenderen *B. cereus* Toxinanalytik und verdeutlicht zum anderen die Wissenslücken, die vor allem im Hinblick auf die Wirkungsweise des HBL-Toxins bestehen.

Für den anderen von *B. cereus* produzierten Enterotoxin-Komplex, nämlich Nhe, konnten in den letzten Jahren sowohl im Hinblick auf die Analytik des Toxins (Heilkenbrinker *et al.*, 2013, Moravek *et al.*, 2006) als auch für das Verständnis des Wirkungsmechanismus (Didier *et al.*, 2012, Zhu *et al.*, 2016) große Fortschritte erzielt werden. Ursächlich hierfür war u.a. die Verfügbarkeit von hochaffinen, Komponenten-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die zum Nachweis der HBL-Einzelkomponenten verfügbare Antikörper-Palette erweitert werden, und – im Hinblick auf fundiertere Untersuchungen zum Toxinbildungsvermögen von *B. cereus* Isolaten bzw. einem robustem Nachweis von eventuell im Lebensmittel präformiert vorliegendem Toxin – sensitive EIA-Verfahren im Sandwich-Format etabliert werden. Neben einer verbesserten HBL-Toxinanalytik sollten die toxinspezifischen Antikörper aber auch dazu genutzt werden, neue Erkenntnisse zur Wirkungsweise dieses Enterotoxins zu gewinnen.

1 Generierung der Antikörper

In früheren Arbeiten am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch wurden als Immunogene zur Gewinnung von mAk gegen HBL-Toxinkomponenten meist mittels klassischer chromatographischer Verfahren hergestellte, proteinhaltige Präparationen verwendet (Dietrich *et al.*, 1999, Fella, 1999). Als Trennmaterialien kamen hierbei, wie auch bei Beecher & Wong (1994b) beschrieben, Anionenaustausch- und Hydroxylapatit-Gele zum Einsatz, zur Immunisierung der Mäuse wurde eine Wasser-in-Öl-Emulsion basierend auf Freund'schen Adjuvans appliziert. Die daraus resultierenden mAk, insbesondere die gegen HBL-B und HBL-L1 gerichteten Antikörper, waren gegen kontinuierliche Epitope gerichtet, der weitaus größte Anteil der generierten Antikörper reagierte jedoch nur unter den Bedingungen eines indirekten EIA mit HBL-B bzw. HBL-L1. Eine Reaktivität mit den nativen Proteinen in Lösung konnte, abgesehen von den beiden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten mAk 1B8 (gegen HBL-B) und mAk 1E9 (HBL-L1), nicht nachgewiesen werden (Dietrich, unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Hinblick auf die beabsichtigte Etablierung von Sandwich-EIAs war es aber von fundamentaler Bedeutung, dass die generierten mAk mit in Lösung befindlichem Antigen reagieren. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer methodischer Ansatz, nämlich die Reinigung der toxischen Rohpräparationen mittels IAC gewählt. Dieses Verfahren basiert auf der reversiblen und spezifischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper, bedingt nur eine vergleichsweise geringe Manipulation der Proteine und sollte daher in einer deutlich geringeren Denaturierung der HBL-Komponenten resultieren (Moser & Hage, 2010, Sheng & Kong, 2012). Im Übrigen hatte sich die IAC am Lehrstuhl auch bei der Generierung von NheC-spezifischen mAk als effiziente und schonende Reinigungsmethode erwiesen. Die so gereinigten Toxinpräparationen waren sehr stabil und zeigten selbst nach einjähriger Lagerung bei 4 °C noch eine Restaktivität im Zellkulturtest mit Vero-Zellen (Heilkenbrinker, 2014). Auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte unter Verwendung des HBL-B-spezifischen mAk 1B8 ein effizientes IAC-Verfahren zur Reinigung des HBL-B etabliert und diese Komponente schnell und einfach im µg-Bereich aus *B. cereus* Überständen isoliert werden. Für die Lagerung der gereinigten Toxinpräparationen bei 4 °C erwies sich eine Aufbewahrung in Glasbehältnissen als obligatorisch. So konnte demonstriert werden, dass sowohl HBL-B als auch HBL-L1, ähnlich wie NheC (Heilkenbrinker, 2014), aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften unspezifisch an Kunststoffmaterialien adsorbiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Interessanterweise konnte bei der Reinigung von *B. cereus* KÜ mit dem HBL-B-spezifischen mAk 1B8 neben HBL-B auch HBL-L1 (42 % des aufgetragenen Materials) und HBL-L2 (20 %) in den Eluaten detektiert werden. Kontrolluntersuchungen basierend auf dem Nachweis der B-Komponente des anderen von *B. cereus* produzierten Enterotoxin-Komplexes Nhe belegten, dass es sich hierbei nicht um eine unspezifische Bindung der Toxinkomponenten an das Immunosorbens handelte. NheB befand sich nahezu vollständig im Durchlauf, nur durchschnittlich 3 % waren im Eluat nachweisbar. Prinzipiell stellten diese bei der Immunogen-Gewinnung gemachten Beobachtungen einen ersten, aber auch schon sehr eindeutigen Beleg dafür dar, dass die HBL-Komponenten in Lösung interagieren und waren Anlass dafür, im weiteren Verlauf der Arbeit detailliertere Untersuchungen zur HBL-Komplexbildung durchzuführen (V.3).

Neben der im Vergleich zu früheren Arbeiten unterschiedlichen Immunogen-Herstellung mittels IAC wurde für die Immunisierung der Mäuse auch ein anderes Adjuvans (Sigma-Adjuvans) eingesetzt. Bei der daraus resultierenden Öl-in-Wasser-Emulsion sollen native Proteinstrukturen besser erhalten bleiben als in den oft für die Generierung von diagnostischen Antikörpern eingesetzten, auf Freund'schen Adjuvans basierenden Wasser-in-Öl-Emulsionen (Bhattacharya & Sinha, 2006; Stills, 2005). Eine Untersuchung der Mäuseseren bestätigte die hohe Immunogenität der affinitätschromatographisch gereinigten Toxinpräparationen, so konnten bereits nach der ersten Restimulierung Antikörper-Titer von $> 1:128.000$ nachgewiesen werden. Die Antiseren wiesen zudem hohe Affinitäten für rekombinantes HBL-B und HBL-L1 auf. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich, zumindest für *B. cereus* Toxine, mit dem verwendeten Sigma-Adjuvans auch hinsichtlich der Immunogenität gleichwertige Ergebnisse wie mit dem auch heute noch häufig verwendeten Freund'schen Adjuvans erzielen lassen. In Zytotoxizitätstests mit Vero-Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Mäuseseren neutralisierende Eigenschaften besitzen. So konnte durch Zugabe der Seren zu KÜ einer *B. cereus* Nhe-Deletionsmutante, die außer HBL keine weiteren zytotoxischen Exoproteine produziert, eine 75 – 90 %ige Reduktion der zytotoxischen Aktivität initiiert werden – ein deutlicher Hinweis darauf, dass von den Seren auch tatsächlich native, aktive Toxine erkannt werden.

2 Charakterisierung der Antikörper und Etablierung von EIAs

Insgesamt konnten zum Nachweis der HBL-Komponenten 35 Hybridomzelllinien etabliert werden. Eine Überprüfung der Spezifität im EIA und Immunoblot mit rekombinanten HBL-Komponenten zeigte, dass 29 mAk HBL-B-spezifisch sind, vier mAk mit HBL-B/-L1 kreuzreagieren und zwei mAk HBL-L2 spezifisch sind. Letztere erwiesen sich dabei um Faktor 3 – 6 sensitiver als der aus einer früheren Arbeit stammende HBL-L2-spezifische mAk 8B12 (Fella, 1999).

Unklar bleibt, weshalb keine HBL-L1-spezifischen mAk gewonnen werden konnten, obwohl in den Mäuseseren hohe Titer gegen rekombinantes HBL-L1 nachweisbar waren (Abb. 5). Eventuell war aber diese beobachtete Reaktivität nur auf einen hohen Anteil an HBL-L1 und HBL-B kreuzreaktiven Antikörpern im Serum zurückzuführen, entsprechende Klone konnten letztlich auch aus dem Fusionsmaterial gewonnen werden. Aufgrund der gewissen Sequenzhomologie (25 %) zwischen den beiden Komponenten (Fagerlund *et al.*, 2008) war die Induzierung entsprechend kreuzreaktiver Antikörper im Übrigen erwartet worden. Eine größere Rolle bei der gescheiterten Identifizierung HBL-L1-spezifischer Klone könnte die limitierte Verfügbarkeit geeigneter Screening-EIAs gespielt haben. Das Screening der Hybridomzelllinien auf HBL-L1-reaktive mAk war nur in einem indirekten EIA möglich, da die Etablierung eines F(ab)-basierten Sandwich-EIA-Systems, das sich bei der Identifizierung HBL-B-positiver Klone bewährt hatte, aufgrund der geringen Restaktivität des enzymmarkierten 1E9-F(ab) scheiterte. Mit einem entsprechendem System wäre auch der Nachweis von Antikörpern gegen diskontinuierliche Konformations-Epitope des HBL-L1 möglich gewesen, dies ist mit dem verwendeten indirekten EIA nicht der Fall.

Im Hinblick auf die gewonnenen Antikörper ist bemerkenswert, dass 27 der 35 mAk mit in Lösung befindlichem Antigen reagieren, wie Untersuchungen in einem indirekten EIA unter kompetitiven Bedingungen bzw. in einem modifizierten Sandwich-EIA-System basierend auf einem Peroxidase-markierten 1B8-F(ab)-Konjugat zeigten. Dies belegt die Effizienz des in V.1 skizzierten Ansatzes, IA-gereinigte Toxine als Öl-in-Wasser-Emulsion zur Immunisierung einzusetzen, um vorzugsweise mit nativen Proteinen reaktive Antikörper zu erhalten. Dass sich dabei die erhaltenen Antikörper nicht notwendigerweise gegen Konformations-Epitope richten, zeigten Immunoblot-Analysen, bei denen zumindest für die ausgewählten mAk Reaktivitäten mit den HBL-Komponenten trotz der vorherigen Denaturierung festgestellt wurden. Insgesamt lassen diese und die in früheren

Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse (siehe V.1) aber auch die Vermutung zu, dass bei einer durch die Aufreinigung induzierten teilweisen Denaturierung der Komponenten bzw. der Bindung des HBL-B bzw. HBL-L1 an die Mikrotiterplatte eine massive Änderung der Tertiärstruktur auftritt, so dass immundominante Epitope, die bei den nativen Proteinen in Lösung für die Antikörper nicht zugänglich sind, frei liegen und die Immunantwort bzw. Reaktivität in indirekten EIAs dominieren. Bei IA-gereinigtem Material und mit einer Öl-in-Wasser-Emulsion wird hingegen offensichtlich eine heterogenere Immunantwort induziert. Ein Beleg für die hohe Bandbreite der von den neuen HBL-B-spezifischen mAk erkannten Epitope ist sicherlich auch, dass mit den gewonnenen mAk (und dem bereits etablierten mAk 1B8) eine breite Palette an verschiedenen Sandwich-EIAs etabliert werden konnte.

Die etablierten Sandwich-EIAs erwiesen sich als hochsensitiv, die Nachweisgrenzen für rekombinante HBL-Komponenten bewegten sich bei allen Testsystemen im unteren Nanogramm-Bereich (0,04 - 4 ng/ml). Die höchsten Testempfindlichkeiten konnten dabei für die HBL-B-spezifischen Nachweissysteme festgestellt werden, hier lagen die Nachweisgrenzen bei $\leq 0,1$ ng/ml. Diese Testsensitivitäten bewegen sich im oberen Bereich dessen, was mit klassischen Sandwich-EIA-Verfahren realisiert werden kann. Ob bei diesen Ergebnissen auch eine Überschätzung der tatsächlichen Testempfindlichkeit, bedingt durch methodenbedingte, systematische Fehler bei der Quantifizierung des rekombinanten HBL-B eine Rolle spielt, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine HBL-L1-spezifischen mAk generiert werden konnten, gelang es unter Verwendung des HBL-L1-spezifischen mAk 1E9 als Fangantikörper, welcher bereits am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch zur Verfügung stand, ein spezifisches Testsystem zum Nachweis von HBL-L1 zu etablieren. Die Sensitivität dieses EIAs ist allerdings limitiert, die Nachweisgrenze für rekombinantes HBL-L1 liegt bei 4 ng/ml und ist damit um fast zwei Größenordnungen schlechter als die entsprechenden HBL-B-spezifischen EIAs.

Im Gegensatz dazu konnte mit den neu generierten HBL-L2-spezifischen mAk eine deutliche Verbesserung dieses Komponenten-spezifischen Nachweises erreicht werden. Zum Nachweis und zur Quantifizierung von HBL-L2 wird am Lehrstuhl bereits seit vielen Jahren ein von Fella (1999) entwickelter Sandwich-EIA eingesetzt (Moravek *et al.*, 2006; Jeßberger *et al.*, 2014). Die Nachweisgrenze des neu etablierten HBL-L2-spezifischen Sandwich-EIA-Systems lag bei 0,2 ng/ml und erwies sich dabei um Faktor 5 empfindlicher als das bei Fella (1999)

beschriebene Testsystem, wobei die dort angegebene Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml in der vorliegenden Arbeit für rekombinantes HBL-L2 nicht bestätigt werden konnte, sondern bei 1 ng/ml lag. Der neu etablierte Sandwich-EIA zum Nachweis von HBL-L2 ist damit auch deutlich sensitiver als die derzeit kommerziell erhältlichen Testkits BCET-RPLA Toxin Assay (1 ng/ml) (Beecher & Wong, 1994a) und das Duopath[®]-System (20 ng/ml) (Krause *et al.*, 2010).

Analog zu der in vielen Untersuchungen gemachten Beobachtung, dass mit einem alleinigen Nachweis der Toxin-Gene (Guinebretière *et al.*, 2002; Moravek *et al.*, 2006; Tallent *et al.*, 2015) keine Aussage über die Virulenz eines *B. cereus* Isolates gemacht werden kann, zeigten auch die eigenen Untersuchungen zur relativen HBL-Produktivität von 16 *hbl*-positiven Stämmen, dass diese zwischen den verschiedenen Stämmen deutlich divergiert. Prinzipiell konnte allerdings im Hinblick auf die relative Expression der verschiedenen HBL-Einzelkomponenten bei den meisten Isolaten ein ähnliches Bild erhalten werden, d. h. bei hohen HBL-B-Titern wurden auch für die beiden anderen Komponenten hohe Reaktivitäten in den EIAs festgestellt. Dies ist insofern nicht überraschend, da bekanntermaßen die maximale biologische Aktivität von HBL erreicht wird, wenn die Einzelkomponenten in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 vorliegen (Beecher *et al.*, 1995). Größere Abweichungen, die bei einigen Isolaten für die HBL-L2-Produktivität beobachtet wurden, könnten insofern weniger auf tatsächliche Expressionsunterschiede als auf eine gesteigerte/reduzierte Reaktivität des Isolates in den Komponenten-spezifischen EIAs hindeuten. Da alle EIAs auf mAk basieren, können gewisse Abweichungen in den Aminosäuresequenzen der jeweiligen antigenen Determinanten in einer deutlich veränderten EIA-Reaktivität resultieren. Prinzipiell sind aber die Aminosäuresequenzen der HBL-Komponenten hoch konserviert (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Bei einer statistischen Auswertung der Produktivitätsdaten konnte für alle Einzelkomponenten eine positive Korrelation zwischen den gemessenen Antigen-Titern und den im WST-Zellkulturtest ermittelten Zytotoxizitätstitern ermittelt werden (HBL-B $r = 0,627$; HBL-L1 $r = 0,632$ und HBL-L2 $r = 0,740$). Die Werte waren dabei alle signifikant ($p < 0,01$). Die von Jeßberger *et al.* (2014) propagierte höhere Signifikanz für HBL-L1-Werte konnte somit nicht bestätigt werden. Da allerdings alle *hbl*-positiven Stämme parallel immer auch das zytotoxisch aktivere Nhe-Toxin exprimieren (Moravek *et al.*, 2006), sind diese Korrelationen immer unter Vorbehalt zu sehen.

Im WST-Zellkulturtest wurde unter Verwendung verschiedener Zelllinien (Vero-, A549- und RAW 264.7-Zellen) untersucht, ob die HBL-Komponenten-spezifischen mAk neutralisierende Eigenschaften besitzen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden HBL-L2-spezifischen mAk 1D8 und mAk 1H9 die Zytotoxizität von KÜ der *B. cereus* Nhe-Deletionsmutante hemmen. Anders als in einer Studie von Dietrich *et al.* (2005), in der es gelang einen NheB-spezifischen mAk (1E11) zu etablieren, der die Zytotoxizität von Nhe nahezu vollständig neutralisiert, konnte mit den HBL-L2-spezifischen mAk keine vollständige Neutralisation von HBL induziert werden. Die zytotoxische Restaktivität der KÜ der *B. cereus* Nhe-Deletionsmutante variierte bei den verschiedenen Zelllinien zwischen 14 und 40 %. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die beiden Antikörper mAk 1D8 bzw. mAk 1H9 – beide weisen eine unterschiedliche Epitop-Spezifität auf (Tab. 13) – mit Bereichen des Toxins reagieren, die für die Zytotoxizität von HBL eine große, aber nicht die entscheidende Rolle spielen. Ob durch die Antikörper die für die Porenbildung theoretisch notwendige Umfaltung der HBL-Komponente (Madegowda *et al.*, 2008) oder die Anhaftung von HBL-L2 an das zellgebundene HBL-B/-L1 behindert wird, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Theoretisch wäre aber auch denkbar, dass – wie die IAC-Untersuchungen belegen – ein gewisser Teil des HBL-L2 bereits als Komplex mit den beiden anderen Komponenten vorliegt und die beiden Antikörper die Aktivität dieses Komplexes aus sterischen Gründen nicht blockieren können. In weiteren Zellexperimenten, bei denen die HBL-Komponenten entsprechend der von Beecher *et al.* (1991) bzw. Sastalla *et al.* (2013) propagierten Bindungsreihenfolge (HBL-B, -L1, -L2) konsekutiv zugegeben werden, könnte diese Hypothese abgeklärt werden.

Interessanterweise konnte im Zellkulturtest unter Verwendung von Vero-Zellen durch die Zugabe der HBL-B-spezifischen mAk 1D7 (+ 220 %) und mAk 1D12 (+ 75 %) sowie des HBL-B/-L1-reaktiven mAk 12D12 (+ 165 %) eine deutliche Verstärkung der Zytotoxizität der KÜ der Nhe-Deletionsmutante beobachtet werden. Auch bei Verwendung anderer Zelllinien (A549- bzw. RAW 264.7-Zellen) wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, wenngleich der verstärkende Effekt etwas geringer ausfiel. In der Literatur findet man zahlreiche Studien über die infektionsverstärkende Wirkung virusspezifischer Antikörper, ein Phänomen das als antibody-dependent-enhancement (ADE) bezeichnet wird (Tirado & Yoon, 2003). Dabei kann die Interaktion spezifischer Antikörper mit Fc- oder Komplementrezeptoren an der Oberfläche von Makrophagen zu einer erhöhten Virusaufnahme in die Zelle führen (Takada & Kawaoka, 2003). ADE wurde beispielsweise bei Dengue-Fieber (Guzman *et al.*, 2013), HIV (Willey *et al.*, 2011), Feliner Infektiöser Peritonitis (Takano *et al.*, 2008) oder Ebola

(Takada *et al.*, 2003) beschrieben. In einer Studie von Mohamed *et al.* (2004) wurde erstmals auch über eine Antikörper-bedingte Verstärkung der Zytotoxizität von bakteriellen Toxinen berichtet. So konnte nach Zugabe eines für die B-Untereinheit Protektives Antigen (PA) spezifischen mAk eine deutliche Erhöhung der Zytotoxizität des vollständigen *B. anthracis* Letaltoxins beobachtet werden. Auch dieses Phänomen wurde von den Autoren auf zellwandständige Fc-Rezeptoren zurückgeführt: Durch die Interaktion des Fc-Teils des an PA-gebundenen mAk mit Fc-Rezeptoren an der Zelloberfläche wird die Bindung von PA an der Zelle stabilisiert. Dadurch kann mehr PA an die Zelloberfläche binden. Folglich wird mehr der zweiten Toxinkomponente Letalfaktor internalisiert, was letztlich zu einem erhöhten Zelltod führt.

Alle mAk, die in der vorliegenden Arbeit eine Verstärkung der Zytotoxizität bewirkten, waren HBL-B-reaktiv. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass HBL-B – ähnlich wie das strukturverwandte NheC – als Bindungskomponente fungiert (Beecher & Macmillan, 1991, Sastalla *et al.*, 2013). Grundsätzlich wäre es daher möglich, dass die HBL-B-reaktiven mAk ebenfalls eine Stabilisierung der B-Komponente an der Zelloberfläche bewirken und dies in einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität resultiert. Eine Beteiligung von Fc-Rezeptoren kann hierbei jedoch ausgeschlossen werden, da die Antikörper-bedingte Verstärkung der Zytotoxizität auch bei Vero- und A549-Zellen beobachtet werden konnte, diese aber keine Fc-Rezeptoren besitzen. Bemerkenswert ist zudem, dass die beiden HBL-L2-spezifischen mAk 1D8 bzw. mAk 1H9 den Zytotoxizitäts-verstärkenden Effekt vollständig aufheben konnten. So entsprach die zytotoxische Restaktivität der Nhe-Deletionsmutante mit 55 % (nach Inkubation mit dem HBL-B-reaktiven mAk 1D7 + mAk 1D8) bzw. 53 % (mAk 1D7 + mAk 1H9) in etwa den Ergebnissen, die bei der alleinigen Zugabe von mAk 1D8 bzw. mAk 1H9 ermittelt wurden.

3 Komplexbildung von HBL

Wie eingangs erwähnt, wurden im Rahmen dieser Arbeit eindeutige Hinweise darauf gefunden, dass die HBL-Komponenten in Lösung interagieren. So konnten bei der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von HBL-B mit dem spezifischen mAk 1B8 neben HBL-B auch HBL-L1 und HBL-L2 in den gereinigten Toxinpräparationen nachgewiesen werden. Da bei diesen Untersuchungen die Gewinnung eines Immunogens im Vordergrund stand und deshalb vergleichsweise große Volumina auf die Säule aufgetragen wurden, sollten in detaillierteren Studien, auch unter Verwendung der neu etablierten Sandwich-EIAs, genauere Daten zur Interaktion der HBL-Komponenten in Lösung erhoben werden. Bei Auftrag kleiner Probenvolumina auf die 1B8 (HBL-B-spezifische mAk)-Säule wurde unter diesen Bedingungen das in den KÜ vorhandene HBL-L1 fast vollständig (> 90 %) gebunden, in den ersten Läufen zur Immunogen-Herstellung lag dieser Anteil hingegen nur bei etwa 50 %. Interessanterweise zeigte sich bei der Bilanzierung, dass der detektierbare Anteil an HBL-B und HBL-L1 in den Eluatn deutlich höher war als in den als Probe aufgetragenen KÜ. So konnte in den IA-gereinigten Toxinpräparationen zwischen 70 und 105 % mehr HBL-B bzw. zwischen 61 und 114 % mehr HBL-L1 im Vergleich zu den ungereinigten *B. cereus* KÜ nachgewiesen werden. In einem von Heilkenbrinker *et al.* (2013) entwickelten NheC-spezifischen Sandwich-EIA lagen die in *B. cereus* KÜ detektierbaren NheC-Titer weit unter den erwarteten Werten, die Autoren führten die Diskrepanz zwischen den theoretisch vorhandenen und den gemessenen Konzentrationen darauf zurück, dass die Bindungsstellen eines der im Sandwich-EIA beteiligten Antikörper aufgrund der Komplexbildung von NheB und NheC in Lösung nicht zugänglich waren. Eine Erklärungsansatz wäre daher, dass durch die Interaktion der HBL-Komponenten in Lösung nicht immer alle Epitope für den Fang- bzw. Detektionsantikörper frei zugänglich sind, wodurch letztlich weniger HBL-B bzw. HBL-L1 in den KÜ detektiert werden kann. Durch die bei der Elution gebundener Proteine von der IA-Säule eingesetzten, niedrigen pH-Werte zerfällt wahrscheinlich ein Großteil dieser Komplexe, so dass die Bindungsstellen wieder frei werden. Dies impliziert gleichzeitig auch, dass das Epitop, des für die IA-Reinigung verwendeten mAk 1B8, durch die Interaktion der HBL-Komponenten nicht blockiert wird.

Auch HBL-L2 scheint an einer Interaktion in Lösung beteiligt zu sein. Dies ist insofern bemerkenswert, da in Studien zur Wirkungsweise des Nhe-Komplexes gezeigt werden konnte, dass nur NheB und NheC in Lösung Komplexe bilden, wohingegen NheA erst nach

Bindung dieser Hetero-Oligomere an die Zelloberfläche an NheB binden kann (Didier *et al.*, 2012, Lindbäck *et al.*, 2010). Die höheren Verluste im Durchlauf (70 - 80 %) lassen jedoch vermuten, dass HBL-L2 nur lose mit dem HBL-B/-L1-Komplex assoziiert ist. Das könnte auch erklären, weshalb bei der IA-Reinigung von *B. cereus* KÜ mit dem HBL-L2-spezifischen mAk 1H9 nur HBL-L2 in größeren Mengen, hingegen praktisch kein HBL-B bzw. HBL-L1, in den Eluaten gefunden werden konnte. Hier ist allerdings auch zu bedenken, dass die neutralisierenden Eigenschaften von mAk 1H9 eventuell darauf beruhen, dass die Interaktion der L2-Komponente mit HBL-B/HBL-L1 gehemmt wird, mit der Folge, dass während der IAC an HBL-L2 gebundenes HBL-B/-L1 bedingt durch die hohe Affinität des mAk aus der Bindung gedrängt wird.

Nachdem mittels Immunaффinitätschromatographie nur indirekte Nachweise der Komplexbildung von HBL möglich sind, sollten unter Verwendung der rekombinant hergestellten HBL-Komponenten, potentielle Interaktionen der Einzelkomponenten direkt nachgewiesen werden. Durch die Kombination eines HBL-L1-reaktiven mAk (mAk 1G8) und eines enzymmarkierten HBL-L2-spezifischen mAk (mAk 1H9) gelang es, eine Interaktion von HBL-L1 und HBL-L2 in Lösung nachzuweisen, dies konnte auch für „natürliches“ IA-gereinigtes HBL-L2 demonstriert werden. Diese in einem Hybrid-Sandwich-EIA erhaltenen Ergebnisse wurden durch Dot Blot-Versuche untermauert. In allen Untersuchungen wurden interessanterweise bei einem Überschuss von HBL-L2 maximale Reaktivitäten erreicht, obwohl postuliert wurde, dass die maximale biologische Aktivität von HBL dann erreicht wird, wenn die Einzelkomponenten im molaren Verhältnis von 1:1:1 vorliegen (Beecher *et al.*, 1995, Sastalla *et al.*, 2013). Die in den eigenen Untersuchungen zur Interaktion von HBL-L1 und HBL-L2 erhaltenen Ergebnisse deuten allerdings daraufhin, dass eventuell ein HBL-L1/-L2-Aggregat sozusagen als Kristallisationskern dient, der die Anlagerung von weiteren L2-Molekülen ermöglicht. Da HBL-L2 die letztlich lytische Komponente darstellt, wäre ein solcher Mechanismus durchaus plausibel.

Ungeklärt bleibt, weshalb entgegen der Erwartungen mit keiner der getesteten Antikörperkombinationen eine Interaktion von rHBL-B mit einer der beiden anderen HBL-Komponenten detektiert werden konnte, obwohl die IAC-Aufreinigung der natürlichen KÜ eindeutig gezeigt hatte, dass ein Zwei-Komponenten-Komplex bestehend aus HBL-B und HBL-L1 (bzw. eventuell teilweise auch ein Drei-Komponenten-Komplex aus HBL-B, -L1 und -L2) existiert. Untersuchungen zur Aktivität der rekombinanten HBL-Komponenten im Zellkulturtest zeigten allerdings, dass das rekombinant hergestellte HBL im Vergleich zu KÜ

der *B. cereus* Nhe-Deletionsmutante nur eine ca. 5 - 10 %ige Restaktivität aufweist, während die beiden L-Komponenten hohe Aktivitäten zeigten. Für rHBL-L2 konnte bereits in früheren Arbeiten (Padalak, 2010) eine dem nativen Protein entsprechende Funktionalität nachgewiesen werden. Die für rHBL-B verfügbaren Ergebnisse deuten eventuell darauf hin, dass die für die Bindung an die Zelle verantwortliche Proteinstruktur beim rekombinanten Protein intakt ist, die für die Interaktion mit HBL-L1 entscheidenden strukturellen Domänen hingegen nicht. Dass die laut IAC-Ergebnissen in natürlichen Überständen vorhandenen HBL-B/-L1-Komplexe mit den rekombinanten Proteinen nicht reproduziert werden konnten, könnte aber auch dadurch bedingt sein, dass – wie bereits erwähnt – die Bindungsstellen der im Sandwich-EIA verwendeten mAk durch die Komplexbildung nicht frei zugänglich sind. Für den spezifischen Nachweis der L1-Komponente steht ausschließlich der mAk 1E9 zur Verfügung, der bereits beim Nachweis der HBL-L1/-L2-Komplexe nur eine vergleichsweise geringe Reaktivität gezeigt hatte (Abb. 22). Der fehlende Nachweis einer HBL-B/-L1-Interaktion im Hybrid-Sandwich-EIA könnte also durchaus auch darauf zurückzuführen sein, dass das Epitop von mAk 1E9 durch die Komplexbildung blockiert wurde. Letztlich können diese Fragen nur über eine Marker-freie Analysetechnik geklärt werden, anbieten würde sich hier das auf dem Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz basierende Biacore-System, mit dem die Wechselwirkung zweier Bindungspartner in Echtzeit detektiert werden kann. Zhu *et al.* (2016) konnte so die hohe Affinität der Interaktion von NheB und NheC demonstrieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen ist, robuste Sandwich-EIA-Systeme zum sensitiven und spezifischen Nachweis aller Einzelkomponenten von Hämolyysin BL zu etablieren. Zudem wurden eindeutige Hinweise gefunden, dass die HBL-Komponenten in Lösung interagieren. Die Interaktion von HBL-B und HBL-L1 konnte dabei indirekt bei der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von *B. cereus* KÜ mit dem HBL-B-spezifischen mAk 1B8 gezeigt werden. In einem direkten Verfahren, nämlich einem Hybrid-Sandwich-EIA basierend auf einem HBL-L1- und einem HBL-L2-reaktiven mAk, konnte zudem eine Interaktion von rHBL-L1 und HBL-L2 demonstriert werden. Damit sind Grundlagen geschaffen, um in weiterführenden Studien den Wirkmechanismus von HBL genauer zu untersuchen. Für die Bindung an die Zelle bzw. für die Interaktion der Einzelkomponenten wichtige strukturelle Domänen könnten beispielsweise mittels Antikörper identifiziert werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Etablierung und Anwendung von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen den aus den drei Einzelkomponenten B, L1 und L2 bestehenden, von *B. cereus* produzierten Enterotoxin-Komplex Hämolysin BL (HBL).

Als Immunogen wurde eine aus *B. cereus* Kulturüberständen (KÜ) mittels Immunaффinitätschromatographie (IAC) gewonnene Toxinpräparation verwendet. Aus drei durchgeführten Zellfusionsexperimenten konnten insgesamt 35 Hybridomzelllinien, die HBL-Komponenten-spezifische mAk produzieren, etabliert werden. Die Charakterisierung der Antikörper erfolgte mittels Enzymimmuntests (EIA), Immunoblot und WST-Zellkulturtest. Untersuchungen zur Spezifität zeigten, dass ein Großteil der mAk (29) gegen HBL-B gerichtet ist, vier mAk reagieren sowohl mit HBL-B als auch HBL-L1, zwei mAk sind HBL-L2-spezifisch. Ein HBL-L1-spezifischer mAk konnte hingegen nicht etabliert werden. In Zellkulturtests waren die beiden HBL-L2-spezifischen mAk in der Lage, die zytotoxische Aktivität von HBL zu neutralisieren. Demgegenüber wurde für drei HBL-B-reaktive mAk ein Zytotoxizitäts-verstärkender Effekt beobachtet.

Unter Verwendung der hergestellten mAk sowie mAk aus früheren Arbeiten am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch gelang es, erstmals zum Nachweis aller HBL-Komponenten hochempfindliche Sandwich-EIAs zu entwickeln. Die Nachweisgrenzen für rekombinante Toxinkomponenten lagen dabei jeweils im unteren Nanogramm-Bereich (0,04 - 4 ng/ml). Eine Untersuchung der HBL-Produktivität von 16 *hbl*-positiven Stämmen zeigte, dass diese zwischen verschiedenen Stämmen zum Teil deutlich divergiert. Allerdings konnte im Hinblick auf die Expression der HBL-Einzelkomponenten bei den meisten Isolaten ein ähnliches Bild erhalten werden.

In Studien zur HBL-Komplexbildung konnte mittels IAC gezeigt werden, dass in nativen *B. cereus* KÜ HBL-B und HBL-L1 interagieren. Da zudem alle drei HBL-Komponenten in den gereinigten Toxinpräparationen detektiert werden konnten, ist wahrscheinlich auch ein Teil des HBL-L2 an diese Komplexe assoziiert. Mit einem Hybrid-Sandwich-EIA-System, das auf der Kombination eines HBL-L1-reaktiven mAk und eines HBL-L2-spezifischen mAk basiert, sowie einem Dot Blot Assay wurde des Weiteren die Interaktion von rekombinantem HBL-L1 und HBL-L2 in Lösung demonstriert.

VII SUMMARY

Detection of the individual components B, L1 and L2 of the *B. cereus* enterotoxin complex hemolysin BL: development and characterization of monoclonal antibodies

This study describes the establishment and characterization of monoclonal antibodies (mAb) against each of the individual components (B, L1, L2) of the *Bacillus cereus* enterotoxin complex hemolysin BL (HBL).

B. cereus supernatants were purified by immunoaffinity chromatography (IAC) and the resulting toxin preparations were used as immunogen. A total of 35 hybridoma cell lines, secreting component-specific antibodies were obtained from three different cell fusion experiments. The mAbs were characterized by means of enzyme immunoassays (EIA), immunoblots and cell culture assays. Specificity analyses revealed that the majority of the mAbs (29) is directed against HBL-B, while four mAbs react with both HBL-B and HBL-L1; another two mAbs are specific for HBL-L2. However, no HBL-L1-specific mAb could be established. In cell culture assays, both of the HBL-L2-specific mAbs were capable to neutralize the cytotoxic activity of the HBL-complex. In contrary, an enhanced cytotoxic effect was observed for some of the HBL-B reactive mAbs.

Based on the new developed antibodies as well as other mAbs previously generated at the chair of hygiene and technology of milk, highly sensitive sandwich EIAs for the detection of each of the individual HBL-components were established. For recombinant toxin components detection limits of these assays were in the range from 0.04 to 4 ng/ml. Studies on the HBL-productivity of 16 *hbl*-positive *B. cereus* strains revealed that there is a large variation in the level of toxin expression. However, with regard to the expression of the individual HBL-components results were similar for most of the tested strains.

By using IAC strong evidence was found that HBL-B and HBL-L1 interact in native supernatants. Further on, as all HBL components could be detected in the purified toxin preparations, it seems to be likely that parts of HBL-L2 are associated to those complexes as well. Interaction of recombinant HBL-L1 and HBL-L2 could be demonstrated by using both a hybrid sandwich EIA, combining a HBL-L1 reactive mAb and a HBL-L2-specific mAb, and a dot blot assay.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

AGAISSE, H., M. GOMINET, O. A. ØKSTAD, A. B. KOLSTØ & D. LERECLUS (1999):
PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in
Bacillus thuringiensis.
Mol Microbiol. 32, 1043-1053.

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI & M. ISOBE (1995):
A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*.
FEMS Microbiol Lett. 129, 17-20.

ASANO, S. I., Y. NUKUMIZU, H. BANDO, T. IIZUKA & T. YAMAMOTO (1997):
Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.
Appl Environ Microbiol. 63, 1054-1057.

AUGER, S., N. GALLERON, E. BIDNENKO, S. D. EHRLICH, A. LAPIDUS &
A. SOROKIN (2008):
The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is
representative of a cluster of thermophilic strains.
Appl Environ Microbiol. 74, 1276-1280.

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.

BEATTIE, S. H. & A. G. WILLIAMS (1999):
Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved
cytotoxicity assay.
Lett Appl Microbiol. 28, 221-225.

BECKER, B., H. BECKER, C. BÜRK, R. DIETRICH & E. MÄRTLBAUER (2005):
Pathogene Mikroorganismen – *B. cereus*.
Behr Verlag, Hamburg.

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. WONG (1994a):

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

Appl Environ Microbiol. 60, 4614-4616.

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

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

Infect Immun. 62, 980-986.

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

Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

Infect Immun. 63, 4423-4428.

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

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

J Biol Chem. 272, 233-239.

BHATTACHARYA, S. & J. SINHA (2006):

A textbook of immunology (basic, cellular & molecular approach).

Academic Publishers, Kalkutta, Indien

CASTIAUX, V., X. LIU, L. DELBRASSINNE & J. MAHILLON (2015):

Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin?

Int J Food Microbiol. 211, 79-85.

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

Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. Crit Rev Microbiol. 37, 188-213.

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

Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. Mol Cell Proteomics. 9, 1486-1498.

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

Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. J Appl Microbiol. 97, 214-219.

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

Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. Int J Food Microbiol. 174, 19-22.

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

Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. Syst Appl Microbiol. 32, 81-90.

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

Monoclonal antibodies neutralize *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin by inhibiting ordered binding of its three exoprotein components. Infect Immun. 80, 832-838.

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

Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. J Clin Microbiol. 43, 4277-4279.

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

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

Appl Environ Microbiol. 65, 4470-4474.

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

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

Appl Environ Microbiol. 71, 8214-8220.

EFSA (2015):

The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014.

EFSA Journal 2015 13 (12), 4329.

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

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

Mol Nutr Food Res. 48, 479-487.

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

Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol Lett. 260, 232-240.

ESBELIN, J., J. ARMENGAUD, A. ZIGHA & C. DUPORT (2009):

ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr.

J Bacteriol. 191, 4419-4426.

ESBELIN, J., Y. JOUANNEAU & C. DUPORT (2012):

Bacillus cereus Fnr binds a [4Fe-4S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR.

BMC Microbiol. 12, 125.

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

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

Microbiology. 150, 2689-2697.

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

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

Microbiology. 154, 693-704.

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK & P. E. GRANUM (2010):

Bacillus cereus cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway.

BMC Microbiol. 10, 304.

FELLA, C. (1999):

Nachweis von *Bacillus cereus*-Enterotoxine mittels monoklonaler Antikörper.

Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.

FLETCHER, P. & N. A. LOGAN (1999):

Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin.

Lett Appl Microbiol. 28, 394-400.

FRANKLAND, G. C. & P. F. FRANKLAND (1887):

Studies in some new micro-organisms obtained from air.

Philos. Trans. R. Soc. London. 178, 257-287.

GIBSON, T. & R. E. Gordon (1974):

Bacillus.

In: BUCHANAN, R. E. & N. E. GIBBONS (eds.) Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed.

Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

GHELARDI, E., F. CELANDRONI, S. SALVETTI, M. CERAGIOLI, D. J. BEECHER, S. SENESI & A. C. WONG (2007):

Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*.
Appl Environ Microbiol. 73, 4089-4093.

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, 299-303.

GOHAR, M., K. FAEGRI, S. PERCHAT, S. RAVNUM, O. A. ØKSTAD, M. GOMINET, A. B. KOLSTØ & D. LERECLUS (2008):

The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*.
PLoS One. 3, e2793.

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

Bacillus cereus and its food poisoning toxins.
FEMS Microbiol Lett. 157, 223-228.

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

The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*.
FEMS Microbiol Lett. 177, 225-229.

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

Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR.
Proc Natl Acad Sci U S A. 110, 1047-1052.

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

Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains.
J Clin Microbiol. 40, 3053-3056.

GUINEBRETIERE, M. H., A. FAGERLUND, P. E. GRANUM & C. NGUYEN-THE (2006):
Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex
PCR system.

FEMS Microbiol Lett. 259, 74-80.

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

Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group.

Environ Microbiol. 10, 851-865.

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

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

J Clin Microbiol. 48, 3388-3391.

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

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

Int J Syst Evol Microbiol. 63, 31-40.

GUZMAN, M. G., M. ALVAREZ & S. B. HALSTEAD (2013):

Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an
historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection.

Arch Virol. 158, 1445-1459.

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

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

FEMS Microbiol Lett. 197, 47-51.

HAUGE, S. (1955):

Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli.

J Appl Bacteriol. 18, 591-595.

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

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

PLoS One. 8, e63104.

HEILKENBRINKER, U. (2014):

Wirkungsweise des *Bacillus cereus* Enterotoxins Nhe: Bedeutung der Komplexbildung zwischen NheB und NheC.

Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.

HELGASON, E., O. A. ØKSTAD, D. A. CAUGANT, H. A. JOHANSEN, A. FOUET,
M. MOCK, I. HEGNA & A. B. KOLSTØ (2000):

Bacillus anthracis, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence.

Appl Environ Microbiol. 66, 2627-2630.

HELGASON, E., N. J. TOURASSE, R. MEISAL, D. A. CAUGANT & A. B. KOLSTØ
(2004):

Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group.

Appl Environ Microbiol. 70, 191-201.

HWANG, J. Y. & J. H. PARK (2015):

Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods.

J Dairy Sci. 98, 1652-1660.

INT' T VELD, P. H., W. S. RITMEESTER, E. H. 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.

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

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

Toxicon. 77, 49-57.

KIM, M. J., J. K. HAN, J. S. PARK, J. S. LEE, S. H. LEE, J. I. CHO & K. S. KIM (2015):

Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains.

J Microbiol Biotechnol. 25, 872-879.

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

Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections.

Microbes Infect. 2, 189-198.

KRAUSE, N., M. MORAVEK, R. DIETRICH, E. WEHRLE, J. SLAGHUIS & E. MÄRTLBAUER (2010):

Performance characteristics of the Duopath(R) cereus enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus* strains.

Int J Food Microbiol. 144, 322-326.

KREFT, J., H. BERGER, M. HÄRTLEIN, B. MÜLLER, G. WEIDINGER & W. GOEBEL (1983):

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

J Bacteriol. 155, 681-689.

LAPIDUS, A., E. GOLTSMAN, S. AUGER, N. GALLERON, B. SÉGURENS, C. DOSSAT, M. L. LAND, V. BROUSSOLLE, J. BRILLARD, M. H. GUINEBRETIERE, V. SANCHIS, C. NGUEN-THE, D. LERECLUS, P. RICHARDSON, P. WINCKER, J. WEISSENBACH, S. D. EHRLICH & A. SOROKIN (2008):

Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity.

Chem Biol Interact. 171, 236-249.

LINDBÄCK, T., O. A. ØKSTAD, A. L. RISHOVD & A. B. KOLSTØ (1999):

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

Microbiology. 145 (Pt 11), 3139-3146.

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

Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin.

Microbiology. 150, 3959-3967.

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

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

Infect Immun. 78, 3813-3821.

LUBENAU (1906):

Bacillus peptonificans als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 40, 433-437.

LÜCKING, G., M. STOECKEL, Z. ATAMER, J. HINRICHS & M. EHLING-SCHULZ (2013):

Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage.

Int J Food Microbiol. 166, 270-279.

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

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

FEMS Microbiol Lett. 141, 151-156.

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.

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

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

Proteins. 71, 534-540.

MARXEN, S., T. D. STARK, E. FRENZEL, A. RÜTSCHLE, G. LÜCKING, G. PÜRSTINGER, E. E. POHL, S. SCHERER, M. EHLING-SCHULZ & T. HOFMANN (2015):

Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*.

Anal Bioanal Chem. 407, 2439-2453.

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

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

J Clin Pathol. 29, 938-940.

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

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

FEMS Microbiol Lett. 257, 293-298.

MOSER, A. C. & D. S. HAGE (2010):

Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments.

Bioanalysis. 2, 769-790.

NARANJO, M., S. DENAYER, N. BOTTELDOORN, L. DELBRASSINNE, J. VEYS, J. WAEGENAERE, N. SIRTAINE, R. B. DRIESEN, K. R. SIPIDO, J. MAHILLON & K. DIERICK (2011):

Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning.

J Clin Microbiol. 49, 4379-4381.

NGAMWONGSATIT, P., P. P. BANADA, W. PANBANGRED & A. K. BHUNIA (2008):

WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line.

J Microbiol Methods. 73, 211-215.

OMER, H., B. ALPHA-BAZIN, J. L. BRUNET, J. ARMENGAUD & C. DUPORT (2015):

Proteomics identifies *Bacillus cereus* EntD as a pivotal protein for the production of numerous virulence factors.

Front Microbiol. 6, 1004.

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

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

J Appl Microbiol. 107, 821-829.

OUOBA, L. I., L. THORSEN & A. H. VARNAM (2008):

Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments.

Int J Food Microbiol. 124, 224-230.

PADALAK, T. (2010):

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

Diss. Med. Vet. Ludwig-Maximilians-Universität München.

RASKO, D. A., J. RAVEL, O. A. ØKSTAD, E. HELGASON, R. Z. CER, L. JIANG, K. A. SHORES, D. E. FOUTS, N. J. TOURASSE, S. V. ANGIUOLI, J. KOLONAY, W. C. NELSON, A. B. KOLSTØ, C. M. FRASER & T. D. READ (2004):

The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1.

Nucleic Acids Res. 32, 977-988.

REIS, A. L., M. T. MONTANHINI, J. V. BITTENCOURT, M. T. DESTRO & L. S. BERSOT (2013):

Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil.

Braz J Microbiol. 44, 1195-1198.

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 L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

J Bacteriol. 179, 2551-2556.

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

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

J Food Prot. 68, 2614-2622.

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

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

PLoS One. 8, e76955.

SETLOW, P. (2014):

Spore Resistance Properties.

Microbiol Spectr. 2.

SHENG, S. & F. KONG (2012):

Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography.

Pharm Biol. 50, 1038-1044.

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

Bacillus cereus-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops.

Appl Microbiol. 24, 341-348.

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

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

FEMS Microbiol Rev. 32, 579-606.

STILLS, H. F., JR. (2005):

Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants.

Ilar j. 46, 280-293.

TAKADA, A., H. FELDMANN, T. G. KSIAZEK & Y. KAWAOKA (2003):

Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection.

J Virol. 77, 7539-7544.

TAKADA, A. & Y. KAWAOKA (2003):

Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications.

Rev Med Virol. 13, 387-398.

TAKANO, T., C. KAWAKAMI, S. YAMADA, R. SATOH & T. HOHDATSU (2008):
Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus
in feline infectious peritonitis virus infection.
J Vet Med Sci. 70, 1315-1321.

TALLENT, S. M., J. M. HAIT & R. W. BENNETT (2015):
Analysis of *Bacillus cereus* toxicity using PCR, ELISA and a lateral flow device.
J Appl Microbiol. 118, 1068-1075.

THOMASSIN, S., M. P. JOBIN & P. SCHMITT (2006):
The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH,
growth rate and intracellular pH.
Arch Microbiol. 186, 229-239.

TIRADO, S. M. & K. J. YOON (2003):
Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease.
Viral Immunol. 16, 69-86.

TSCHIEDEL, E., P. M. RATH, J. STEINMANN, H. BECKER, R. DIETRICH, A. PAUL,
U. FELDERHOFF-MÜSER & C. DOHNA-SCHWAKE (2015):
Lifesaving liver transplantation for multi-organ failure caused by *Bacillus cereus* food
poisoning.
Pediatr Transplant. 19, E11-14.

TSILIA, V., B. DEVREESE, I. DE BAENST, B. MESUERE, A. RAJKOVIC,
M. UYTTENDAELE, T. VAN DE WIELE & M. HEYNDRICKX (2012):
Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by
pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group.
Anal Bioanal Chem. 404, 1691-1702.

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

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

J Clin Pathol. 32, 289-293.

VAN DER VOORT, M. & T. ABEE (2009):

Transcriptional regulation of metabolic pathways, alternative respiration and enterotoxin genes in anaerobic growth of *Bacillus cereus* ATCC 14579.

J Appl Microbiol. 107, 795-804.

VAN WELY, K. H., J. SWAVING, R. FREUDL, A. J. DRIESSEN (2001):

Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria.

FEMS Microbiol Rev. 25, 437-454.

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

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

J Microbiol Methods. 78, 265-270.

WILLEY, S., M. M. AASA-CHAPMAN, S. O'FARRELL, P. PELLEGRINO, I. WILLIAMS, R. A. WEISS & S. J. NEIL (2011):

Extensive complement-dependent enhancement of HIV-1 by autologous non-neutralising antibodies at early stages of infection.

Retrovirology. 8, 16.

YANG, I. C., D. Y. SHIH, J. Y. WANG & T. M. PANI (2007):

Development of rapid real-time PCR and most-probable-number real-time PCR assays to quantify enterotoxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group.

J Food Prot. 70, 2774-2781.

YOKOYAMA, K., M. ITO, N. AGATA, M. ISOBE, K. SHIBAYAMA, T. HORII & M. OHTA (1999):

Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice.

FEMS Immunol Med Microbiol. 24, 115-120.

ZHU, K., A. DIDIER, R. DIETRICH, U. HEILKENBRINKER, E. WALTENBERGER, N. JEßBERGER, E. MÄRTLBAUER & R. BENZ (2016):

Formation of small transmembrane pores: An intermediate stage on the way to *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) full pores in the absence of NheA.

Biochem Biophys Res Commun. 469, 613-618.

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

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

J Bacteriol. 189, 2813-2824.

IX ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des <i>hbl</i> -Operons (nach Ryan <i>et al.</i> , 1997; Lindbäck <i>et al.</i> , 1999).....	11
Abbildung 2:	Regulation der Gentranskription von <i>B. cereus</i> Toxinen und potentiellen Virulenzfaktoren (modifiziert nach Ceuppens <i>et al.</i> , 2011).....	15
Abbildung 3:	(A) Analyse der IA-Reinigung basierend auf dem HBL-B-spezifischen mAk 1B8 mittels Immunoblot; (B) Reaktivität von mAk 1B8 im Immunoblot mit rekombinanten HBL-Komponenten.....	39
Abbildung 4:	SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Quantifizierung der HBL-B/-L1 Konzentration in IA-gereinigten Toxinpräparationen.....	40
Abbildung 5:	Relative Affinität der Mäuseseren I - V für KÜ des <i>B. cereus</i> Isolates MHI 1532 bzw. rekombinante HBL-Komponenten B und L1.....	44
Abbildung 6:	Zytotoxische Restaktivität von KÜ einer <i>B. cereus</i> Nhe-Deletionsmutante im WST-Zellkulturtest mit Vero-Zellen nach Vorinkubation mit HBL-spezifischen Mausantiseren.....	45
Abbildung 7:	Vergleich der relativen Affinitäten HBL-L2-spezifischer mAk für KÜ verschiedener <i>B. cereus</i> Stämme.....	50
Abbildung 8:	Relative Reaktivität verschiedener ZKÜ in einem indirekten EIA unter kompetitiven Bedingungen.....	51
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Sandwich-EIA-Systems mit Peroxidase-markiertem F(ab)-Antikörper.....	52

- Abbildung 10:** Standardkurven für *B. cereus* KÜ (MHI 1532) unter Verwendung HBL-B-spezifischer mAk als Fangantikörper und 1B8-F(ab)-HRP als Detektionsantikörper.....54
- Abbildung 11:** Reaktivität der massenproduzierten mAk im Immunoblot mit KÜ des *B. cereus* Isolates MHI 1532 bzw. rekombinanten HBL-Komponenten55
- Abbildung 12:** Einfluss von HBL-Komponenten-spezifischen mAk auf die messbare zytotoxische Aktivität eines toxinhaltigen *B. cereus* KÜ (Nhe-Deletionsmutante).....57
- Abbildung 13:** Wirkung von mAk-Kombinationen auf die zytotoxische Aktivität einer Nhe-Deletionsmutante.....58
- Abbildung 14:** Vergleich der im HBL-B-spezifischen Sandwich-EIA mit mAk 1D12/mAk 1B8 bzw. mAk 1D7/mAk 1G8 erhaltenen Antigen-Verdünnungskurven.....62
- Abbildung 15:** Im HBL-L1-spezifischen Sandwich-EIA – basierend auf mAk 1E9 (Fangantikörper) und mAk 1G8 (Detektionsantikörper) – erhaltene Antigen-Verdünnungskurve.....63
- Abbildung 16:** Vergleich der Sensitivität verschiedener Sandwich-EIA-Varianten zum Nachweis von HBL-L2 mit mAk 1A12 als Fangantikörper.....64
- Abbildung 17:** Relative mittels Sandwich-EIA ermittelte HBL-B-Produktivität verschiedener *B. cereus* Stämme.....66
- Abbildung 18:** Relative mittels Sandwich-EIA ermittelte HBL-L1-Produktivität verschiedener *B. cereus* Stämme.....67
- Abbildung 19:** Relative mittels Sandwich-EIA ermittelte HBL-L2-Produktivität verschiedener *B. cereus* Stämme.....67

- Abbildung 20:** Analyse der einzelnen Fraktionen der IA-Reinigung basierend auf mAk 1B8 mittels Immunoblot. Nachweis von HBL-B (mit mAk 1B8), HBL-L1 (mit mAk 1E9) und HBL-L2 (mit mAk 1H9) bzw. NheB (mAk 1E11).....70
- Abbildung 21:** Analyse der einzelnen Fraktionen der IA-Reinigung basierend auf mAk 1H9 mittels Immunoblot. Nachweis von HBL-B (mit mAk 1B8), HBL-L1 (mit mAk 1E9) und HBL-L2 (mAk 1D8).....72
- Abbildung 22:** Im Hybrid-Sandwich-EIA messbare Interaktion von HBL-L1/HBL-L2 unter Verwendung verschiedener HBL-L1-reaktiver mAk als Fangantikörper und dem HBL-L2-spezifischen mAk 1H9 als Detektionsantikörper.....73
- Abbildung 23:** Im Hybrid-Sandwich-EIA mit HBL-(mAk 1G8/mAk 1H9) messbare Interaktion von rHBL-L1 mit rekombinanten bzw. IA-gereinigtem HBL-L2.....74
- Abbildung 24:** Im Hybrid-Sandwich-EIA (mAk 1G8/mAk 1H9) messbare konzentrationsabhängige Bildung des HBL-L1/HBL-L2 Komplexes..76
- Abbildung 25:** (A) Nachweis der Interaktion von rHBL-L1 und IA-gereinigtem HBL-L2 im Dot Blot Assay. Zur Detektion des gebundenen HBL-L2 wurde der mAk 1H9 (HBL-L2 spezifisch) verwendet; (B) Kontrollansatz (anstelle von rHBL-L1 wurde PBS auf die Membran aufgetragen).....77

X TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche verursacht durch <i>B. cereus</i> in der EU und in Deutschland (The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks, EFSA, 2004-2014).....	7
Tabelle 2:	Sequenzhomologien der von <i>B. cereus</i> ATCC 14579 produzierten HBL- und Nhe-Komponenten bzw. im Vergleich zu <i>E. coli</i> ClyA (nach Fagerlund <i>et al.</i> , 2008).....	12
Tabelle 3:	Charakteristika der verwendeten <i>B. cereus</i> Stämme.....	20
Tabelle 4:	Charakteristika der verwendeten Zelllinien.....	21
Tabelle 5:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper gegen <i>B. cereus</i> Enterotoxinkomponenten aus früheren Arbeiten am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch.....	25
Tabelle 6:	Auswahl des Immunogenstamms: HBL-Produktivität verschiedener <i>B. cereus</i> Stämme.....	36
Tabelle 7:	Im EIA ermittelter Anteil (%) der HBL-Komponenten B, L1 und L2 in den einzelnen Fraktionen der IAC basierend auf dem HBL-B spezifischen mAk 1B8. Die für NheB angegebenen Werte wurden zur Kontrolle ermittelt, um eine unspezifische Bindung der Proteine an das Immunosorbens auszuschließen.....	37
Tabelle 8:	Mittels SYPRO Ruby-Protein-Färbung ermittelte Konzentrationen von HBL-B/-L1 im Eluat der IAC-Läufe 1 – 6.....	41
Tabelle 9:	Immunisierung von Mäusen mit IA-gereinigtem HBL.....	42

Tabelle 10:	Übersicht zu den wesentlichen Charakteristika der etablierten Hybridomzelllinien bzw. monoklonalen Antikörpern.....	47
Tabelle 11:	Wirkung von HBL-Komponenten-spezifischen mAk auf die zytotoxische Aktivität eines toxinhaltigen <i>B. cereus</i> KÜ auf A549- bzw. RAW 264.7-Zellen.....	59
Tabelle 12:	Nachweisgrenzen (ng/ml) verschiedener Sandwich-EIA-Varianten zum Nachweis von rHBL-B.....	61
Tabelle 13:	Relative Testempfindlichkeit verschiedener Sandwich-EIA-Varianten zum Nachweis von HBL-L2.....	65
Tabelle 14:	Im Sandwich-EIA ermittelter Anteil (%) an HBL-B bzw. HBL-L1 in den einzelnen Fraktionen der IAC basierend auf dem HBL-B-spezifischen mAk 1B8.....	69
Tabelle 15:	Im Sandwich-EIA ermittelter Anteil (%) der HBL-Komponenten B, L1 und L2 bzw. NheB (Kontrolle) in den einzelnen Fraktionen der IAC basierend auf dem HBL-L2-spezifischen mAk 1H9.....	71

XI DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung des interessanten Themas sowie der Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Richard Dietrich, der durch die hervorragende Betreuung in den letzten drei Jahren mit seinem unglaublichen Wissen, den zahlreichen Anregungen, der sorgfältigen Durchsicht des Manuskripts und seiner geduldigen und humorvollen Art maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat. DANKE!!!

Mein herzlichster Dank geht an Brunhilde Minich und Franziska Faber für die gute Einarbeitung, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie die ausgezeichnete Zusammenarbeit. An dieser Stelle sei auch Gaby Acar für ihre Hilfe gedankt.

Danke an Dr. Nadja Jeßberger für die Bereitstellung der rekombinanten HBL-Komponenten sowie an Dr. Kristina Schauer für die Bereitstellung der *B. cereus* Nhe-Deletionsmutante. Ebenso sei Dr. Andrea Didier für ihre allseits gewährte Hilfe bei Fragen gedankt.

Tausend Dank an Dr. Rupert Bassitta für die vielen aufmunternden Worte, die Hilfe bei allerlei Fragen und die Durchsicht des Manuskripts.

Ein riesiges Dankeschön geht an Dr. Sophia Mast und Dr. Theresa Laufer. Danke euch beiden für die super Zeit am Lehrstuhl und die vielen gemeinsamen Stunden außerhalb. Ich bin wirklich sehr froh, euch als Freundinnen gefunden zu haben und hoffe, wir erleben noch viele tolle Dinge miteinander.

Weiterhin möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern und Mitdoktoranden bedanken. Es war eine wunderbare Zeit mit euch, ob während der Arbeit, bei Festen oder Ausflügen. Ich werde immer gerne an die letzten drei Jahre zurückdenken. Ihr seid ein super Team!

Mein außerordentlicher Dank gilt aber vor allem auch meiner Familie für die unentwegte Unterstützung in den letzten Jahren. Danke, dass ihr immer für mich da seid!