

Charakterisierung der molekularen Wirkungsweise  
von Hämolyisin BL aus *Bacillus cereus*

von Stefanie Bianca Schwemmer

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

Charakterisierung der molekularen Wirkungsweise  
von Hämolysin BL aus *Bacillus cereus*

von Stefanie Bianca Schwemmer

aus Nürnberg

München 2020



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 Märtlbauer

Mitbetreuung durch:

Dr. Nadja Jeßberger



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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

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

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Elisabeth G. Kemter

Tag der Promotion: 8. Februar 2020



*Meinem Opa  
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*





## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Allgemeines zu <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Taxonomie .....	3
1.2.	Historischer Überblick .....	4
1.3.	Besonderheiten .....	5
<b>2.</b>	<b>Eigenschaften von <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>6</b>
2.1.	Ausbrüche von lebensmittelbedingten Krankheiten .....	6
2.2.	Krankheitsbilder .....	8
2.3.	<i>B. cereus</i> als nosokomialer Keim .....	9
<b>3.</b>	<b><i>B. cereus</i> Enterotoxine und andere Virulenzfaktoren .....</b>	<b>10</b>
3.1.	Nachweis von <i>B. cereus</i> und seinen Toxinen .....	10
3.2.	Regulation der Toxinexpression .....	11
3.3.	Zytotoxin K und weitere Virulenzfaktoren .....	12
3.4.	Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) .....	14
3.5.	Hämolysin BL (Hbl) .....	15
<b>4.</b>	<b>Vorarbeiten und Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>23</b>
1.1.	Chemikalien .....	23
1.2.	Nährmedien .....	25
1.2.1.	Flüssige Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	25
1.2.2.	Flüssige Nährmedien für die Zellkultur .....	26
1.2.3.	Feste Nährmedien .....	27
1.3.	Puffer und Lösungen .....	27
1.3.1.	Plasmidpräparation .....	27
1.3.2.	Proteinreinigung .....	27
1.3.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	27
1.3.4.	SYPRO Ruby-Protein-Färbung .....	28
1.3.5.	Western Blot .....	28
1.3.6.	Hämolyseassay .....	28

---

1.3.7.	Durchflusszytometrie .....	28
1.3.8.	Enzymimmunoassays .....	29
1.4.	Enzyme.....	29
1.5.	Molekularbiologische Kits .....	30
1.6.	PCR-Primer .....	30
1.7.	Immunreagenzien.....	30
1.7.1.	Monoklonale Antikörper (mAk) .....	30
1.7.2.	Polyklonale Antiseren .....	31
1.8.	Zelllinien .....	31
1.9.	Bakterienstämme.....	32
1.10.	Expressionvektoren .....	33
1.11.	Verbrauchsmaterialien .....	35
1.12.	Geräte .....	36
1.13.	Software .....	37
1.14.	Sonstiges .....	38
<b>2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.1.	Klonierung .....	38
2.1.1.	PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ).....	38
2.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese.....	39
2.1.3.	DNA-Extraktion und -reinigung .....	39
2.1.4.	Restriktionsverdau .....	40
2.1.5.	Ligation .....	40
2.1.6.	Transformation von <i>E coli</i> DH5 $\alpha$ /BL21 .....	40
2.1.7.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	41
2.1.8.	Sequenzierung .....	42
2.2.	Arbeiten mit Protein.....	42
2.2.1.	Protein-Überexpression.....	42
2.2.2.	Proteinreinigung .....	42
2.2.3.	Konzentrationsbestimmung der rekombinanten Proteine .....	44
2.2.3.1.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.2.3.2.	SYPRO Ruby-Protein-Färbung.....	44
2.2.4.	Abspaltung des Strep-tags durch die Protease Faktor Xa .....	44
2.2.5.	Western Blot .....	45
2.2.6.	Enzymimmunoassays .....	46

2.2.6.1.	Indirekter Enzymimmunoassay (EIA) .....	46
2.2.6.2.	Sandwich-Enzymimmunoassay .....	47
2.3.	Zellkultur.....	47
2.3.1.	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien .....	47
2.3.2.	WST-1-Bioassay .....	48
2.3.3.	Propidiumiodid(PI)-Test .....	49
2.3.4.	PI-Test in einem <i>Chamber Slide</i> System .....	50
2.3.5.	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence-activated cell scanning</i> , FACS).....	50
2.4.	Hämolysseassay .....	51
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>1.</b>	<b>Funktionalität rekombinant exprimierter Hbl (rHbl)-Komponenten ...</b>	<b>53</b>
1.1.	Reinigung der rHbl-Komponenten.....	53
1.2.	Zytotoxische und hämolytische Aktivität .....	57
1.3.	Bindung an die Zielzelloberfläche .....	63
<b>2.</b>	<b>Anwendung des pASK-IBA7plus-Systems zur Abspaltung des Strep-</b>	
	<b>tags.....</b>	<b>66</b>
2.1.	Klonierung und Reinigung der rHbl-Komponenten .....	66
2.2.	Abspaltung des Strep-tags durch die Protease Faktor Xa .....	68
2.3.	Zytotoxische und hämolytische Aktivität der rHbl 7+ Komponenten.....	69
2.4.	Bindung von rHbl 7+B an die Zelloberfläche.....	73
<b>3.</b>	<b>Verkürzte Varianten der rHbl-Komponenten .....</b>	<b>74</b>
3.1.	Übersicht .....	74
3.2.	Reinigung der verkürzten Varianten der rHbl-Komponenten.....	76
3.3.	Funktionalität .....	80
3.4.	Bindung von monoklonalen Antikörpern .....	85
3.4.1.	rHbl 3+L1.....	85
3.4.2.	rHbl 5+L2.....	87
3.4.3.	rHbl 5+B .....	89
<b>4.</b>	<b>Toxische Aktivität von Hbl gegenüber verschiedenen Zelllinien .....</b>	<b>93</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>99</b>
<b>1.</b>	<b>Zur Funktionalität der rHbl-Komponenten.....</b>	<b>99</b>
<b>2.</b>	<b>Zur Identifizierung funktionell wichtiger Bereiche der Hbl-</b>	

---

	<b>Komponenten .....</b>	<b>106</b>
<b>3.</b>	<b>Modell der Hbl-Porenbildung an der Zielzellmembran.....</b>	<b>110</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>117</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>119</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>121</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>141</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>147</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>149</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A. dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
B.	<i>Bacillus</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
C.	<i>Clostridium</i>
CytK	Zytotoxin K ( <i>Cytotoxin K</i> )
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit ( <i>European Food Safety Authority</i> )
EIA	Enzymimmuntest ( <i>enzyme immunoassay</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence-activated cell scanning</i> )
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Hbl	Hämolysin BL
HlyII	Hämolysin II
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
KBE	Koloniebildende Einheiten
mAk	Monoklonaler Antikörper
Nhe	Nicht-hämolytisches Enterotoxin
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

---

PI	Propidiumiodid
PlcR	Pleiotropischer Transkriptionsfaktor Phospholipase C Regulator
rHbl	Rekombinantes Hbl
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
WST	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz ( <i>watersoluble tetrazolium salt</i> )
ZE	Zellextrakt

## ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN HBL-KONSTRUKTE

<i>Protein</i>	<i>Gen</i>	<i>Expressionsvektor</i>	<i>Affinitäts-tag rHbl</i>	<i>Benennung</i>	
Hbl L1	<i>hblD</i>	pASK-IBA3plus	C-Terminus	3+L1	bereits getestet (Tausch et al., 2017)
Hbl L2	<i>hblC</i>	pASK-IBA5plus	N-Terminus	5+L2	
Hbl B	<i>hblA</i>	pASK-IBA5plus	N-Terminus	5+B	
Hbl L1	<i>hblD</i>	pASK-IBA5plus	N-Terminus	5+L1	bisher nicht untersucht
Hbl L2	<i>hblC</i>	pASK-IBA3plus	C-Terminus	3+L2	
Hbl B	<i>hblA</i>	pASK-IBA3plus	C-Terminus	3+B	
Hbl L1	<i>hblD</i>	pASK-IBA7plus	N-Terminus, Strep-tag abspaltbar	7+L1	in dieser Arbeit kloniert
Hbl L2	<i>hblC</i>	pASK-IBA7plus	N-Terminus, Strep-tag abspaltbar	7+L2	
Hbl B	<i>hblA</i>	pASK-IBA7plus	N-Terminus, Strep-tag abspaltbar	7+B	





## I. EINLEITUNG

*Bacillus (B.) cereus* ist ein Gram-positives, ubiquitäres, sporenbildendes Bakterium, das als Ursache für lebensmittelbedingte Krankheiten gilt. Nach deutschem Infektionsschutzgesetz stellt es jedoch keinen meldepflichtigen Krankheitserreger dar und aufgrund von oft milden Verläufen bleiben Ausbrüche meist unentdeckt. Dadurch machen *B. cereus* bedingte Krankheiten eher einen geringen Anteil in der amtlichen Statistik aus. 2017 waren es 4,1 % der lebensmittelbedingten Ausbrüche in Deutschland (BVL, 2017).

Durch die weite Verbreitung des Bakteriums kommt es häufig zum Eintrag in die Lebensmittelkette und durch Kreuzkontamination können dessen Sporen und Bakterienzellen auf andere Lebensmittel übergehen (Stenfors Arnesen et al., 2008). Aufgrund seiner Fähigkeit auf festen Oberflächen zu haften und Biofilme zu bilden, greifen Desinfektionsmaßnahmen nur bedingt (Kumari & Sarkar, 2016, Nam et al., 2014).

*B. cereus* Ausbrüche können in Lebensmittelintoxikationen (emetisches Syndrom) und Lebensmittelinfektionen (Diarrhö-Form) gegliedert werden. Das emetische Syndrom wird durch das hitze- und säurestabile Peptid Cereulid hervorgerufen, das bei Aufnahme präformiert im Lebensmittel vorliegt. Die Diarrhö-Form ist durch verschiedene Enterotoxine bedingt, die von enteropathogenen *B. cereus* Stämmen nach Aufnahme und Passieren des Magens im Dünndarm gebildet werden. Dabei spielen die beiden porenformenden Drei-Komponenten-Toxine Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) (Lund & Granum, 1996) und Hämolysin BL (Hbl) (Beecher & Macmillan, 1991) eine maßgebliche Rolle.

Bei dem aus den Komponenten L1, L2 und B bestehenden Hbl-Komplex konnte der genaue Wirkmechanismus an der Zielzellmembran bis heute nicht geklärt werden. Deshalb wurden die einzelnen Komponenten rekombinant in *Escherichia (E.) coli* überexprimiert und über Strep-tags gereinigt, um deren Wirkungsweise auf molekularer Ebene zu untersuchen. Des Weiteren wurden verschiedene Abschnitte der rHbl-Komponenten deletiert, um herauszufinden, wo sich zentrale Bereiche für die Aktivität des Toxins befinden. Bislang ist auch nicht bekannt, ob es für die Bindung an der Zielzelloberfläche spezifische Strukturen oder Rezeptoren gibt. Deswegen wurde die toxische Aktivität von Hbl auf Zellen verschiedenen Ursprungs und Gewebes getestet.

---

Teile dieser Arbeit sind in der Publikation „Binding to The Target Cell Surface Is The Crucial Step in Pore Formation of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*“ (Jessberger et al., 2019) veröffentlicht.

---

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projekts JE 871/2-1 „Charakterisierung der Wirkungsweise des Dreikomponenten-Enterotoxinkomplexes Hbl aus *Bacillus cereus*“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Allgemeines zu *B. cereus*

#### 1.1. Taxonomie

*B. cereus* ist ein ubiquitäres, Gram-positives, fakultativ anaerobes Stäbchen, welches hitzeresistente Endosporen bildet und als Toxinbildner von Bedeutung ist (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Zur *B. cereus* Gruppe (Okinaka & Keim, 2016) gehören bislang neun Spezies: *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. weihenstephanensis* und *B. wiedmannii* (Miller et al., 2016). Außerdem werden immer wieder neue Arten beschrieben, wie z. B. *B. gaemokensis* (Jung et al., 2010), *B. manliponensis* (Jung et al., 2011), *B. bingmayongensis* (Liu et al., 2014a) oder *B. tropicus* (Liu et al., 2017).

Eine taxonomische Einteilung innerhalb der Gruppe gestaltet sich schwierig, da die einzelnen Spezies eine hohe Übereinstimmung in ihrer 16S rRNA Gensequenz aufweisen. Zwischen *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* und *B. thuringiensis* wurde eine über 99%ige Sequenzsimilarität in den Primärstrukturen der 16S rRNA festgestellt (Ash et al., 1991, Kotiranta et al., 2000). Diese Spezies sind eher durch verschiedene Gene, die auf Plasmiden getragen werden, sowie aufgrund einer unterschiedlichen Pathologie zu unterscheiden (Helgason et al., 2000).

Didelot et al. (2009) nahmen die bisher umfassendste evolutionäre Analyse der *B. cereus* Gruppe vor und haben damit die Einteilung in drei große „Clades“ (Priest et al., 2004) bestätigt. Clade 1 umfasst alle *B. anthracis* Stämme, die Hälfte der *B. cereus* Stämme und einige *B. thuringiensis* Stämme. Clade 2 besteht aus den übrigen *B. cereus* Stämmen und der Mehrheit der *B. thuringiensis* Stämme. Die dritte und kleinste Clade enthält *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* und einige unbestimmte Stämme. Die pathogenen Isolate sind dabei gleichmäßig zwischen den ersten zwei Clades verteilt. Alle *B. anthracis* Stämme und die Isolate, die mit der emetischen Form von einer Lebensmittelvergiftung assoziiert waren, wurden Clade 1 zugeordnet. Stämme, die aus Fällen mit Septikämie isoliert wurden, wurden in die ersten beiden Clades aufgeteilt. Isolate, welche Diarrhö auslösten, finden sich vorwiegend in Clade 2 (Didelot et al., 2009).

Auf der anderen Seite teilten Guinebretière et al. (2008) die *B. cereus* Gruppe in sieben phylogenetische Gruppen ein, indem sie die Stämme auf Wachstumstemperaturen prüften und genetische sowie phänotypische Analysen durchführten. Zwei Jahre später veröffentlichten sie eine weitere Studie zu zytotoxischen Aktivitätsniveaus. Diese variierten je nach phylogenetischer Gruppe innerhalb der *B. cereus* Gruppe, so dass eine Einteilung nach phylogenetischer Gruppe aussagekräftiger ist als eine Einteilung nach Spezies (Guinebretière et al., 2010). Liu et al. (2015) schlugen darüber hinaus eine neue Einteilung in 30 Cluster vor, welche jeweils unabhängige Arten repräsentieren, darunter 19 - 20 vermeintlich neue Arten. Wegen der schwierigen Abgrenzung der verschiedenen Spezies wurde ebenso vorgeschlagen, die Taxonomie zu ändern und die Gruppe in eine einzige Art umzuklassifizieren (Okinaka & Keim, 2016).

## 1.2. Historischer Überblick

Erstmals erwähnt wurde *B. cereus* 1887, als der Keim aus einer Luftprobe in einem Kuhstall isoliert werden konnte (Frankland & Frankland, 1887). Er zeigte sich als große verflüssigende Kolonie auf Gelatine und erhielt seinen Namen aufgrund seiner wachsartigen Expansion auf Agar-Agar. Lubenau (1906) untersuchte nach Ausbruch einer Lebensmittelvergiftung ein Gericht von Königsberger Kloppen, das die Insassen einer Heilanstalt zu sich genommen hatten. Zwei bis drei Tage nach Einnahme des Gerichts zeigten sich bei  $\frac{3}{4}$  der Patienten Erbrechen und Durchfall. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften, nämlich Verflüssigung von Gelatine, rasche Hämolyse, typische Koloniemorphologie, Abbau von Glucose ohne Gasbildung, Eiweißabbau und Sporenbildung lässt sich annehmen, dass es sich hierbei um *B. cereus* handelte. Damit erbrachte Lubenau auch den ersten Beweis für *B. cereus* als Erreger gastrointestinaler Erkrankungen.

Nach weiteren Erwähnungen von Magen-Darm-Erkrankungen im Zusammenhang mit aeroben Sporenbildnern (Brekenfeld, 1926, Seitz, 1913, Trüb & Wundram, 1942) konnte durch Hauge (1950) *B. cereus* als Keim von lebensmittelbedingten Erkrankungen gesichert werden. Er berichtete über einen Ausbruch von Durchfallerkrankungen nach Konsum von Vanillesauce in norwegischen Krankenhäusern in den Jahren von 1947 - 1949, was nach der heutigen Einteilung der Diarrhö-Form entspricht. Hauge (1955) konnte in einem Selbstversuch mit

einem Stamm, der bei dem Ausbruch isoliert wurde, die Symptome (Bauchschmerzen, profuse wässrige Durchfälle und Übelkeit) reproduzieren. Über das emetische Syndrom wurde erstmals aus Großbritannien berichtet, als mehrere Fälle von Übelkeit und Erbrechen nach Verzehr von frittiertem Reis in einem chinesischen Restaurant auftraten (Mortimer & McCann, 1974). Der Reis wurde am Vortag gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### 1.3. Besonderheiten

Eine Kontamination von Nahrungsmitteln mit dem ubiquitären Bodenbakterium *B. cereus* kann nicht 100%ig vermieden werden (Stenfors Arnesen et al., 2008). Davon betroffen sind z. B. Reis, Milchprodukte, Gewürze und Gemüse (Kramer & Gilbert, 1989). Ein weiteres Problem ist die Überlebensfähigkeit der Sporen, die sich durch ihre Resistenz gegenüber Austrocknung, Einfrieren, Auftauen, Kühltemperaturen, UV- und  $\gamma$ -Strahlung, Hochdruck und einer großen Zahl an toxischen Chemikalien auszeichnet (Setlow, 2014). Bakterien der *B. cereus* Gruppe besitzen die Fähigkeit auf festen Oberflächen, einschließlich Edelstahl, zu haften und dort Biofilme zu bilden (Kumari & Sarkar, 2016, Salustiano et al., 2009). Damit sind diese Biofilme ein Drehpunkt für die Bildung der Sporen, die anschließend in die Lebensmittelproduktion gelangen können. So kann es zu einer Rekontamination von bereits sterilen/wärmebehandelten Produkten und Anlagen kommen, wodurch die Qualität und Sicherheit der Lebensmittel beeinträchtigt wird (Ryu & Beuchat, 2005, Wijman et al., 2007). Desinfektionsmaßnahmen greifen nur bedingt. Eine Inaktivierung von *B. cereus* Sporen auf Edelstahl mit gasförmigem Chlordioxid gelingt innerhalb einer Stunde, während Sporen in Biofilmen erst nach sechs Stunden erfolgreich eliminiert werden können (Nam et al., 2014). Mit Peressigsäure oder Natriumhypochlorit ist es dagegen gar nicht möglich, *B. cereus* Biofilme effektiv zu beseitigen (Silva et al., 2018).

## 2. Eigenschaften von *B. cereus*

### 2.1. Ausbrüche von lebensmittelbedingten Krankheiten

*B. cereus* ist eine wichtige Ursache für lebensmittelbedingte Krankheiten weltweit (EFSA, 2018, Glasset et al., 2016, Lindqvist et al., 2000, Todd, 1992). Jedoch werden nur wenige Ausbrüche gemeldet, da *B. cereus* zum einen nach § 7 Infektionsschutzgesetz keinen meldepflichtigen Krankheitserreger darstellt. Dadurch liegen die Ausbrüche in der amtlichen Statistik vermutlich weit unter der tatsächlichen Zahl. Auch suchen Erkrankte aufgrund der kurzen und, in der Regel, selbstlimitierenden Krankheitsdauer nur selten den Arzt auf (Granum & Lund, 1997). Zum anderen kommt es aufgrund ähnlicher Symptomatik bei Lebensmittelinfektionen durch *Staphylococcus aureus* und *Clostridium perfringens* leicht zu Fehldiagnosen. So sind die Symptome des emetischen Syndroms mit denen einer *S. aureus* Intoxikation einfach zu verwechseln (Bennett et al., 2013), und eine Lebensmittelvergiftung mit *C. perfringens* Typ A zeigt als Leitsymptom Durchfall, genauso wie die Diarrhö-Form von *B. cereus* (Stenfors Arnesen et al., 2008). Auch wenn *B. cereus* bedingte Ausbrüche in den Jahren 2009 - 2017 zurückgingen, machten sie 2017 doch noch 4,1 % der lebensmittelbedingten Ausbrüche in Deutschland aus (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, BVL, 2017, Tabelle 1).

**Tabelle 1:** An die EFSA übermittelte lebensmittelbedingte Ausbrüche mit hoher Evidenz, nach Erregern, Deutschland 2017 (n = 49), BVL.

	<i>Anzahl Ausbrüche</i>	<i>Anteil (%)</i>	<i>Anzahl Fälle</i>	<i>Anzahl Hospitalisierungen</i>	<i>Anzahl Todesfälle</i>
<i>Campylobacter spp.</i>	16	32,7	221	26	0
<i>Salmonella spp.</i>	14	28,6	334	106	2
<i>Clostridium perfringens</i>	4	8,2	114	unbekannt	0
Norovirus	3	6,1	173	2	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	6,1	43	11	0
<i>Bacillus cereus</i>	2	4,1	33	unbekannt	0
VTEC2	2	4,1	27	17	1
Histamin	2	4,1	9	unbekannt	0
Ciguatoxin	1	2,0	15	2	0
Flavivirus (FSME Virus)	1	2,0	13	1	0
Hepatitis-A-Virus	1	2,0	5	4	1
<b>GESAMT</b>	<b>49</b>	<b>100</b>	<b>987</b>	<b>169</b>	<b>4</b>



## 2.2. Krankheitsbilder

*B. cereus* verursacht lokale sowie generalisierte Infektionen und dadurch eine große Bandbreite von Krankheiten. Am häufigsten sind Lebensmittelvergiftungen, die in zwei Formen unterteilt werden können. Das emetische Syndrom charakterisiert sich durch Übelkeit, Erbrechen und abdominale Krämpfe und steht meist im Zusammenhang mit Reis oder Pasta (Kramer & Gilbert, 1989, Shinagawa, 1990). Es gilt als klassische Lebensmittelintoxikation (Ehling-Schulz et al., 2004). Die Symptome setzen ein bis fünf Stunden nach Aufnahme der kontaminierten Nahrung mit  $10^5$  -  $10^8$  koloniebildenden Einheiten (KBE)/g Lebensmittel ein (Glasset et al., 2018, Turnbull, 1981). Hervorgerufen werden diese durch das Cereulid, ein Dodecadepsipeptid (Agata et al., 1995), das bei Aufnahme bereits präformiert im Lebensmittel vorliegt (Shinagawa, 1990). Das hitze- und säurestabile Peptid, das in zyklischer Form vorliegt, ist eng verwandt mit Valinomycin. Die Symptome ähneln einer *S. aureus* Intoxikation, wodurch es leicht zur Verwechslung kommen kann. In der Regel klingen diese ohne bleibende Schäden wieder ab (Ehling-Schulz et al., 2004). In einzelnen Fällen, v. a. bei jüngeren Personen, führte die Aufnahme von Nudelgerichten, die emetische *B. cereus* Stämme enthielten, jedoch zu Leberversagen (Dierick et al., 2005, Mahler et al., 1997, Naranjo et al., 2011, Takabe & Oya, 1976). Deswegen stellt fulminante Leberinsuffizienz durch emetische *B. cereus* eine der am meisten gefürchteten Komplikationen dar (Naranjo et al., 2011).

Die Diarrhö-Form zählt zu den Lebensmittelinfektionen und kann durch verschiedene Enterotoxine (siehe Kapitel II.3.) hervorgerufen werden (Kramer & Gilbert, 1989). Ähnlich der emetischen Form beträgt die infektiöse Dosis  $10^5$  -  $10^8$  Zellen oder Sporen, wobei sogar Dosen von  $10^3$  KBE/g in Lebensmitteln gefunden wurden, die Symptome ausgelöst haben (Kramer & Gilbert, 1989). Nach Aufnahme und Passieren des Magens produzieren vegetative Zellen Toxine im Dünndarm. Die Anzahl der lebensfähigen Bakterien hängt dabei stark von der Form der aufgenommenen Zellen (meist Sporen), vom Säuregehalt des Magens und von der mitverzeharten Nahrung ab (Clavel et al., 2004, Da Rioli et al., 2018). Typische Lebensmittel, die mit der Diarrhö-Form in Verbindung gebracht werden, sind Fleisch, Suppen, Gemüse, Pudding, Saucen und Milch sowie Milchprodukte (Granum, 1994, Granum & Lund, 1997). Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt 8 - 16 Stunden mit einer nachfolgenden Krankheitsdauer von 12 - 24

Stunden, in der Bauchschmerzen, wässriger Durchfall, gelegentlich auch Übelkeit, beobachtet werden können. Dies kann leicht mit einer Infektion durch *C. perfringens* verwechselt werden (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Des Weiteren wurden verschiedene andere, sowohl lokale als auch generalisierte, extraintestinale Krankheitsbilder beschrieben. Dazu gehören Augeninfektionen, wie End- oder Panophthalmitis, Wundinfektionen, Infektionen des zentralen Nervensystems, Endocarditiden, Osteomyelitis und Septikämien (Bottone, 2010, Callegan et al., 2005).

### **2.3. *B. cereus* als nosokomialer Keim**

*B. cereus* gewinnt als nosokomialer Keim zunehmend an Bedeutung. Eine Studie von Gasset et al. (2018) zeigt die hohe Persistenz von *B. cereus* Stämmen im Krankenhausumfeld, welche zu intrahospitalen Übertragungen führen kann. Insbesondere Neugeborene nehmen die Keime wahrscheinlich über Verweilvorrichtungen aus der hospitalen Umgebung auf. Sogar eine krankenhausesübergreifende Kreuzkontamination konnte festgestellt werden. Da *B. cereus* selten als Grund der Infektion angesehen wird, scheitert eine antibiotische Therapie des Öfteren an einer Missinterpretation der klinischen und bakteriologischen Diagnose der *B. cereus* Infektionen. Durch ihre häufige Resistenz gegenüber Beta-Laktamen (Ikeda et al., 2015) wird ein Antibiotogramm zur adäquaten Behandlung empfohlen. Katheterbedingte *B. cereus* Blutkreislaufinfektionen, die hohe Morbiditäten und Mortalitäten verursachen können, wurden auch von anderen Autoren erwähnt und sind besonders bei immunsupprimierten Patienten und solchen mit hämatologischen Malignomen zu beobachten (Bottone, 2010, Ozkocaman et al., 2006). Kuroki et al. (2009) untersuchten in einer Studie bakterielle Biofilme in Krankenhäusern und fanden heraus, dass verschiedene *B. cereus* Stämme in der Krankenhausumgebung existieren, und dass biofilmbildende *B. cereus* Stämme nosokomiale Infektionen über Katheter hervorrufen können.

### 3. *B. cereus* Enterotoxine und andere Virulenzfaktoren

#### 3.1. Nachweis von *B. cereus* und seinen Toxinen

Bis heute sind der kulturelle Nachweis und die Zählung die Standardverfahren zum Nachweis von präsumtiven *B. cereus* in lebensmittelmikrobiologischen Laboren. Hierfür werden zwei Standardagar benutzt, einmal der Polymyxin-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agar und der Mannitol-Eigelb-Polymyxin-Agar, auf denen *B. cereus* selektiv angezüchtet wird (Ehling-Schulz & Messelhäusser, 2013). Jedoch ist eine sichere Unterscheidung von *B. cereus* zu anderen Spezies der *B. cereus* Gruppe nicht immer möglich, da verschiedene Stämme atypische Reaktionen auf den Medien zeigen können. So führt die Untersuchung häufig zu falsch negativen Ergebnissen (Fricker et al., 2008).

Die *B. cereus* Enterotoxine wurden früher *in vivo* anhand von verschiedenen Tiermodellversuchen nachgewiesen, unter anderem mit dem Darmschlingenligationstest (Spira & Goepfert, 1972) oder über Gefäßpermeabilitätsreaktion (Glatz et al., 1974). Heute haben *in vitro* Bioassays die *in vivo* Verfahren abgelöst. Mit Zytotoxizitätsassays ist es möglich, toxische Stämme nachzuweisen. Hierzu werden verschiedene Zelllinien, wie CHO-, HEp-2-, CaCo-2- oder Vero-Zellen in MTT- und WST-Zellkulturtests verwendet (Beattie & Williams, 1999, Fletcher & Logan, 1999, Hardy et al., 2001, Jessberger et al., 2014, Ngamwongsatit et al., 2008a, Rowan et al., 2001). Schwierig ist hierbei aber der Nachweis einzelner Toxine, da *B. cereus* Stämme immer mehrere Enterotoxine und weitere Virulenzfaktoren produzieren (Jessberger et al., 2014).

Besonders nach einem lebensmittelassoziierten Krankheitsausbruch liegt der Fokus auf der Identifizierung der Enterotoxine anstatt auf der genauen Speziesdifferenzierung. Hierfür stehen molekulare Untersuchungsmethoden, wie verschiedene Polymerase-Kettenreaktions-Systeme (PCR-Systeme), zur Verfügung, sowohl Gel-basierte als auch *real-time* PCRs. Diese erkennen v. a. die drei Hauptenterotoxine Nhe, Hbl und CytK, aber auch das *ces* Gencluster, das für die nicht-ribosomale Peptidsynthetase, welche das emetische Toxin produziert, kodiert (Guinebretière et al., 2002, Yang et al., 2007). *Multilocus sequence typing* (MLST) stellt hierbei den Goldstandard dar (Ehling-Schulz & Messelhäusser, 2013). Verschiedene MLST-basierte Schemata wurden entwickelt, um genetische Beziehungen zwischen *B. cereus* Stämmen unterschiedlicher Herkunft zu ermitteln,

da die Kenntnis der Populationsstruktur von *B. cereus sensu lato* nicht nur für die Wissenschaft von Bedeutung ist, sondern auch für Klinik und Lebensmittelmikrobiologie (Tourasse & Kolstø, 2008). Allerdings geben diese Methoden keinen Nachweis über die Menge des produzierten Toxins und können somit das pathogene Potential eines Stammes nicht abbilden (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Um die Enterotoxine immunologisch nachzuweisen, wurden monoklonale Antikörper (mAk) gegen jeweils alle drei Komponenten von Nhe und Hbl hergestellt (Dietrich et al., 1999, Dietrich et al., 2005). Momentan sind drei Antikörperbasierte Nachweiskits kommerziell erhältlich, zum einen der BCET-RPLA *B. cereus* Enterotoxin Test Kit, bei dem über reverse Antikörperagglutination die L2-Komponente von Hbl nachgewiesen wird (Beecher & Wong, 1994a). Der Test liefert ein semi-quantitatives Ergebnis. Zum anderen ist der Tecra BDE Kit erhältlich, der NheA über einen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) nachweist (Beecher & Wong, 1994a, Ehling-Schulz et al., 2004, Stenfors Arnesen et al., 2008). Zudem lassen sich mit dem Duopath<sup>®</sup> *Cereus* Enterotoxin Test über mAk Hbl L2 und NheB gleichzeitig nachweisen (Krause et al., 2010).

### 3.2. Regulation der Toxinexpression

Die Cereulidexpression wird von zwei Sporulationsregulatoren, Spo0A und AbrB, die unabhängig von dem pleiotropischen Transkriptionsfaktor Phospholipase C Regulator (PlcR) agieren, kontrolliert. Am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase wird durch AbrB, das an die *ces* Promotorregion bindet, die *ces* Genexpression verhindert. Während der stationären Phase wird Spo0A gebildet, das an AbrB bindet und dieses verdrängt, so dass die *ces* Gene exprimiert werden können (Ceuppens et al., 2011). Das 24 kbp große *ces* Gencluster codiert für sieben Enzyme, die eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase bilden, welche das Cereulid synthetisiert (Ehling-Schulz et al., 2006a, Rasko et al., 2007). Zusätzlich ist die Cereulidproduktion von Umwelt- und Nährstoffbedingungen abhängig. Insgesamt zeigt sie große Ähnlichkeiten zur Regulation des Anthrax-Toxins von *B. anthracis* (Ceuppens et al., 2011, Saile & Koehler, 2002).

Die meisten *B. cereus* Virulenzgene hingegen, u. a. die Enterotoxine Hbl und Nhe, CytK und Hämolytine, werden über den Quorum Sensing Phospholipase C Regulator (PlcR) reguliert (Declerck et al., 2007, Gohar et al., 2002, Lereclus et al., 1996, Økstad et al., 1999). Dabei aktiviert das Peptid PapR in der späten exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase das Effektorprotein PlcR, wodurch die Expression des PlcR Regulons stimuliert wird (Ceuppens et al., 2011). Die Gentranskription erfolgt nach Bindung von PlcR an die „PlcR-Box“, eine hochkonservierte palindromische Region in den Promotorbereichen (Agaisse et al., 1999, Gohar et al., 2008, Gohar et al., 2002). Während es seine eigene Expression positiv reguliert (Lereclus et al., 1996), verhindert der Übergangsphasenregulator Spo0A mit hoher Wahrscheinlichkeit dessen Transkription (Lereclus et al., 2000). Für die Aktivierung von PlcR müssen demnach wahrscheinlich mindestens zwei Bedingungen erfüllt sein: 1. Die Zelldichte muss so hoch sein, dass das *Quorum sensing* erfasst wird, und 2. der Ernährungszustand der Zelle muss in dem Status sein, dass Spo0A~P in einer ausreichend niedrigen Konzentration vorliegt, um die *plcR* Transkription zu ermöglichen (Stenfors Arnesen et al., 2008). Zusätzlich wird die Enterotoxinexpression durch Umgebungsfaktoren wie Temperatur, dem pH-Wert, Sauerstoff- und Nährstoffangebot sowie dem Redoxpotential (Ceuppens et al., 2011, Duport et al., 2006, van der Voort & Abee, 2009) beeinflusst. Die Produktion von Hbl und Nhe ist z. B. besonders hoch unter Fructoseeinfluss (Ouhib-Jacobs et al., 2009). Auch die Wachstumsrate spielt eine Rolle (Thomassin et al., 2006). 2015 wurde erstmals ein ganzes *B. cereus* Stammset verglichen. Die Quantifizierung von *nheB* und *hblD* mRNA mit Hilfe von qRT-PCR zeigte in der frühen und späten exponentiellen Wachstumsphase bzw. Übergangsphase starke, stammabhängige Differenzen im Transkriptionsniveau des Toxingens sowie in der Transkriptionseffizienz (Jessberger et al., 2015).

### 3.3. Zytotoxin K und weitere Virulenzfaktoren

Zytotoxin K, ein Ein-Komponenten-Toxin, konnte erstmals 1998 in Frankreich aus einer schweren Lebensmittelvergiftung mit blutiger Diarrhö und drei Todesfällen aus dem *B. cereus* Stamm NVH 391/98 isoliert werden. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 34 kDa, zeigt hämolytische und dermonekrotische Eigenschaften und kann nekrotische Enteritis hervorrufen. Mit Haemolysin II von *B. cereus*, verschiedenen Leukozidinen und dem  $\alpha$ -Hämolyysin von *S. aureus* wie

auch dem  $\beta$ -Toxin von *C. perfringens* weist es Sequenzhomologien auf (Lund et al., 2000). Wie alle  $\beta$ -barrel pore-forming toxins kann es spontan Oligomere bilden, die resistent gegenüber SDS, nicht aber dem Kochen, sind (Hardy et al., 2001). Fagerlund et al. (2004) konnten ein Protein aus drei verschiedenen Stämmen isolieren, das eine 89%ige Übereinstimmung in der DNA-Sequenz zu dem CytK-Protein aus dem *B. cereus* Stamm NVH 391/98 aufweist. Dieses CytK-2 ist wie das originäre CytK-1-Protein hämolytisch, zytotoxisch und porenbildend, zeigt jedoch in Zytotoxizitätstests deutlich niedrigere Titer. Von 390 *B. cereus* Stämmen enthielten in einer Studie nahezu die Hälfte *cytK-2*, während *cytK-1* nicht vorgefunden wurde (Castiaux et al., 2015). Auch in anderen Studien überwog die *cytK-2* Prävalenz (Fagerlund et al., 2004, Guinebretière et al., 2006, Reis et al., 2019). *cytK-1* konnte bisher in nur einigen wenigen Stämmen nachgewiesen werden, die einer neuen, thermotoleranten Spezies in der *B. cereus* Gruppe, *B. cytotoxicus*, zugeordnet wurden (Guinebretière et al., 2013). Contzen et al. (2014) konnten *B. cytotoxicus* aus verschiedenen Kartoffelprodukten isolieren, mit der höchsten Prävalenz bei getrockneten Produkten.

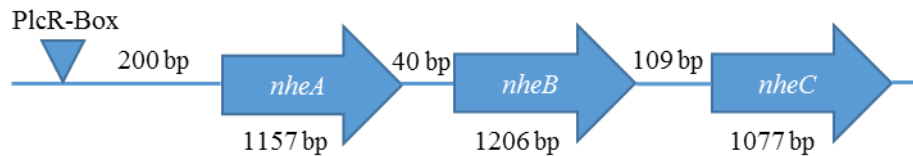
Neben den bereits genannten Virulenzfaktoren sind *B. cereus* Stämme in der Lage, weitere Proteine zu sezernieren, die zur Pathogenität beitragen können. Clair et al. (2010) führten unter verschiedenen Redoxbedingungen Sekretomanalysen des *B. cereus* Stammes ATCC 14579 durch und identifizierten dabei mehrere neue PlcR unabhängige Proteine. EntFM, welches das erste Mal im *B. cereus* Sekretom entdeckt wurde, weist drei SH3-Domänen auf, von denen bekannt ist, dass sie bei Protein-Protein-Interaktionen mit einer NlpC/P69 Domäne beteiligt sind. Diese wird auch in Peptidasen beobachtet. Das *entFM* Gen ist das am weitesten verbreitete Enterotoxin-Gen der *B. cereus* Gruppe (Boonchai et al., 2008). Hämolysin II (HlyII) zählt zu der  $\beta$ -barrel pore-forming toxin Familie, die auch CytK und andere Cytolysine pathogener Bakterien beinhaltet, darunter *S. aureus*. Sein Vorkommen beschränkt sich auf Stämme mit pathogenem Potential, wobei das Expressionslevel von *hlyII* in klinischen Stämmen doppelt so hoch liegt wie in Stämmen, die in Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen stehen. Damit kommt das *hlyII* Gen nur in 19 - 21 % aller *B. cereus* Stämme vor (Cadot et al., 2010, Fagerlund et al., 2004). Drei vermutliche Enterotoxine, die mit EntA, EntB und EntC benannt wurden, zeigten ebenso Ähnlichkeiten mit SH3-Domänen enthaltenden Enterotoxinen und wurden bis dato als „Enterotoxin/Zellwand-

bindende Proteine“ bezeichnet, da sie neben den SH3-Domänen auch vermeintliche Zellwandpeptidasen-Domänen besitzen (Clair et al., 2010).

Die Gene *inhA1* und *nprA*, die für Zink-Metalloproteasen codieren, haben ein höheres Expressionslevel in virulenten als in avirulenten Stämmen, besonders in solchen, die mit klinischen, extraintestinalen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Cadot et al., 2010). Beide Proteine werden gleichzeitig in einem Sekretom sezerniert und sind für das Entkommen aus Makrophagen erforderlich. Hierfür spaltet *InhA1* *NprA* zu einer C-terminalen Form, die wahrscheinlich die aktive Form von *NprA* darstellt. Unter anderem dadurch gelingt es den *B. cereus* Sporen zu überleben, auszukeimen und sich in Kontakt mit Makrophagen zu vermehren. Damit stellt *NprA* ein entscheidendes Element dar, um dem Immunsystem des Wirtes entgegenzuwirken (Haydar et al., 2018).

#### **3.4. Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe)**

Nach einem großen lebensmittelassoziierten Krankheitsausbruch 1995 in Norwegen konnte erstmals das Drei-Komponenten-Enterotoxin „Nicht-hämolytisches Enterotoxin“ (Nhe) aus dem Stamm NVH 0075/95 isoliert und charakterisiert werden. Seinen Namen erhielt der Toxinkomplex, da er zunächst auf Rinderblutagar keinerlei Hämolyseaktivität vorwies (Lund & Granum, 1996). 1999 wurden von Granum et al. die Größen für *NheA*, *NheB* und *NheC* (41,0, 39,8 und 36,5 kDa) bestimmt. Nahezu 100 % der *B. cereus* Stämme tragen die Gene für *Nhe* (Ehling-Schulz et al., 2006b, Guinebretière et al., 2002, Hansen & Hendriksen, 2001, Hwang & Park, 2015, Moravek et al., 2006). Diese liegen auf einem Operon, dessen Transkription unter der Kontrolle des pleiotropischen Transkriptionsregulators *PlcR* steht (Ceuppens et al., 2011, Granum & Lund, 1997). Das Operon besteht aus den drei Genen *nheA*, *nheB* und *nheC* (Abbildung 1). Ungefähr 200 Basenpaare (bp) oberhalb des Startkodons von *nheA* liegt die „*PlcR*-Box“ (siehe Kapitel II.3.2.). Zwischen *nheA* und *nheB* liegen 40 bp, *nheB* und *nheC* sind durch 109 bp getrennt (Granum et al., 1999).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Nhe-Operons (nach Granum et al., 1999, Lindbäck et al., 2004).

Der Nhe-Toxinkomplex formt Poren und weist strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit dem ebenfalls porenformenden Cytolysin A von *E. coli* auf. Trotz nur begrenzter Sequenzähnlichkeiten bilden Nhe, Hbl und Cytolysin A zusammen eine Superfamilie von Toxinen (Stenfors Arnesen et al., 2008). Bei einem Test mit 1,5 % humanen Erythrozyten zeigte Nhe neben der osmotischen, zytolytischen Wirkung nun doch auch hämolytische Aktivität (Fagerlund et al., 2008).

Für eine biologische Aktivität werden alle drei Nhe-Komponenten benötigt, wobei diese für eine maximale zytotoxische Aktivität im molaren Verhältnis von 10:10:1 (NheA:NheB:NheC) vorkommen müssen (Lindbäck et al., 2004). NheB und NheC können, im Gegensatz zu NheA, direkt an die Oberfläche von eukaryotischen Zellen binden (Lindbäck et al., 2010). Aktuell geht man davon aus, dass NheC mit NheB Komplexe in Lösung bildet und der Komplex an die Zelloberfläche bindet. Dadurch kommt es zu Konformationsänderungen und eine permeable Pro-Pore wird geformt. Wenn ausreichende Mengen an NheB/C-Komplexen und freiem NheA existieren, wird eine ringförmige Struktur gebildet, wodurch sich NheA an das bereits gebundene NheB heften kann und eine Konformationsänderung vollführt. Dies führt zum irreversiblen Durchdringen der Zielzellmembran, womit die Porenbildung abgeschlossen ist (Didier et al., 2016, Heilkenbrinker et al., 2013, Zhu et al., 2016).

### 3.5. Hämolysin BL (Hbl)

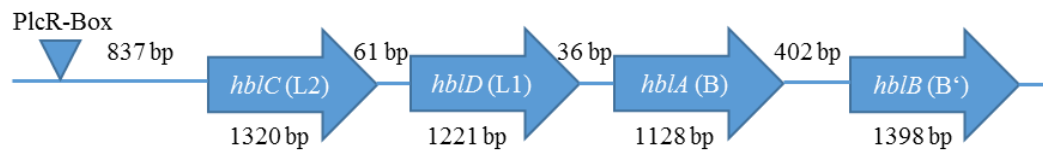
Beecher & MacMillan (1990) war es als Erste möglich, Hämolysin BL (Hbl) in dem *B. cereus* Stamm F837/76 auszumachen. Diesen Stamm haben Turnbull et al. (1979) schon 14 Jahre vorher aus einer postoperativen Wunde isoliert. Der



Toxinkomplex besteht aus den drei Proteinen B, L1 und L2 mit den Größen 35, 36 und 45 kDa (Beecher & Macmillan, 1991). Durch verschiedene Versuche, wie das Prüfen von Flüssigkeitsansammlung in ligierten Kaninchendarmschleifen oder die Erhöhung von vaskulärer Permeabilität in Kaninchenhaut, konnte gezeigt werden, dass Hbl ein Enterotoxin darstellt (Beecher & Wong, 1994b). Neben der Enteropathogenität zeigt Hbl hämolytische, nekrotische und zytolytische Eigenschaften (Beecher et al., 1995). Besonders bei Mäuse- und Schaferythrozyten ist die Hämolyse auf Blutplatten sehr gut zu sehen, während humane, Pferde- und Kaninchenerythrozyten nicht empfindlich sind (Beecher & MacMillan, 1990). Auf Schafblutagar zeigt es eine ringförmige, diskontinuierliche Hämolysezone, die erst einige Millimeter von der Diffusionsstelle entfernt beginnt (Beecher & Macmillan, 1991, Beecher & Wong, 1997).

Die Genprävalenz von Hbl in *B. cereus* variiert von Studie zu Studie, ca. 40 - 80 % der getesteten Stämme tragen Gene für Hbl (Hwang & Park, 2015, Kim et al., 2015, Reis et al., 2013, Tallent et al., 2015). Einige Stämme, wie z. B. der *B. cereus* Stamm ATCC 10876, tragen sogar zwei *hbl* Kopien in ihrem Genom. Die einzelnen Hbl-Proteine zeigen hierbei hohe Sequenzübereinstimmungen mit ihren jeweiligen Paralogen (Sastalla et al., 2013). Die *hbl* Gene liegen ebenfalls zusammen auf einem Operon (Abbildung 2). *hblC* und *hblD*, die für L2 und L1 codieren, sind in einem Tandem angeordnet. *hblA* codiert für die Komponente B, es findet sich direkt nach *hblD*. Sie werden in der Reihenfolge *hblC*, *hblD* und *hblA* in ihre mRNA transkribiert. Das Gen *hblB*, das unterhalb von *hblA* lokalisiert ist, zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu *hblA* und codiert für das Protein Hbl B' (Ryan et al., 1997). *hblB* wurde ursprünglich von Heinrichs et al. (1993) identifiziert, als das Gen *hblA* aus dem *B. cereus* Stamm F837/76 sequenziert wurde, wobei man lange Zeit von einem Pseudogen ausging, da es in nicht nachweisbaren Mengen transkribiert wurde und das *hblCDA* mRNA-Transkript vor *hblB* zu enden scheint (Lindbäck et al., 1999, Stenfors Arnesen et al., 2008). Clair et al. (2010) konnten jedoch wenige Zeit später feststellen, dass das Hbl B' Protein in nachweisbaren Mengen im frühen Sekretom des *B. cereus* Stammes ATCC14579 existiert. Es wird als monocistronisches Gen unabhängig vom PlcR regulierten *hblCDA* Polycistron transkribiert. HblB' könnte dieselbe Funktion wie Hbl B, das von *hblA* transkribiert wird, aufweisen. Die Autoren vermuten, dass Hbl B' die Hbl B Funktion in einer bestimmten Wachstumsphase oder unter speziellen Wachstumsvoraussetzungen

vervollständigen oder verstärken kann (Clair et al., 2010).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des *hbl*-Operons (nach Økstad et al., 1999, Ryan et al., 1997, Sastalla et al., 2013).

Wie bei Nhe sind die einzelnen Hbl-Komponenten atoxisch und können nur in einer bestimmten Reihenfolge an die Zielzelle binden, um so eine Pore zu bilden und die Zellyse zu initiieren. Als erstes bindet Hbl B an die Zellmembran, worauf L1 sich an B anlagert. L2 bindet daraufhin an L1 (Sastalla et al., 2013). Für die volle biologische Aktivität auf CHO-Zellen wird ein molares Verhältnis der drei Proteine von 1:1:1 benötigt. Sastalla und Kollegen widerlegten hiermit frühere Annahmen, dass alle Komponenten unabhängig an die Zelle binden. Hier ist man davon ausgegangen, dass Hbl die Hämolyse durch das Zusammenwirken von mindestens Hbl L1 und L2 in einem „Membranangriffskomplex“ verursacht, weil sich die membrangebundenen L-Komponenten durch spezifische Antikörper neutralisieren ließen (Beecher & Wong, 1997). In diesen Studien wurde Hbl allerdings mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt, wodurch der in nahezu allen *B. cereus* Stämmen vorhandene weitere Toxinkomplex Nhe noch in Spuren vorhanden sein konnte (Beecher & Macmillan, 1991, Beecher & Wong, 1994b). Die Ergebnisse von Sastalla et al. wurden in neuesten Untersuchungen mit einem *nheABC* Deletionsstamm sowie mit rekombinant in *E. coli* hergestellten Hbl-Komponenten bestätigt. In Dot blots, indirekten und Hybrid-Sandwich-Enzymimmunoassays konnte erstmals eine Komplexbildung von Hbl L1 und B sowie von L1 und L2 in Lösung gezeigt werden, was durch Oberflächenplasmonenresonanz bestätigt wurde (Tausch et al., 2017).

Hbl unterscheidet sich in mehreren Punkten von Nhe. Während Nhe zunächst nur zytotoxische und enterotoxische Eigenschaften zeigte, ist Hbl zusätzlich hämolytisch und dermonekrotisch (Beecher & Macmillan, 1991, Beecher et al.,

1995, Beecher & Wong, 1994b). Obwohl die Transkription sowohl von Hbl als auch von Nhe von PlcR reguliert wird, kommt das *hbl* Operon nur in 40 - 80 % der *B. cereus* Stämme vor, während *nhe* in fast allen Isolaten zu finden ist (Agaisse et al., 1999, Gohar et al., 2002). Trotzdem sind die Ähnlichkeiten in den Eigenschaften auch in Sequenzhomologien ersichtlich, die sowohl zwischen den jeweiligen drei Komponenten innerhalb eines Komplexes als auch zwischen den Proteinen von Nhe und Hbl vorkommen. So fanden Ryan et al. (1997) eine 22%ige Übereinstimmung der Hbl-Komponenten L1 und B. Die größten Ähnlichkeiten in den Sequenzen zwischen den beiden Drei-Komponenten-Enterotoxinen weisen *nheA* und *hblC*, *nheB* und *hblD* sowie *nheC* und *hblA* auf, wobei in der Studie nicht nur die Sequenzen, sondern auch die Transmembran-Helices verglichen wurden (Granum et al., 1999). Bei einem alleinigen Sequenzvergleich hat *hblD* mit *nheC* eine höhere Übereinstimmung (Tabelle 2). Trotz dieser Sequenzhomologien können sich die einzelnen Komponenten von Nhe und Hbl für ein aktives Toxin weder ergänzen noch gegenseitig ersetzen. Die Nhe- und Hbl-Komponenten wurden in allen 20 verschiedenen Kombinationen zu CHO-Zellen gegeben, nur die drei Nhe- bzw. die drei Hbl-Proteine allein führten zu nahezu 100%igem Zelltod. Alle anderen Kombinationen waren nicht toxisch (Sastalla et al., 2013).

Eine Röntgenstrukturanalyse der B-Komponente des Hbl-Komplexes von Madegowda et al. (2008) offenbarte weitere verwandte Muster. Die höchste Übereinstimmung hat diese Struktur mit Cytolysin A von *E. coli* (Stenfors Arnesen et al., 2008). Trotz niedriger Sequenzhomologie besitzen sie ähnliche Kopfdomänen mit je zwei  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Haarnadel, und Schwanzdomänen mit je fünf  $\alpha$ -Helices, nur in ihrer Ausrichtung unterscheiden sie sich. Diese ähnlichen Strukturen weisen auf ein analoges Porenbildungsvermögen hin. Hypothetische Strukturmodelle von NheB und NheC zeigen die gleichen Übereinstimmungen (Fagerlund et al., 2008). Deswegen schlugen Fagerlund et al. (2008) vor, die drei Proteine (Nhe, Hbl, ClyA) zu einer Superfamilie von porenformenden Toxinen zusammenzufassen.

**Tabelle 2:** Sequenzhomologien der Proteine der Hbl- und Nhe-Komplexe von *B. cereus* ATCC 14579 und Cytolysin A von *E. coli* (nach Fagerlund et al., 2008).

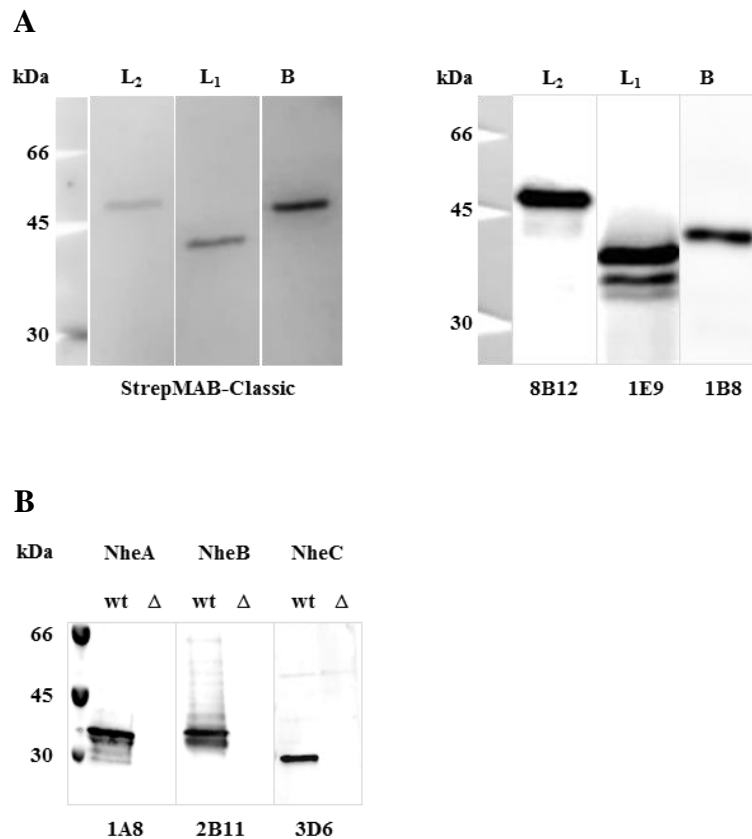
	<i>Hbl L2</i>	<i>Hbl L1</i>	<i>Hbl B</i>	<i>NheA</i>	<i>NheB</i>	<i>NheC</i>
ClyA	18 %	20 %	20 %	18 %	19 %	20 %
Hbl L2		18 %	23 %	23 %	21 %	19 %
Hbl L1			25 %	18 %	40 %	32 %
Hbl B				20 %	27 %	25 %
NheA					22 %	22 %
NheB						44 %

#### 4. Vorarbeiten und Zielsetzung dieser Arbeit

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens der drei Hbl-Komponenten wurden diese rekombinant in *E. coli* hergestellt. Mit Hilfe von Expressionsvektoren wurden dem rekombinanten Hbl (rHbl) L2 und B ein N-terminaler Strep-tag hinzugefügt, rHbl L1 ein C-terminaler Strep-tag. Hierfür wurden die Gene in die Expressionsvektoren pASK-IBA3plus und pASK-IBA5plus der Firma IBA Lifesciences kloniert. Anschließend wurde jede der drei Hbl-Komponenten mit N- bzw. C-terminalem Strep-tag in *E. coli* BL21 überexprimiert und über Affinitätschromatographie mit dem Strep-Tactin<sup>®</sup>-System (IBA Lifesciences) gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden in Western Blots mittels des Strep-tag spezifischen Antikörpers StrepMAB-Classic sowie Hbl spezifischen mAk, die am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch hergestellt wurden, detektiert (Abbildung 3A). Zusätzlich wurde ein  $\Delta nheABC$  Stamm aus dem *B. cereus* Stamm F837/76 hergestellt, indem das *nhe* Operon durch eine Spectinomycin-Resistenz-Kassette ersetzt wurde. Dieser Stamm zeigt im Vergleich zum Wildtyp keinerlei phänotypische Veränderungen. Allerdings bestätigen Western Blots, dass der Deletionsstamm kein Nhe-Toxin mehr bildet (Abbildung 3B).

Um die toxische Aktivität der rHbl-Komponenten und des  $\Delta nheABC$  Stammes zu testen, wurden diese in Propidiumiodid(PI)-Tests und in WST-1-Bioassays untersucht. Dabei konnten die gleichzeitig eingesetzten rHbl-Komponenten eindeutige Poren in der Zellmembran von Vero-Zellen bilden bzw. diese abtöten,

während der Deletionsstamm im Gegensatz zum Wildtyp F837/76 verlangsamten PI-Einstrom bzw. reduzierten reziproken Zytotoxizitätstiter zeigte (Tausch et al., 2017).



**Abbildung 3:** (A) Detektion der rHbl-Komponenten in Western Blots mit StrepMAB-Classic (links) und Hbl spezifischen mAK 8B12 (L2), 1E9 (L1) und 1B8 (B) (rechts) (Tausch et al., 2017). (B) Detektion von NheA, B und C im Überstand von Stamm F837/76 im Western Blot durch mAk 1A8, 2B11 und 3D6. Keine Detektion im Überstand des Deletionsstammes (Tausch et al., 2017).

Die drei rekombinanten Einzelkomponenten rHbl L2, L1 und B, sowie der  $\Delta nheABC$  Deletionsstamm bieten optimale Voraussetzungen zur detaillierten Charakterisierung der Wirkungsweise von Hbl auf seinen Zielzellen. Trotz einer Vielzahl von Forschungsarbeiten konnte bislang nicht geklärt werden, in welcher

genauen Weise die Hbl-Komponenten B, L1 und L2 an ihren Zielzellen wirken. Bis heute konnte man durch *in vitro* Versuche lediglich herausfinden, dass die einzelnen Proteine atoxisch sind und nur in der Reihenfolge B, L1 und L2 an die Zelle binden können (Sastalla et al., 2013). Die Untersuchungen gestalteten sich zusätzlich dadurch schwierig, dass natürlich vorkommende *B. cereus* auch immer Nhe produzieren, das an der Ätiologie von durch *B. cereus* verursachten gastrointestinalen Erkrankungen mit beteiligt ist (Beecher & Macmillan, 1991, Beecher & Wong, 1994b).

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit besteht auf der genaueren Charakterisierung des Zusammenspiels der drei Hbl-Komponenten auf molekularer Ebene anhand rekombinant hergestellter Hbl-Komponenten. Die wesentlichen Fragen hierbei sind, welche der Komponenten einen freien N- oder C-Terminus für die Interaktion benötigen, welche Proteindomänen wichtig für die Interaktion sind und welche Abschnitte der Proteine deletiert werden können. Basis für die Arbeit waren die bereits klonierten rHbl-Komponenten in den Expressionsvektoren pASK-IBA3plus und pASK-IBA5plus.



### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Material**

##### **1.1. Chemikalien**

2-Mercapto-Ethanol (Sigma-Aldrich, M-6250)

Aceton (Merck, 14.2500)

Agar bacteriological (Oxoid, LP0011)

Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, 17-0446-01)

Amino-Caprinsäure (Sigma-Aldrich, A2504)

Ampicillin-Natriumsalz (Roth, K029.2)

Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, A7030)

Bromphenolblau (Merck, 8122)

Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) (Merck, 2387)

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

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11644807001)

Citronensäure-Monohydrat (Sigma-Aldrich, C1909)

Desthiobiotin (IBA Lifesciences, 2-1000-005)

D-Glukose-Monohydrat (Merck, 1.083.421.000)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, D2650)

Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, 71640)

Doxycyclin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, D3447)

Essigsäure (Roth, 3738.2)

Ethidiumbromid (Serva, 21238.01)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma-Aldrich, E1644)

Fetales Kälberserum (Capricorn, FBS-11A)



Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)

Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES) (Sigma-Aldrich, H4034)

Hydroxyphenylazobenzoessäure (HABA) (Sigma-Aldrich, H5126)

Kaliumchlorid (KCl) (Roth, 6781.1)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, 60220)

L-Glutamin (Biochrom, K0282)

Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O) (Roth, A537.1)

McCoy's 5A modified Medium (Biochrom, F1015)

MEM Earle's (Biochrom, FG0325)

Methanol (Merck, 34860)

Natriumazid (Riedel de Haën, 13412)

Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Riedel de Haën, 31432)

Natriumchlorid (NaCl) (Sigma-Aldrich, S7653)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, L4390)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) (Riedel de Haën, 31437)

Natrium-Pyruvat (Biochrom, L0473)

Natronlauge (VWR, 31.627.290)

PBS Dulbecco (*phosphate buffered saline*) (Biochrom, L1825)

Penicillin/Streptomycin (Biochrom, A2212)

Ponceau S solution (Sigma-Aldrich, P7170)

ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Thermo Fisher, P36935)

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, P4864)

RPMI 1640 (Biochrom, FG1215)

Salzsäure (HCl) (Honeywell, 71763)

Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck, 30743)

Sheep blood defibrinated (Oxoid, SR0051)

Strep-Tactin-Sepharose (IBA Lifesciences, 2-1201-010)

SuperSignal™ ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrat (Thermo Fisher, 11879310)

SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Thermo Fisher, S12001)

Tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma-Aldrich, T2885)

Tris-Hcl (Sigma-Aldrich, T3253)

Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503)

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

Trypton enzymatischer Verdau aus Casein (Sigma-Aldrich, 95039)

Tween 20 (Roth, 9127.2)

Universal-Agarose (peqGOLD, 732-2789P)

## **1.2. Nährmedien**

### **1.2.1. Flüssige Nährmedien zur Anzucht von *E. coli***

#### LB (*lysogeny broth*)-Medium

10 g Trypton

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

Die abgewogenen Reagenzien wurden mit A. dest. auf 1 l aufgefüllt und für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

### 1.2.2. Flüssige Nährmedien für die Zellkultur

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien.

<i>Zelllinie</i>	<i>Zellmedium</i>	<i>Supplementierung</i>
Vero	MEM Earle's	+ 1 % FCS + 1 % Natrium-Pyruvat + 0,2 % Penicillin/Streptomycin
CaCo-2	RPMI 1640	+ 10 % FCS
MDBK	MEM Earle's	+ 2 % FCS + 1 % Na-Pyruvat + 0,2 % Penicillin/Streptomycin
RAW 264.7	RPMI 1640	+ 10 % FCS
A-204	McCoy's 5A modified Medium	+ 15 % FCS + 1 % Na-Pyruvat + 2 % L-Glutamin
A-549	Dulbecco's MEM	+ 10 % FCS + 1 % Na-Pyruvat + 2 % L-Glutamin
Hep-G2	RPMI 1640	+ 10 % FCS + 1 % Na-Pyruvat
Jurkat	RPMI 1640	+ 10 % FCS + 1 % Na-Pyruvat
U-937	RPMI 1640	+ 10 % FCS + 1 % Na-Pyruvat
HEp-2	MEM Earle's	+ 1 % FCS + 1 % Natrium-Pyruvat + 0,2 % Penicillin/Streptomycin
IPEC-J2	Dulbecco's MEM	+ 10 % FCS + 1 % Na-Pyruvat + 2 % L-Glutamin
HT-29	McCoy's 5A modified Medium	+ 10 % FCS + 2 % L-Glutamin

### 1.2.3. Feste Nährmedien

#### LB-Ampicillin-Agar

Zusätzlich zu den Reagenzien des LB-Mediums (siehe Kapitel III.1.2.1.) wurden 15 g/l Agar zugegeben. Nachdem das Medium nach dem Autoklavieren handwarm abgekühlt war, wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben und je ca. 25 ml in eine sterile Petrischale gefüllt. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

### 1.3. Puffer und Lösungen

#### 1.3.1. Plasmidpräparation

Resuspensionspuffer:	303 mg Tris, 186 mg EDTA, pH 8, A. dest. ad 50 ml, 100 µg/ml RNase
Lösung III:	22,4 ml H <sub>2</sub> O, 6,4 ml 1 N NaOH, 3,2 ml 10 % SDS (für ca. 70 Proben)

#### 1.3.2. Proteinreinigung

Strep-Tactin-Waschpuffer (pH 8):	12,1 g Tris, 17,5 g NaCl, 372 mg EDTA, 1 l A. dest., pH 8
Strep-Tactin-Elutionspuffer:	zusätzlich zu Reagenzien von Strep-Tactin- Waschpuffer 535 mg Desthiobiotin
Strep-Tactin-Regenerationspuffer:	zusätzlich zu Reagenzien von Strep-Tactin- Waschpuffer 242 mg Hydroxyphenylazobenzoessäure (HABA)

#### 1.3.3. 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 M) auf pH 8,0
SDS-Puffer:	0,2 g EDTA, 15 g SDS, 200 ml Tris/HCl- Puffer
Bromphenolblau-Lösung:	0,3 % (w/v) Bromphenolblau in A. dest

**1.3.4. 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 der Proteinbanden:

1 mg BSA/ml A. dest.

**1.3.5. Western Blot**

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-Caprinsäure, 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 % (w/v) Casein-  
Natriumsalz und 0,025 % (v/v) Tween 20

Waschlösung: PBS mit Zusatz von 0,025 % (v/v) Tween 20

**1.3.6. Hämolyseassay**

Salzpuffer (pH 7,2): 8,77 g NaCl, 788 mg Tris-HCl, pH 7,2

**1.3.7. Durchflusszytometrie**

EC-Puffer (pH 7,2): 8,18 g NaCl, 3,6 g Hydroxyethylpiperazinyl-  
ethansulfonsäure (HEPES), 0,1 g MgCl<sub>2</sub>,  
0,22 g CaCl<sub>2</sub>, 1,8 g Glukose, 1 l A. dest.,  
pH 7,2, sterilfiltriert

FACS-Puffer (sheath fluid): 8 g NaCl, 1,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
0,2 g KCl, 100 mg NaN<sub>3</sub> (0,01 %), 1 l A. dest.

### 1.3.8. Enzymimmunoassays

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> , PBS, pH 7,3):	6,79 g NaCl, 1,47 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,43 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 l A. dest., pH 7,3
Absättigungslösung:	PBS mit Zusatz von 3 % (w/v) Casein-Natriumsalz
Waschlösung:	8,55 g NaCl, 2,5 ml Tween 20, 10 l A. dest.
Probenverdünnungspuffer:	PBS bzw. PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20 bzw. BSA (3 µg/ml)
Lösung zum Verdünnen des Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers:	PBS mit Zusatz von 1 % (w/v) Casein-Natriumsalz
Citratpuffer (0,23 mol/l, pH 3,95):	44,13 g Citronensäure-Monohydrat, 200 ml 1 M KOH, 800 ml A. dest., weitere Zugabe von KOH bis pH 3,95 sowie 336 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Tetramethylbenzidin-Lösung:	252 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 5 ml Aceton, 45 ml Methanol
Substrat/Chromogen-Lösung:	20 Teile Substrat-Puffer, 1 Teil Tetramethylbenzidin-Lösung
Schwefelsäure (1 M)	

### 1.4. Enzyme

Antarctic Phosphatase (New England BioLabs, M0289S)

Faktor Xa Protease (New England BioLabs, P8010S)

Lysozym (Sigma-Aldrich, L-7001)

Sac II (New England BioLabs, R0157S, CCGC'GG)

Sal I (New England BioLabs, R0138S, G'TCGAC)

Thermoprime Plus DNA-Polymerase (5 U/µl, Thermo Fisher, AB0301B)

T4 DNA Ligase (New England BioLabs, M0202S)

## 1.5. Molekularbiologische Kits

Hi Yield™ Gel / PCR DNA Extraction Kit (RBC, YDF100)

GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, PLN 70)

## 1.6. PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden bei der Firma Eurofins Genomics bestellt (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Charakteristika der verwendeten Primer. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sal I und Sac II sind unterstrichen.

Zielgen	Primer	Primersequenz (5' - 3')
<i>hblD</i>	L1_7+_fw	ATAT <u>CCGCGGT</u> GCACAAGAAACGACCG
	L1_7+_rev	ATAT <u>GTCGAC</u> CTACTCCTGTTTAAAAGCAAT ATC
<i>hblC</i>	L2_7+_fw	ATAT <u>CCGCGGT</u> CAAGCAGAAACTCAACAAGA
	L2_7+_rev	ATAT <u>GTCGACT</u> CAAAATTTATACACTTGTTC TC
<i>hblA</i>	B_7+_fw	ATAT <u>CCGCGGT</u> GCAAGTGAAATTGAACAAAC
	B_7+_rev	ATAT <u>GTCGAC</u> CTATTTTTGTGGAGTAACAGTT TC

## 1.7. Immunreagenzien

### 1.7.1. Monoklonale Antikörper (mAk)

Die in Tabelle 5 aufgeführten Antikörper wurden in früheren Arbeiten am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch etabliert (Dietrich et al., 1999, Tausch et al., 2017, Wehrle et al., 2009). Daneben wurde der kommerziell erhältliche Antikörper StrepMAB-Classic (IBA Lifesciences, 2-1507-001) verwendet.

**Tabelle 5:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper gegen *B. cereus* Hbl-Komponenten.

<i>Zielantigen</i>	<i>Monoklonale Antikörper</i>
Hbl B	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>1D12</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>2G4</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>11A5</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>1G8</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>1G8-F488</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>12D12</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B II <b>1D7</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B III <b>1C12</b>
Hbl L2	HT-L <sub>1</sub> II <b>1B8</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B II <b>1D8</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B III <b>1H9</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B III <b>1H9-HRP</b>
	B. cer 45 I <b>8B12</b>
B. cer 45 I <b>1A12</b>	
Hbl L1	B. cer 45 I <b>1A12</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>1G8</b>
	Hbl-L <sub>1</sub> /B I <b>12D12</b>
	HT-L <sub>1</sub> II <b>1E9</b>
	HT-L <sub>1</sub> I <b>1F8</b>
B. cer 39 II <b>2A3</b>	

### 1.7.2. Polyklonale Antiseren

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

### 1.8. Zelllinien

Zum Test der Zytotoxizität der rHbl-Komponenten wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 6 aufgeführten Zelllinien benutzt. Da Vero-Zellen bereits als empfindlich gegenüber rHbl verifiziert wurden (Tausch et al., 2017), wurden sie auch zum Test der verkürzten Varianten der rHbl-Komponenten genutzt.



**Tabelle 6:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

<i>Zelllinie</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Wachstum</i>	<i>Herkunft</i>
Vero	Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze	Adhärent	ECACC 84113001
CaCo-2	Humane Kolonadenokarzinom-Zellen	Adhärent	DSMZ ACC 169
MDBK	Bovine Nierenzellen	Adhärent	Institut für Tierphysiologie, Tierärztliche Fakultät, LMU
RAW 264.7	Murine Makrophagen mit Leukämievirus	Semi-adhärent	ECACC 91062702
A-204	Humane Rhabdomyosarkom-Zellen	Adhärent	DSMZ ACC 250
A-549	Humane Lungenkarzinom-Zellen	Adhärent	DSMZ ACC 107
Hep G2	Humane Leberkarzinom-Zellen	Adhärent	DSMZ ACC 180
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie-Zellen	Suspension	DSMZ 282
U-937	Humane histiozytäre Lymphom-Zellen	Suspension	DSMZ ACC 5
HEp-2	Humane Larynxkarzinom-Zellen	Adhärent	BioWhittaker 71-136B
IPEC-J2	Porzine Jejunumepithel-Zellen	Adhärent	DSMZ ACC 701
HT-29	Humane Kolonadenokarzinom-Zellen	Adhärent	DSMZ ACC 299

### 1.9. Bakterienstämme

In Tabelle 7 und 8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *B. cereus* Stamm F837/76 stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ). F837/76  $\Delta nheABC$  wurde aus dem Stamm F837/76 hergestellt, indem das *nhe* Operon durch eine Spectinomycin-Resistenz-Kassette ersetzt wurde (Tausch et al., 2017).

**Tabelle 7:** Charakteristika der verwendeten *B. cereus* Stämme.

<i>B. cereus</i> Stämme		Toxinprofil			
Bezeichnung	Herkunft	<i>ces</i>	<i>nhe</i>	<i>hbl</i>	<i>cytK-2</i>
F837/76, DSM 4222	Postoperative Wunde (Beecher & MacMillan, 1990)	-	+	+	-
F837/76 $\Delta nheABC$	Deletionsstamm (Tausch et al., 2017)	-	-	+	-

**Tabelle 8:** Charakteristika der verwendeten *E. coli* Stämme.

<i>E. coli</i> Stämme	
Bezeichnung	Eigenschaften
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	hocheffizienter Stamm (Transformationseffizienz: 1 - 3 x 10 <sup>9</sup> KBE/ $\mu$ g pUC19 DNA)  hohe Insertstabilität durch <i>recA</i> Mutation (verhindert homologe Rekombination)  hohe Ausbeute und Qualität der DNA durch <i>endAI</i> Mutation (inaktiviert intrazelluläre Endonuklease)
<b>BL21 (DE3)</b>	für Expression von Proteinen entwickelt  Transformationseffizienz: 1 - 5 x 10 <sup>7</sup> KBE/ $\mu$ g pUC19 DNA  Proteasemangel, dadurch kein Verdau der rekombinanten Proteine

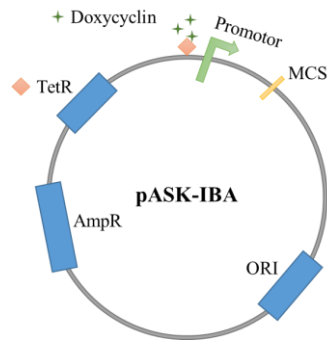
### 1.10. Expressionvektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *E. coli* Expressionsvektoren (pASK) der Firma IBA Lifesciences verwendet. Alle aufgeführten Expressionsvektoren führen folgende Eigenschaften: Sie besitzen eine Resistenz gegenüber Ampicillin, die Expressionskassette steht unter der transkriptionellen Kontrolle des Tetracyclin-Promotors und ist induzierbar durch Tetracyclin-Derivate, das fertig exprimierte, rekombinante Protein findet sich im Cytoplasma und ist mit einem Strep-Tactin<sup>®</sup> Affinitäts-tag (Strep-tag<sup>®</sup> II) versehen. In Tabelle 9 sind alle klonierten Konstrukte

dargestellt. Eine schematische Zeichnung eines Expressionsvektors ist in Abbildung 4 zu sehen.

**Tabelle 9:** rHbl-Proteine mit zugehörigen Expressionsvektoren und Lage der Affinitäts-tags.

<i>Protein</i>	<i>Gen</i>	<i>Expressionsvektor</i>	<i>Affinitäts-tag rHbl</i>	<i>Benennung</i>	
Hbl L1	<i>hblD</i>	pASK-IBA3plus	C-Terminus	3+L1	bereits getestet (Tausch et al., 2017)
Hbl L2	<i>hblC</i>	pASK-IBA5plus	N-Terminus	5+L2	
Hbl B	<i>hblA</i>	pASK-IBA5plus	N-Terminus	5+B	
Hbl L1	<i>hblD</i>	pASK-IBA5plus	N-Terminus	5+L1	bisher nicht untersucht
Hbl L2	<i>hblC</i>	pASK-IBA3plus	C-Terminus	3+L2	
Hbl B	<i>hblA</i>	pASK-IBA3plus	C-Terminus	3+B	
Hbl L1	<i>hblD</i>	pASK-IBA7plus	N-Terminus, Strep-tag abspaltbar	7+L1	in dieser Arbeit kloniert
Hbl L2	<i>hblC</i>	pASK-IBA7plus	N-Terminus, Strep-tag abspaltbar	7+L2	
Hbl B	<i>hblA</i>	pASK-IBA7plus	N-Terminus, Strep-tag abspaltbar	7+B	



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung eines pASK-IBA Expressionsvektors mit ORI (*origin of replication*, Replikationsursprung), AmpR (Ampicillin-Resistenz-Gen), TetR (Tetracyclin-Repressor-Gen), Promotorregion, Doxycyclin zur Freisetzung des Tetracyclin-Repressors und MCS (*Multiple Cloning Site*).

### 1.11. Verbrauchsmaterialien

8-well Chamber Slide w/ removable wells (Thermo Fisher, 177402)

Cryotubes 1,8 ml (Thermo Fisher, 375418)

Einmalspritzen 20 ml (Braun, 4606205V)

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

Immobilon-P Transfermembran, 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, IPVH304F0)

Mikrotiterplatten, 96 well (Thermo Fisher, 439454)

Mikrotiterplatten, 96 well, schwarz (Thermo Fisher, 165305)

Mikrotiterplatten, 96 well, steril (Thermo Fisher, 167008)

PCR-Gefäße 0,2 ml (Brand, 7813 00)

Petrischalen 94  $\times$  16 mm (Greiner Bio-One, 633102)

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

PhastGel™ Probenapplikator für PhastSystem™ Elektrophorese-System 8/1  $\mu\text{l}$  (GE Healthcare, 18-1618-01)

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

Pipettenspitzen 0,5 - 20 µl, 2 - 200 µl, 50 - 1000 µl (Brand, 732024, 732028, 732032)

Probenröhrchen 15 ml, 50 ml (Greiner Bio-One, 188271, 227261)

Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf, 0030120.086)

Safe-Lock Tubes 2 ml (Eppendorf, 0030120.094)

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

UV-Küvetten (Brand, 759210)

Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, 80 cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher, 156367, 178905)

Zentrifugenröhrchen, 50 ml (VWR, 734-0453)

Zählkammer nach Thoma (Brand)

### **1.12. Geräte**

Biofuge pico (Heraeus)

Biophotometer 8,5 mm (Eppendorf)

Electrophoresis Power Supply – EPS 200 (Pharmacia Biotech)

Electrophoresis Power Supply – EPS 1001 (GE Healthcare)

Elektrophoresekammer (VWR Peqlab)

FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson)

Flockeneisbereiter (Scotsman)

Fluoreszenzmikroskop Biozero mit Filter TexasRed (Keyence)

Hei-Standard Magnetrührer, Heidolph

Heracell™ 150i CO<sub>2</sub>-Inkubator (Thermo Fisher)

Herasafe® Sicherheitswerkbank (Heraeus)

HB-1000 Hybridizer Hybridisierungsofen (UVP Laboratory Products)

Imager (biostep)

Imager UVP ChemStudio 815 Imaging System (Analytik Jena)

Inkubator (Mettler)

Inverses Mikroskop (Zeiss)

Mikrotiterplattenlesegerät Infinite<sup>®</sup> F50 (Tecan)

Multifuge 1 S-R (Heraeus)

NovaBlot Multiphor II (GE Healthcare)

PhastSystem Separation and Control Unit (Pharmacia)

pH-Meter (InoLab)

Schüttelinkubator CERTOMAT MO II (Sartorius)

Sorvall LYNX 4000 Superspeed-Zentrifuge (Thermo Fisher)

Taumelschüttler Polymax 1040 (Heidolph)

ThermoCycler, PCR Express (Hybaid)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Überkopfmischer Intelli-Mixer RM-2M (neoLab Migge)

Varifuge 3.0R (Heraeus)

Victor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter (PerkinElmer)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

Waage (Sartorius)

### **1.13. Software**

Argus X1 (Biostep)

Bildanalyse-Software, BZ-Analyser für Fluoreszenzmikroskop (Keyence)

FCS Express Software (De Novo Software)

Flowing Software (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology)

Magellan for F50 (Tecan)

VisionWorks Acquisition and Analysis (Analytik Jena)

Wallac 1420 WorkStation (PerkinElmer)

#### 1.14. Sonstiges

CutSmart<sup>®</sup> Buffer (New England BioLabs, B7204S)

Erlenmeyerkolben 200 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml (Schott)

Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs, B7024S)

Glaspipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml

Handdispenser (LKB)

Handzählgerät

Parafilm (Bemis, PM996)

Pipettierhilfe Pipetboy acu 2 (Integra)

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

Variable Zwölfkanalpipette 30 - 300 µl (Eppendorf)

Zählkammer nach Thoma (Brand)

## 2. Methoden

### 2.1. Klonierung

Die Gene der rHbl-Komponenten L1, L2 und B, *hblD*, *hblC* und *hblA*, wurden in das Expressionsplasmid pASK-IBA7plus (IBA Lifesciences) kloniert, wodurch sich der Strep-tag am N-Terminus des rekombinanten Proteins befindet und durch Spaltung mit Hilfe der Protease Faktor Xa entfernt werden kann.

#### 2.1.1. PCR (*polymerase chain reaction*)

Zur Amplifikation von *hblD*, *hblC* und *hblA* wurden die Plasmide pASK-IBA3plus mit L1 und pASK-IBA5plus mit L2 und B (siehe Tabelle 9) verwendet. Je Ansatz wurden 1 µl Plasmid (= Template), 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, jeweils 2 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 2 µl dNTPs und 1 µl *Taq*-Polymerase mit

33 µl A. dest. auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Annealing-Temperatur und die Anzahl der Wiederholungen des Syntheszyklus der PCR wurden individuell mit dem Thermocycler (Hybaid) angepasst und sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** PCR-Programm zur Amplifikation von *hblD*, *hblC* und *hblA*.

	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Anzahl Zyklen</i>
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	L1: 62 °C	30 s	35
	L2: Gradient 61 - 57 °C (61; 60; 58,8; 58,1; 56,9 °C)		40
	B: 62 °C		35
Elongation	72 °C	1 min 30 s	
Stabilisierung	72 °C	7 min	
Kühlung	4 °C		

### 2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenidentifizierung der DNA wurde diese auf ein 1%iges Agarosegel (0,7 g Agarose auf 70 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer) gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden „GeneRuler“ Größenstandards (0,1 - 3 kbp) mitgeführt. Jede Probe wurde mit einem Ladepuffer (Gel Loading Dye, 6X) gemischt und in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Bei 125 Volt und für 30 min wurde die DNA in Tris-Acetat-EDTA-Puffer elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend für ca. 30 min in Ethidiumbromid gefärbt. Nach kurzem Waschen in A. dest. wurden die DNA-Banden unter einem UV-Transilluminator (biostep) mit dem Programm Argus X1 (biostep) sichtbar gemacht.

### 2.1.3. DNA-Extraktion und -reinigung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines Elutionskits (HiYield™ Gel / PCR DNA Extraction Kit) aus dem Agarosegel



eluiert. Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht lokalisiert, ausgeschnitten und in einem Bindepuffer gelöst. Die Extraktion erfolgte durch die reversible Bindung der DNA an eine Säule und anschließende Elution durch einen Elutionspuffer.

#### 2.1.4. Restriktionsverdau

Mit den drei *hbl* Fragmenten sowie pASK-IBA7plus wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Zuerst wurde hierfür die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (*hblD*: 72 µg/ml, *hblC*: 94 µg/ml, *hblA*: 77 µg/ml, pASK-IBA7plus: 100 µg/ml). 26 µl pASK-IBA7plus wurden mit je 1,5 µl der Restriktionsenzyme Sac II und Sal I und 4 µl Puffer (CutSmart) sowie 30 µl *hbl* Fragmente wurden mit je 1 µl der Restriktionsenzyme Sac II und Sal I und 4 µl Puffer (CutSmart) versetzt und mit *A. dest.* auf ein Gesamtvolumen von 40 µl aufgefüllt. Nach Inkubation bei 37 °C für ca. 1,5 Stunden wurde dem pASK-IBA7plus Ansatz 1 µl alkalische Phosphatase zugesetzt. Anschließend wurden die Enzyme bei 65 °C für ca. 20 min inaktiviert.

#### 2.1.5. Ligation

Zur Ligation wurden 4 µl (ca. 60 ng) pASK-IBA7plus mit je 2 µl *hbl* Fragmenten (ca. 3x molarer Überschuss), 1 µl Puffer und 0,5 µl DNA-Ligase vermengt. Mit 2,5 µl *A. dest.* wurde auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Bei Raumtemperatur (RT) verbindet die DNA-Ligase die beim Verdau entstandenen überhängenden Einzelstrang-Enden der DNA. Nach drei bis vier Stunden wurden die Ansätze eingefroren.

#### 2.1.6. Transformation von *E coli* DH5a/BL21

Für die Transformation wurden CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* hergestellt. Hierzu wurden *E. coli* DH5a oder BL21 über Nacht in LB-Medium vorangereichert. Daraufhin wurden 100 ml frisches LB-Medium auf eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD<sub>600</sub>) von 0,2 angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert. Die Proben wurden bei 1520 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 20 ml sterilem, eiskaltem

CaCl<sub>2</sub> (50 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellpellets in 2,5 ml sterilem, eiskaltem CaCl<sub>2</sub> (50 mM) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Darauf wurden 650 µl eiskaltes, steriles, 87%iges Glycerin zugegeben. Je 100 µl wurden steril aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurden entweder der komplette Ligationsansatz (DH5α) oder 3 µl Plasmid (BL21) zu den CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli* steril und auf Eis pipettiert, eine halbe Stunde auf Eis und anschließend für 1 min bei 42 °C inkubiert. Daraufhin wurden sie zur Regeneration eine weitere halbe Stunde auf Eis inkubiert, bevor 1 ml LB-Medium steril zugegeben wurde. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und 850 rpm wurden die Ansätze bei 2376 g für 3 min zentrifugiert, das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert und auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert (über Nacht bei 37 °C). Die Einzelkolonien, die hierbei entstanden, wurden auf das Vorhandensein der *hbl* Gene untersucht.

#### **2.1.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Um die Klonierung überprüfen zu können, wurde die Plasmid-DNA mittels Elutionskit (GenElute Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich) oder von Hand isoliert. Hierfür wurden zunächst Übernachtskulturen von einzelnen Kolonien in 4 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin angelegt. Im Elutionskit erfolgte die Isolierung den Herstellerangaben entsprechend, zunächst durch Zentrifugieren und Lyse der Bakterien, dann Binden der Plasmid-DNA an die Säule, Auswaschen der Verunreinigungen und Elution der gereinigten Plasmid-DNA. Für die Präparation von Hand (nach Birnboim & Doly, 1979) wurde eine Kultur in zwei Safe-Lock Tubes aufgeteilt und bei 16060 g für 30 s zentrifugiert und in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend wurden 400 µl Lösung III hinzugegeben. Nach kurzer Inkubation auf Eis (weniger als 5 min) wurde 300 µl 7,5 M Ammoniumacetat zugegeben und wiederum auf Eis inkubiert (10 min). Danach wurden die Proben für 15 min bei 16060 g zentrifugiert und der Überstand zu je 650 µl Isopropanol gegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT folgte erneut ein Zentrifugationsschritt (20 min, 16060 g). Der Überstand wurde verworfen und 500 µl 70%iges Ethanol zum DNA-Pellet gegeben. Darauf wurde nochmals zentrifugiert (15 min, 16060 g), das Ethanol abgenommen und die Pellets

bei 50 °C im Heizblock getrocknet. Anschließend wurde das Plasmid in 50 µl A. dest. aufgenommen und kurz gevortext. In jedem Fall wurde die DNA-Konzentration im Photometer bestimmt.

### **2.1.8. Sequenzierung**

Im Anschluss an die Isolierung der Plasmid-DNA wurde ein erneuter Restriktionsverdau mit Sac II und Sal I sowie eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um Plasmide mit *hbl* Genen zu identifizieren. Die Sequenzierung dieser Gene erfolgte durch die Firma GATC/Eurofins Genomics. Nach Transformation von *E. coli* BL21 konnten diese für die Protein-Überexpression verwendet werden.

## **2.2. Arbeiten mit Protein**

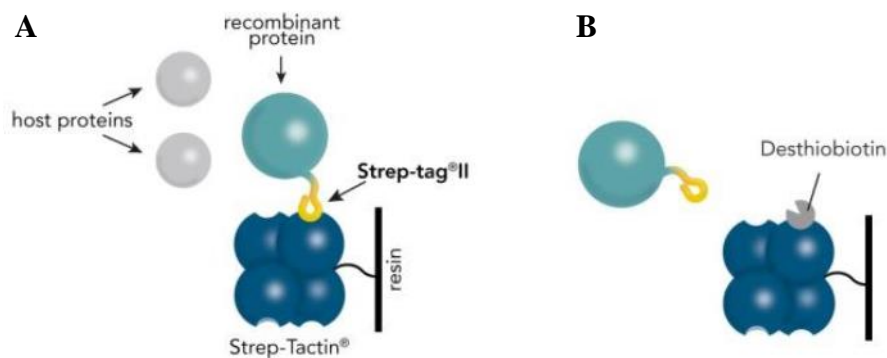
### **2.2.1. Protein-Überexpression**

Zur Voranreicherung wurden 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Einzelkolonie der entsprechenden *E. coli* BL21 Kultur von einer LB-Ampicillin Platte beimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Mit dieser Voranreicherung wurden standardmäßig 150 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin auf eine optische Dichte von 0,15 beimpft. Hierzu wurde die OD<sub>600</sub> photometrisch bestimmt und die entsprechende Menge an Übernachtskultur in das vorbereitete Medium überführt. Die OD<sub>600</sub> von 0,15 wurde photometrisch kontrolliert, anschließend wurden die Bakterien bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,9 inkubiert. Nach Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin zur Induktion der Proteinüberexpression wurden die Zellen für weitere vier Stunden inkubiert und anschließend bei 4234 g für 15 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

### **2.2.2. Proteinreinigung**

Das *E. coli* Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 12,5 ml Resuspensionspuffer, bestehend aus 100 mM Tris, 500 mM NaCl und 1 mM EDTA mit einem pH-Wert von 8, mit dem Protease Inhibitor cComplete Mini (Roche) und 100 µg/ml Lysozym

gelöst. Im Ultraschallbad wurden die Zellen für zweimal 15 min auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben bei 14000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm Filter gelassen und auf eine Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatographie-Säule (Bio-Rad) mit 0,5 ml Strep-Tactin<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> gegeben. Zur Proteinreinigung wurde das Protokoll der Firma IBA Lifesciences modifiziert. Nach dem gefilterten Zellextrakt (ZE) wurde die Säule dreimal mit 1 ml Strep-Tactin-Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen (Abbildung 5A). Zur Entfernung des Restwaschpuffers wurden vor der eigentlichen Elution des rekombinanten Proteins 250 µl Elutionspuffer aufgetragen (Elutionsfraktion 1, E1). Das im Elutionspuffer enthaltene Desthiobiotin führt zur kompetitiven Elution, indem es um die Biotinbindungstasche konkurriert, an das der Strep-tag des rekombinanten Proteins gebunden hat (Abbildung 5B). Im Anschluss wurde mit 500 µl die 2. Elutionsfraktion (E2) in einem Cryotube aufgefangen, Elutionsfraktion 3 (E3) mit 600 µl in einem separaten Cryotube. Zur vollständigen Auswaschung des Proteins genügte es, bis zur Elutionsfraktion 3 aufzufangen. Nach Durchlaufen von 2 ml Regenerationspuffer und ca. 30 ml Strep-Tactin-Waschpuffer wurden die einzelnen Säulen bei 4 °C aufbewahrt.



**Abbildung 5:** Strep-Tactin<sup>®</sup> Protein-Reinigung. (A) Bindung des rekombinanten Proteins an immobilisiertes Strep-Tactin<sup>®</sup>. (B) Elution des rekombinanten Proteins durch Desthiobiotin (Expression and purification of proteins using Strep-Tactin<sup>®</sup> A comprehensive manual, IBA Lifesciences).

### **2.2.3. Konzentrationsbestimmung der rekombinanten Proteine**

#### **2.2.3.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Konzentrationsbestimmung der rekombinanten Hbl-Komponenten wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (PhastSystem von Pharmacia). Als Referenz wurden i. d. R. Bovines Serumalbumin(BSA)-Verdünnungen zu 50, 25, 12,5 und 6,25 µg/ml angelegt. Die zu testenden Proteine wurden 1:10 in A. dest. verdünnt (18 µl A. dest. und 2 µl Protein). 20 µl Probe wurde mit 10 µl SDS-Puffer und 3 µl 0,3%iger Bromphenolblau-Lösung vermischt und bei 99 °C im Heizblock für 10 min denaturiert. Nach kurzem Zentrifugieren (10 s bei 2376 g) wurden jeweils 1 µl der Proben sowie ein Eichprotein-Standard auf Gradienten-Polyacrylamidgele (10 - 15 %) aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei 250 V, 10 mA, 3 W und 15 °C aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele für zweimal 30 min in Fixierlösung auf dem Taumelschüttler inkubiert.

#### **2.2.3.2. SYPRO Ruby-Protein-Färbung**

Die Polyacrylamidgele wurden über Nacht mit 2 ml SYPRO<sup>®</sup> Ruby Protein Gel Stain (Thermo Fisher), einem hochempfindlichen Fluoreszenzfarbstoff speziell für den Nachweis von Proteinen, bei RT gefärbt. Am nächsten Tag wurden diese für 30 min im Dunkeln mit Waschpuffer auf dem Taumelschüttler gewaschen und für 5 min in A. dest. gespült. Die Auswertung erfolgte am Imager UVP ChemStudio (Analytik Jena) unter UV-Licht. Mit der Software VisionWorks Acquisition and Analysis (Analytik Jena) wurden die Intensitäten der Proteinbanden im Vergleich zu den Banden der BSA-Eichgerade gemessen und die Konzentrationen berechnet.

### **2.2.4. Abspaltung des Strep-tags durch die Protease Faktor Xa**

Vor der *Multiple Cloning Site* des Vektors pASK-IBA7plus liegt eine kurze Gensequenz, die für vier Aminosäuren codiert, welche als Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa dienen (siehe Abbildung 14A). Dieses Enzym kann nach dem Arginin den Strep-tag vom gereinigten Protein abspalten. Hierzu wurden die rHbl-Komponenten mit Strep-Tactin-Waschpuffer und Strep-Tactin-Elutionspuffer ohne EDTA gereinigt, da der Verdau durch EDTA gestört wird. Zur Abspaltung

des Strep-tags wurden die rHbl-Proteine 7+L1, 7+L2 und 7+B in 100  $\mu$ l Gesamtvolumen auf eine einheitliche Stoffmengenkonzentration eingestellt (1,5 pmol/ $\mu$ l) und mit 1,4  $\mu$ l Faktor Xa (New England BioLabs, P8010S) (1 ng/ml) versetzt. Die Ansätze wurden sechs Stunden bei RT inkubiert und anschließend bei -20 °C eingefroren. Als Negativkontrolle wurde Strep-Tactin-Waschpuffer mit der Protease mitgeführt.

### 2.2.5. Western Blot

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel III.2.2.3.) und anschließend auf eine Immobilon-P-Membran transferiert (125 V, 17 mA, 10 W, 1 h). Nach orientierender Anfärbung der Eichproteinbanden mit Ponceau S wurde die Transfermembran für eine Stunde in 3%iger (w/v) Casein/PBS-Lösung auf dem Taumelschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Zur Darstellung der toxinspezifischen Banden wurde die Membran mit den jeweiligen mAks (Hbl L1: HT-L<sub>1</sub> II 1E9 2  $\mu$ g/ml, Hbl L2: B. cer. 45 I 1A12 2  $\mu$ g/ml, Hbl B: HT-L<sub>1</sub> II 1B8 2  $\mu$ g/ml) für eine Stunde bei RT in 1%igem Casein/PBS inkubiert. Der Antikörper StrepMAB-Classic (IBA Lifesciences) wurde in einer speziellen Verdünnung auf die Membran gegeben. Von einer 1:10 Vorverdünnung des Antikörpers in PBS mit 0,2 % BSA und 0,1 % Tween 20 wurden 10  $\mu$ l in 10 ml PBS mit 0,1 % Tween 20 aufgenommen, sodass auf die Transfermembran 20 ng/ml Antikörper gegeben wurden. Nach dreimaligem zehnminütigen Waschen in 0,025 % (v/v) Tween 20/PBS-Lösung auf dem Taumelschüttler wurde der Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Maus) 1:2000 in 1 % Casein/0,025 % Tween 20/PBS-Lösung auf die Transfermembran gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut 3 x 10 min in 0,025%igem (v/v) Tween 20/PBS gewaschen und zusätzlich 2 x 10 min in PBS gespült. Zuletzt wurde die Membran für 2 min im Dunkeln mit Chemilumineszenz Substrat (SuperSignal™ ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrat, Thermo Fisher) versetzt und über den Imager UVP ChemStudio (Analytik Jena) detektiert.

## 2.2.6. Enzymimmunoassays

### 2.2.6.1. Indirekter Enzymimmunoassay (EIA)

Zum Test der Bindungskapazität von mAk 1G8 an rHbl 3+B, 5+B und 7+B sowie zur Epitopeingrenzung wurden indirekte EIAs durchgeführt. Das Prinzip eines indirekten EIAs beruht darauf, dass ein spezifischer Antikörper an ein immobilisiertes Antigen bindet. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch einen mit Merrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) markierten Sekundärantikörper detektiert. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung sichtbar gemacht. Der Anteil an gebundenem Antikörper wird durch Messen der Absorption bei 450 nm bestimmt.

Alle rHbl-Komponenten sowie verkürzte Varianten wurden auf 0,75 pmol/μl mit Strep-Tactin-Waschpuffer eingestellt. Die Startkonzentration für rHbl 3+L1 und seine verkürzten Varianten war 23,2 fmol/μl, für rHbl 5+L2 und seine verkürzten Varianten 21 fmol/μl und für rHbl 5+B und seine verkürzten Varianten 24,4 fmol/μl. Mit diesen wurde zur Plattenbeschichtung eine serielle Verdünnungsreihe in 3 μg/ml BSA/PBS angelegt (100 μl/well). Die beschichteten Mikrotiterplatten wurden entweder bei RT über Nacht oder bei 4 °C drei Nächte in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch Absaugen mit einer Vakuumpumpe wurde nicht gebundenes Antigen entfernt. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit 3 % (w/v) Casein/PBS-Lösung (150 μl/well) auf dem Taumelschüttler für 30 min inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Spülen mit Waschlösung und Ausklopfen der Mikrotiterplatten auf Zellstoffstapeln wurden 2 μg/ml (100 μl/well) in PBS der spezifischen mAk hinzugegeben und die Mikrotiterplatten auf dem Taumelschüttler für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen und Ausklopfen der Platten auf Zellstoff wurde der Peroxidase-markierte Sekundär-Antikörper (Kaninchen Anti-Maus) 1:2000 in einer 1%igen (w/v) Casein/PBS-Lösung 100 μl/well aufgetragen und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach fünf Waschschritten und Trocknen wurde die Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung (100 μl/well) zugegeben. Die Platten wurden für 20 min auf dem Taumelschüttler inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 M, 100 μl/well) abgestoppt. Die Auswertung erfolgte durch Messen der Absorption bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite® F50, Tecan).

### **2.2.6.2. Sandwich-Enzymimmunoassay**

Für den Hbl L2 spezifischen Antikörper B. cer 45 I 1A12 wurde ein Sandwich-EIA vorgezogen, da der Antikörper eine intakte Tertiärstruktur der Antigene benötigt, um binden zu können. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte mit 10 µg/ml mAk 1A12 beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Absättigung der Platten mit Casein/PBS wurden die Proben, die zuvor auf die gleiche Stoffmengenkonzentration (0,75 pmol/µl) eingestellt worden waren, in 0,1 % Tween 20/PBS verdünnt. Anschließend wurden, wie oben beschrieben, rHbl 5+L2 und seine verkürzten Varianten auf 21 fmol/µl Startkonzentration eingestellt. Nach dreimaligem Waschen und Trocknen wurden die Proben in einer seriellen Verdünnungsreihe (in 1:2 Schritten, 100 µl/well) aufgetragen. Nach Absaugen von nicht gebundenem Antigen und vier Waschschrritten wurde der Sekundärantikörper Hbl-L<sub>1</sub>/B III 1H9-HRP 1:1000 verdünnt in 1%iger Casein/PBS-Lösung zugegeben und die Mikrotiterplatte eine Stunde auf dem Taumelschüttler inkubiert. Die anschließende Behandlung der Mikrotiterplatte sowie die Auswertung erfolgten wie unter Punkt III.2.2.6.1. beschrieben.

## **2.3. Zellkultur**

### **2.3.1. Kultivierung eukaryotischer Zelllinien**

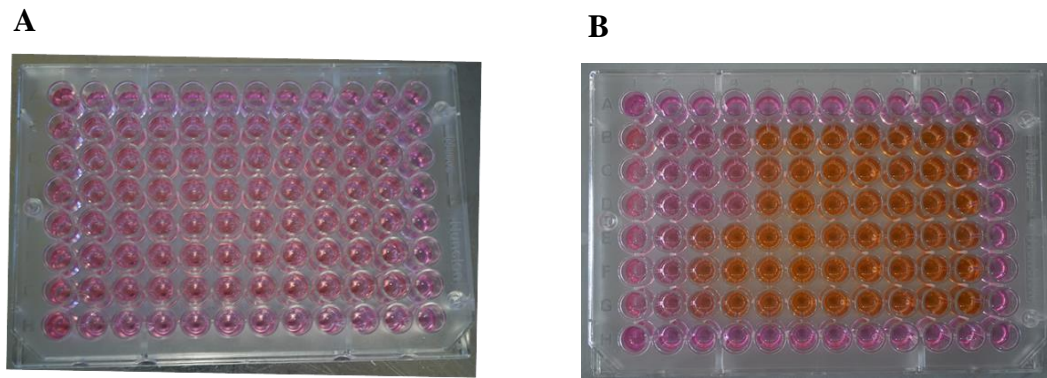
Mit den Zelllinien Vero, CaCo-2, MDBK, RAW 264.7, A-204, A-549, Hep G2, Jurkat, U-937, HEp-2, IPEC-J2 und HT-29 wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Hierfür wurden die Zelllinien in den jeweiligen Zellkulturmedien mit Supplementen (siehe Tabelle 3) in 80 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Bei den adhärennten Zelllinien wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach makroskopischem Prüfen der Ablösung des Zellrasens wurden die trypsinierten Zellen in 10 ml des entsprechenden Mediums suspendiert und für 5 min bei 51 g (Vero: 73 g) und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und im benötigten Verhältnis (1:4 - 1:10) in eine neue Zellkulturflasche mit 40 ml Medium (CaCo-2: 30 ml) gegeben. Bei der semi-adhärennten Zelllinie RAW 264.7 wurde das Medium abgenommen, die restlichen



Zellen wurden mit 10 ml Medium abgespült und 1:10 in eine neue 80 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche mit 40 ml Medium überführt. Die Suspensionszelllinien Jurkat und U-937 wurden i. d. R. 1:3 in neue Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>) passagiert.

### 2.3.2. WST-1-Bioassay

Zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität der rHbl-Komponenten wurden diese in WST-1-Bioassays eingesetzt. Meist wurden hierfür Vero-Zellen verwendet, da diese nachweislich empfindlich gegenüber *B. cereus* Kulturüberständen sind (Jessberger et al., 2014). Die toxische Aktivität wurde aber auch auf elf weiteren Zelllinien getestet. Zunächst wurde in den Spalten 1 - 10 einer Mikrotiterplatte (96 well) eine 1:2 Verdünnungsreihe der rHbl-Komponenten angelegt (100 µl/well). Dazu wurden die einzelnen rHbl-Komponenten auf eine konstante Stoffmengenkonzentration (1,5 bzw. 0,75 pmol/µl) eingestellt, im Verhältnis 1:1:1 gemischt und in einer Anfangsverdünnung von 1:20 in Zellkulturmedium in die Spalte 1 der Mikrotiterplatte gegeben. Die Spalten 11 und 12 dienten als toxischfreie Kontrollansätze, die Reihen A und H wurden zur Vermeidung von Randeffekten nicht belegt. Anschließend wurde die Zellsuspension hinzugegeben (100 µl/well). Hierfür wurden für Verozellen  $1,5 \times 10^4$ /well, für alle anderen Zelllinien  $2 \times 10^4$  Zellen/well verwendet. Nach 22-stündiger Inkubation bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub>-Begasung wurde zunächst die Zellschädigung mikroskopisch beurteilt und anschließend von den adhären Zellen 100 µl abgenommen. Die Suspensionszellen wurden, um Zellverluste zu vermeiden, in den insgesamt 200 µl belassen. Darauf wurden 10 µl/well WST-1 Reagenz hinzugegeben und die Platten erneut bis zur Entwicklung einer ausreichenden Farbintensität im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert (je nach Zelllinie i. d. R. 1 - 2,5 h). Viable Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System bewirken hierbei die enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliums Salzes WST-1 in den Farbstoff Formazan (Abbildung 6), dessen Intensität in dem Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite<sup>®</sup> F50 (Tecan) bei 450 nm gemessen wurde. Die reziproken Zytotoxizitätstiter wurden nach der Messung über diejenigen Verdünnungsstufen bestimmt, bei denen die Zellviabilität um 50 % im Vergleich zur Zellkontrolle reduziert war.



**Abbildung 6:** Beispiel eines WST-1-Bioassays. (A) nach 22-stündiger Inkubation. (B) zwei Stunden nach Zugabe des WST-1 Reagenz.

### 2.3.3. Propidiumiodid(PI)-Test

PI-Tests wurden durchgeführt, um die porenformende Wirkung der rHbl-Komponenten auf verschiedenen Zelllinien zu testen. Wie beim WST-1-Bioassay wurden hierfür meist Vero-Zellen verwendet, genauso wurde die porenformende Aktivität aber auch auf den anderen elf Zelllinien untersucht. Bei adhärenen Zelllinien wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in  $200 \mu\text{l/well}$ , bei Suspensionszelllinien  $2 \times 10^4$  Zellen in  $100 \mu\text{l/well}$  in schwarzen Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden (96 well) ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 7 %  $\text{CO}_2$ -Begasung wurden zunächst die Zellen mikroskopisch auf ihre Viabilität und ihr Wachstum überprüft. Zeigten sich in den einzelnen wells ausreichend Zellen, wurden bei den adhärenen Zellen  $100 \mu\text{l}$  Medium entnommen. Die einzelnen rHbl-Komponenten wurden wiederum auf eine konstante Stoffmengenkonzentration (1,5 bzw.  $0,75 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ) eingestellt und in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt. Die Toxin-Mischungen wurden 1:20 in Zellkulturmedium mit  $10 \mu\text{g/ml}$  Propidiumiodid vorverdünnt und auf die Zellen gegeben. Aufgrund der Porenbildung kann dieses durch die perforierte Zellmembran in die Zelle eindringen und in die DNA interkalieren. Dadurch entstehen fluoreszierende Komplexe, die im Fluorometer gemessen werden können. Gemessen wurde im Fluorometer Victor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter (PerkinElmer) ca. alle 5 min 99 Mal in einer Zeit von über acht Stunden bei einer Absorption von 530 nm, einer Emission von 616 nm und einer Anregungszeit von 1 s. Der PI-Test zeigt im Vergleich zum WST-1-Bioassay die Geschwindigkeit der Porenbildung an und es können mehrere Kombinationen in einem Ansatz verglichen werden. Der WST-1-Bioassay bestimmt hingegen die

Endpunkt-Toxizität.

#### **2.3.4. PI-Test in einem *Chamber Slide* System**

Um den PI-Einstrom am Fluoreszenzmikroskop beobachten zu können, wurden Vero-Zellen in einem *Chamber Slide* System mit acht wells ausgesät.  $6 \times 10^4$  Zellen wurden in 300  $\mu\text{l}$  Medium/well ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Proben (*B. cereus* Überstände und rHbl) in 200  $\mu\text{l}$  EC-Puffer 1:40 verdünnt mit 5  $\mu\text{g/ml}$  PI zugegeben. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Biozero und dem Filter TexasRed (Keyence) kann der PI-Einstrom in die Zellen sichtbar gemacht werden. Zusätzlich ist es möglich, die Zellmorphologie zu beurteilen. Bilder wurden nach 5, 15 und 30 min sowie nach einer, zwei, drei und fünf Stunden gemacht, in der Zwischenzeit wurden die Zellen bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert.

#### **2.3.5. Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell scanning*, FACS)**

Die Quantifizierung der Bindung von rHbl B an Vero-Zellen erfolgte mit Hilfe der fluoreszenz-basierenden Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell scanning*, FACS). Die Toxinbindung an die Zellen wurde indirekt durch den fluoreszenz-markierten mAk 1G8-Alexa 488 detektiert.

Hierzu wurden die auf eine konstante Stoffmengenkonzentration (1,5 pmol/ $\mu\text{l}$ ) eingestellten rHbl-Proteine 1:80 in 500  $\mu\text{l}$  EC-Puffer verdünnt. Je  $1 \times 10^6$  Vero-Zellen wurden in 500  $\mu\text{l}$  EC-Puffer aufgenommen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit den Proteinproben versetzt (End-Verdünnung 1:160). Die Proben wurden im Überkopfmischer (neoLab Migge) bei 2 rpm und 37 °C über verschiedene Zeitspannen (30, 15 und 5 min) inkubiert. Nach zwei Waschschritten (2 ml 1%iges steriles BSA/PBS, Zentrifugation für 5 min bei RT und 134 g) wurden 3  $\mu\text{g/ml}$  des fluoreszenz-markierten Antikörpers 1G8-Alexa 488 in 1 ml 1%igem sterilen BSA/PBS pro Ansatz auf die Proben gegeben und bei 4 °C eine Stunde im Überkopfmischer inkubiert. In zwei anschließenden Waschschritten wurden ungebundene Antikörper entfernt und die Proben in 500  $\mu\text{l}$  1%igem sterilen BSA/PBS aufgenommen. Je Ansatz wurden  $1 \times 10^4$  Zellen im Durchflusszytometer

analysiert. Als Negativkontrollen wurden Zellen ohne rHbl, ohne und mit fluoreszenz-markiertem Antikörper, mitgeführt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit FCS Express (De Novo Software) und Flowing Software (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology). Außerdem wurde die Bindungskapazität des Antikörpers 1G8-Alexa 488 an rHbl B mit verschiedenen Strep-tags getestet. Im indirekten EIA mit rHbl 3+B, 5+B und 7+B stellte sich eine unterschiedliche Bindungskapazität des Antikörpers an rHbl B mit verschiedenen Strep-tags heraus. Dieser wurde viermal wiederholt, anhand der Mittelwerte der reziproken Titer wurden die durchflusszytometrischen Auswertungen korrigiert.

#### **2.4. Hämolyseassay**

Für den Hämolyseassay wurden zweimal 1 ml defibriniertes Schafsblut für 5 min bei 594 g und RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 800 µl Salzpuffer hinzugegeben. Nach vorsichtigem Invertieren wurde das Blut dreimal gewaschen, indem jeweils 800 µl Salzpuffer zugegeben wurden, zentrifugiert und der Überstand abgenommen wurde, bis dieser klar war. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl Salzpuffer resuspendiert und damit eine 2%ige Lösung hergestellt. Hierzu wurden 500 µl in 25 ml Salzpuffer für die Proben und 100 µl in 5 ml A. dest. für die Positivkontrolle gegeben. Als Negativkontrolle dienten 800 µl Erythrozyten-Salzpuffer-Lösung. Die rHbl-Komponenten wurden auf eine konstante Stoffmengenkonzentration (1,5 bzw. 0,75 pmol/µl) eingestellt und in einem Verhältnis von 1:1:1 gemischt. 15 µl *B. cereus* Kulturüberstände bzw. der verschiedenen rHbl-Kombinationen wurden zu je 785 µl Erythrozyten-Salzpuffer-Lösung gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Proben 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Je 200 µl der Überstände wurden als Triplikate in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Menge des freigesetzten Hämoglobins wurde spektrophotometrisch im Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite® F50 (Tecan) bei 560 nm ohne Referenzfilter gemessen.

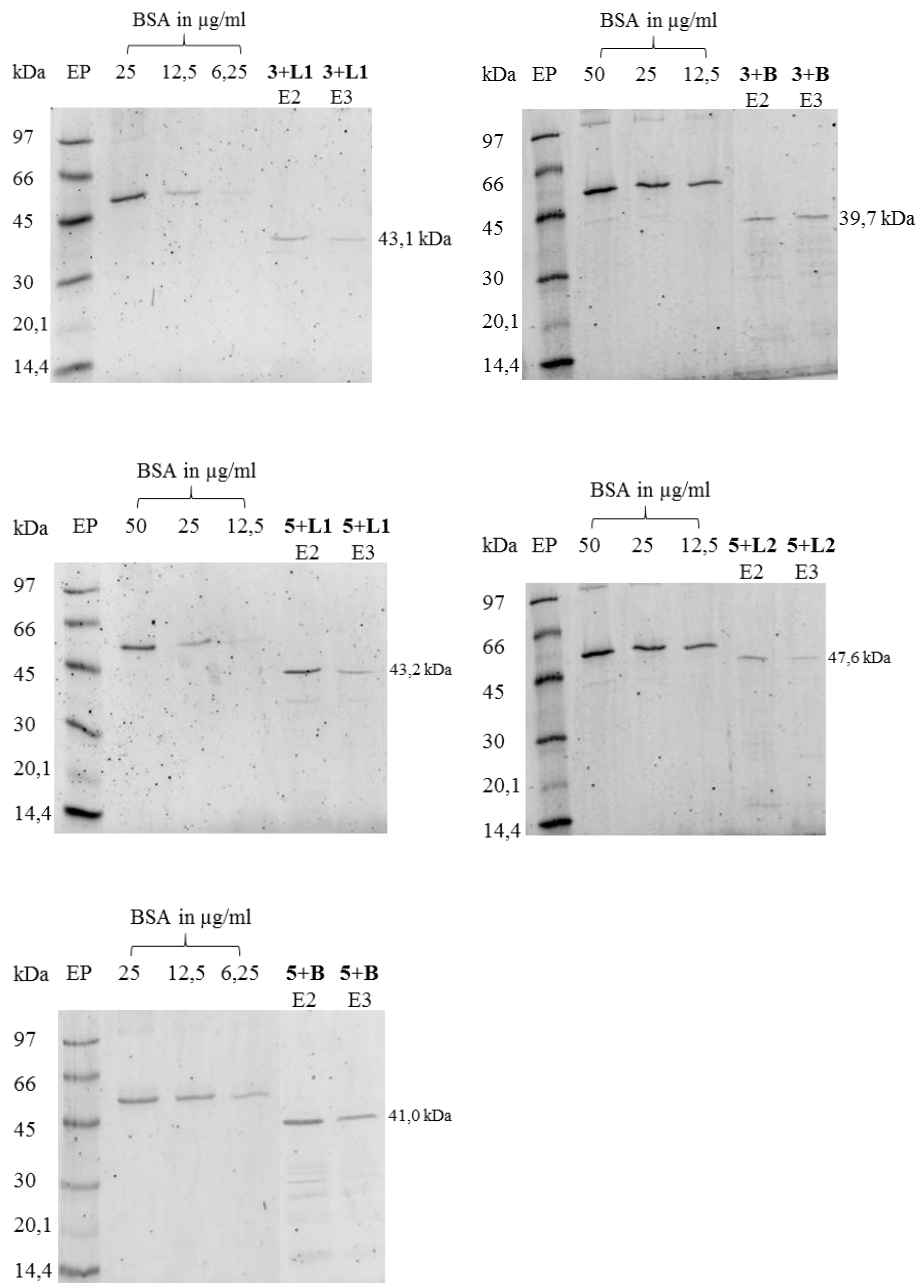


## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Funktionalität rekombinant exprimierter Hbl (rHbl)-Komponenten**

#### **1.1. Reinigung der rHbl-Komponenten**

In vorangegangenen Arbeiten (Tausch et al., 2017) wurden rHbl B und L2 mit N-terminalem Strep-tag (5+) und rHbl L1 mit C-terminalem Strep-tag (3+) verwendet (siehe auch Übersicht Tabelle 9) und für funktionell aktiv befunden. Im Folgenden wurden die Auswirkungen der Lage des Strep-tags auf die Funktionalität der rHbl-Komponenten untersucht. Dazu wurden rHbl 3+L1, 3+B, 5+L1, 5+L2 und 5+B (siehe auch Übersicht Tabelle 9) über das Strep-Tactin<sup>®</sup>-System (IBA Lifesciences) gereinigt. Dabei wurden zwei Elutionsfraktionen aufgefangen. Größe, Reinheit und Konzentration der Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese und SYPRO Ruby-Protein-Färbung ermittelt (Abbildung 7). Von den rHbl-Komponenten mit C-terminalem Strep-tag weist rHbl 3+L1 eine Größe von 43,1 kDa auf, rHbl 3+B 39,7 kDa. Bei den rHbl-Komponenten mit N-terminalem Strep-tag hat rHbl 5+L1 eine Größe von 43,2 kDa, rHbl 5+L2 47,6 kDa und rHbl 5+B 41,0 kDa. Alle fünf Proteine konnten in ausreichend hohen Konzentrationen gereinigt werden, für die nachfolgenden Toxizitätsstudien wurden mindestens 60 µg/ml benötigt.



**Abbildung 7:** SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Quantifizierung der Konzentrationen von rHbl 3+L1, 3+B, 5+L1, 5+L2 und 5+B. E = Elutionsfraktion. Eine BSA-Standardkurve wurde zur Konzentrationsbestimmung mitgeführt.

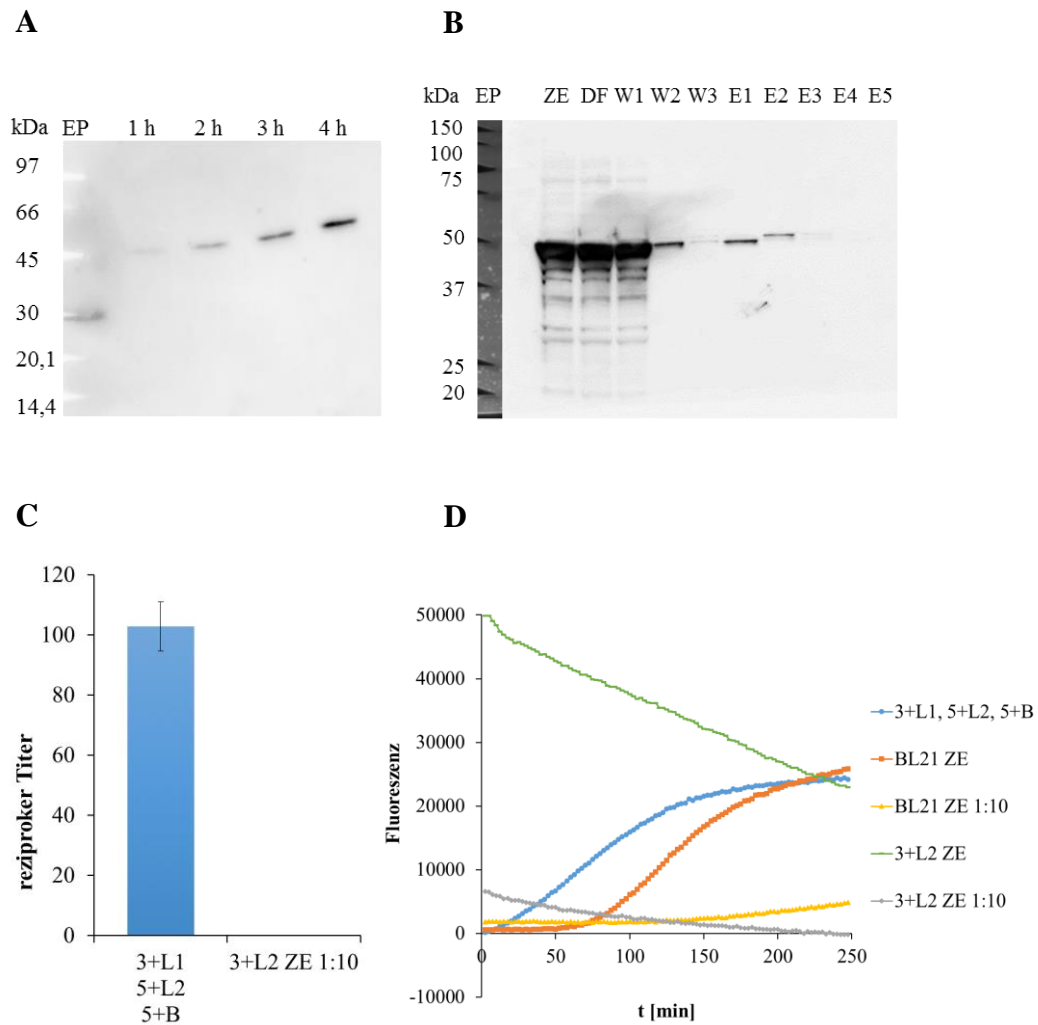
Einzig rHbl 3+L2 konnte über das obige Verfahren nicht gereinigt werden. Zur Kontrolle der Überexpression wurden eine, zwei, drei und vier Stunden nach Induktion Proben entnommen. Diese wurden im Western Blot untersucht. Zur Markierung der toxinspezifischen Banden wurde der mAk 1A12 verwendet.

Abbildung 8A zeigt deutlich, dass rHbl 3+L2 von *E. coli* BL21 überexprimiert wird. Ein weiterer Western Blot, der die einzelnen Schritte der Proteinreinigung dokumentiert, stellt dar, dass im *E. coli* ZE, Durchfluss (DF) und Waschschrift 1 (W1) große Mengen Protein vorhanden waren, während in den Elutionsfraktionen nur noch Spuren nachweisbar waren (Abbildung 8B). rHbl 3+L2 lässt sich offensichtlich aufgrund einer fehlerhaften Bindung des Strep-tags nicht über die Chromatographie-Säule reinigen.

Um zu prüfen, ob der *E. coli* rHbl 3+L2 ZE (Abbildung 8B) für Zellkulturtests verwendet werden kann, wurden WST-1-Bioassays und PI-Tests mit Vero-Zellen durchgeführt. Für den WST-1-Bioassay wurde der ZE 1:10 in Strep-Tactin-Waschpuffer verdünnt eingesetzt. Im Gegensatz zu einer Kontrolle, bestehend aus rHbl 3+L1, 5+L2 und 5+B (Tausch et al., 2017), zeigte der verdünnte rHbl 3+L2 ZE nach 24 Stunden keinerlei toxische Aktivität (Abbildung 8C).

Auch im PI-Test wurde der *E. coli* ZE mehrfach untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Lauf (Abbildung 8D). Der unverdünnte ZE zeigte Fluoreszenz (grün), was durch eine 1:10 Verdünnung inhibiert wurde (grau). Ähnlich verhielt sich ein als Kontrolle eingesetzter reiner *E. coli* BL21 ZE (orange und gelb). Als Positivkontrolle zur Porenbildung dienten wiederum rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) (blau). Da der rHbl 3+L2 ZE in einer 1:10 Verdünnung im WST-1-Bioassay keinerlei und im PI vernachlässigbare Aktivität zeigte, konnte er für die nachfolgenden Kombinationsversuche der einzelnen rHbl-Komponenten mit unterschiedlicher Strep-tag Position eingesetzt werden.



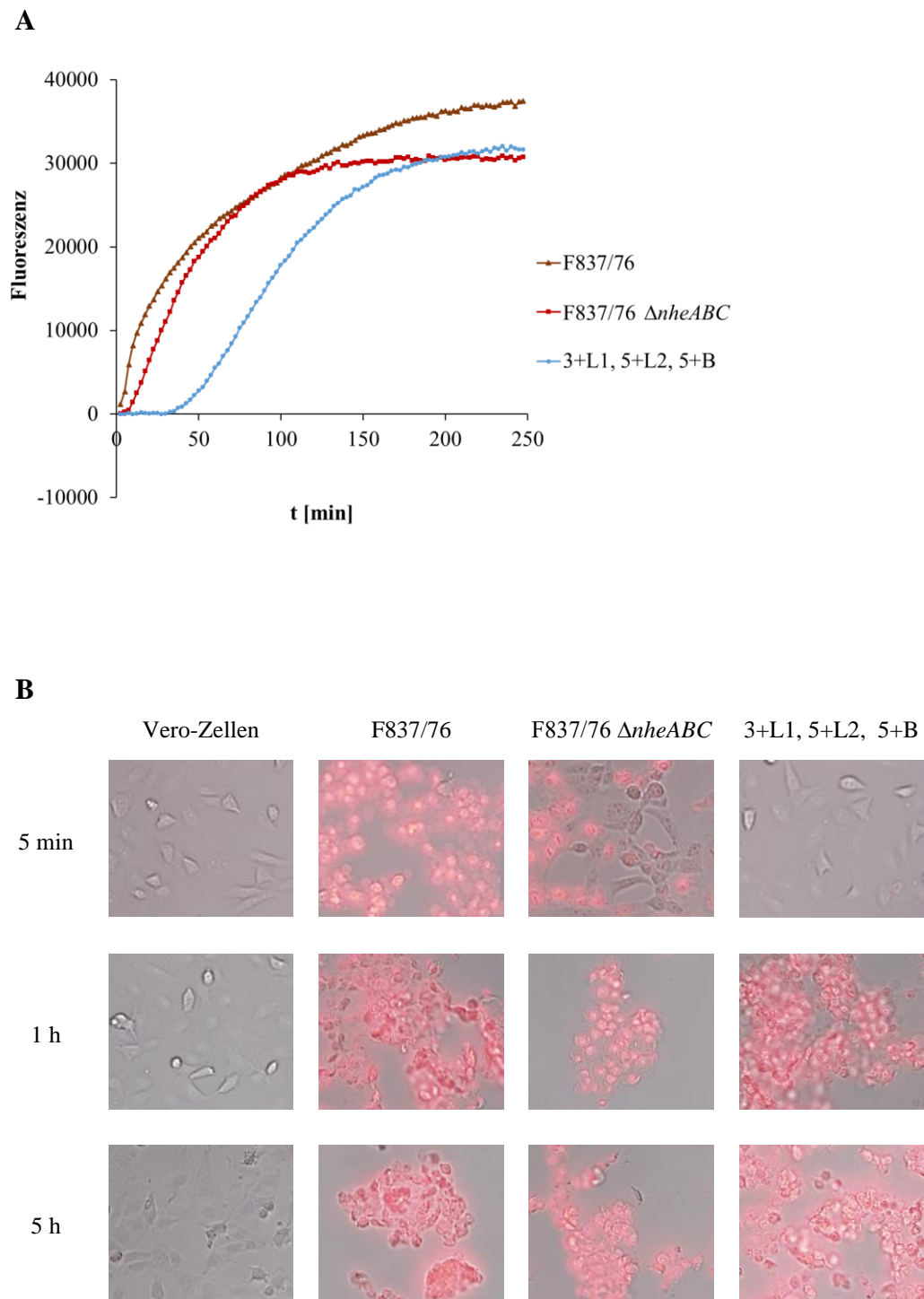


**Abbildung 8:** (A) Western Blot mit dem *E. coli* ZE (rHbl 3+L2) aus der Protein-Überexpression eine, zwei, drei und vier Stunden nach Induktion. Zur Detektion wurde der Hbl L2 spezifische mAk 1A12 verwendet. (B) Western Blot von rHbl 3+L2 mit den einzelnen Proteinreinigungsschritten: ZE, DF, W1 - 3, E1 - 5. DF = Durchfluss, W = Waschfraktion, E = Elutionsfraktion. Zur Detektion wurde der L2 spezifische mAk 1A12 verwendet. (C) WST-1-Bioassay auf Vero-Zellen mit dem ZE von rHbl 3+L2 1:10 verdünnt und der Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle. Der reziproke Titer wurde über diejenigen Verdünnungsstufen bestimmt, bei denen die Zellviabilität um 50 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert war. (D) PI-Test auf Vero-Zellen mit rHbl 3+L2 ZE, reinem *E. coli* BL21 ZE und der rHbl-Kombination 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017).

## 1.2. Zytotoxische und hämolytische Aktivität

Die zytotoxische und hämolytische Aktivität der rHbl-Komponenten wurde in PI-Tests, WST-1-Bioassays und Hämolyseassays untersucht. Der PI-Test dient dazu, die unterschiedliche Geschwindigkeit der Porenbildung zu messen. Zur Kontrolle der Aktivität der gereinigten rHbl-Komponenten wurden diese zunächst mit *B. cereus* Kulturüberständen verglichen (Abbildung 9). Die Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) zeigte deutlichen PI-Einstrom und damit Porenbildung in der Zielzellmembran, wenn auch zeitlich verzögert im Vergleich zu F837/76 (Nhe+/Hbl+) sowie F837/76  $\Delta$ nheABC (Hbl+) (Abbildung 9A).

Ersichtlich ist dieser Unterschied auch im Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden Vero-Zellen in einem 8-well Chamber Slide System verschiedenen *B. cereus* Kulturüberständen sowie rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) ausgesetzt. Vero-Zellen in EC-Puffer mit PI wurden als Kontrolle mitgeführt, diese zeigten zu allen Zeiten ein physiologisches Erscheinungsbild. Durch den Überstand von F837/76 zeigten die Zellen bereits nach 5 min PI-Fluoreszenz (rot), waren teilweise morphologisch verändert und aggregiert (Abbildung 9B). Bei den Vero-Zellen, die mit F837/76  $\Delta$ nheABC behandelt wurden, waren nach 5 min noch ca. 50 % unveränderte Zellen zu sehen, bei denen, die mit rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) versetzt wurden, noch nahezu 100 %. Nach einer Stunde stellten sich bei F837/76  $\Delta$ nheABC alle Zellen morphologisch verändert und fluoreszierend dar. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die meisten Zellen, die mit rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) versetzt wurden, PI-Einstrom, jedoch äußerten einige wenige noch eine physiologische Zellmorphologie. Nach fünf Stunden waren alle behandelten Zellen morphologisch verändert und aggregiert. Zusammengefasst zeigte der Überstand von F837/76 mit einem nahezu vollständigen PI-Einstrom nach 5 min die höchste porenformende Aktivität. F837/76  $\Delta$ nheABC zeigte volle PI-Fluoreszenz nach 45 min bis einer Stunde, während die rHbl-Komponenten deutlich langsamer agierten, allerdings nach fünf Stunden ebenso alle Zellen perforiert hatten.



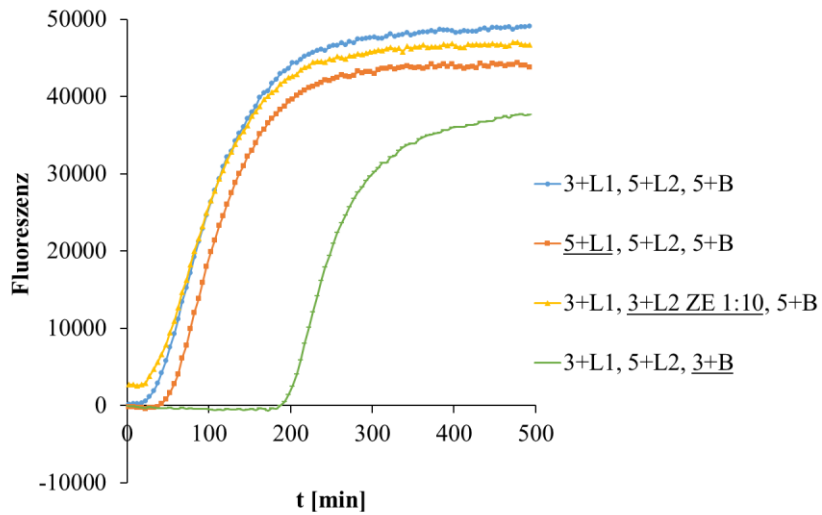
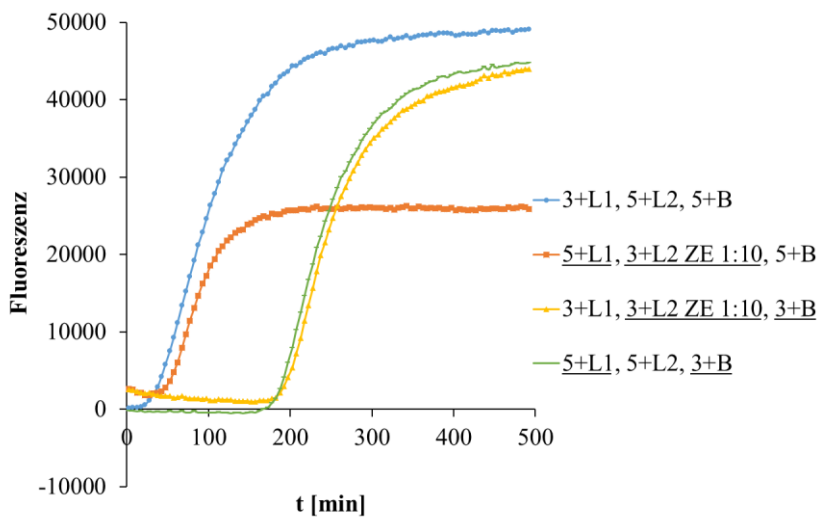
**Abbildung 9:** PI-Test auf Vero-Zellen. **(A)** Kulturüberstand von *B. cereus* F837/76 (braun) und F837/76  $\Delta nheABC$  (rot), sowie rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). **(B)** PI-Test in einem *Chamber Slide* System, detektiert mittels Fluoreszenzmikroskop.

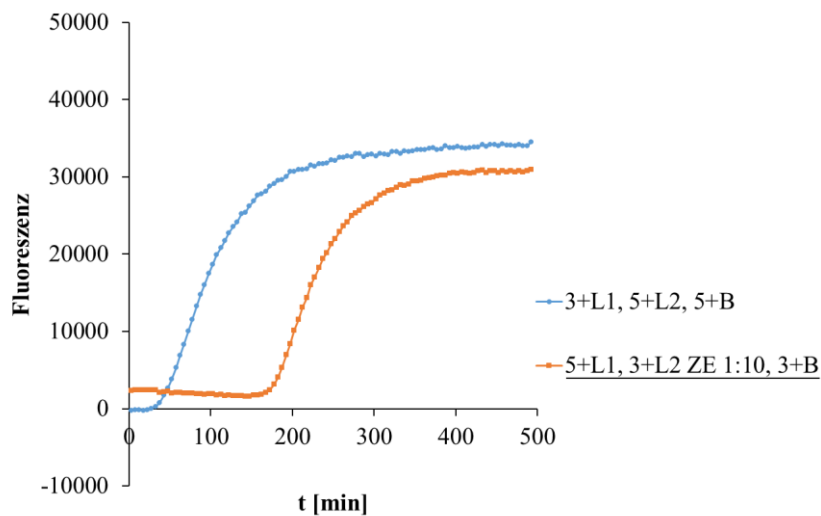
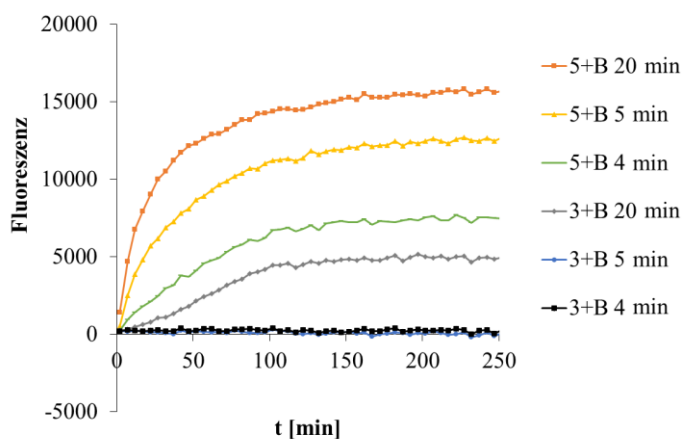
Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen rHbl-Komponenten mit entweder N- oder C-terminal gelagerten Strep-tags in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 miteinander kombiniert. Der PI-Test wurde mehrfach wiederholt, abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Lauf. Zur Kontrolle wurde die Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) mitgeführt (blau, Abbildung 10), diese zeigte einen relativ schnellen PI-Einstrom. Bei der Kombination rHbl 5+L1, 5+L2, 5+B haben alle Komponenten ihren Strep-tag N-terminal, bei dieser war die Fluoreszenzzunahme im Vergleich zur Kontrolle nur leicht verzögert (orange). Einen ähnlichen Verlauf zeigten die rHbl-Komponenten, wenn der Strep-tag an rHbl L2 von N- nach C-terminal getauscht wird (gelb). Ein deutlich späterer PI-Einstrom fällt bei der Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 3+B, bei der der Strep-tag an rHbl B von N- nach C-terminal getauscht wurde, auf (grün, Abbildung 10A).

Abbildung 10B zeigt jeweils zwei Komponenten mit ausgetauschtem Strep-tag im Vergleich zur Ausgangskombination. Die Kombination rHbl 5+L1, 3+L2 ZE 1:10, 5+B (orange), bei der der Strep-tag an L1 (C -> N) und L2 (N -> C) geändert wurde, wies im Vergleich zur Ausgangskombination nur sehr gering verzögerten PI-Einstrom auf, erreichte aber nicht so hohe Fluoreszenzwerte. rHbl 3+L1, 3+L2 ZE 1:10, 3+B, alle mit einem C-terminalen Strep-tag versehen, hingegen stieg erst nach ca. 200 min erkennbar an (gelb). Die Kombination rHbl 5+L1, 5+L2, 3+B (grün), bei der rHbl B einen C-terminalen Strep-tag trägt, zeichnete eine ähnliche Kurve. Diese Kombinationen bestätigen noch einmal Abbildung 10A und lassen vermuten, dass Hbl B durch eine Veränderung am C-Terminus an einer schnellen Interaktion mit der Zielzelle oder den beiden anderen Komponenten gehindert wird, so dass es erst deutlich später zur Porenbildung kommt. Wenn die Strep-tags an allen drei Komponenten getauscht wurden (rHbl 5+L1, 3+L2 ZE 1:10, 3+B, Abbildung 10C), zeigte sich ein ähnlich verzögerter PI-Einstrom.

Einen weiteren, deutlichen Hinweis auf eine verlangsamte Funktionsweise von rHbl B mit C-terminalem Strep-tag lieferte die konsekutive Zugabe der rHbl-Komponenten im PI-Test. Hierbei wurden zunächst entweder rHbl 3+B oder 5+B für je 4, 5 oder 20 min mit den Vero-Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Zellkulturmedium wurden rHbl 3+L1 und 5+L2 mit PI zugegeben und die Fluoreszenzzunahme wie gewohnt detektiert. Während für rHbl 5+B 4 - 5 min ausreichend für eine effektive Bindung an die Zielzellen waren, konnte für rHbl

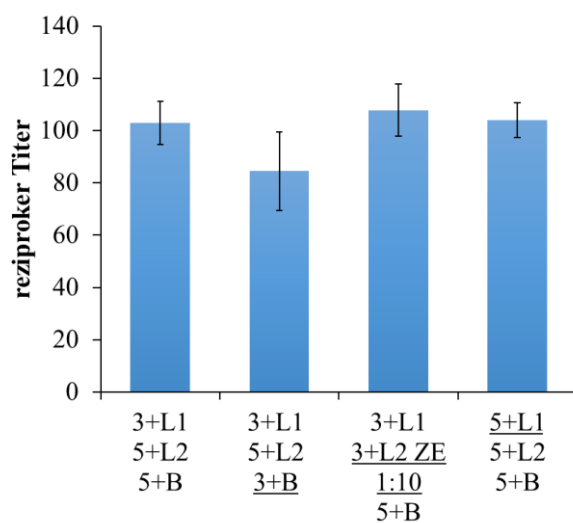
3+B keine Aktivität mehr nachgewiesen werden, wenn die Inkubationszeit weniger als 20 min betrug (Abbildung 10D).

**A****B**

**C****D**

**Abbildung 10:** PI-Test auf Vero-Zellen. Verwendet wurden rHbl-Komponenten mit jeweils C- oder N-terminalen Strep-tags. **(A)** Austausch jeweils eines Strep-tags gegenüber der Ausgangs-Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). **(B)** Austausch jeweils zweier Strep-tags gegenüber der Ausgangs-Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). **(C)** Austausch aller Strep-tags gegenüber der Ausgangs-Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). Die Gesamtfluoreszenz ist hier niedriger, da sie in einem unabhängigen Experiment ermittelt wurde. **(D)** Konsekutive Zugabe von rHbl 3+B oder 5+B, 3+L1 und 5+L2.

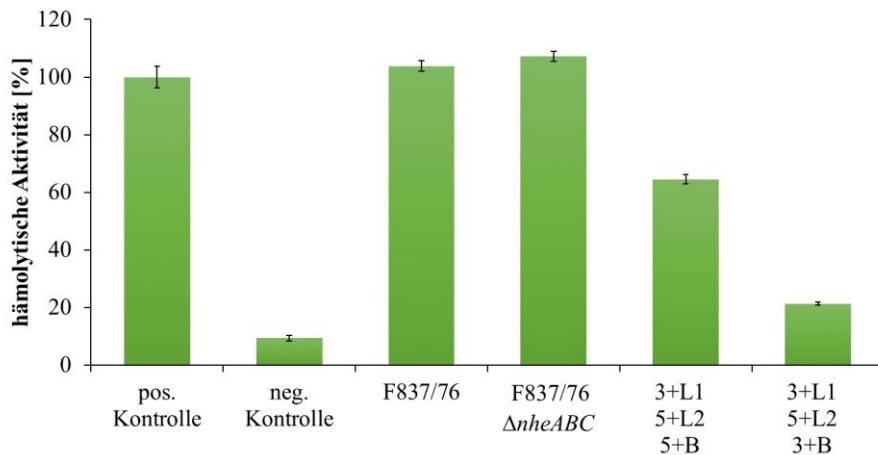
Zum Test der Auswirkung der Lage des Strep-tags auf die zytotoxische Aktivität wurden die rHbl-Komponenten in WST-1-Bioassays eingesetzt. rHbl L1, L2 und B wurden, jeweils mit einem N- oder C-terminalen Strep-tag versehen, auf 1,5 pmol/ $\mu$ l eingestellt und in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 eingesetzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurde im Gegensatz zu den PI-Läufen keine signifikante Reduktion der zytotoxischen Aktivität bei der Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 3+B beobachtet (Abbildung 11). Sie wies einen reziproken Titer von 84,5 auf im Gegensatz zu 103 (rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017)), 108 (rHbl 3+L1, 3+L2 ZE 1:10, 5+B) und 104 (rHbl 5+L1, 5+L2, 5+B). Dies beweist wiederum, dass Hbl B trotz Hinderung durch den C-terminalen Strep-tag in der Lage ist, an die Zelle zu binden und mit den anderen beiden Komponenten zu interagieren, sodass Poren gebildet werden können und nach 24 Stunden keinerlei Unterschied in der Zytotoxizität mehr feststellbar ist.



**Abbildung 11:** WST-1-Bioassay mit verschiedenen rHbl-Kombinationen auf Vero-Zellen.

Im Hämolyseassay zeigte sich ein ähnliches Bild wie im PI-Test. Als Positivkontrolle dienten Erythrozyten in A. dest., Negativkontrolle waren Erythrozyten in Salzpuffer-Lösung. Wie zuvor wurden die rHbl-Komponenten auf 1,5 pmol/ $\mu$ l eingestellt und in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 gemischt. Zur besseren schematischen Darstellung wurde die Positivkontrolle auf 100 % gesetzt

und die anderen Werte entsprechend berechnet. Zwei biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten wurden vermessen. Die Überstände von F837/76 und F837/76  $\Delta$ *hneABC* zeigten nach 30 min Inkubation 100 % hämolytische Aktivität, die rHbl-Kombination 3+L1, 5+L2, 5+B ca. 60 % (Abbildung 12). Auch hier wird die Verzögerung der Porenbildung durch den C-terminalen Strep-tag an rHbl B sichtbar (Kombination 3+L1, 5+L2, 3+B).



**Abbildung 12:** Hämolyseassay mit Schafsblut. Positivkontrolle: Erythrozyten in A. dest., auf 100 % gesetzt, Negativkontrolle: Erythrozyten-Salzpuffer-Lösung. *B. cereus* F837/76 und F837/76  $\Delta$ *hneABC* Kulturüberstände und die rHbl-Kombinationen 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und 3+L1, 5+L2, 3+B wurden getestet.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aktivität von rHbl L1 oder L2 nicht durch die Lage des Strep-tags beeinflusst wird. Allerdings scheint sich eine Besetzung des C-Terminus von rHbl B verlangsamernd auf dessen Funktionsweise auszuwirken. Ein PI-Test lieferte erste Hinweise darauf, dass die Bindung von rHbl B an die Zielzelloberfläche gestört wird (vgl. Abbildung 10D).

### 1.3. Bindung an die Zielzelloberfläche

Mittels Durchflusszytometrie wurde untersucht, ob der C-terminale Strep-tag die Bindung von rHbl B an die Zielzelloberfläche stört und es so zu einer Verzögerung der Porenbildung kommt. Als Negativkontrollen dienten Vero-Zellen und Vero-



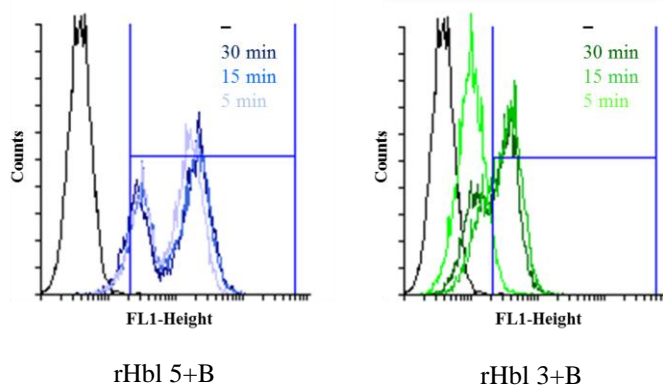
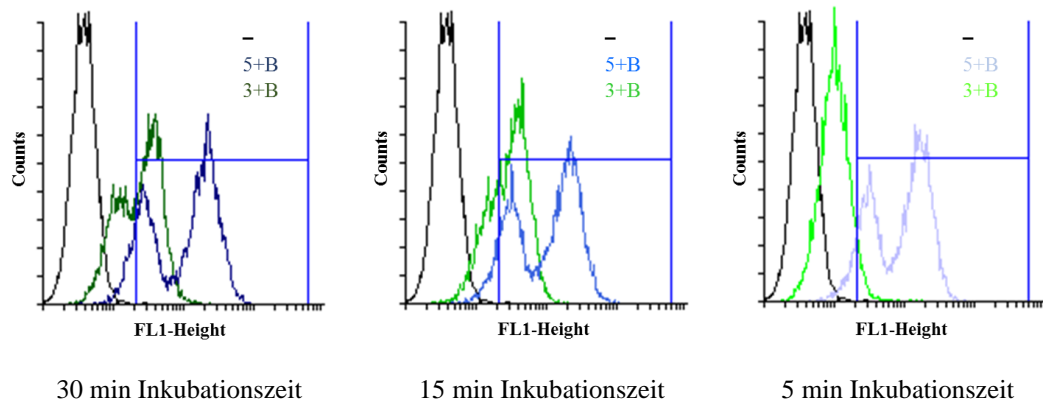
Zellen mit dem Hbl spezifischen mAk 1G8, der an Alexa Fluor® 488 gekoppelt war. Getestet wurden rHbl 5+B und 3+B mit Inkubationszeiten von 30, 15 und 5 min. Durch die unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde die Geschwindigkeit der Bindung an die Zielzellen untersucht. Je  $1 \times 10^4$  Zellen wurden im Durchflusszytometer vermessen. Anhand ihrer im sogenannten *Forward-* und *Side-Scatter* bestimmten morphologischen Merkmale wurde eine homogene Population an Zellen eingegrenzt und deren Fluoreszenzintensität bei 488 nm (FL1-Height) bestimmt. In Tabelle 11 ist die Anzahl der fluoreszierenden Zellen je Probe in Prozent dargestellt. Abbildung 13 zeigt in Overlay-Histogrammen einen repräsentativen Lauf. Während bei rHbl 5+B zu allen Zeiten nahezu alle Zellen Fluoreszenz-positiv waren, war dies bei rHbl 3+B vor allem nach nur 5 min Inkubationszeit kaum der Fall (Abbildung 13A). Dies ist noch deutlicher zu erkennen, wenn die Proben nach Inkubationszeiten eingeteilt sind (Abbildung 13B). Allerdings ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass der Detektionsantikörper 1G8 nicht mit gleicher Kapazität an rHbl 3+B und 5+B, sondern ca. 2,3-fach besser an rHbl 5+B bindet (siehe Kapitel III.2.3.5.). Daher wurden die prozentualen Werte der FL1-positiven Zellen korrigiert (siehe Tabelle 11). Die Korrektur der unterschiedlichen Bindungskapazität des Antikörpers 1G8-F488 ist in den Overlay-Histogrammen nicht möglich.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Porenbildung durch den Strep-tag am C-Terminus von rHbl B signifikant verzögert wird. Im Durchflusszytometer wurde nachgewiesen, dass diese Verzögerung auf eine langsamere Bindung von rHbl 3+B an die Zielzellen zurückzuführen ist. Die toxische Aktivität nach 24 Stunden Inkubationszeit wird davon nicht beeinflusst.

**Tabelle 11:** Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Vermessen wurden zwei biologische mit jeweils zwei technischen Replikaten. MW zeigen den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen.

	<i>Vero neg.</i>	<i>Vero 1G8-F488</i>	<i>5+B 30 min</i>	<i>5+B 15 min</i>	<i>5+B 5 min</i>	<i>3+B 30 min</i>	<i>3+B 15 min</i>	<i>3+B 5 min</i>
MW [%]	0,22	0,48	93,0	93,4	93,4	100 *	100 *	8,92 *
STABW [%]	0,02	0,15	4,11	2,30	1,38	7,05	5,94	2,36

\* korrigiert nach Test der Bindungskapazität von mAk 1G8 an rHbl 3+B und 5+B.

**A****B**

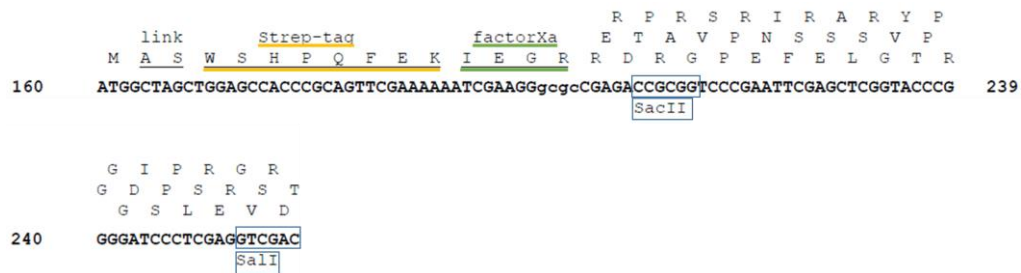
**Abbildung 13:** Overlay-Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von rHbl 5+B und 3+B auf Vero-Zellen. **(A)** rHbl 5+B und 3+B zu den Inkubationszeiten 30, 15 und 5 min (blaue Markierung grenzt FL1-positive Zellen ab). **(B)** rHbl 5+B und 3+B in jeweils einem Overlay-Histogramm zusammengefasst zu den Inkubationszeiten 30, 15 und 5 min.

## **2. Anwendung des pASK-IBA7plus-Systems zur Abspaltung des Strep-tags**

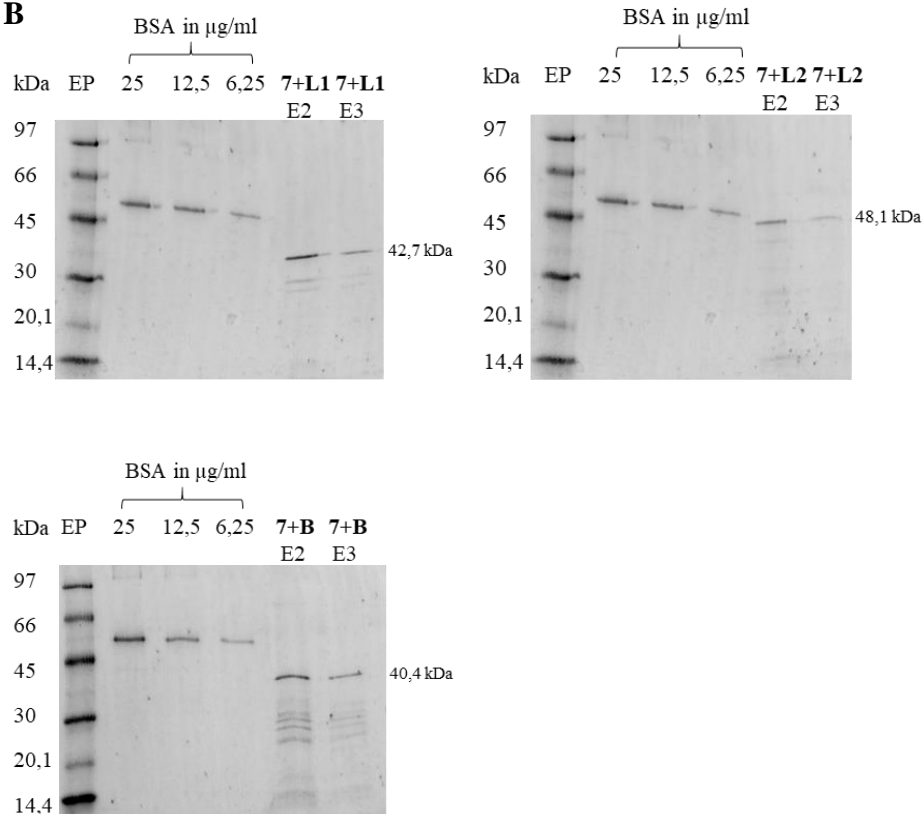
### **2.1. Klonierung und Reinigung der rHbl-Komponenten**

Da für einige Anwendungen die Anwesenheit eines Protein-tags an rekombinanten Proteinen hinderlich sein kann, wurde ein System zur Abspaltung des Strep-tags getestet. Zusätzlich zu den Plasmiden pASK-IBA3plus und pASK-IBA5plus wurde pASK-IBA7plus eingesetzt. Bei dem hierüber produzierten Protein liegt der Strep-tag, wie bei pASK-IBA5plus, N-terminal, zudem lässt sich dieser mit der Protease Faktor Xa abspalten. In Abbildung 14A ist ein Ausschnitt aus pASK-IBA7plus dargestellt. Nach dem Startcodon und einer Linker-Sequenz ist der Strep-tag, bestehend aus acht Aminosäuren, codiert. Direkt danach folgt eine Sequenz, die für die Aminosäuren Isoleucin, Glutamat, Glutamin und Arginin codiert. Dies ist die Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa, die diese nach dem Argininrest spaltet. Zusätzlich sind die beiden Restriktionsenzyme markiert, mit denen die drei *hbl* Gene in den Vektor kloniert wurden. Die korrespondierenden rHbl-Proteine wurden auf gleiche Weise wie zuvor (siehe Kapitel IV.1.1.) über das Strep-Tactin®-System (IBA Lifesciences) gereinigt. rHbl 7+L1 ist 42,7 kDa, rHbl 7+L2 48,1 kDa groß. rHbl 7+B hat eine Größe von 40,4 kDa. Die Banden aller Proteine lagen auf der richtigen Höhe, die Konzentrationen in der Elutionsfraktion 2 waren ausreichend für die Versuche in der Zellkultur (Abbildung 14B).

A



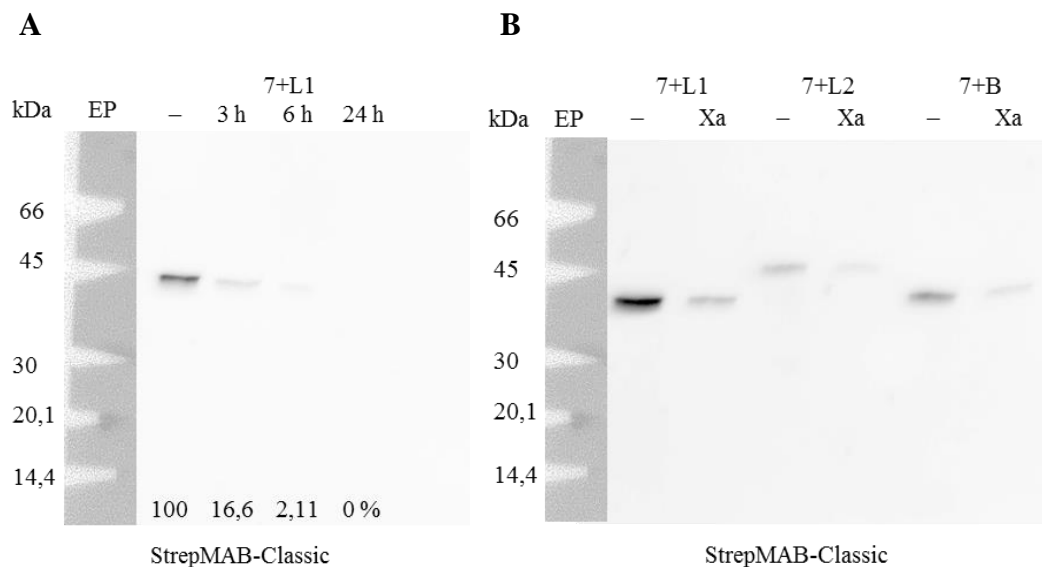
B

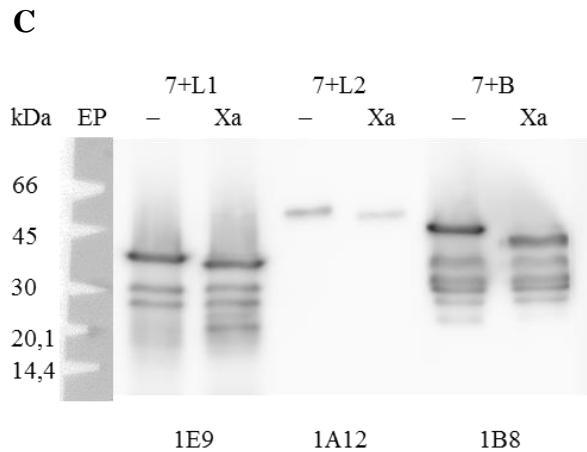


**Abbildung 14:** (A) Ausschnitt aus pASK-IBA7plus mit Startcodon und Codierungssequenzen für Linker, Strep-tag, Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa und die Restriktionsenzyme Sac II und Sal I (IBA Lifesciences, data sheet pASK-IBA7plus). (B) SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Bestimmung der Konzentrationen von rHbl 7+L1, 7+L2 und 7+B. Eine BSA-Standardkurve wurde zur Konzentrationsbestimmung mitgeführt.

## 2.2. Abspaltung des Strep-tags durch die Protease Faktor Xa

Die Besonderheit des Vektors pASK-IBA7plus ist die kurze Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa, mit der der Strep-tag vom gereinigten Protein abgespalten werden kann (Abbildung 14A). Dies geschieht durch mehrstündige Inkubation mit der Protease bei RT. Zunächst wurde am Beispiel von rHbl 7+L1 die optimale Inkubationszeit ermittelt. Die Abspaltung des Strep-tags wurde im Western Blot überprüft (Abbildung 15A). Durch Auswertung der Intensitäten der Banden wurde der prozentuale Restanteil des Proteins mit Strep-tag bestimmt. Die Negativkontrolle wurde dazu gleich 100 % gesetzt, während die Probe nach 24 Stunden, bei der keine Bande mehr zu sehen war, auf 0 % gesetzt wurde. So blieb nach drei Stunden 16,6 % und nach sechs Stunden ein Rest von 2,11 %, bei dem der Strep-tag noch nicht vollständig verdaut war. In Abbildung 15B sind alle drei rHbl-Komponenten nach sechsstündiger Inkubation mit der Protease jeweils mit einem unverdauten Protein als Kontrolle abgebildet. Des Weiteren wurde überprüft, ob die rHbl-Komponenten nach dem Faktor Xa Verdau noch intakt sind (Abbildung 15C). Dazu wurden die spezifischen mAk 1E9 (L1), 1A12 (L2) und 1B8 (B) verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass ein sechsstündiger Verdau mit Faktor Xa bei RT am besten zur maximalen Beseitigung des Strep-tags bei minimaler Schädigung des Restproteins geeignet ist.





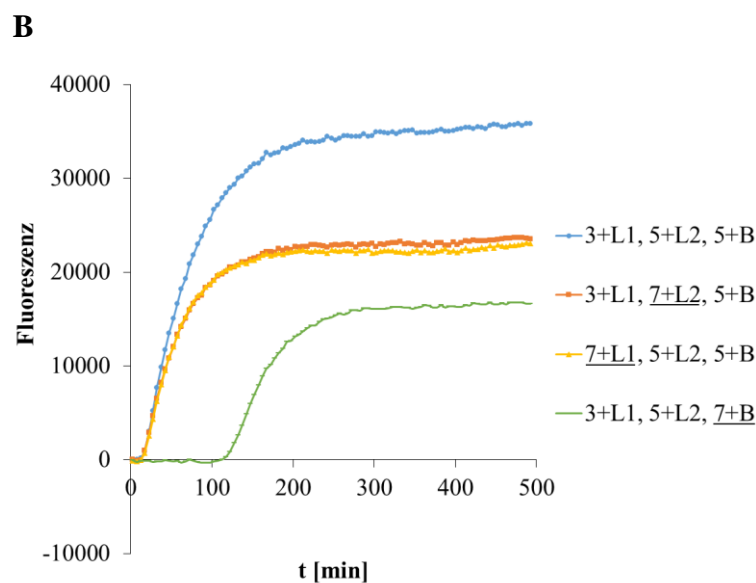
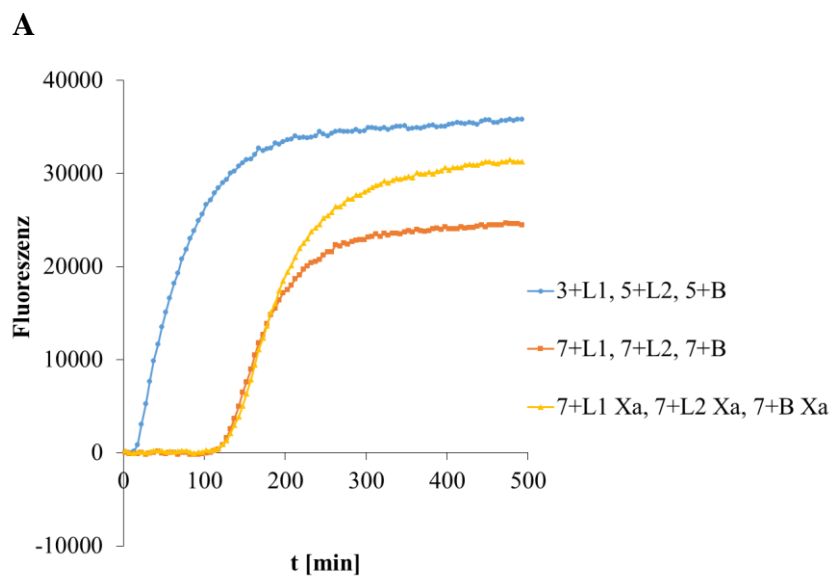
**Abbildung 15:** Western Blot von (A) rHbl 7+L1 detektiert mit mAk StrepMAB-Classic. Das Protein wurde zuvor für 3, 6 und 24 Stunden bei RT mit der Protease inkubiert (– = unverdautes Protein). (B) rHbl 7+L1, 7+L2 und 7+B nach sechs Stunden Verdau und unverdaut, detektiert mit mAk StrepMAB-Classic. (C) rHbl 7+L1, 7+L2 und 7+B detektiert mit den jeweils spezifischen mAk 1E9 (L1), 1A12 (L2), 1B8 (B).

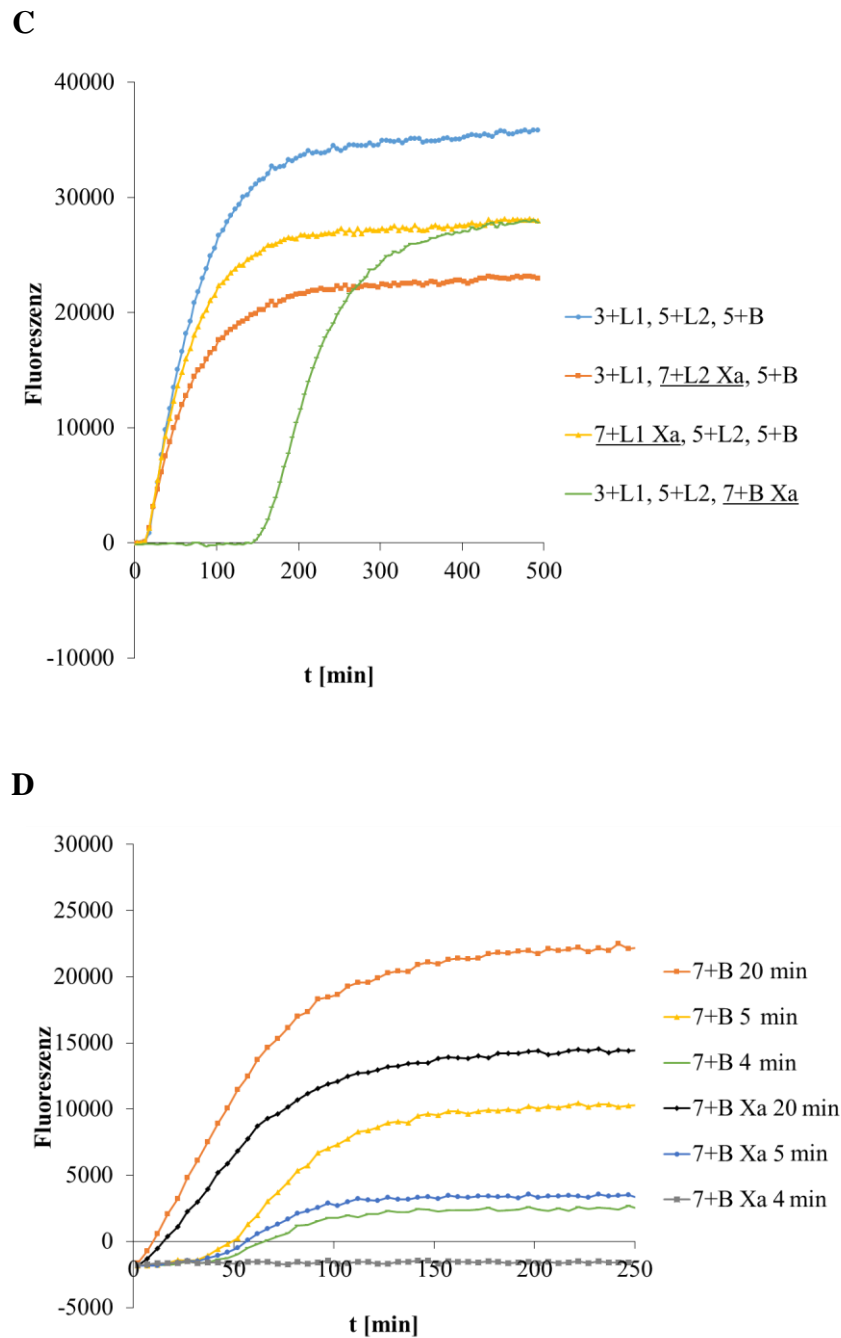
### 2.3. Zytotoxische und hämolytische Aktivität der rHbl 7+ Komponenten

Wie zuvor wurde auch die Funktionalität der über das pASK-IBA7plus System gereinigten Proteine in Zellkulturtests untersucht. Im PI-Test zeigte die Kombination rHbl 7+L1, 7+L2, 7+B im Vergleich zu rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) eine deutlich spätere Fluoreszenzzunahme (Abbildung 16A, orange). Die rHbl-Komponenten ohne Strep-tag, in der Abbildung mit dem Suffix „Xa“ gekennzeichnet, bilden einen ähnlichen Graphen ab (gelb), d. h. die Proteine waren auch nach der Behandlung mit Faktor Xa noch aktiv. Allerdings brachte die Abspaltung des Strep-tags keine Verbesserung der porenbildenden Aktivität. Abbildung 16B führt jeweils eine rHbl 7+ Komponente im Vergleich zur ursprünglichen Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) auf. Auffällig ist die Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 7+B (grün), die deutlich später als die anderen Kombinationen Fluoreszenz zeigte. Auch bei den Kombinationen ohne Strep-tag war kein schnellerer PI-Einstrom ersichtlich (Abbildung 16C). Die Bindungskapazität von rHbl 7+B und 7+B Xa in Abhängigkeit von der Zeit wurde wiederum durch konsekutive Zugabe der Komponenten getestet. Es zeigte sich eine

deutlich schnellere Fluoreszenzzunahme, wenn die Zellen im ersten Schritt mit rHbl 7+B inkubiert wurden (Abbildung 16D). Der Test wurde mehrfach wiederholt, abgebildet sind repräsentative Kurven. Im Gegensatz zum PI-Test (porenformende Aktivität) konnte im WST-1-Bioassay erneut kein signifikanter Unterschied durch den Einsatz der 7+ rHbl-Komponenten detektiert werden (Abbildung 17).

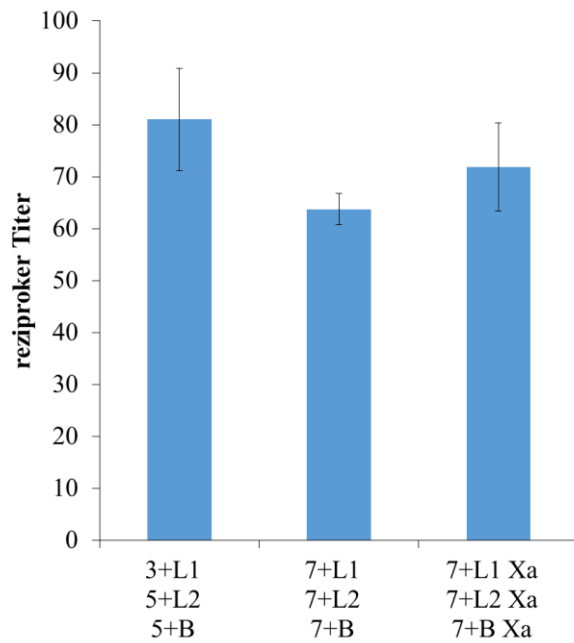
Auch im Hämolyseassay zeigte die Kombination rHbl 7+L1, 7+L2, 7+B im Vergleich zu rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) keine niedrigere hämolytische Aktivität (Abbildung 18).



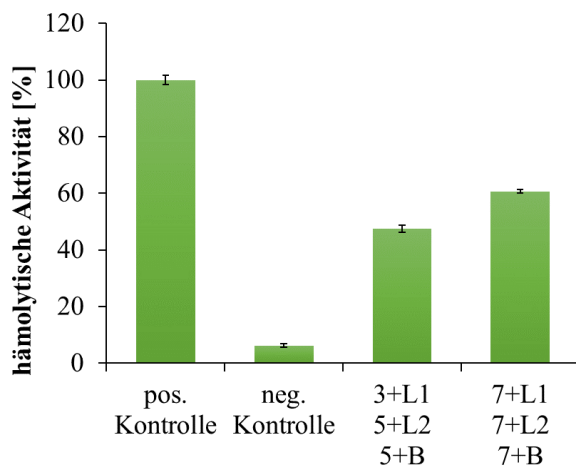


**Abbildung 16:** PI-Test auf Vero-Zellen. **(A)** rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle, 7+ rHbl-Komponenten und 7+ rHbl-Komponenten ohne Strep-tag (Xa). **(B)** rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle und jeweils eine ausgetauschte Komponente. **(C)** rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle und jeweils eine ausgetauschte Komponente ohne Strep-tag. **(D)** konsekutive Zugabe der Komponenten rHbl 7+B und 7+B Xa, 3+L1 und 5+L2. rHbl 7+B und 7+B Xa wurden für jeweils 20, 5 oder 4 min mit den Vero-Zellen inkubiert.





**Abbildung 17:** WST-1-Bioassay auf Vero-Zellen.



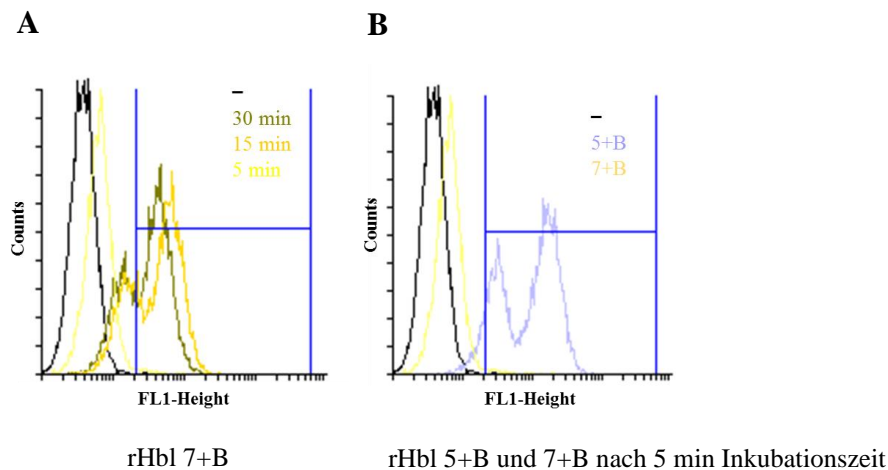
**Abbildung 18:** Hämolyseassay mit Schafsblut. Als Positivkontrolle dienten Erythrozyten in A. dest., auf 100 % gesetzt, als Negativkontrolle Erythrozyten-Salzpuffer-Lösung. Als Vergleich ist die Kombination 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) angegeben.

#### 2.4. Bindung von rHbl 7+B an die Zelloberfläche

Da sich im PI-Test ähnlich wie bei rHbl 3+B (C-terminaler Strep-tag, siehe Abbildung 10) beim Einsatz von rHbl 7+B oder 7+B Xa eine verzögerte Fluoreszenzzunahme zeigte (siehe Abbildung 16B und C), wurde mittels Durchflusszytometrie erneut untersucht, ob sich Unterschiede in der Bindungskapazität von rHbl 7+B und 5+B an Vero-Zellen darstellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Negativkontrollen lassen sich Tabelle 11 entnehmen. Im Allgemeinen war die Bindungskapazität von rHbl 7+B zu allen Zeiten geringer als die von rHbl 5+B. Nach 30 min Inkubation zeigten sich bei rHbl 5+B 93 % der Zellen FL1-positiv, während dies bei rHbl 7+B 64 % waren. Nach 5 min Inkubation war der Unterschied am eindeutigsten. Während bei rHbl 5+B immer noch 93 % der Zellen FL1-positiv waren, waren dies bei rHbl 7+B nur noch 1,18 % (Tabelle 12). Dies wird auch in den Overlay-Histogrammen deutlich (Abbildung 19). Damit wurde gezeigt, dass auch rHbl 7+B trotz N-terminaler Lage des Strep-tags deutlich mehr Zeit für eine effektive Bindung an die Zielzelloberfläche benötigt als rHbl 5+B.

**Tabelle 12:** Ergebnisse der Durchflusszytometrie. rHbl 7+B und 5+B wurden für 30, 15 und 5 min mit Vero-Zellen inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Hbl B spezifischem mAk 1G8-F488. Dargestellt ist die Menge der jeweils FL1-positiven Zellen in Prozent.

	<i>7+B</i> <i>30 min</i>	<i>5+B</i> <i>30 min</i>	<i>7+B</i> <i>15 min</i>	<i>5+B</i> <i>15 min</i>	<i>7+B</i> <i>5 min</i>	<i>5+B</i> <i>5 min</i>
MW [%]	64,1	93,0	71,3	93,4	1,18	93,4
STABW [%]	1,4	4,11	0,59	2,30	0,15	1,38

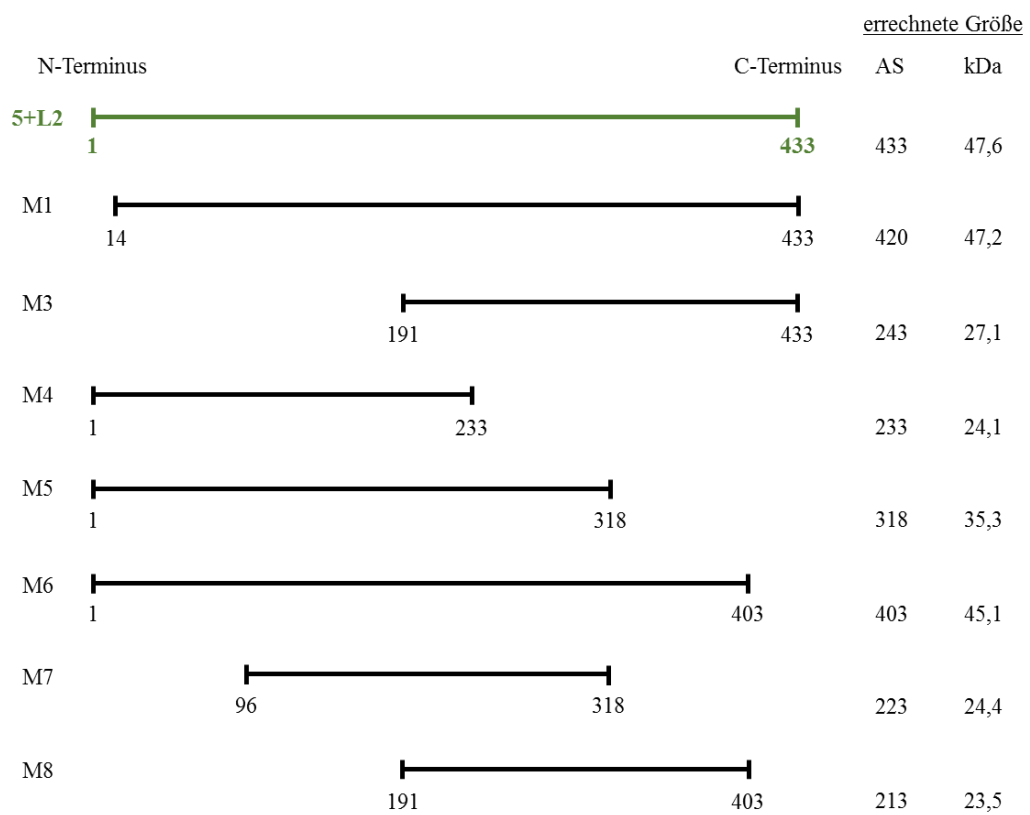
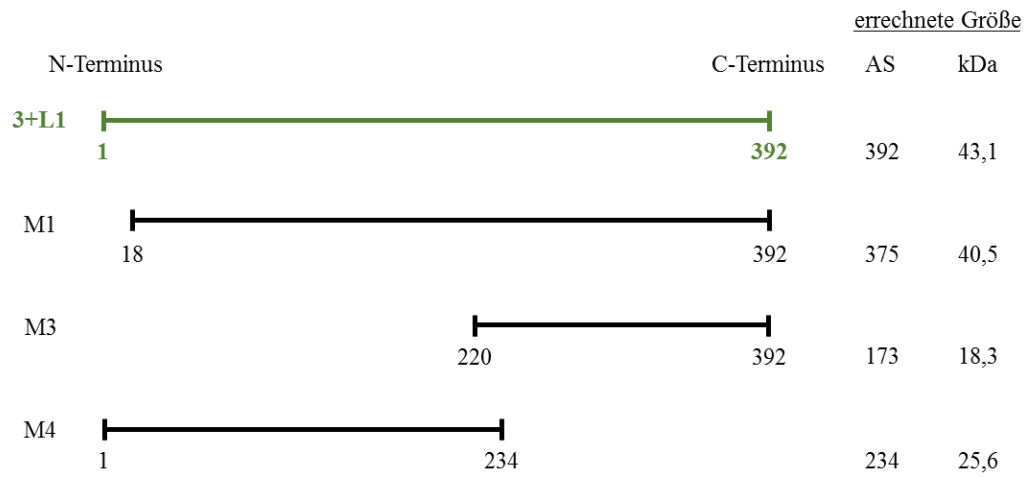


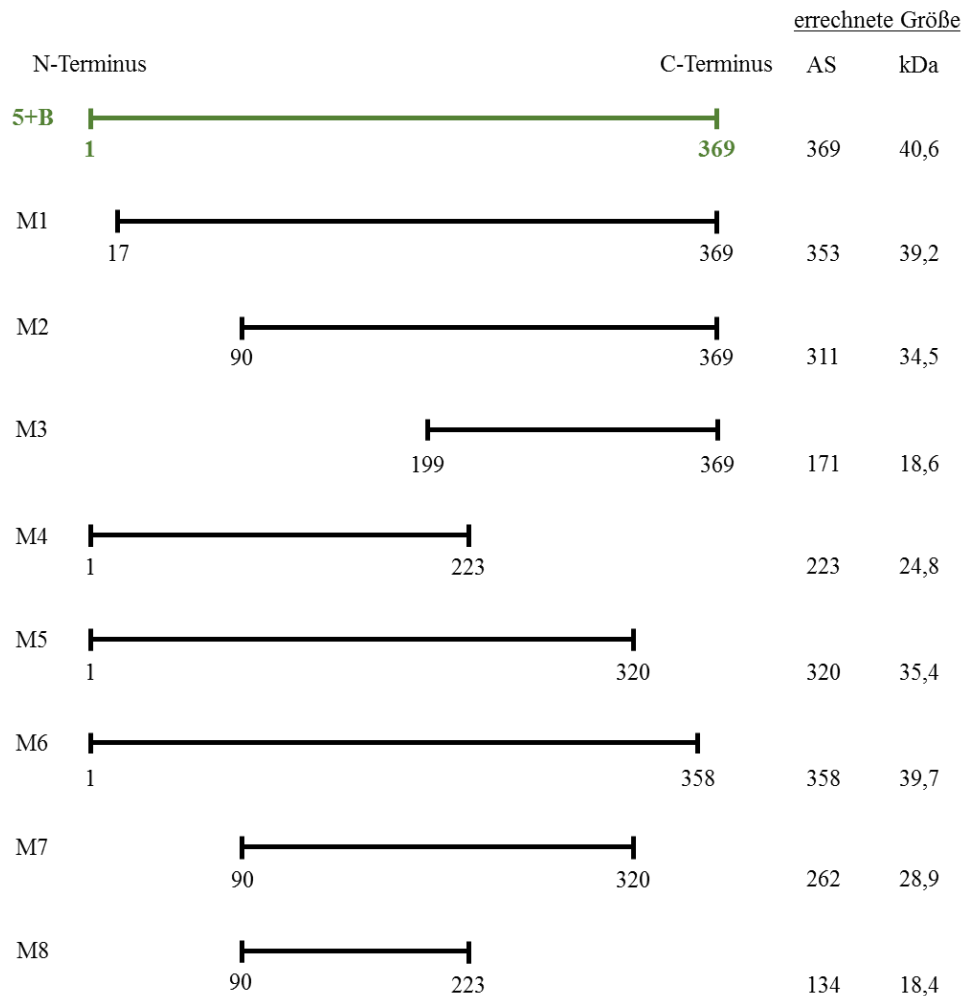
**Abbildung 19:** Overlay-Histogramme der Durchflusszytometrie. (A) FL1-positive Zellen nach 30-, 15- und 5-minütiger Inkubation mit rHbl 7+B (blaue Markierung grenzt FL-1 positive Zellen ab). (B) rHbl 7+B und 5+B in einem Overlay-Histogramm zusammengefasst nach einer Inkubationszeit von 5 min.

### 3. Verkürzte Varianten der rHbl-Komponenten

#### 3.1. Übersicht

Ziel dieses Teilprojekts war es, nach den Auswirkungen der Position des Strep-tags weitere funktionell wichtige Bereiche der drei Hbl-Komponenten zu untersuchen. Hierzu wurden verkürzte Genfragmente der ursprünglich hergestellten rHbl-Komponenten (3+L1, 5+L2, 5+B; Tausch et al., 2017) in die entsprechenden Plasmide kloniert (bereits vorhanden). In dieser Arbeit wurden die verkürzten Proteinvarianten in gleicher Weise wie zuvor in *E. coli* BL21 überexprimiert und gereinigt. Um eine bessere Übersicht über die gekürzten Abschnitte der Proteine zu geben, sind diese Proteinvarianten in Abbildung 20 schematisch dargestellt. Diese wurden mit dem Präfix „M“ benannt. 18 verkürzte Varianten wurden gereinigt, von rHbl 3+L1 drei, von rHbl 5+L2 sieben und von rHbl 5+B acht.



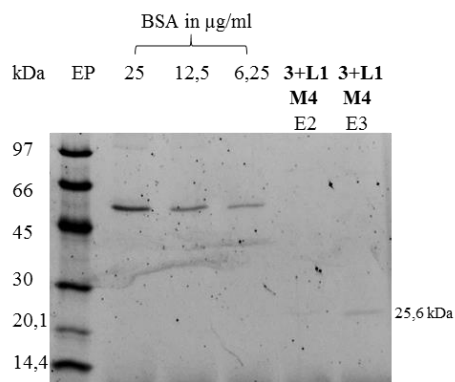
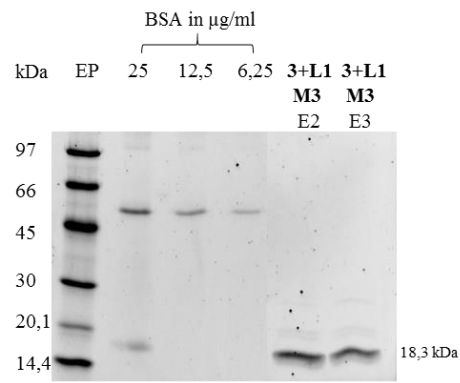
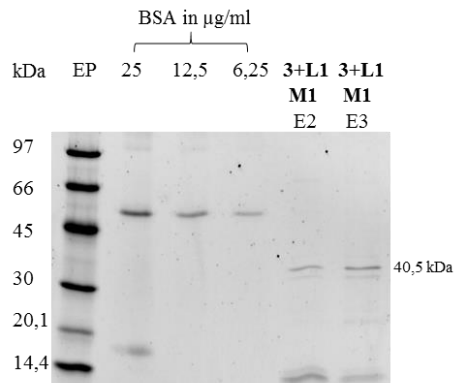


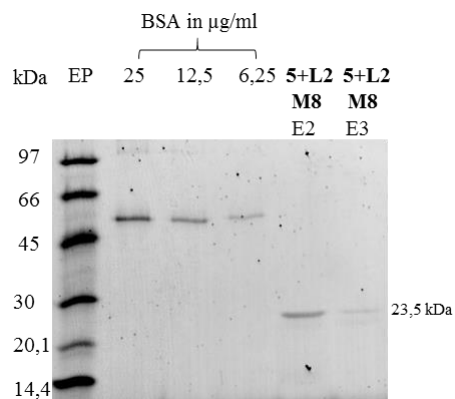
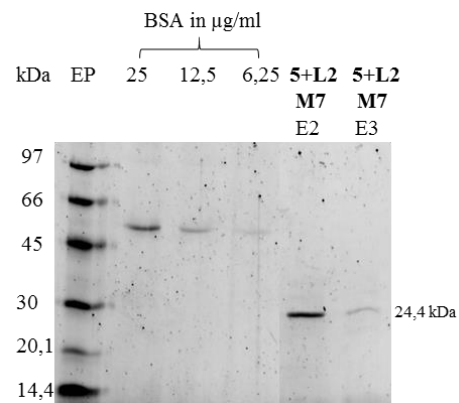
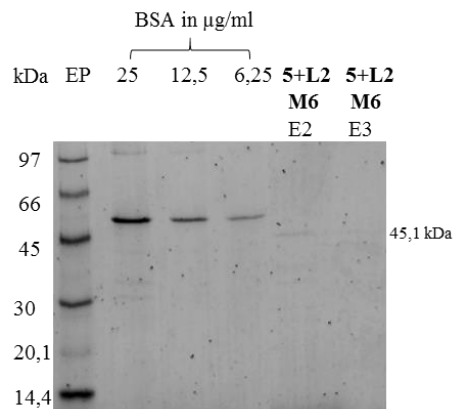
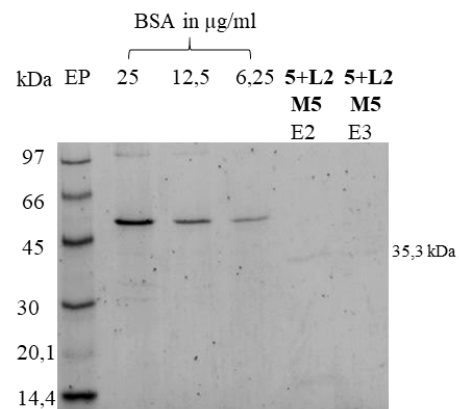
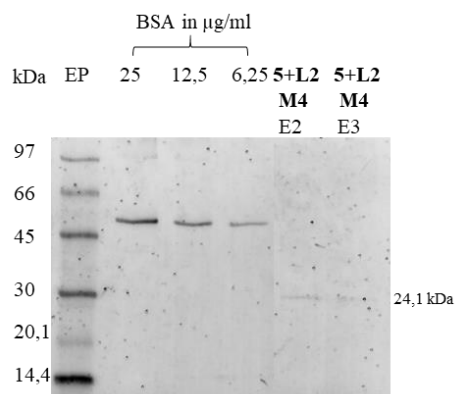
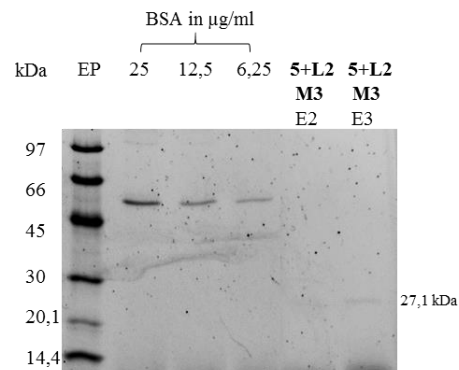
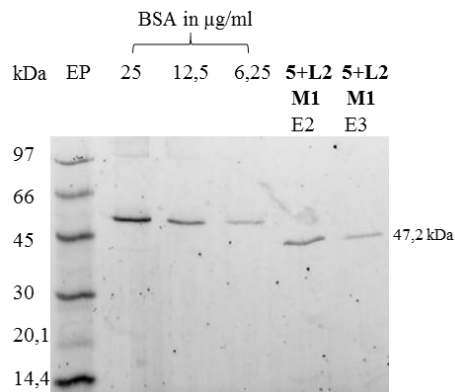
**Abbildung 20:** Schematische Darstellung der verkürzten Varianten der rHbl-Komponenten 3+L1, 5+L2 und 5+B. Die Ziffern geben jeweils die erste und letzte Aminosäure der Proteine an.

### 3.2. Reinigung der verkürzten Varianten der rHbl-Komponenten

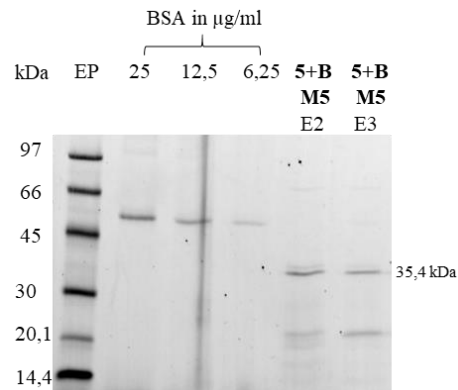
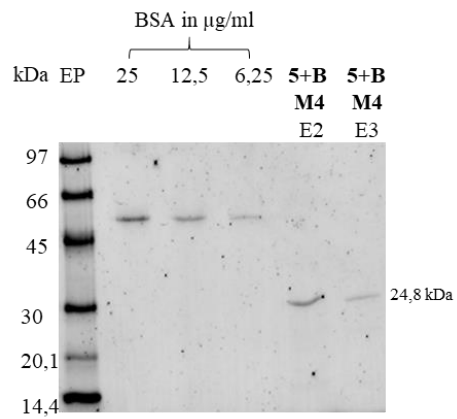
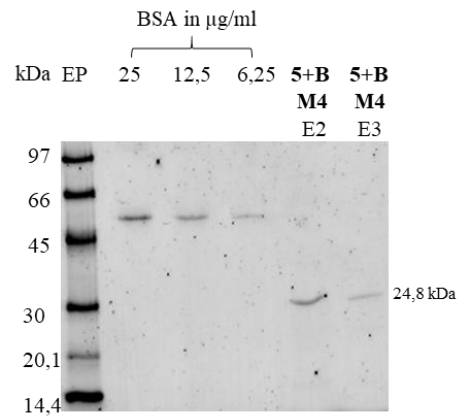
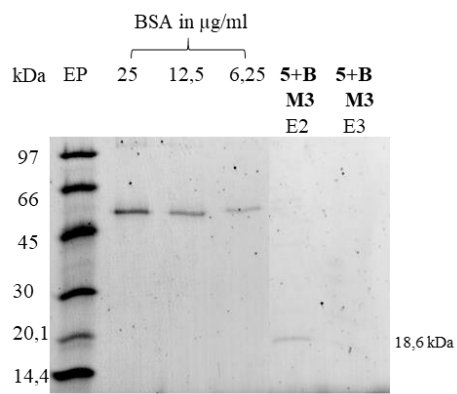
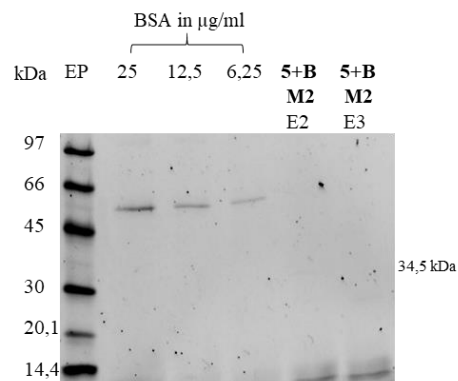
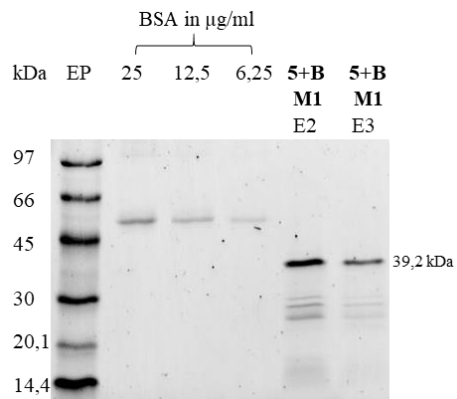
Alle rHbl-Varianten wurden über das Strep-Tactin<sup>®</sup>-System (IBA Lifesciences) gereinigt, das auch bei allen vorherigen rHbl-Komponenten verwendet wurde (siehe Kapitel IV.1.1.). Die Größen der Proteine (siehe Abbildung 20) stimmten mit den Banden auf den jeweiligen Polyacrylamidgelen überein (Abbildung 21). In einigen Fällen waren die Banden leicht über der errechneten Größe, wie z. B. bei rHbl 5+L2 M4. Die Richtigkeit ließ sich aber durch dreimalige Aufreinigung und SYPRO Ruby-Färbung bestätigen. Alle Proteine konnten in ausreichender Konzentration aufgereinigt werden, so dass sie für nachfolgende Funktionalitätstests in der Zellkultur eingesetzt werden konnten.

## A 3+L1 Varianten:

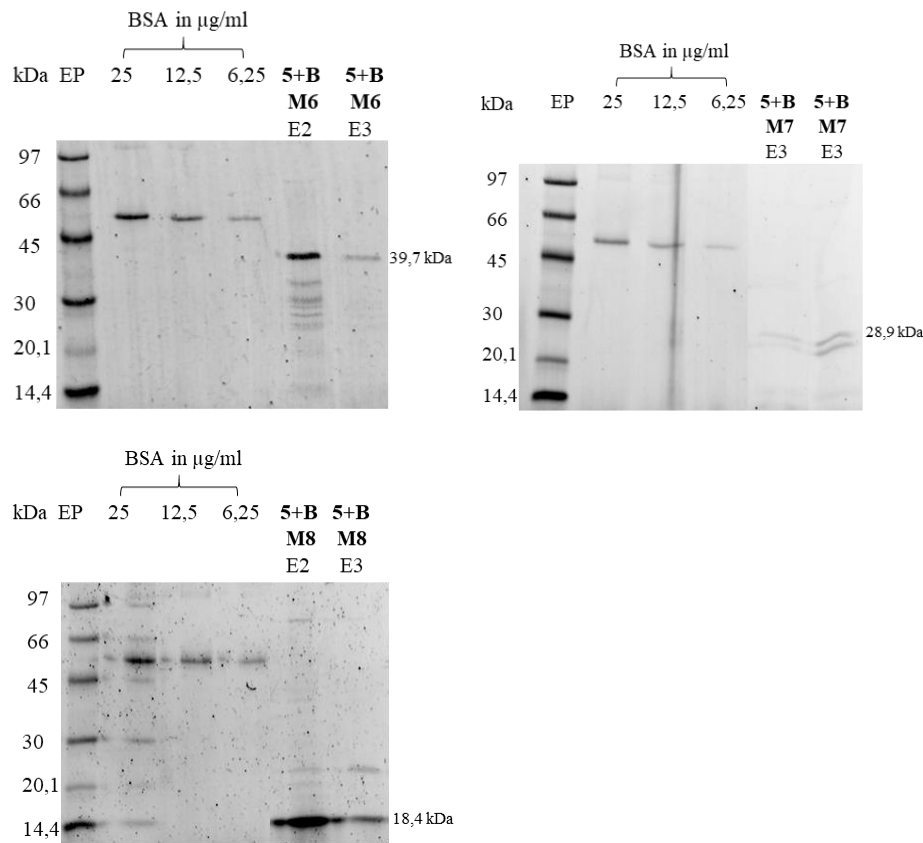


**B** 5+L2 Varianten:

**C 5+B Varianten:**



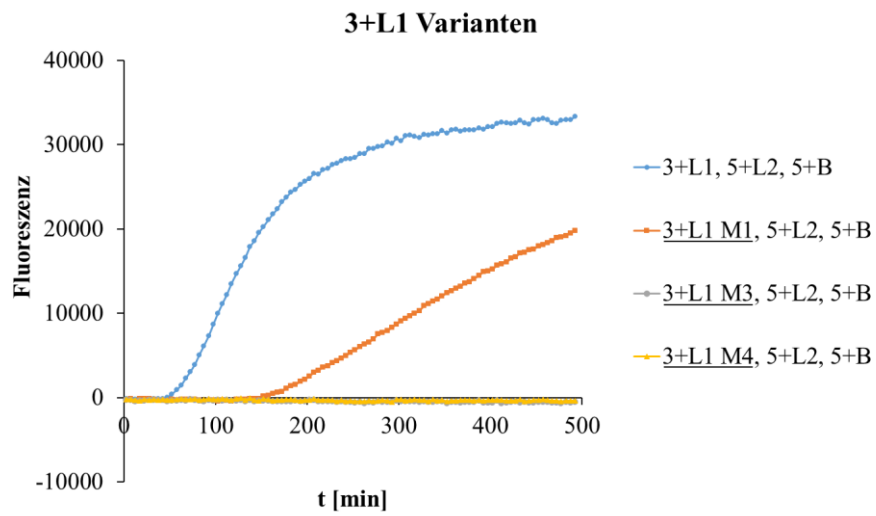
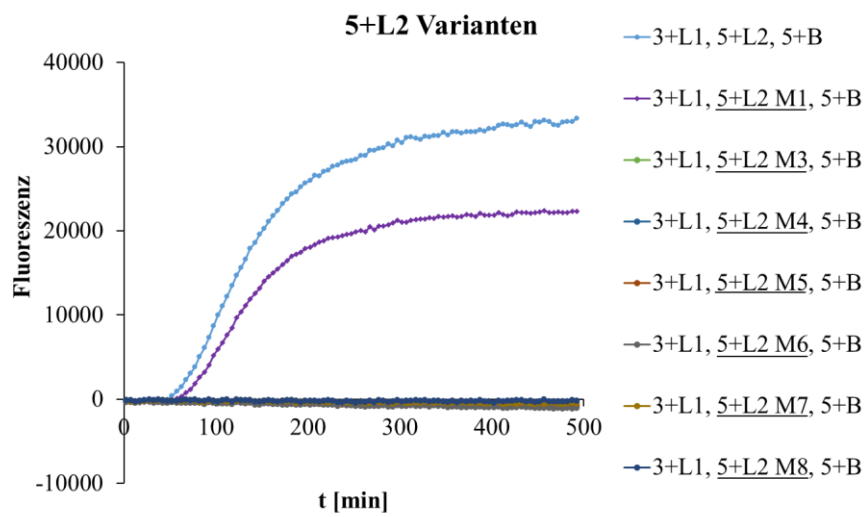




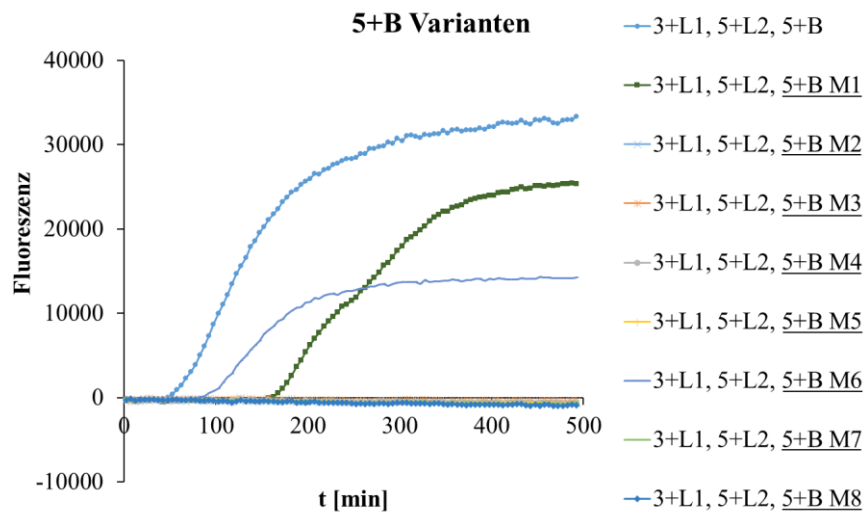
**Abbildung 21:** SDS-Gelelektrophorese und SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Kontrolle und Quantifizierung der rHbl-Varianten. BSA-Standardkurven wurden zur Konzentrationsbestimmung mitgeführt.

### 3.3. Funktionalität

Zur Untersuchung der Funktionalität der verkürzten rHbl-Varianten wurden Zellkulturtests mit Vero-Zellen durchgeführt. Zuerst wurde jede verkürzte Variante einzeln getestet, indem diese ihr jeweiliges vollständiges Protein in der Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) ersetzte. Der Test wurde dreimal mit zwei unterschiedlichen Proteinpräparationen wiederholt, dargestellt ist ein repräsentativer Lauf. PI-Fluoreszenz zeigten die Kombinationen mit rHbl 3+L1 M1 (Abbildung 22A), rHbl 5+L2 M1 (Abbildung 22B), rHbl 5+B M1 und M6 (Abbildung 22C). Alle anderen Varianten zeigten keine Fluoreszenz und können somit offenbar nicht zur Vervollständigung der Hbl-Pore verwendet werden.

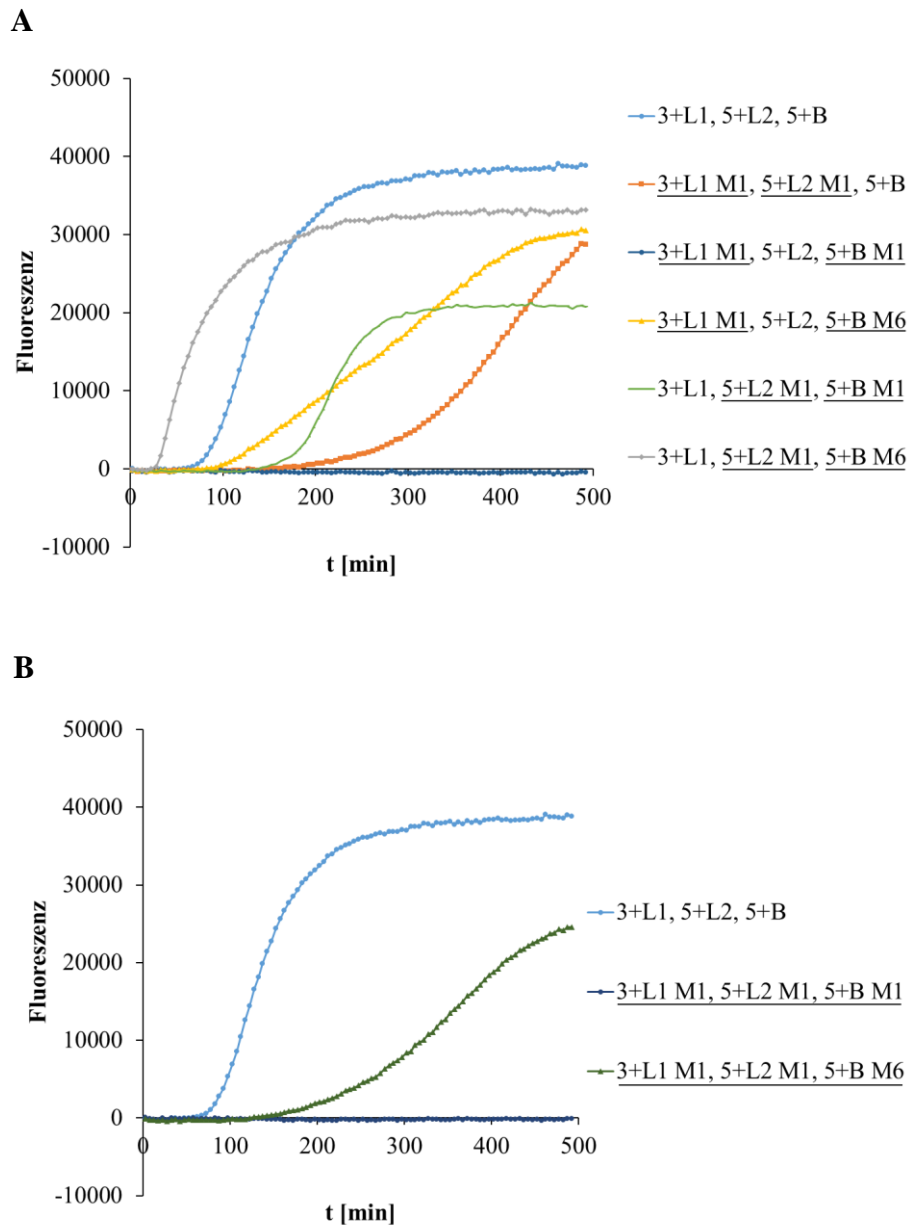
**A****B**

C



**Abbildung 22:** PI-Test auf Vero-Zellen mit den einzelnen, gekürzten rHbl-Varianten. **(A)** rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und rHbl 3+L1 Varianten. **(B)** rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und rHbl 5+L2 Varianten. **(C)** rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und rHbl 5+B Varianten.

Anschließend wurden alle im PI-Test funktionell aktiven Varianten in Kombinationen eingesetzt. Der Versuch wurde fünfmal mit drei unterschiedlichen Proteinpräparationen wiederholt, dargestellt sind repräsentative Läufe. Abbildung 23A zeigt den Austausch von je zwei Varianten im Vergleich zur Ausgangskombination (blau). PI-Fluoreszenz zeigten die Kombinationen rHbl 3+L1 M1, 5+L2 M1, 5+B (orange), 3+L1 M1, 5+L2, 5+B M6 (gelb), 3+L1, 5+L2 M1, 5+B M1 (grün) und 3+L1, 5+L2 M1, 5+B M6 (grau). D. h. die verkürzten Varianten konnten in diesen Kombinationen miteinander interagieren und eine Pore formen. Keine toxische Aktivität hingegen war bei der Kombination rHbl 3+L1 M1, 5+L2, 5+B M1 zu erkennen. Wenn alle drei Komponenten getauscht wurden, zeigte nur noch die Kombination rHbl 3+L1 M1, 5+L2 M1, 5+B M6 porenformende Aktivität (Abbildung 23B). Bei der Kombination rHbl 3+L1 M1, 5+L2 M1, 5+B M1 war kein PI-Einstrom zu sehen, was sich mit dem Ergebnis der zwei getauschten Komponenten rHbl 3+L1 M1, 5+B M1 deckte.



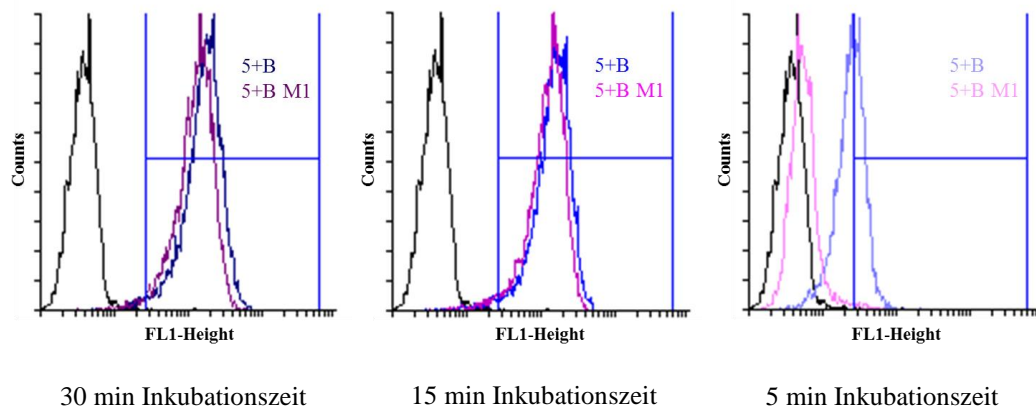
**Abbildung 23:** PI-Test auf Vero-Zellen. **(A)** Ausgangskombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und jeweils zwei getauschte Varianten. **(B)** Ausgangskombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und jeweils drei getauschte Varianten.

Im Folgenden wurde die Bindungskapazität der Variante rHbl 5+B M1 im Vergleich zu rHbl 5+B an Vero-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Zu den Inkubationszeiten von 30 und 15 min zeigten beide Komponenten fast gleiche Bindungskapazitäten an Vero-Zellen (zwischen 99 und 100 %). Nach nur 5 min Inkubationszeit wurde ein deutlicher Unterschied in der Bindungskapazität

ersichtlich (Tabelle 13 und Abbildung 24). rHbl 5+B M1 lag mit 3,69 % FL1-positiven Zellen deutlich unterhalb von rHbl 5+B (blauer Graph) mit 70,8 % Bindungskapazität. Damit liegt auch die Bindungskapazität von rHbl 5+B M1 offensichtlich unter der von rHbl 5+B.

**Tabelle 13:** Ergebnisse der Durchflusszytometrie. rHbl 5+B und 5+B M1 wurden für 30, 15 und 5 min mit Vero-Zellen inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Hbl B spezifischem mAk 1G8-F488. Dargestellt ist die Menge der jeweils FL1-positiven Zellen in Prozent.

	<i>5+B</i> <i>30 min</i>	<i>5+B</i> <i>15 min</i>	<i>5+B</i> <i>5 min</i>	<i>5+B M1</i> <i>30 min</i>	<i>5+B M1</i> <i>15 min</i>	<i>5+B M1</i> <i>5 min</i>
MW [%]	99,6	99,3	70,8	99,7	99,4	3,69
STABW [%]	0,22	0,07	19,9	0,09	0,1	0,315



**Abbildung 24:** Overlay-Histogramme. Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach Inkubation von Vero-Zellen mit je rHbl 5+B oder 5+B M1 für 30, 15 und 5 min (blaue Markierung grenzt FL-1 positive Zellen ab).

### 3.4. Bindung von monoklonalen Antikörpern

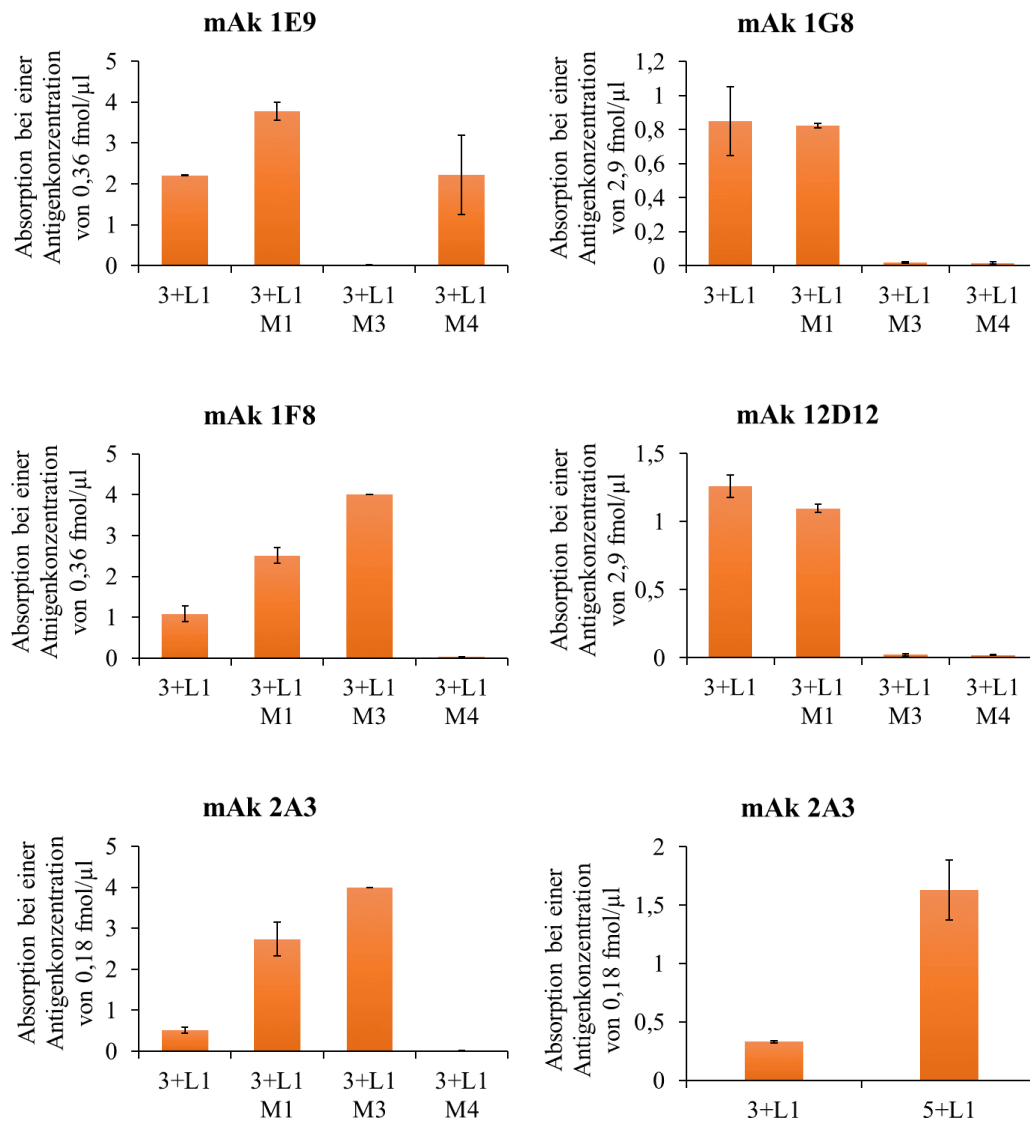
Die rHbl-Komponenten 3+L1, 5+L2 und 5+B (Tausch et al., 2017) sowie ihre gereinigten, verkürzten Varianten wurden im Weiteren zur Eingrenzung der Bindestellen der am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch verfügbaren mAk herangezogen.

#### 3.4.1. rHbl 3+L1

Mit rHbl 3+L1 sowie dessen verkürzten Varianten M1, M3 und M4 wurde die Bindungsfähigkeit der Antikörper 1E9, 1G8, 1F8, 12D12, 2A3 und StrepMAB-Classic in EIAs untersucht. rHbl 3+L1 zeigte bei allen Antikörpern ausreichend Absorption. Alle Antikörper konnten rHbl 3+L1 M1 binden, wobei die mAk 1G8 und 12D12 eine ca. sechsmal niedrigere Affinität aufwiesen als die mAk 1E9 und 1F8 (Abbildung 25). Der mAk 1E9 hatte zu rHbl 3+L1 M4 mit einem Absorptionswert von 2,22 bei 0,36 fmol/μl eine geringere Affinität als zu rHbl 3+L1 M1 (3,78 bei 0,36 fmol/μl), an M3 konnte er nicht binden. Demnach liegt das Epitop von mAk 1E9 zwischen Aminosäure 18 und 219 (vgl. Abbildung 20). Die mAk 1G8 und 12D12 banden nur an rHbl 3+L1 M1, damit ließ sich das Epitop kaum eingrenzen. Beide Antikörper verhalten sich kreuzreaktiv gegenüber Hbl B und Hbl L1 (Tausch, 2016).

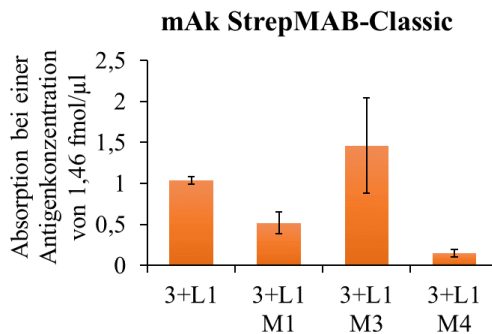
Der mAk 1F8 wies gute Bindung an rHbl 3+L1 M1 und M3 auf, an rHbl 3+L1 M4 konnte er nicht binden. Dadurch ließ sich dessen Epitop auf die Aminosäuren 235 - 392 eingrenzen. rHbl 3+L1 M3 war aufgrund sehr hoher Absorptionswerte vom Mikrotiterplattenlesegerät nicht auswertbar, deswegen wurde ein maximaler Absorptionswert von vier festgelegt. Zusätzlich wurde der mAk 2A3 herangezogen. Bei ihm verhielt es sich ähnlich, auch hier wiesen rHbl 3+L1 M1 und M3 hohe Absorptionswerte auf, während rHbl 3+L1 M4 bei nahezu null lag. rHbl 3+L1 M3 war wiederum aufgrund sehr hoher Absorptionswerte vom Mikrotiterplattenlesegerät nicht auswertbar, deswegen wurde ein maximaler Absorptionswert von vier festgelegt. Auch das komplette Protein rHbl 3+L1 wies niedrige Absorptionswerte auf (Abbildung 25). Die mAk 2A3 und 1F8 haben also beide im Bereich von Aminosäure 235 - 392 ihre Epitope (vgl. Abbildung 20). Diese Antikörper stammen zwar aus unterschiedlichen Fusionen, verhielten sich aber in verschiedenen vorangegangenen Tests gleich (Dr. R. Dietrich, persönliche

Mitteilung). Da der mAk 2A3 bei rHbl 5+L1 eine höhere Reaktivität zeigte (Abbildung 25), ist es wahrscheinlich, dass der mAk nahe am C-Terminus bindet und der Strep-tag von rHbl 3+L1 den mAk an der Bindung hindert.



**Abbildung 25:** Indirekte EIA von rHbl 3+L1 und dessen verkürzten Varianten mit den mAk 1E9, 1G8, 1F8, 12D12 und 2A3. Die Absorption bei 450 nm ist bei den mAk 1E9 und 1F8 bei einer Antigenkonzentration von 0,36 fmol/µl, bei den mAk 1G8 und 12D12 bei einer Antigenkonzentration von 2,9 fmol/µl und bei dem mAk 2A3 bei einer Antigenkonzentration von 0,18 fmol/µl dargestellt. Rechts unten der Vergleich von rHbl 3+L1 und 5+L1 für mAk 2A3.

Abbildung 26 zeigt die Absorptionswerte des mAk StrepMAB-Classic bei einer Antigenkonzentration von 1,46 fmol/ $\mu$ l. Der Antikörper, der an den C-terminalen Strep-tag der Proteine bindet, wies bei den verschiedenen verkürzten Varianten unterschiedliche Absorptionswerte auf. Bei rHbl 3+L1 M1 und M4 zeigte der mAk deutlich geringere Absorptionswerte als bei rHbl 3+L1 und 3+L1 M3. Die geringere Bindungskapazität des Antikörpers könnte an der Tertiärstruktur der Proteine liegen, wodurch der Strep-tag schwerer zugänglich sein kann.

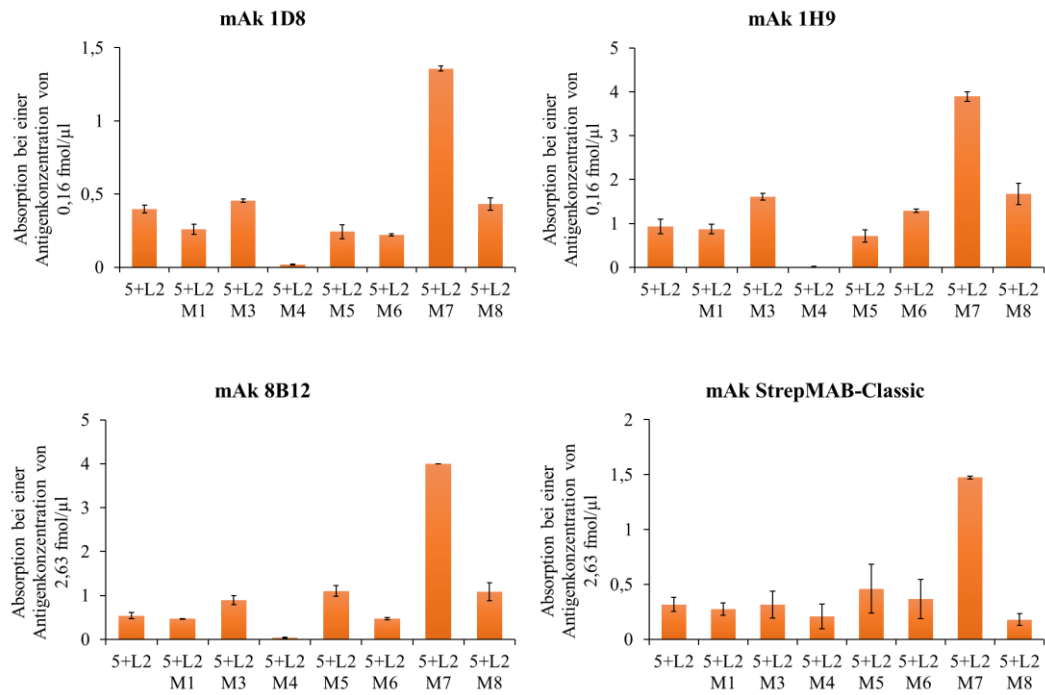


**Abbildung 26:** Indirekter EIA von rHbl 3+L1 und dessen verkürzten Varianten mit mAk StrepMAB-Classic. Die Absorption bei 450 nm ist bei einer Antigenkonzentration von 1,46 fmol/ $\mu$ l dargestellt.

### 3.4.2. rHbl 5+L2

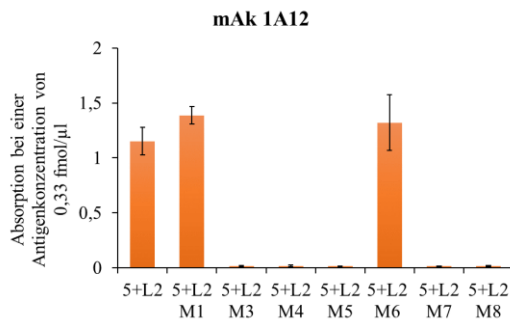
Ebenso wurde mittels EIA die Bindungsfähigkeit der mAk 1D8, 1H9, 8B12, 1A12 und StrepMAB-Classic an rHbl 5+L2 und dessen Varianten untersucht, um Epitope einzugrenzen. Die mAk 1D8, 1H9 und 8B12 zeigten ähnliche und deutliche Bindung an rHbl 5+L2, 5+L2 M1, M3, M5, M6, M7 und M8 (Abbildung 27). Demnach liegen deren Epitope zwischen den Aminosäuren 234 und 318 (vgl. Abbildung 20). Auch der zur Kontrolle mitgeführte mAk StrepMAB-Classic wies deutliche Bindung auf. Nur rHbl 5+L2 M7 hatte bei einer Antigenkonzentration von 2,63 fmol/ $\mu$ l einen deutlich erhöhten Absorptionswert.





**Abbildung 27:** Indirekte EIA von rHbl 5+L2 und seinen verkürzten Varianten mit mAk 1D8, 1H9, 8B12 und StrepMAB-Classic. Die Absorptionswerte bei 450 nm der mAk 1D8 und 1H9 sind bei einer Antigenkonzentration von 0,16 fmol/µl, die der mAk 8B12 und StrepMAB-Classic bei einer Antigenkonzentration von 2,63 fmol/µl dargestellt.

Der mAk 1A12 zeigte im indirekten EIA keine Reaktion, da er vermutlich eine intakte Tertiärstruktur der Antigene benötigt. Deswegen wurde dieser im Sandwich-EIA getestet (siehe Kapitel III.2.2.6.2.), in dem 1H9-HRP als Detektionsantikörper diente. Wie in Abbildung 28 zu sehen, konnte der mAk 1A12 nur das vollständige rHbl 5+L2 sowie die Varianten M1 und M6 binden, denen je 13 Aminosäuren N-terminal bzw. 30 Aminosäuren C-terminal fehlen (vgl. Abbildung 20). Der mAk reagierte also weder mit dem N- noch mit dem C-Terminus von Hbl. Eine weitere Eingrenzung des Epitops war nicht möglich.



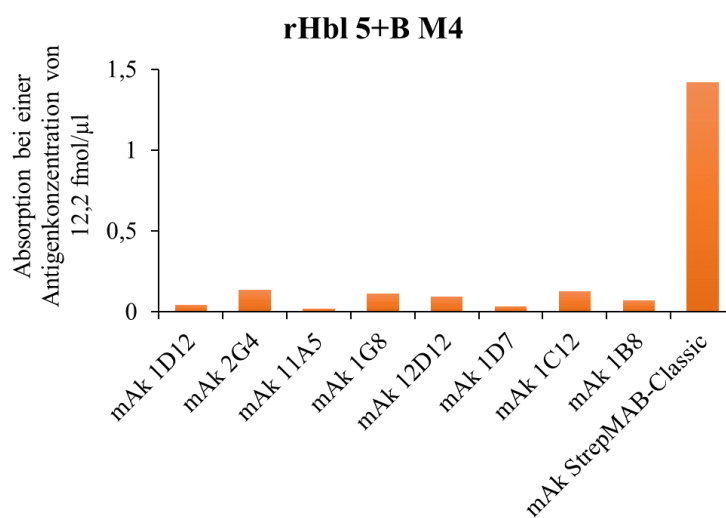
**Abbildung 28:** Sandwich-EIA von rHbl 5+L2 und seinen verkürzten Varianten mit mAk 1A12 sowie 1H9-HRP als Detektionsantikörper. Die Absorption bei 450 nm ist bei einer Antigenkonzentration von 0,33 fmol/µl gezeigt.

### 3.4.3. rHbl 5+B

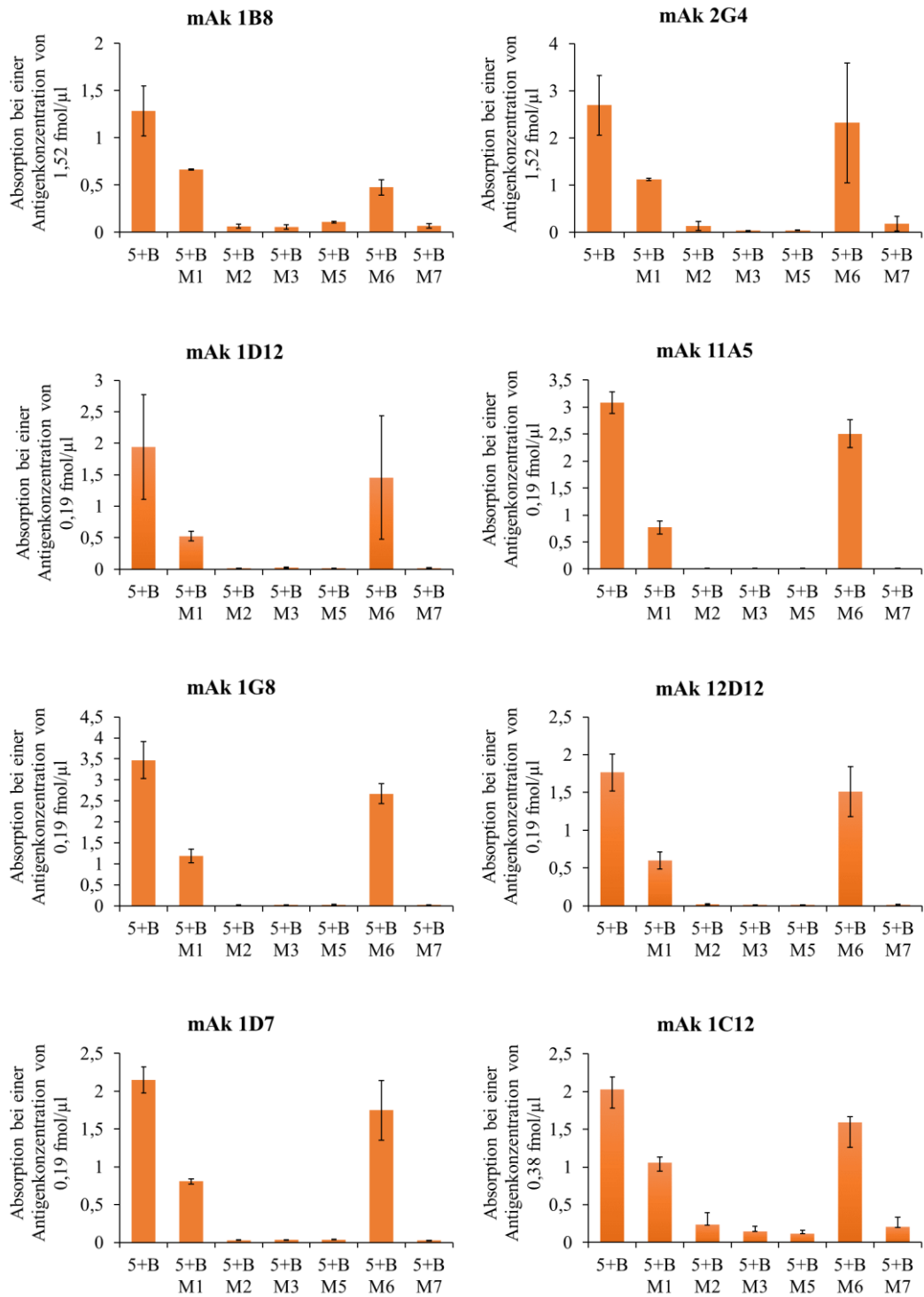
rHbl 5+B sowie dessen verkürzte Varianten wurden verwendet, um die Bindungsfähigkeit der Antikörper 1B8, 2G4, 1D12, 11A5, 1G8, 12D12, 1D7, 1C12 und StrepMAB-Classic zu testen. Aufgrund einer vermutlich instabilen Struktur von rHbl 5+B M4 wurde dieses Protein überexprimiert, gereinigt und nach Konzentrationsbestimmung sofort im EIA eingesetzt. Dieser wurde mit allen zu testenden mAk durchgeführt. Die Darstellung der Absorption bei einer Antigenkonzentration von 12,2 fmol/µl zeigt, dass das Protein relativ instabil ist und nur wenig reagiert (Abbildung 29). Die Ergebnisse der EIAs zu allen anderen verkürzten Varianten sind in Abbildung 30 dargestellt, M8 wurde nicht getestet. Die mAk 1D12, 11A5, 1G8, 12D12 und 1D7 banden rHbl 5+B M1 und M6 (Abbildung 30), reagierten also nicht mit dem direkten N- oder C-Terminus der Proteine (vgl. Abbildung 20). Außerdem zeigten mAk 1G8 und 12D12 geringe Interaktion mit rHbl 5+B M4 (Abbildung 29), was auf eine Lage ihrer Epitope zwischen Aminosäure 17 und 223 schließen ließe. Da sie allerdings keine Interaktion mit weiteren Varianten zeigten (Abbildung 30), konnte dies nicht bestätigt werden.

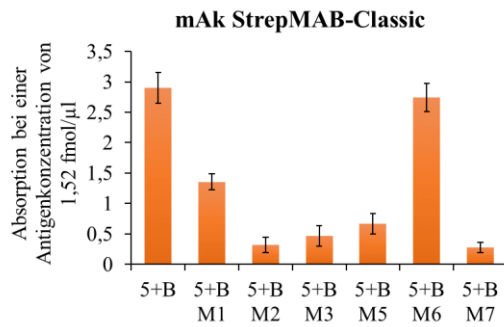
Ein anderes Bild zeigte mAk 1B8, bei dem Absorption bei den Varianten M1, M5 und M6 zu verzeichnen war (Abbildung 30). Damit können nur die Aminosäuren 1 - 16 sowie 321 - 369 als Epitope ausgeschlossen werden.

Der mAk 2G4 hob sich von den anderen mAk deutlich ab, indem er Bindungen an rHbl 5+B M1, M2, M4 (Abbildung 29), M6 und M7 vorwies, wobei die Bindungskapazität an rHbl 5+B M2 und M7 deutlich geringer erschien als an den anderen Varianten. Minimale Bindungskapazität wies er bei rHbl 5+B M5 auf, die aber bei einer Antigenkonzentration von 1,52 fmol/ $\mu$ l nicht mehr detektiert werden konnte. Demnach liegt das Epitop des mAk 2G4 zwischen Aminosäure 90 und 198. Der mAk 1C12 zeigte starke Bindungskapazitäten bei rHbl 5+B M1 und M6. Bei M2, M3, M4 (Abbildung 29), M5 und M7 zeigte er schwächere Bindungskapazitäten. Damit lässt sich auch bei mAk 1C12 kein eindeutiges Epitop bestimmen. Auch der zur Kontrolle mitgeführte mAk StrepMAB-Classic band unterschiedlich stark an die Varianten rHbl 5+B. Während er bei M1 und M6 hohe Absorptionswerte zeigte, waren die anderen Werte nachweisbar geringer (Abbildung 30).



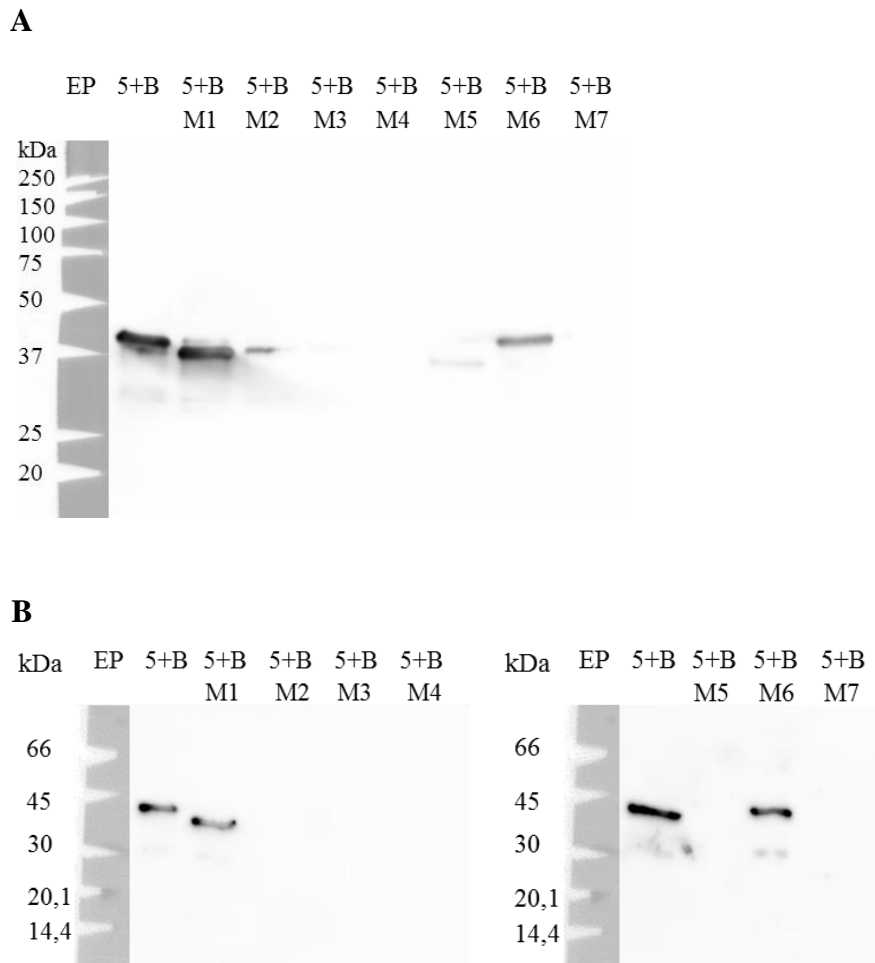
**Abbildung 29:** Indirekter EIA von rHbl 5+B M4 mit mAk 1D12, 2G4, 11A5, 1G8, 12D12, 1D7, 1C12, 1B8 und StrepMAB-Classic. Die Absorption bei 450 nm ist bei einer Antigenkonzentration von 12,2 fmol/ $\mu$ l gezeigt.





**Abbildung 30:** Indirekte EIA von rHbl 5+B und seinen verkürzten Varianten mit den mAk 1B8, 2G4, 1D12, 11A5, 1G8, 12D12, 1D7, 1C12 und StrepMAB-Classic. Dargestellt ist jeweils die maximale Absorption bei 450 nm bei einer Antigenkonzentration von 0,19, 0,38 bzw. 1,52 fmol/μl.

Als Ergänzung wurden Western Blots von rHbl 5+B und seinen verkürzten Varianten mit den mAk 1B8 und 2G4 durchgeführt. Die Ergebnisse zu mAk 1B8 (Abbildung 31A) deckten sich weitestgehend mit dem EIA (die Bande bei rHbl 5+B M2 stellt einen Überlauf der Bande von M1 dar). Die Ergebnisse zu mAk 2G4 (Abbildung 31B) glichen zunächst nicht den EIA-Werten. Es konnten nur deutliche Banden bei rHbl 5+B M1 und M6 detektiert werden. Beim EIA hingegen konnte der mAk 2G4 rHbl 5+B M1, M2, M4, M5, M6 und M7 binden. Da allerdings die Absorptionswerte bei rHbl 5+B M2, M4, M5 und M7 deutlich niedriger lagen als die bei M1 und M6, ist es wahrscheinlich, dass die Sensitivität des Western Blots nicht ausreicht, um alle Bindungen zu detektieren.

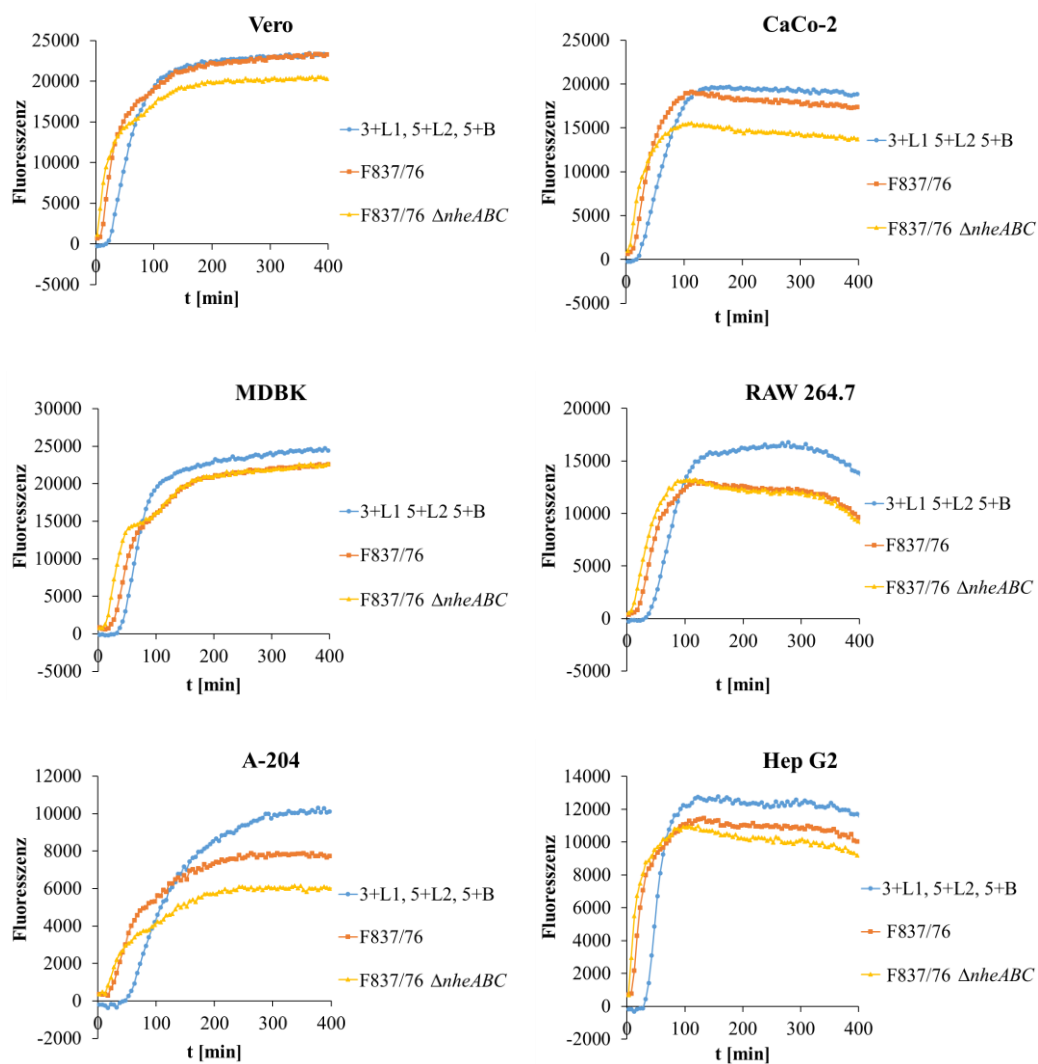


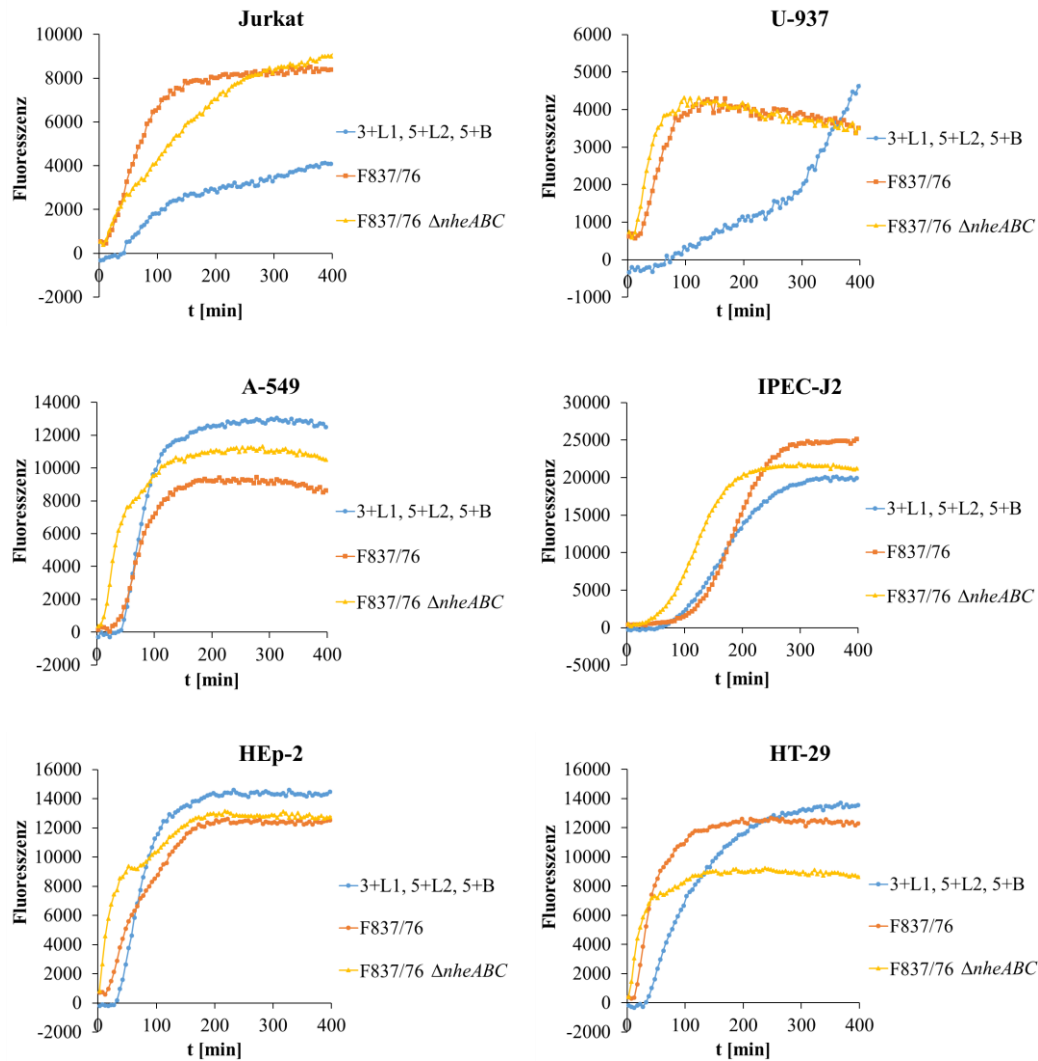
**Abbildung 31:** Western Blots von rHbl 5+B und seinen verkürzten Varianten. (A) mit mAk 1B8. (B) mit mAk 2G4.

#### 4. Toxische Aktivität von Hbl gegenüber verschiedenen Zelllinien

Bislang ist bekannt, dass die Toxinkomplexe Nhe und Hbl durch spezifische Interaktion ihrer drei Komponenten Poren in der Zielzellmembran bilden. NheB/C (Lindbäck et al., 2010) sowie Hbl B (Jessberger et al., 2019, Sastalla et al., 2013) sind hierbei essentiell für den ersten Schritt: Erkennung und Bindung der Zelloberfläche. Nicht bekannt ist allerdings, ob es hierfür spezifische Zielstrukturen oder Rezeptoren gibt. Um erste Hinweise hierfür zu sammeln, wurde die toxische Aktivität von Hbl gegenüber Zelllinien verschiedenen Ursprungs und Gewebes getestet (siehe Tabelle 6), um deren Sensitivität gegen Hbl zu ermitteln. Hierzu wurden PI- und WST-Tests durchgeführt und die Kombination rHbl 3+L1, 5+L2,

5+B (Tausch et al., 2017) im Vergleich zu *B. cereus* Kulturüberständen eingesetzt. In Abbildung 32 sind repräsentative Läufe der PI-Tests dargestellt. Der Test wurde je Zelllinie dreimal durchgeführt. F837/76 (orange), ein Nhe- und Hbl-Produzent, und der Deletionsstamm F837/76  $\Delta$ nheABC (gelb) verhielten sich auf allen Zelllinien ähnlich, indem sie deutlichen PI-Einstrom in die Zellen auslösten. Ebenso deutlich, wenn auch im Vergleich leicht verzögert, zeigte sich die Fluoreszenzzunahme beim Einsatz von rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (blau; Tausch et al., 2017). Einzig auf Jurkat- und U-937-Zellen waren Unterschiede zu erkennen. Die Fluoreszenzzunahme durch rHbl erfolgte sehr viel langsamer und später als bei F837/76 und F837/76  $\Delta$ nheABC. Damit scheinen die rHbl-Komponenten gegenüber diesen Zelllinien ein geringeres porenformendes Potential zu haben. Bei U-937-Zellen erreichte der Graph erst nach ca. 370 min höhere Werte als F837/76.



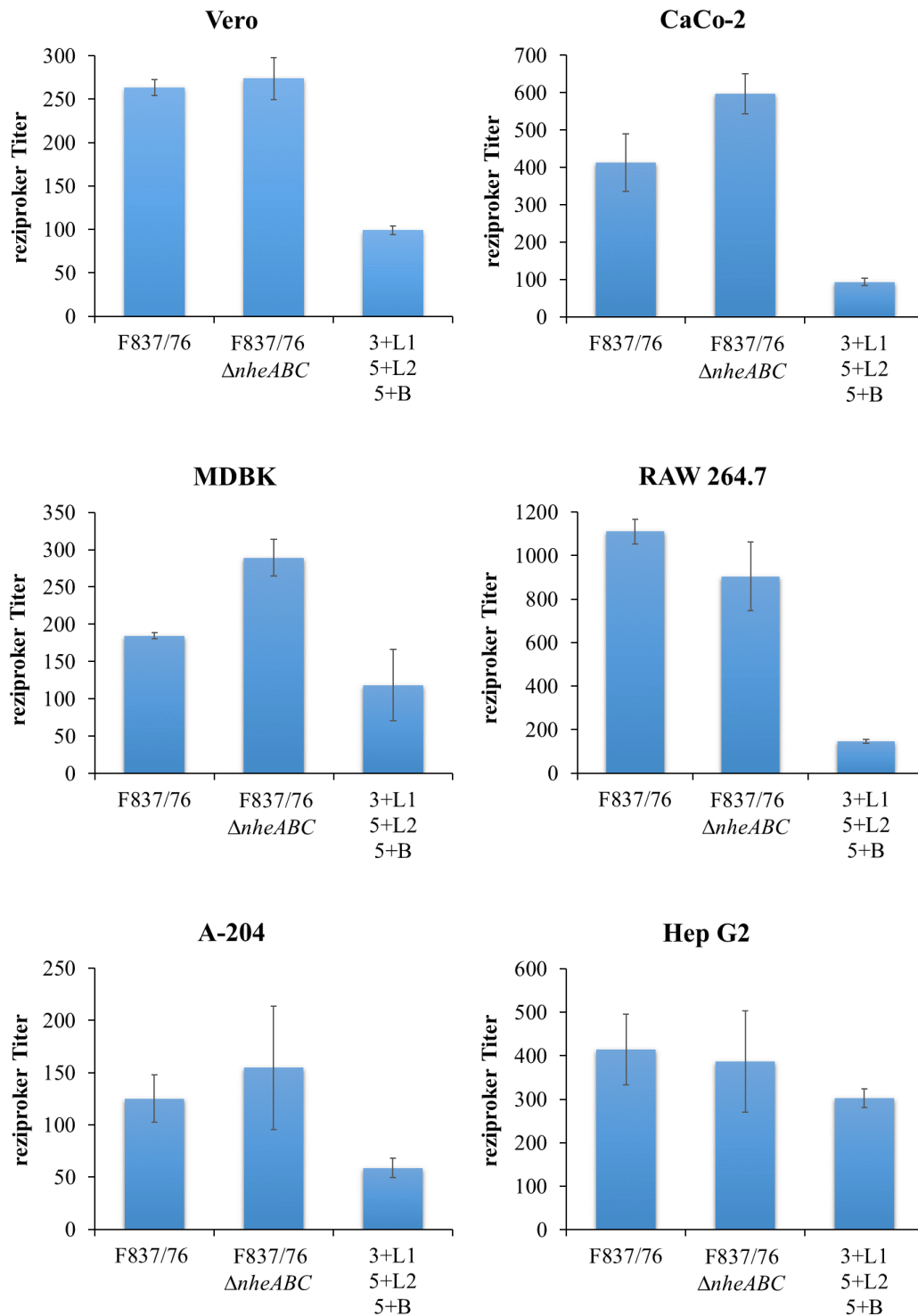


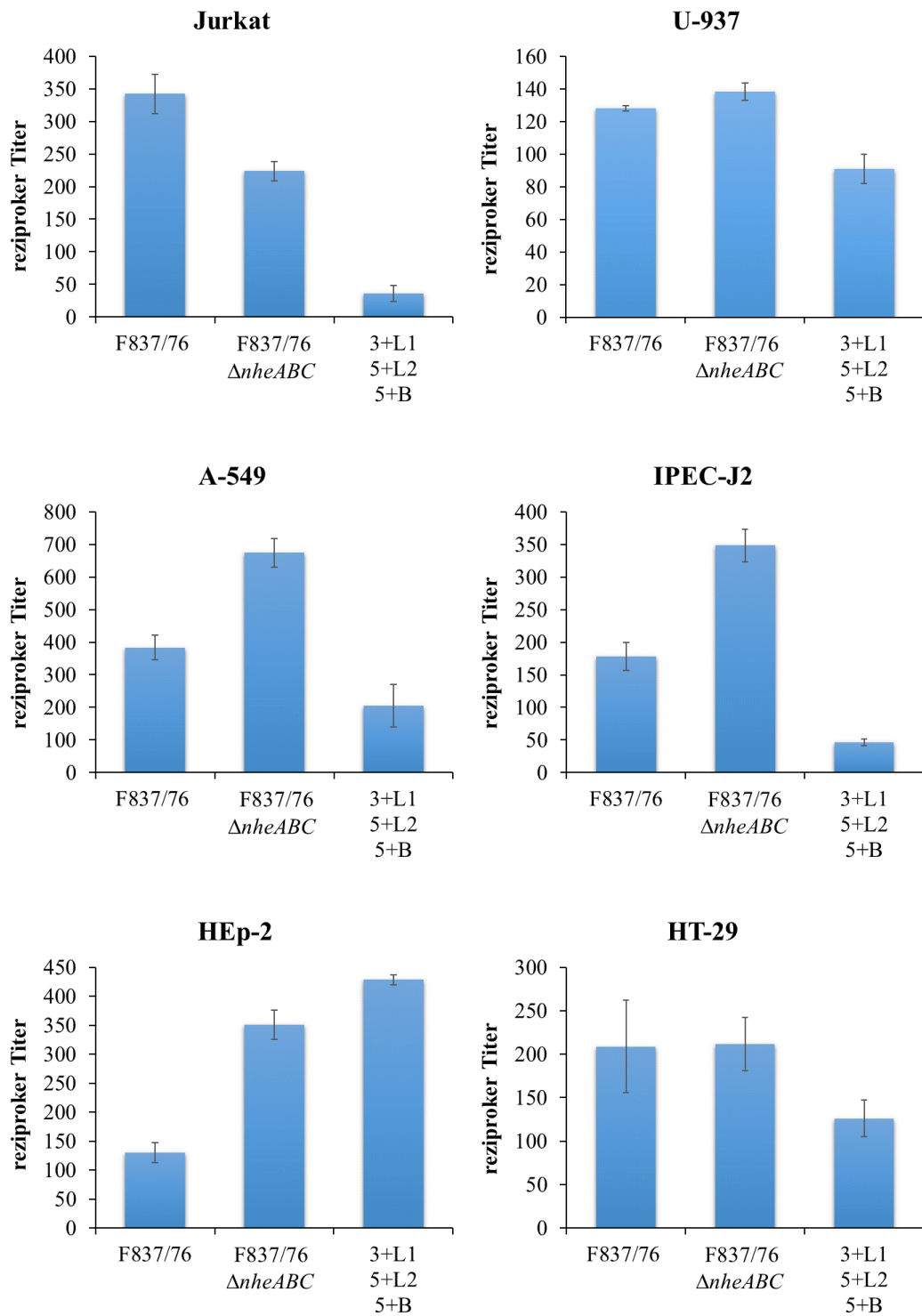
**Abbildung 32:** PI-Test zur Überprüfung der Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und Kulturüberständen von *B. cereus* F837/76 und F837/76  $\Delta nheABC$ .

In WST-1-Bioassays wurde die Zytotoxizität der Kulturüberstände und rHbl-Komponenten gegenüber den unterschiedlichen Zelllinien nach 24 Stunden gemessen. F837/76, ein Nhe- und Hbl-Produzent, zeigte bei allen Zelllinien hohe Zytotoxizität (Abbildung 33). Ebenfalls erreichte der Deletionsstamm F837/76  $\Delta nheABC$  bei allen Zelllinien hohe Titer. Auch rHbl war toxisch gegenüber allen getesteten Zelllinien, allerdings bis auf HEp-2-Zellen meist deutlich geringer als die *B. cereus* Kulturüberstände. Wie im PI-Test wies rHbl auch im WST-1-Bioassay bei den Jurkat-Zellen sehr geringe Zytotoxizität auf, ebenso bei CaCo-2 und RAW 264.7. Bei der Zelllinie U-937 hingegen lag der reziproke Titer von rHbl



mit 91,0 nicht weit unter dem des Deletionsstammes mit 138. Dies stimmt mit dem Ergebnis des PI-Tests (Abbildung 32) überein, bei dem die Fluoreszenz durch rHbl zwar erst spät, dann aber steil anstieg, sodass im WST-1-Bioassay nach 24 Stunden eine hohe Zytotoxizität gemessen werden konnte.





**Abbildung 33:** Überprüfung der Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber Kulturüberständen von F837/76, F837/76  $\Delta nheABC$  sowie rHbl anhand von WST-1-Bioassays.

Insgesamt ließ sich durch die PI- und WST-Tests keine eindeutig resistente Zelllinie gegenüber Hbl identifizieren. Die *B. cereus* Kulturüberstände zeigten schnelle Porenbildung sowie relativ hohe Zytotoxizität gegenüber allen getesteten Zelllinien. Die rHbl-Komponenten hingegen zeigten verzögerten PI-Einstrom und damit evtl. langsamere Zellbindung oder Porenbildung auf Jurkat- und U-937-Zellen sowie generell eine niedrigere zytotoxische Aktivität. Von besonderem Interesse sind HEP-2-Zellen, die als einzige Zelllinie starke Sensitivität gegenüber rHbl zeigten.

## V. DISKUSSION

Immer wieder kommt es zu lebensmittelbedingten Krankheiten durch Infektionen mit *B. cereus* (EFSA, 2018). Die Diarrhö-Form wird durch die beiden Drei-Komponenten-Toxine Nhe und Hbl ausgelöst, deren pathogene Relevanz unumstritten ist (Beecher & Macmillan, 1991, Lund & Granum, 1996). Trotz eingängiger Forschungen ist die Wirkungsweise des Hbl-Komplexes bis heute nicht vollständig geklärt. Bislang weiß man zwar, dass die Komponenten in der Reihenfolge B, L1 und L2 an die Zielzelloberfläche binden. Jedoch kann man keine Aussage darüber treffen, wie es genau zur Porenbildung an der Zelloberfläche kommt oder ob es z. B. wie Nhe Pro-Poren bildet (Zhu et al., 2016). Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, das Zusammenspiel der drei Hbl-Komponenten auf molekularer Ebene genauer zu charakterisieren. Hierfür wurden die Hbl-Komponenten rekombinant hergestellt und deren Wirkungsweise in Zellkultur- und Hämolyse-Tests untersucht. Im Vordergrund standen die Auswirkungen von durch Strep-tags blockierten C- und N-Termini der Proteine sowie von verkürzten Proteinfragmenten auf die toxische Aktivität. Zusätzlich wurden die Epitope der am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch verfügbaren mAk eingegrenzt. Außerdem wurde die Wirkung der rHbl-Komponenten auf Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs und Gewebes getestet.

### 1. Zur Funktionalität der rHbl-Komponenten

Bis vor kurzem war es schwierig, die Wirkungsweise von Hbl in Überständen aus natürlich vorkommenden *B. cereus* Stämmen zu untersuchen, da diese i. d. R. auch immer das Drei-Komponenten-Enterotoxin Nhe sekretieren. Beecher & Macmillan (1991) reinigten die Proteine erstmals über Anionenaustauschchromatographie, sodass die einzelnen Komponenten nicht sicher voneinander getrennt waren. So waren wahrscheinlich Reste der L-Komponenten in der B-Komponente. Schon 1995 schlugen sie daher vor, die Proteine rekombinant herzustellen, um Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten und anderen Proteinen auszuschließen (Beecher et al., 1995). Ryan et al. (1997) überexprimierten die Proteine bereits in *E. coli*, diese wurden jedoch direkt aus dem Zellysate in die SDS-PAGE eingesetzt, wodurch Verunreinigungen nicht ausgeschlossen werden konnten. Auch wurde spekuliert, ob nicht die einzelnen Komponenten toxisch für

*E. coli* sind (Ryan et al., 1997). Tausch et al. (2017) war es erstmals möglich, die Hbl-Komponenten rekombinant in *E. coli* zu überexprimieren und zu reinigen. In der vorliegenden Arbeit wurden die rHbl-Komponenten zusätzlich mit verschiedenen Strep-tags N- wie auch C-terminal versehen und wiederum einzeln aufgereinigt. Durch das Strep-Tactin<sup>®</sup>-System (IBA Lifesciences) war es möglich, das rekombinante Hbl-Protein mit Hilfe des Strep-tags an eine Chromatographiesäule zu binden und die Wirtsproteine auszuwaschen, bevor das gereinigte Protein aufgefangen wurde.

Anschließend wurden die gereinigten rHbl-Komponenten in verschiedenen Tests auf ihre Funktionalität überprüft. In PI-Tests zeigten alle neuen rHbl-Komponenten (5+L1, 3+L2 ZE 1:10, 3+B, 7+L1, 7+L2, 7+B) mit Austausch der Strep-tags (im Vergleich zu rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B; Tausch et al., 2017) Fluoreszenz, im WST-1-Bioassay waren deutliche reziproke Titer ersichtlich, genauso wie sie auch hämolytische Aktivität zeigten. Damit wurde die Funktionalität der einzeln gereinigten rHbl-Komponenten bestätigt.

Entgegen früherer Vermutungen (Beecher & Macmillan, 1991, Ryan et al., 1997) werden alle drei Hbl-Komponenten, L1, L2 und B, für volle biologische Aktivität des Komplexes benötigt. Einzeln sind die Komponenten atoxisch (Sastalla et al., 2013). Dies wurde durch PI-Tests und WST-1-Bioassays belegt, in denen weder eine einzelne Komponente noch eine Kombination aus zwei der drei Hbl-Komponenten eine Pore bildeten (Jessberger et al., 2019). Hier zeigten die zuerst generierten rHbl-Komponenten 3+L1, 5+L2 und 5+B deutliche Toxizität im WST-1-Bioassay, lagen von ihrer Aktivität jedoch deutlich unter der von Überständen des *B. cereus* Stammes F837/76. In PI-Tests erzeugten sie nach ca. 25 min Fluoreszenz, während der Überstand von F837/76 sofortigen PI-Einstrom zeigte. Dennoch sind sie in der Lage, Poren zu formen und zytotoxisch gegenüber Zellen zu wirken (Tausch et al., 2017).

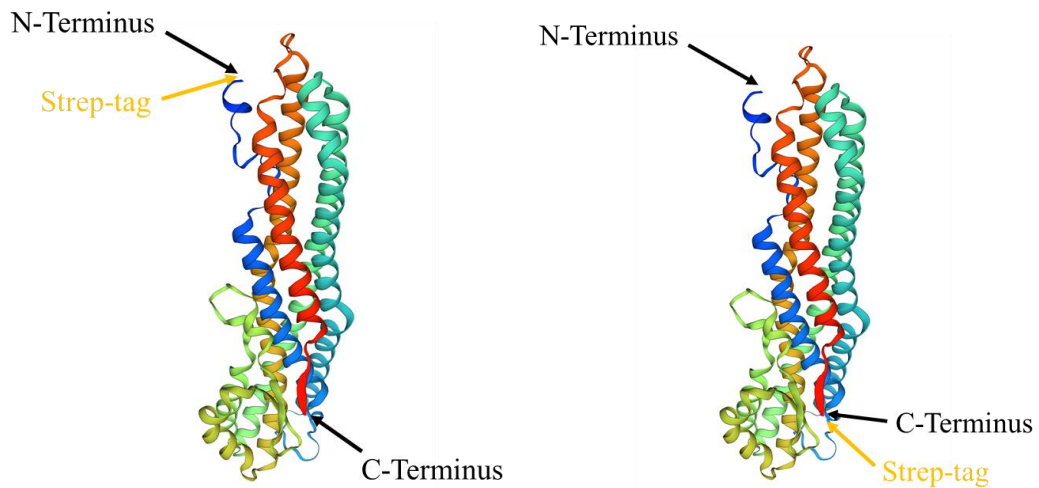
Bei den Untersuchungen zur Auswirkung der Lage des Strep-tags auf die Funktionalität der rHbl-Komponenten fiel eine deutlich spätere Fluoreszenzzunahme im PI-Test bei den Kombinationen mit rHbl 3+B im Vergleich zu rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) auf, d. h. wenn der Strep-tag an rHbl B vom N- zum C-terminalen Ende getauscht ist. Auch eine reduzierte hämolytische Aktivität konnte festgestellt werden. Im WST-1-Bioassay dagegen zeigte sich nach 24 Stunden keinerlei Unterschied mehr in der Zytotoxizität. Dies

legt die Vermutung nahe, dass Hbl B durch einen C-terminalen Strep-tag an einer schnellen Interaktion mit der Zielzelle gehindert wird. Untersuchungen im Durchflusszytometer belegten dies. rHbl 3+B zeigte nach 5 min Inkubation deutlich geringere Fluoreszenz als rHbl 5+B, also deutlich weniger Bindung an Vero-Zellen. Allerdings wiesen auch die Kombinationen mit rHbl 7+B spätere Fluoreszenzzunahme im PI-Test auf. Bei rHbl 7+B liegt der Strep-tag, wie bei rHbl 5+B, N-terminal. Allerdings unterscheiden sich Sequenz und Länge des Linkers (Zwischenstücks) abhängig von der Klonierungsstrategie (Abbildung 34). Mit Hilfe von SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) wurde eine 3D-Proteinstruktur von Hbl B erstellt. Als Template diente die Kristall-Struktur von Hbl B (2nrj.1.A; Madegowda et al., 2008), N- und C-Terminus sowie die Lage des Strep-tags sind eingezeichnet (Abbildung 35). Zum Vergleich ist in Abbildung 36 die 3D-Struktur von Madegowda et al. gezeigt. Hbl B besitzt eine vorwiegend  $\alpha$ -helikale Struktur. Die Polypeptidkette besteht aus sieben Haupthelices mit ein paar kürzeren  $\alpha$ -helikalen Segmenten und einem kurzen C-terminalen  $\beta$ -Strang und kann in eine Kopf- und eine Schwanzdomäne geteilt werden. Die Kopfdomäne beinhaltet eine  $\beta$ -Haarnadel, zwei  $\alpha$ -Helices sowie zwei weitere kurze  $\alpha$ -Helices mit vier Resten. Die Schwanzdomäne besteht aus den restlichen fünf  $\alpha$ -Helices (Madegowda et al., 2008). Während der N-Terminus an der Schwanz-Domäne eher frei zu sein scheint, liegt der C-Terminus an der Kopf-Domäne nahe der  $\beta$ -Faltblattstruktur. Der Strep-tag am C-Terminus könnte also den C-terminal gelegenen  $\beta$ -Strang in seiner Funktion stören. Außerdem könnte der Strep-tag am C-Terminus die tertiäre Struktur des Proteins verändern, sodass eine Bindung an die Zielzellmembran schwieriger wird. Diese Strukturanalysen liefern jedoch keine Erklärung für die verzögerte Bindung von rHbl 7+B. Der N-Terminus des Proteins ist frei zugänglich (Abbildung 35) und mit dem Strep-tag aus dem pASK-IBA5plus System war eine schnelle Fluoreszenzzunahme in PI-Tests zu erkennen. Damit ist es unwahrscheinlich, dass der Strep-tag von rHbl 7+B das Protein an der Interaktion mit den Zielzellen hindert. Um die Ursache für die langsamere Bindung von rHbl 7+B zu finden, benötigt es weitere Forschung.

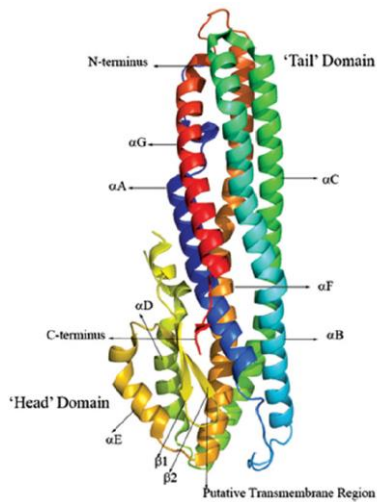
MASWSHPQFEKGAETAVPNSSSVPASEIEQTNNGDTALSANEAKMKETLQKAGLFAKSMN  
 AYSYMLIKNPDVNFEGITINGYVDLPGRIVQDQKNARAHAVTWDTKVKKQLLDTLTGIVE  
 YDTTFDNY~~YETMVEAINTGDGETLKEGITDLRGEIQNQKYAQQ~~LIEELTKLRDSIGHDV  
 RAFGSNKELLQSILKNQGADVDADQKRLEEVVLSVNYKQLESDGFNVMKGAILGLPIIG  
 GIIVGWARDNLGKLEPLLAELRQTVDYKVTLNRRVVGVAYSNINEMHKALDDAINALTYMS  
 TQWHDLDSQYSGVLGHIENAAQKADQNKFKFLKPNLNAAKDSWKTLRTDAVTLKEGIKEL  
 KVETVTPQK

MASWSHPQFEKIEGRDRGASEIEQTNNGDTALSANEAKMKETLQKAGLFAKSMNAYSYMLI  
 KNPVDVNFEGITINGYVDLPGRIVQDQKNARAHAVTWDTKVKKQLLDTLTGIVEYDTTFDNY  
 YETMVEAINTGDGETLKEGITDLRGEIQNQKYAQQ~~LIEELTKLRDSIGHDV~~RAFGSNKE  
 LLQSILKNQGADVDADQKRLEEVVLSVNYKQLESDGFNVMKGAILGLPIIGGIIVGVAR  
 DNLGKLEPLLAELRQTVDYKVTLNRRVVGVAYSNINEMHKALDDAINALTYMSTQWHDLDS  
 QYSGVLGHIENAAQKADQNKFKFLKPNLNAAKDSWKTLRTDAVTLKEGIKELKVETVTPQ  
 K

**Abbildung 34:** Proteinsequenzen von rHbl 5+B (oben) und rHbl 7+B (unten) mit Strep-tag (gelb), Zwischenstück (grün) und Faktor Xa Erkennungssequenz (rot).



**Abbildung 35:** 3D-Proteinstruktur von Hbl B mit Markierung der Strep-tags für rHbl 5+B und 7+B (links) sowie 3+B (rechts) (anhand von <https://swissmodel.expasy.org>).



**Abbildung 36:** 3D-Proteinstruktur von Hbl B mit Kopf- und Schwanzdomäne (Madegowda et al., 2008).

Mit Hilfe der Protease Faktor Xa und der spezifischen Sequenz „IEGR“ (vgl. Abbildung 34) wurde der N-terminale Strep-tag der rHbl-Komponenten 7+L1, 7+L2 und 7+B abgespalten. Im WST-1-Bioassay wiesen diese Proteine nach 24 Stunden Inkubation einen etwas höheren reziproken Titer (71,8) im Vergleich zu denen mit Strep-tag (63,8) auf. In PI-Tests zeigten sie allerdings keine Verbesserung der porenbildenden Aktivität im Vergleich zu denen mit noch vorhandenem Strep-tag. Diese, entgegen den Erwartungen, kaum gesteigerte Aktivität könnte zum einen darin begründet sein, dass der bestehende N-terminale Aminosäuren-Rest „RDRGA“ (siehe Abbildung 34) die Proteinstruktur beeinflusst. Zum anderen könnten die Proteine durch die sechsstündige Inkubation mit der Protease bei RT geschädigt worden sein. Generell stellt sich die Abspaltung des Strep-tags problematisch dar, da die Protease sich kaum wieder extrahieren lässt. Da sie mit einem Molekulargewicht von 43 kDa in der Größe der Hbl-Komponenten liegt, war eine Trennung der Proteine nach deren Molekulargewichten innerhalb dieser Arbeit nicht möglich. Der Hersteller (New England BioLabs) schlägt eine Inaktivierung über die Chemikalie Dansylchlorid-Glutaminsäure-Glycin-Arginin-Chloromethyl-Keton (Calbiochem, 251700) vor. Diese inaktiviert den Faktor Xa über kovalente Bindung an der aktiven Stelle (Datasheet, New England BioLabs). Da sich diese Chemikalie auch in der Zellkultur negativ auswirken könnte, wurde von der Inaktivierung abgesehen und die rHbl 7+ Komponenten zusammen mit der Protease eingesetzt. Diese allein hatte



keinen Einfluss auf die Zellkulturtests (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich haben die rHbl 7+ Komponenten mit Faktor Xa Schnittstelle den Vorteil, dass die Strep-tags abgespalten werden können, die evtl. Proteinkonformationen, -interaktionen oder -aktivitäten stören. Nach Faktor Xa Behandlung änderte sich deren Aktivität allerdings kaum.

Generell wurde für alle rekombinant hergestellten Hbl-Komponenten eine niedrigere porenbildende sowie zytotoxische Aktivität festgestellt als für Hbl aus *B. cereus* Kulturüberständen. Letztere zum detaillierten Test der Wirkungsweise von Hbl heranzuziehen, gestaltet sich allerdings schwierig, da im Kulturüberstand auch immer weitere Proteine und Virulenzfaktoren vorliegen, wie z. B. das zweite Drei-Komponenten-Toxin Nhe (Beecher & Macmillan, 1991, Beecher & Wong, 1994b). Enteropathogene Stämme tragen neben dem *hbl* auch immer das *nhe* Operon. Während die Gene von Nhe in allen enteropathogenen Stämmen zu finden sind, sind die von Hbl nur in 40 - 80 % der Stämme vorhanden (Hwang & Park, 2015, Kim et al., 2015, Tallent et al., 2015). Bei einer Reinigung der Proteine durch Anionenaustauschchromatographie, wie es in früheren Studien üblich war (Beecher & Macmillan, 1991), konnten Spurenkontaminationen durch andere Proteine nicht ausgeschlossen werden (Beecher et al., 1995). Der allgegenwärtigen Präsenz von Nhe wurde durch die Erstellung des Deletionsstammes F837/76  $\Delta nheABC$  Abhilfe geschaffen (Tausch et al., 2017).

Dennoch finden sich in *B. cereus* Kulturüberständen etliche weitere, sekretierte Virulenzfaktoren, über deren Beteiligung an der Pathogenese spekuliert wird. EntFM, das erstmals 1991 als Enterotoxin beschrieben wurde, zeigt vaskuläre Permeabilität, Zytotoxizität gegenüber Vero-Zellen und verursacht Flüssigkeitsansammlung in ligierten Darmschleifen von Mäusen (Shinagawa et al., 1991). Es weist drei SH3-Domänen auf, von denen bekannt ist, dass sie bei Protein-Protein-Interaktionen mit einer NlpC/P69 Domäne beteiligt sind, die Ähnlichkeiten mit Zellwand-Peptidasen aufweist (Boonchai et al., 2008, Clair et al., 2010). Das Enterotoxin-Gen ist sowohl in *B. thuringiensis* als auch in *B. cereus* Stämmen weit verbreitet (Asano et al., 1997). In einer Studie von Ngamwongsatit et al. (2008b) konnte *entFM* in allen insgesamt 616 getesteten *B. cereus* und *B. thuringiensis* Stämmen nachgewiesen werden und Boonchai et al. (2008) stellten fest, dass das *entFM* Gen das am weitesten verbreitete Enterotoxin-Gen in der *B. cereus* Gruppe ist. Drei vermutliche Enterotoxine, EntA, EntB und EntC, zeigten ebenso wie

EntFM Ähnlichkeiten mit SH3-Domänen enthaltenen Enterotoxinen und besitzen auch vermeintliche Zellwandpeptidasen-Domänen (Clair et al., 2010).

Des Weiteren sind verschiedene porenformende Hämolsine beschrieben. Hämolsin I bzw. Cereolysin O ist ein hitzelabiles Protein, dessen hämolytische Aktivität durch Cholesterol inhibiert werden kann, es gehört zur Familie der Cholesterol abhängigen Zytolsine (Ramarao & Sanchis, 2013). Hämolsin II gehört neben CytK und  $\alpha$ -Hämolsin aus *S. aureus* zur Familie der  *$\beta$ -barrel pore-forming toxins* (Cadot et al., 2010, Fagerlund et al., 2004). Im Gegensatz zu vielen anderen *B. cereus* Virulenzfaktoren wird dessen Transkription nicht durch PlcR reguliert, sondern negativ von HlyIIR (Budarina et al., 2004). Hämolsin III ist mit 24,4 kDa das kleinste der Hämolsine und bildet einen Porendurchmesser von 3 - 3,5 nm (Baida & Kuzmin, 1995, Baida & Kuzmin, 1996). Wahrscheinlich agiert das Toxin PlcR unabhängig, da keine hochkonservierte palindromische Region im Promotorbereich gefunden wurde. Genauso konnte bislang nicht bewiesen werden, ob es überhaupt von *B. cereus* sekretiert wird (Ramarao & Sanchis, 2013). Hämolsin IV, auch als Zytotoxin K bekannt, weist 37%ige Übereinstimmung in seiner Aminosäuresequenz mit der von Hämolsin II auf und 30 % mit der von  $\alpha$ -Hämolsin aus *S. aureus* (Ramarao & Sanchis, 2013). Damit wurde es mit in die Gruppe der  *$\beta$ -barrel pore-forming toxins* aufgenommen (Lund et al., 2000). CytK-2 weist gleiche Eigenschaften zu dem originären CytK-1 auf, hat jedoch deutlich niedrigere Titer in Zellkulturtests (Fagerlund et al., 2004). Die Prävalenz des *cytK-2* Gens überwiegt deutlich die des *cytK-1* (Castiaux et al., 2015, Guinebretière et al., 2006, Reis et al., 2019). Auch die beiden Zink-Metalloproteasen InhA1 und NprA werden sezerniert (Haydar et al., 2018). InhA1 hilft NprA von seiner Propeptidform in die aktive Form zu wechseln, indem es dieses spaltet. Besonders durch NprA ist es *B. cereus* Sporen möglich, in Makrophagen zu überleben und diesen zu entkommen. Damit stellt NprA einen entscheidenden Faktor dar, um dem Immunsystem des Wirtes entgegenzuwirken (Haydar et al., 2018). Für die Sphingomyelinase wurde bereits eine synergistische Interaktion mit Nhe gezeigt (Doll et al., 2013). Ob einige der sekretierten Faktoren auch mit den Hbl-Komponenten interagieren, ist bislang nicht bekannt. Dennoch bietet die Verwendung rekombinant hergestellter Hbl-Komponenten den Vorteil, dass Kreuzkontaminationen oder -interaktionen mit anderen *B. cereus* Toxinen oder Virulenzfaktoren ausgeschlossen werden. Damit sind die rekombinant exprimierten

Einzelkomponenten das geeignetste und effektivste Mittel zur Untersuchung der komplexen Wirkungsweise von Hbl.

## **2. Zur Identifizierung funktionell wichtiger Bereiche der Hbl-Komponenten**

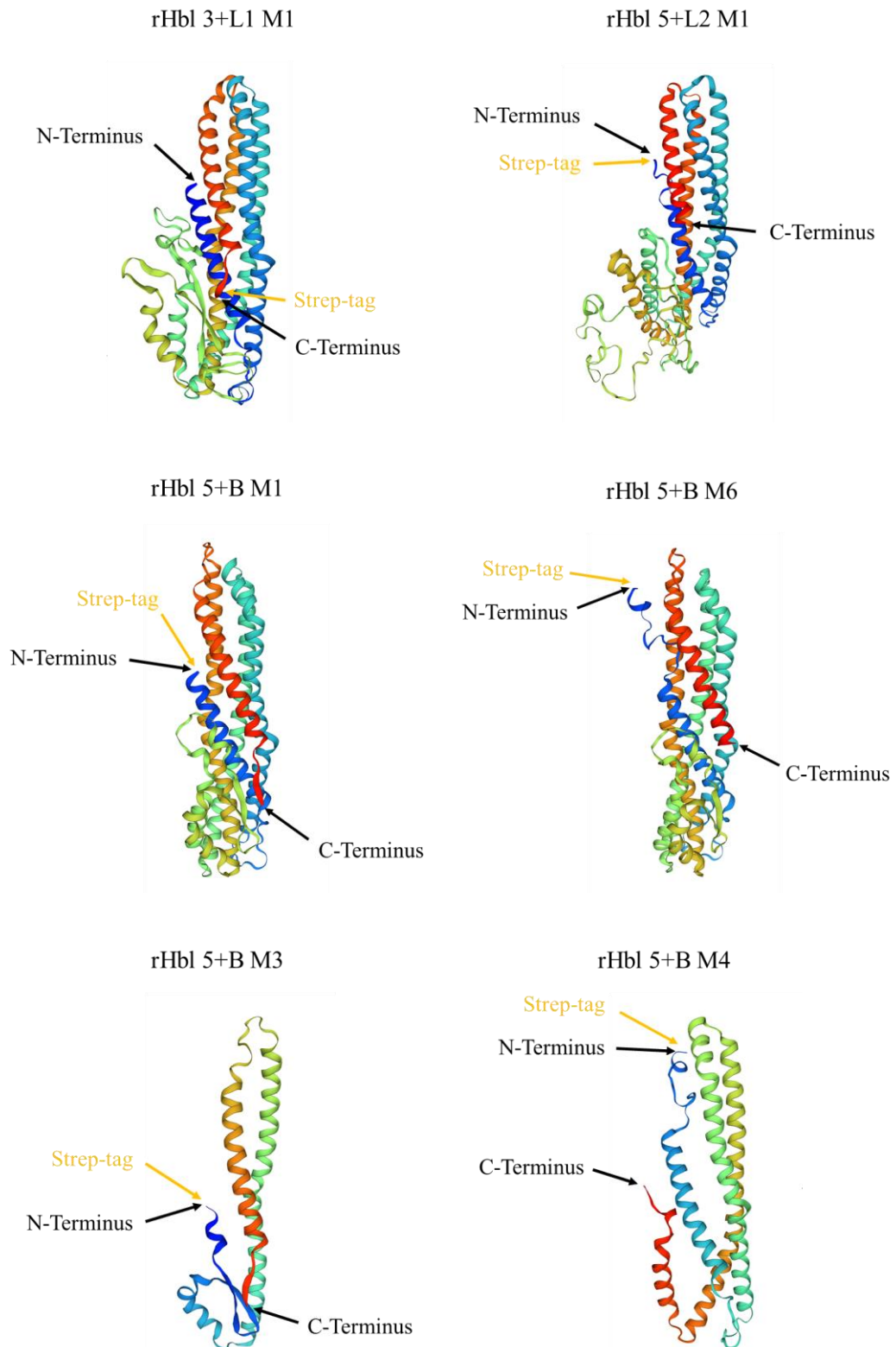
Um funktionell wichtige Bereiche der drei Hbl-Komponenten zu untersuchen, wurden verkürzte Varianten der rekombinanten Proteine hergestellt. Bei dem porenformenden Toxin Cry4A von *B. thuringiensis* konnten bereits durch Herstellung von Mutanten und Überexpression in *E. coli* wichtige Bereiche für dessen Toxizität eingegrenzt werden. Das Protein besteht aus drei Domänen, eine aufgebaut aus  $\alpha$ -Helices, zwei bestehend aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Angsuthanasombat et al., 2004). Es konnte festgestellt werden, dass die Interaktion zweier Fragmente für die Toxizität von CryA und die Helices  $\alpha_4$  und  $\alpha_5$  für die insektizide Wirkung notwendig sind (Yamagiwa & Sakai, 2003).

In Zellkulturtests zeigten die Hbl-Varianten 3+L1 M1, 5+L2 M1, 5+B M1 und M6 im Austausch mit rHbl 3+L1, 5+L2 und 5+B (Tausch et al., 2017) zytotoxische Aktivität. rHbl 3+L1 M1 fehlen 17 Aminosäuren N-terminal, rHbl 5+L2 M1 13 Aminosäuren N-terminal, rHbl 5+B M1 16 Aminosäuren N-terminal und rHbl 5+B M6 11 Aminosäuren C-terminal (siehe Abbildung 20). Zur Veranschaulichung wurden 3D-Proteinstrukturen dieser verkürzten Varianten anhand von SWISS-MODEL erstellt (Abbildung 37). Als Template diente bei rHbl 3+L1 M1 sowie rHbl 5+B M1 und M6 die Kristall-Struktur von Hbl B (2nrj.1.A; Madegowda et al., 2008), bei rHbl 5+L2 M1 aufgrund größerer Sequenzidentität die Struktur von NheA (4k1p.1.A; Ganash et al., 2013). N- und C-Terminus sowie die Lage des Strep-tags sind markiert (Abbildung 37). Fehlen mehr als 17 Aminosäuren N- oder C-terminal, scheint eine Interaktion der Proteine mit der Zelloberfläche bzw. mit den anderen Komponenten nicht mehr möglich zu sein.

Die Proteinstruktur von rHbl 3+L1 M1 kommt der Kristallstruktur von Hbl B sehr nahe (vgl. Abbildung 36). Zu sehen ist eine Kopf- und Schwanzdomäne wie bei Hbl B mit fünf langen  $\alpha$ -Helices in der Schwanzdomäne. Nur die erste  $\alpha$ -Helix ist am N-terminalen Ende durch die deletierten Aminosäuren verkürzt. rHbl 5+L1 M1 wurde anhand der Struktur des NheA modelliert. NheA gleicht in seiner

Kristallstruktur sehr der des Hbl B, weist allerdings nur 20 % Sequenzhomologie mit Hbl B auf, da es vor allem aus  $\alpha$ -Helices besteht. Das NheA hat wie Hbl B eine Schwanzdomäne mit fünf  $\alpha$ -Helices (Ganash et al., 2013). Diese sind auch im Modell von rHbl 5+L2 M1 wiederzuerkennen. Im Gegensatz zu NheA zeigt rHbl 5+L2 M1 in der Kopfdomäne allerdings zusätzlich zu den zwei  $\alpha$ -Helices weitere Strukturen, die keine eindeutigen  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter erkennen lassen. Die Proteinstrukturen der verkürzten Varianten rHbl 5+B M1 und M6 gleichen sehr der von Hbl B, sind lediglich am N- bzw. C-Terminus um die entsprechende Anzahl an Aminosäuren verkürzt. Dadurch liegt der N-Terminus von rHbl 5+B M1 näher an der Schwanzdomäne. (Die Modelle wurden im Vergleich zu den anderen leicht um die X-Achse gedreht, damit beide Termini sichtbar sind.) Zum Vergleich wurden Modelle von rHbl 5+B M3 und M4 (keine toxische Aktivität) erstellt, welche aus nur noch 171 bzw. 223 Aminosäuren bestehen (das vollständige rHbl B besteht aus 369 Aminosäuren, vgl. Abbildung 20). Das Modell von rHbl 5+B M3, dem 198 Aminosäuren N-terminal fehlen, beschränkt sich auf nur zwei lange  $\alpha$ -Helices, lässt nur noch eine kurze Kopfdomäne erkennen und weist insgesamt eine reduzierte Tertiärstruktur auf (Abbildung 37). rHbl 5+B M4, dem 146 Aminosäuren C-terminal deletiert sind, zeigt sich ähnlich. Bei diesem ist keinerlei Kopfdomäne mehr erkennbar, es beschränkt sich auf vier  $\alpha$ -Helices, wobei die vierte C-terminal stark verkürzt ist.

Für die Funktionalität der Hbl-Komponenten sind N-terminal nur die ersten 17 Aminosäuren von L1, die ersten 13 Aminosäuren von L2 und die ersten 16 Aminosäuren von B sowie C-terminal die letzten 11 Aminosäuren von B vernachlässigbar.



**Abbildung 37:** 3D-Proteinstrukturen der funktionellen, verkürzten Varianten rHbl 3+L1 M1, 5+L2 M1, 5+B M1 und M6, zum Vergleich die nicht funktionellen rHbl 5+B M3 und M4 (anhand von <https://swissmodel.expasy.org>).

Außerdem wurden die am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch verfügbaren mAk in EIAs mit den verkürzten rHbl-Varianten eingesetzt. Bei der Bindung erkennt ein Antikörper nur einen kleinen Bereich der molekularen Struktur des Antigens, die Antigendeterminante oder das Epitop. Proteine besitzen i. d. R. viele verschiedene Epitope, die von unterschiedlichen Antikörpern erkannt werden können. Die Antikörperbindung an sein Epitop erfolgt über physikochemische Wechselwirkungen und ist eine reversible, nicht-kovalente Bindung. Nur durch eine komplementäre dreidimensionale Struktur ist eine starke Bindung bzw. eine hohe Antikörperaffinität möglich (Bröker et al., 2019, Murphy & Weaver, 2018, Rink et al., 2012).

Bei rHbl 3+L1 war keine Epitopeingrenzung der mAk 1G8 und 12D12 möglich. Auch ein Alignment der ersten 25 Aminosäuren von Hbl L1 mit der vollständigen Sequenz von Hbl B ließ keine Epitopeingrenzung der kreuzreaktiven mAk zu, da die beiden Proteinsequenzen keine Übereinstimmung in mehreren aufeinanderfolgenden Aminosäuren zeigten. Der mAk 1E9 konnte rHbl 3+L1, 3+L1 M1 und M4 binden, wodurch sich dessen Epitop im Bereich der Aminosäuren 18 - 219 befindet. Sowohl mAk 1F8 als auch mAk 2A3 konnte rHbl 3+L1 M1 und M3 binden. Damit liegen deren Epitope zwischen Aminosäure 235 und 392.

Bei den mAk 1D8, 1H9 und 8B12, die an Hbl L2 binden, konnten Bindungen an rHbl 5+L2, 5+L2 M1, M3, M5, M6, M7 und M8 nachgewiesen werden. Somit ergeben sich Epitope im Bereich der Aminosäuren 234 - 318. Bei dem mAk 1A12 konnten Absorptionswerte nur bei rHbl 5+L2, 5+L2 M1 und M6 gemessen werden. Dabei fehlen rHbl 5+L2 M1 13 Aminosäuren N-terminal und rHbl 5+L2 M6 30 Aminosäuren C-terminal (siehe Abbildung 20). Allen anderen verkürzten Varianten von rHbl 5+L2 fehlen deutlich mehrere Aminosäuren. Dies unterstützt die Theorie, dass der mAk für eine Bindung an der Zielsequenz eine intakte Tertiärstruktur benötigt.

Bei den Hbl B spezifischen mAk 1B8, 2G4, 1D12, 11A5, 1G8, 12D12, 1D7 und 1C12 gestaltete sich eine Eingrenzung der Epitope schwierig. Die mAk 1D12, 11A5, 1G8, 12D12 und 1D7 wiesen Absorptionswerte bei rHbl 5+B, 5+B M1 und M6 auf. Zusätzlich zeigten die mAk 1G8 und 12D12 geringe Absorption bei rHbl 5+B M4. Demnach könnten deren Epitope zwischen Aminosäure 17 und 223 liegen, jedoch zeigten die mAk keine Interaktionen mit weiteren verkürzten Varianten. Dadurch kann diese Vermutung nicht sicher bestätigt werden. Der mAk

1B8 band an rHbl 5+B, 5+B M1, M5 und M6, wodurch sich lediglich die Aminosäuren 1 - 16 und 321 - 369 von Hbl B als Epitope ausschließen lassen. Bindung an rHbl 5+B, 5+B M1, M2, M4, M6, M7 und minimal an M5 zeigte der mAk 2G4. Dadurch liegt dessen Epitop zwischen Aminosäure 90 und 198. Der mAk 1C12 band an rHbl 5+B, 5+B M1, M2, M3, M4, M5, M6 und M7 mit sehr unterschiedlichen Bindungskapazitäten, weshalb sich kein eindeutiges Epitop eingrenzen ließ. rHbl 5+B M8 zeigte vermutlich unspezifische Bindungen und wurde deswegen nicht mit in die Auswertungen einbezogen. Auch hier lässt sich durch die gleichen Bindungen der mAk 1D12, 11A5 und 1D7 (rHbl 5+B, 5+B M1 und M6) vermuten, dass diese mAk nicht mehr binden können, wenn viele Aminosäuren fehlen, d. h. eine intakte Tertiärstruktur für die Bindung benötigen.

### 3. Modell der Hbl-Porenbildung an der Zielzellmembran

Trotz einer Vielzahl von Publikationen über *B. cereus* und dessen Drei-Komponenten-Toxin Hbl konnten bislang nur wenige Details zur Porenbildung herausgefunden werden. In frühen spektrophotometrischen Assays konnte Hämolyse mit einer Kombination aus Hbl B und L2 beobachtet werden, und Hbl B und L1 bewirkten kleine Ödeme (Beecher & Macmillan, 1991). Sastalla et al. (2013) hingegen konnten keine Aktivität durch eine Kombination aus lediglich zwei Hbl-Komponenten feststellen. Zusätzlich testeten sie die Bindungsreihenfolge der einzelnen Komponenten an CHO-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung von zellgebundenen Proteinen mit Antikörpern und anschließender konfokaler Mikroskopie. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Hbl B die einzige Komponente war, die an die Zellen gebunden hat und nur Hbl L1 mit Hbl B reagierte. So ergab sich eine Bindungsreihenfolge von Hbl B, L1 und anschließend L2. Mit den aus *E. coli* gereinigten rHbl-Komponenten konnte die Bildung von Hbl-Komplexen untersucht werden (Tausch et al., 2017). In Dot Blots und EIAs mit spezifischen mAk konnte Komplexbildung sowohl zwischen rHbl B und L1 als auch rHbl L1 und L2 nachgewiesen werden. Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen bestätigten diese Bindung mit  $K_D$  Werten von  $4,7 \times 10^{-7}$  M bzw.  $3,4 \times 10^{-6}$  M. Diese Komplexbildungen wurden auch in natürlichen *B. cereus* Kulturüberständen in Sandwich EIAs nachgewiesen. Deutliche Interaktion zwischen (r)Hbl B und L2 wurde nicht detektiert. Auch Jessberger et al. (2019)

konnten in WST-1-Bioassays und PI-Tests verdeutlichen, dass einzelne bzw. zwei Komponenten nicht in der Lage sind, eine Pore zu bilden bzw. zytotoxische Aktivität aufzubauen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Porenbildung von der molaren rHbl-Konzentration abhängt. Außerdem wurde beobachtet, dass ein Überschuss an rHbl 5+B die Porenbildung beschleunigt, während ein Überschuss an rHbl 3+L1 die Porenbildung hemmt. Durch einen PI-Test mit einzelner Zugabe der rHbl-Komponenten und dazwischen gelegenen Waschschrritten und durch Durchflusszytometrie mit gleichem Verfahren konnte Sastallas aufgestellte Theorie der sequentiellen Bindung der einzelnen Komponenten bewiesen werden (Jessberger et al., 2019). Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Hbl B offensichtlich einen freien C-Terminus zur Interaktion mit der Zielzellmembran benötigt, da es mit dem Strep-tag am C-Terminus deutlich längere Zeit brauchte, um an die Zelle zu binden. Gleichzeitig wurden die zwei älteren, in der Literatur vorhandenen Theorien zur Wirkungsweise von Hbl widerlegt. Beecher & Wong (1997) gingen von einem „Membranangriffskomplex“ aus, bei dem alle Komponenten unabhängig voneinander an die Zelle binden und darauf einen Komplex bilden, bevor es zur Läsion der Zielzellmembran kommt. In dieser Theorie muss Hbl B eine autonome Reaktion durchlaufen, bevor mit Hbl L1 und L2 eine Pore gebildet werden kann. Ein anderes Modell von Madegowda et al. (2008) ließ vermuten, dass Hbl B über verschiedene Übergangsformen alleine eine Pore bildet. Ähnlich zu Cytolysin A aus *E. coli* soll es zur Mono-Oligomerisierung fähig sein.

Das zweite Drei-Komponenten-Toxin von *B. cereus*, Nhe, benötigt, genauso wie Hbl, für seine volle biologische Aktivität alle drei Komponenten. Für eine maximale zytotoxische Aktivität müssen diese jedoch im molaren Verhältnis von 10:10:1 (NheA:NheB:NheC) vorliegen (Lindbäck et al., 2004). In planaren Lipiddoppelschichten bildet Nhe Poren und es bewirkt eine Epithelzellvergrößerung bevor es zum Zelltod kommt (Fagerlund et al., 2008). Ebenso wie Hbl benötigt Nhe eine spezifische Bindungsreihenfolge, um seine Toxizität entfalten zu können (Lindbäck et al., 2010). Man geht davon aus, dass NheC und NheB in Lösung hochaffine Komplexe mit  $K_D$  Werten von  $4,8 \times 10^{-10}$  M bilden und diese dann an die Zelloberfläche binden, wodurch zunächst permeable Pro-Poren gebildet werden. Bei ausreichender Menge an NheB/C-Komplexen und freiem NheB entwickelt sich eine ringförmige Struktur. Nach



Konformationsänderungen heftet sich NheA an das bereits gebundene NheB und vervollständigt die Transmembranpore (Didier et al., 2016, Heilkenbrinker et al., 2013, Zhu et al., 2016). Insgesamt ist über den Mechanismus der Porenbildung von Nhe also inzwischen deutlich mehr bekannt als über den von Hbl. Insbesondere unterscheidet es sich durch Bildung der Pro-Pore, was bei Hbl bisher nicht festgestellt werden konnte (Tausch et al., 2017). Hbl L1 verstärkt jedoch evtl. die Bindung von Hbl B an die Zelloberfläche (Jessberger et al., 2019). Ein weiterer Unterschied ist die Tatsache, dass große Mengen an NheC die Toxizität inhibieren (Lindbäck et al., 2004), während große Mengen an Hbl B die Porenbildung beschleunigen (Jessberger et al., 2019).

Die beiden Toxinkomplexe weisen auch große Sequenzhomologien auf. Diese sind sowohl zwischen den drei Komponenten innerhalb eines Komplexes erkennbar als auch zwischen den Proteinen von Nhe und Hbl. Obwohl Hbl L1 und Hbl B eine 22%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz besitzen, können diese sich nicht gegenseitig ersetzen (Ryan et al., 1997). Wenn man zusätzlich zu den DNA- bzw. Protein-Sequenzen die Transmembran-Helices in den Vergleich mit einbezieht, haben die größten Ähnlichkeiten NheA und Hbl L2, NheB und Hbl L1 sowie NheC und Hbl B (Granum et al., 1999). Sastalla et al. zeigten 2013, dass, obwohl Hbl und Nhe gleichzeitig exprimiert werden, die einzelnen Komponenten weder kompatibel sind noch einander ergänzen können. Die sequentielle Bindung wird immer initiiert durch NheC bzw. Hbl B, gefolgt von NheB bzw. Hbl L1 und anschließend der jeweiligen dritten Komponente NheA bzw. Hbl L2.

Bei der Bindung von Hbl an die Zelloberfläche bleibt weiterhin unklar, wie viele Moleküle der einzelnen Komponenten für die Porenbildung notwendig sind, ob es, wie bei Nhe, zu Konformationsänderungen kommt und welche Strukturen der Proteine an den Interaktionen beteiligt sind. Dass die rHbl-Komponenten nicht mehr funktional sind, wenn mehr als 17 Aminosäuren N- oder C-terminal deletiert sind (diese Arbeit), lässt jedoch vermuten, dass diese, wie Nhe, bei der sequentiellen Bindung an die Zelloberfläche Konformationsänderungen vollziehen, die mit einer reduzierten Tertiärstruktur nicht mehr möglich scheinen.

Neben den beiden Drei-Komponenten-Toxinen von *B. cereus* wurden viele binäre Toxine beschrieben, einige schädigen die Zelle durch Porenbildung (Barth et al., 2004). Die binären Toxine von *B. anthracis* wurden als erste Mehr-Komponenten-Toxine in der Literatur beschrieben (Smith et al., 1956). Sie bestehen aus den drei

synergistisch agierenden Proteinen, dem Protektiven Antigen (PA), dem Letalfaktor (LF) und dem Ödemfaktor (EF) (Pezard et al., 1991, Smith, 2002). Einzeln sind diese, wie die Hbl-Komponenten, atoxisch (Liu et al., 2014b). Allerdings können sie als Binärkombinationen zwei aktive Toxine bilden, das letale Toxin (PA + LF) und das ödematisierende Toxin (PA + EF) (Friebe et al., 2016). Dabei bildet PA die zelluläre Bindungseinheit und LF sowie EF bilden die katalytischen Einheiten des Toxins. PA bindet an einen Rezeptor, worauf es durch Furin oder eine Furin ähnliche Protease gespalten wird und so eine kürzere Form von PA entsteht. Durch Abspaltung von 20 Aminosäuren ist es in der Lage, Oligomere zu bilden, was durch sterische Hinderung vorher nicht möglich war (Kintzer et al., 2009). Der Rezeptor-Toxin-Komplex wird darauf über Endozytose internalisiert. Nach Konformationsänderungen des PA formt es eine Pore, die als Translokationskanal für die beiden enzymatischen Untereinheiten dient. Diese gelangen entweder direkt über den Kanal ins Zytoplasma oder über intraluminale Vesikel und darauffolgende Rückfusion dieser mit der Endosomenmembran (Liu et al., 2014b, Moayeri et al., 2015). LF stellt eine Zink-Metalloprotease und EF eine Calmodulin abhängige Adenylatcyclase dar (Klimpel et al., 1994, Leppla, 1982). Diese beiden Enzyme manipulieren den Zellstoffwechsel bis hin zum Zelltod und verändern die Zellsignalwege im Wirt, um die angeborenen Immunantworten zu stören (Liu et al., 2014b, Moayeri et al., 2015). Madegowda et al. (2008) vermuteten, dass die beiden lytischen Hbl-Komponenten L1 und L2, genauso wie LF und EF, in die Zelle über die von Hbl B gebildete Pore eindringen und so wie die beiden katalytischen Komponenten von *B. anthracis* zum Zelltod führen können. Dies konnte bislang allerdings nicht belegt werden. Insgesamt kann zumindest die sequentielle Bindung der Toxine von *B. anthracis* vergleichsweise zum Hbl-Komplex betrachtet werden.

Grundsätzlich werden porenformende Toxine in  $\alpha$ -porenbildende Toxine, die als  $\alpha$ -Helix in die Membran gelangen, und in  $\beta$ -porenbildende Toxine, die als  $\beta$ -Faltblatt in die Membran eintreten, eingeteilt. Zu den  $\alpha$ -porenbildenden Toxinen gehört das Cytolysin A, das von Fagerlund et al. (2008) mit Hbl und Nhe zu einer Superfamilie von porenbildenden Toxinen zusammengefasst wurde, da es eine ähnliche Tertiärstruktur wie die beiden Drei-Komponenten-Toxine aufweist, was auf ein analoges Porenbildungsvermögen hindeuten könnte. Der größte Unterschied ist jedoch die Ausbildung von mono-oligomeren Poren (Benke et al., 2015, Bräuning

& Groll, 2018, Stenfors Arnesen et al., 2008). Zu den  $\beta$ -porenbildenden Toxinen gehören z. B. die Leukozidine von *S. aureus*, die Zellen von leukozytärer Abstammung lysieren (Yoong & Torres, 2013). Diese Toxine werden als lösliche Proteine exprimiert und oligomerisieren auf der Plasmamembran, wodurch  $\beta$ -Haarnadeln zur Bildung der Pore beitragen (Henkel et al., 2010). Die bereits beschriebenen Hämolytine von *B. cereus* (siehe Kapitel V.1.) gehören ebenfalls zu den porenformenden Toxinen. Die Hämolytine II und IV (Zytotoxin K) zählen hierbei zu den  $\beta$ -porenbildenden Toxinen (Ramarao & Sanchis, 2013).

Lange Zeit konnte kein vergleichbares Toxin zu Nhe und Hbl gefunden werden, das die Anordnung von drei Untereinheiten auf der Zellmembran benötigt, um zur Zellyse zu führen (Sastalla et al., 2013). Eine jüngst veröffentlichte Publikation beschreibt nun ein weiteres Drei-Komponenten-Toxin, AhlABC, das auch der Cytolysin A Familie zugeordnet werden konnte (Wilson et al., 2019). Das  $\alpha$ -porenformende Protein hat eine 46%ige Übereinstimmung mit NheB. Genau wie bei Nhe und Hbl werden alle drei Komponenten, AhlA, AhlB und AhlC, für eine maximale Zellyse benötigt und wie Hbl zeigt es maximale Lyse von Pferdeerythrocyten im Hämolyseassay, wenn die drei Komponenten im Verhältnis 1:1:1 eingesetzt werden. Die Proteinstrukturen der Komponenten weisen deutliche Ähnlichkeiten mit denen der Superfamilie auf. So gleicht die Struktur von AhlB sehr der löslichen Formen von Cytolysin A, NheA und Hbl B und kann auch in eine Kopf- und Schwanzdomäne geteilt werden, bei der die Kopfdomäne eine hydrophobe  $\beta$ -Zunge beinhaltet. Diese  $\beta$ -Zunge ist ein charakteristisches Merkmal der löslichen Konformationen vieler Proteine der Familie, einschließlich Hbl B, und dient zum Schutz der Membran-einschließenden hydrophoben Reste. Im Modell des sequentiellen Aufbaus an der Membran bindet initial AhlC an die Membran, nachdem dessen Tetramer dissoziiert ist. Das für NheC und Hbl B beobachtete Phänomen, dass die Verzögerungszeit der Lyse entfällt, wenn die Zellen mit diesen vorinkubiert werden (Lindbäck et al., 2010, Sastalla et al., 2013), wurde auch für AhlC gezeigt. AhlC rekrutiert AhlB und bildet mit diesem eine Pore, wie die Pore von NheB/C. Jedoch wird für die maximale Zellyse auch AhlA zur Porenkonstruktion benötigt, möglicherweise sorgt dieses für die hydrophile Porenauskleidung (Wilson et al., 2019). Durch diese neue Studie wird zudem vermutet, dass auch Hbl B Konformationsänderungen bei der Bindung an die Zielzellmembran vollzieht, da die lösliche Form dieselbe Konformation hat wie

AhlB, welches seine Struktur definitiv während des Bindungsprozesses ändert. Demnach stellt Ahl ein weiteres Drei-Komponenten-Toxin dar, das in vielerlei Hinsicht mit Nhe und Hbl verglichen werden kann.

Bisher konnte nicht geklärt werden, ob es für die Erkennung und Bindung an der Zelloberfläche durch Nhe und Hbl spezielle Zielstrukturen oder Rezeptoren gibt. Hierfür wurde Hbl in dieser Arbeit auf Zelllinien verschiedenen Ursprungs und Gewebes anhand von PI-Tests und WST-1-Bioassays getestet. Darunter befanden sich humane, porcine, bovine und murine Zelllinien sowie eine Zelllinie der Grünen Meerkatze (siehe Tabelle 6). Keine der Zelllinien war resistent gegenüber Hbl, verzögerte Porenbildung und eine niedrigere zytotoxische Aktivität zeigten die rHbl-Komponenten auf Jurkat- und U-937-Zellen, humanen T-Zell-Leukämie Zellen und histiozytären Lymphom-Zellen. Stark sensitiv zeigte sich die humane Epitheliom-Zelllinie HEp-2. Die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien spricht eher für Oberflächen spezifische Zielstrukturen für Hbl, so wie es bereits in einer vorangegangenen Studie postuliert wurde (Jessberger et al., 2014). Die Fähigkeit der Enterotoxine, Poren auch in synthetischen Lipidmembranen zu bilden (Zhu et al., 2016), spricht dagegen.

Auf den Zelllinien CaCo-2, MDBK, A-204, A-549, IPEC-J2 und HEp-2 zeigten die Kulturüberstände von F837/76  $\Delta nheABC$  gegenüber F837/76 überraschenderweise deutlich höhere reziproke Titer, d. h. der Stamm F837/76 mit den beiden Drei-Komponenten-Toxinen Nhe und Hbl war weniger toxisch als der Stamm F837/76  $\Delta nheABC$ , bei dem das *nhe* Operon deletiert wurde. So ist es sehr erstaunlich, dass Hbl alleine eine höhere Toxizität erreichte als mit Nhe zusammen. Dass die einzelnen Komponenten der Toxine sich nicht ersetzen können, um ein aktives Toxin zu bilden, wurde bereits gezeigt (Sastalla et al., 2013). Es ist allerdings nicht bekannt, ob sie sich gegenseitig an der Entfaltung ihrer vollen Toxizität im Überstand von F837/76 hindern.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit alle Hbl-Komponenten erstmals rekombinant exprimiert und mit unterschiedlichen Strep-tags N- und C-terminal versehen werden. Mit dem pASK-IBA7plus-System wurde das Faktor Xa Verfahren etabliert, womit der Strep-tag am Protein wieder abgespalten werden kann. In Zellkulturtests konnte nachgewiesen werden, dass Hbl B zur schnellen Interaktion mit der Zielzellmembran einen freien C-Terminus benötigt. Zudem konnten die Epitope der spezifischen mAk 1E9, 1F8 und 2A3 an Hbl L1, 1D8, 1H9

---

und 8B12 an Hbl L2 sowie 1B8 und 2G4 an Hbl B eingegrenzt werden. Im Weiteren wurde eine variable Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber Hbl ermittelt.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekularen Wirkungsweise von Hämolyisin BL (Hbl) aus *Bacillus (B.) cereus*. *B. cereus* ist ein bekannter Verursacher lebensmittelbedingter Krankheiten. Nach Aufnahme kontaminierter Nahrung kommt es zur Lebensmittelinfektion, wobei enteropathogene Stämme im Darm Toxine bilden, die Diarrhö auslösen. Eines dieser Enterotoxine ist Hämolyisin BL, das aus den drei Komponenten B, L1 und L2 besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei Komponenten in die Vektoren pASK-IBA3plus, pASK-IBA5plus und pASK-IBA7plus kloniert, rekombinant exprimiert und über Strep-tags am N- sowie C-Terminus gereinigt. Die Proteine wurden im Vergleich zur bereits vorhandenen Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) in Propidium(PI)-Tests, WST-1-Bioassays und Hämolyseassays eingesetzt. Dabei zeigten Kombinationen mit rHbl 3+B (Strep-tag C-terminal) verzögerte Fluoreszenzzunahme, nach 24 Stunden allerdings keine signifikante Reduktion der zytotoxischen Aktivität. Anhand von Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass der C-terminale Strep-tag rHbl B bei der Bindung an die Zielzelloberfläche stört. Mit Hilfe des pASK-IBA7plus-Systems konnte der Strep-tag über die Protease Faktor Xa erfolgreich wieder abgespalten werden. Diese Proteine zeigten jedoch in Zellkulturtests keine verbesserte Zytotoxizität im Vergleich zu denen mit Strep-tag.

Zur Untersuchung funktionell wichtiger Bereiche wurden verkürzte Varianten der drei Hbl-Komponenten hergestellt. Für die Funktionalität sind N-terminal die ersten 17 Aminosäuren von L1, die ersten 13 Aminosäuren von L2 und die ersten 16 Aminosäuren von B sowie C-terminal die letzten 11 Aminosäuren von B vernachlässigbar. Des Weiteren konnten die Bindestellen der am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch verfügbaren spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) gegen die drei Hbl-Komponenten mit Hilfe von Enzymimmunoassays (EIAs) und Western Blots eingegrenzt werden. Allerdings sind für eine exakte Epitopanalyse weitere Untersuchungen notwendig.

Außerdem wurde die zytotoxische Aktivität von Hbl gegenüber Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs und Gewebes untersucht. Es ließ sich keine eindeutig resistente Zelllinie gegenüber Hbl identifizieren, zudem zeigten die Zelllinien unterschiedliche Sensitivität, was auf spezifische Zielstrukturen hindeuten könnte.



## VII. SUMMARY

This study addresses the molecular mode of action of the hemolysin BL complex (Hbl) of *Bacillus (B.) cereus*. *B. cereus* causes foodborne diseases. After ingestion of contaminated food enteropathogenic strains produce toxins in the intestine, which leads to food borne infections causing diarrhea. One of these enterotoxins is Hbl, which consists of three components: B, L1 and L2.

In this study the three components were cloned into the vectors pASK-IBA3plus, pASK-IBA5plus and pASK-IBA7plus, recombinantly expressed and purified via Strep-tags at the N- and C-terminus. Compared to the existing combination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017), the proteins were used in propidium iodide (PI) tests, WST-1 bioassays and hemolysis assays. Any combination with rHbl 3+B (C-terminal Strep-tag) showed delayed fluorescence increase, but after 24 hours no significant reduction of cytotoxic activity. Flow cytometry was used to demonstrate that the C-terminal Strep-tag interferes with rHbl B binding to the target cell surface. With the pASK-IBA7plus system, the Strep-tag could be successfully cleaved via the protease factor Xa. Nonetheless, these proteins showed no improved cytotoxicity in cell culture tests compared to those with Strep-tag.

To investigate functionally important domains, truncated variants of the three Hbl components were produced. For functionality, the first 17 amino acids of L1, the first 13 amino acids of L2 and the first 16 amino acids of B N-terminal as well as the last 11 amino acids of B C-terminal are negligible. Furthermore, binding sites of the Hbl specific monoclonal antibodies available at the Chair of Hygiene and Technology of Milk were narrowed down using enzyme immunoassays (EIAs) and Western blots. However, further investigation is necessary for precise epitope analysis.

Moreover, the cytotoxic activity of Hbl towards cell lines of different origin and tissue was investigated. No Hbl resistant cell line could be identified. In addition, the cell lines showed different sensitivities, which might point to specific target structures.





## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

AGAISSE, H., GOMINET, M., ØKSTAD, O. A., KOLSTØ, A. B. and LERECLUS, D. 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*, 32, 1043-53.

AGATA, N., OHTA, M., MORI, M. and ISOBE, M. 1995. A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 129, 17-20.

ANGSUTHANASOMBAT, C., UAWITHYA, P., LEETACHEWA, S., PORNWIROON, W., OUNJAI, P., KERDCHAROEN, T., KATZENMEIER, G. R. and PANYIM, S. 2004. *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity. *J Biochem Mol Biol*, 37, 304-13.

ASANO, S. I., NUKUMIZU, Y., BANDO, H., IIZUKA, T. and YAMAMOTO, T. 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 63, 1054-7.

ASH, C., FARROW, J. A., DORSCH, M., STACKEBRANDT, E. and COLLINS, M. D. 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*, 41, 343-6.

BAIDA, G. E. and KUZMIN, N. P. 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta*, 1264, 151-4.

BAIDA, G. E. and KUZMIN, N. P. 1996. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta*, 1284, 122-4.

BARTH, H., AKTORIES, K., POPOFF, M. R. and STILES, B. G. 2004. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 373-402, table of contents.

BEATTIE, S. H. and WILLIAMS, A. G. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett Appl Microbiol*, 28, 221-5.

BEECHER, D. J. and MACMILLAN, J. D. 1990. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 58, 2220-7.

BEECHER, D. J. and MACMILLAN, J. D. 1991. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 59, 1778-84.

BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L. and WONG, A. C. 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 63, 4423-8.

BEECHER, D. J. and WONG, A. C. 1994a. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Appl Environ Microbiol*, 60, 4614-6.

BEECHER, D. J. and WONG, A. C. 1994b. Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*, 62, 980-6.

BEECHER, D. J. and WONG, A. C. 1997. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J Biol Chem*, 272, 233-9.

BENKE, S., RODERER, D., WUNDERLICH, B., NETTELS, D., GLOCKSHUBER, R. and SCHULER, B. 2015. The assembly dynamics of the cytolytic pore toxin ClyA. *Nat Commun*, 6, 6198.

BENNETT, S. D., WALSH, K. A. and GOULD, L. H. 2013. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*--United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases*, 57, 425-33.

BIRNBOIM, H. C. and DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.

BOONCHAI, N., ASANO, S. I., BANDO, H. and WIWAT, C. 2008. Study on cytotoxicity and nucleotide sequences of enterotoxin FM of *Bacillus cereus* isolated from various food sources. *J Med Assoc Thai*, 91, 1425-32.

BOTTONE, E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 23, 382-98.

BRÄUNING, B. and GROLL, M. 2018. Structural and Mechanistic Features of ClyA-Like alpha-Pore-Forming Toxins. *Toxins (Basel)*, 10.

BREKENFELD, H. 1926. Lebensmittelbakterien und Vergiftungen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 99, 353.

BRÖKER, B., SCHÜTT, C. and FLEISCHER, B. 2019. Grundwissen Immunologie. *Springer-Verlag*.

BUDARINA, Z. I., NIKITIN, D. V., ZENKIN, N., ZAKHAROVA, M., SEMENOVA, E., SHLYAPNIKOV, M. G., RODIKOVA, E. A., MASYUKOVA, S., OGARKOV, O., BAIDA, G. E., SOLONIN, A. S. and SEVERINOV, K. 2004. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II. *Microbiology*, 150, 3691-701.

CADOT, C., TRAN, S. L., VIGNAUD, M. L., DE BUYSER, M. L., KOLSTØ, A. B., BRISABOIS, A., NGUYEN-THE, C., LERECLUS, D., GUINEBRETIERE, M. H. and RAMARAO, N. 2010. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol*, 48, 1358-65.

CALLEGAN, M. C., KANE, S. T., COCHRAN, D. C., NOVOSAD, B., GILMORE, M. S., GOMINET, M. and LERECLUS, D. 2005. *Bacillus*

endophthalmitis: roles of bacterial toxins and motility during infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 3233-8.

CASTIAUX, V., LIU, X., DELBRASSINNE, L. and MAHILLON, J. 2015. Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fide enterotoxin? *Int J Food Microbiol*, 211, 79-85.

CEUPPENS, S., RAJKOVIC, A., HEYNDRICKX, M., TSILIA, V., VAN DE WIELE, T., BOON, N. and UYTTENDAELE, M. 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit Rev Microbiol*, 37, 188-213.

CLAIR, G., ROUSSI, S., ARMENGAUD, J. and DUPORT, C. 2010. Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Mol Cell Proteomics*, 9, 1486-98.

CLAVEL, T., CARLIN, F., LAIRON, D., NGUYEN-THE, C. and SCHMITT, P. 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol*, 97, 214-9.

CONTZEN, M., HAILER, M. and RAU, J. 2014. Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. *Int J Food Microbiol*, 174, 19-22.

DA RIOL, C., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E. and JESSBERGER, N. 2018. Consumed Foodstuffs Have a Crucial Impact on the Toxic Activity of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*, 9, 1946.

DECLERCK, N., BOUILLAUT, L., CHAIX, D., RUGANI, N., SLAMTI, L., HOH, F., LERECLUS, D. and AROLD, S. T. 2007. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 18490-5.

DIDELOT, X., BARKER, M., FALUSH, D. and PRIEST, F. G. 2009. Evolution of

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

DIDIER, A., DIETRICH, R. and MÄRTLBAUER, E. 2016. Antibody Binding Studies Reveal Conformational Flexibility of the *Bacillus cereus* Non-Hemolytic Enterotoxin (Nhe) A-Component. *PLoS One*, 11, e0165135.

DIERICK, K., VAN COILLIE, E., SWIECICKA, I., MEYFROIDT, G., DEVLIEGER, H., MEULEMANS, A., HOEDEMAEKERS, G., FOURIE, L., HEYNDRIKX, M. and MAHILLON, J. 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol*, 43, 4277-9.

DIETRICH, R., FELLA, C., STRICH, S. and MÄRTLBAUER, E. 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4470-4.

DIETRICH, R., MORAVEK, M., BURK, C., GRANUM, P. E. and MÄRTLBAUER, E. 2005. Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex. *Appl Environ Microbiol*, 71, 8214-20.

DOLL, V. M., EHLING-SCHULZ, M. and VOGELMANN, R. 2013. Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 8, e61404.

DUPORT, C., ZIGHA, A., ROSENFELD, E. and SCHMITT, P. 2006. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol*, 188, 6640-51.

EFSA 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16, e05500.

EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M., GRALLERT, H., RIECK, P., WAGNER, M. and SCHERER, S. 2006a. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol*, 6, 20.

EHLING-SCHULZ, M., FRICKER, M. and SCHERER, S. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res*, 48, 479-87.

EHLING-SCHULZ, M., GUINEBRETIERE, M. H., MONTHÁN, A., BERGE, O., FRICKER, M. and SVENSSON, B. 2006b. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 260, 232-40.

EHLING-SCHULZ, M. and MESSELHÄUSSER, U. 2013. *Bacillus* "next generation" diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Front Microbiol*, 4, 32.

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

FAGERLUND, A., WEEN, O., LUND, T., HARDY, S. P. and GRANUM, P. E. 2004. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 150, 2689-97.

FLETCHER, P. and LOGAN, N. A. 1999. Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 394-400.

FRANKLAND, G. C. and FRANKLAND, P. F. 1887. XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)*, 257-287.

FRICKER, M., REISSBRODT, R. and EHLING-SCHULZ, M. 2008. Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*, 121, 27-34.

FRIEBE, S., VAN DER GOOT, F. G. and BÜRGI, J. 2016. The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins (Basel)*, 8.

GANASH, M., PHUNG, D., SEDELNIKOVA, S. E., LINDBÄCK, T., GRANUM, P. E. and ARTYMIUK, P. J. 2013. Structure of the NheA component of the Nhe toxin from *Bacillus cereus*: implications for function. *PLoS One*, 8, e74748.

GLASSET, B., HERBIN, S., GRANIER, S. A., CAVALIÉ, L., LAFEUILLE, E., GUÉRIN, C., RUIMY, R., CASAGRANDE-MAGNE, F., LEVAST, M., CHAITEMPS, N., DECOUSSER, J. W., BELOTTI, L., PELLOUX, I., ROBERT, J., BRISABOIS, A. and RAMARAO, N. 2018. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLoS One*, 13, e0194346.

GLASSET, B., HERBIN, S., GUILLIER, L., CADEL-SIX, S., VIGNAUD, M.-L., GROUT, J., PAIRAUD, S., MICHEL, V., HENNEKINNE, J. and RAMARAO, N. 2016. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Eurosurveillance*, 21.

GLATZ, B. A., SPIRA, W. M. and GOEPFERT, J. M. 1974. Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species. *Infect Immun*, 10, 299-303.

GOHAR, M., FAEGRI, K., PERCHAT, S., RAVNUM, S., ØKSTAD, O. A., GOMINET, M., KOLSTØ, A. B. and LERECLUS, D. 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One*, 3, e2793.

GOHAR, M., ØKSTAD, O. A., GILOIS, N., SANCHIS, V., KOLSTØ, A. B. and LERECLUS, D. 2002. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR



regulon. *Proteomics*, 2, 784-91.

GRANUM, P. E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 23, 61s-66s.

GRANUM, P. E. and LUND, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett*, 157, 223-8.

GRANUM, P. E., O'SULLIVAN, K. and LUND, T. 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 177, 225-9.

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

GUINEBRETIERE, M. H., BROUSSOLLE, V. and NGUYEN-THE, C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol*, 40, 3053-6.

GUINEBRETIERE, M. H., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E. and NGUYEN-THE, C. 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., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THE, C., HEYNDRIKX, M. and DE VOS, P. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol*, 10, 851-65.

GUINEBRETIERE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F.,

DEBUYSER, M. L. and NGUYEN-THE, C. 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, 3388-91.

HANSEN, B. M. and HENDRIKSEN, N. B. 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl Environ Microbiol*, 67, 185-9.

HARDY, S. P., LUND, T. and GRANUM, P. E. 2001. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol Lett*, 197, 47-51.

HAUGE, S. 1950. Matforgiftninger fremkalt av *Bacillus cereus*. *Nordisk Hygienisk Tidsskrift*, 31, 189.

HAUGE, S. 1955. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 18, 591-595.

HAYDAR, A., TRAN, S. L., GUILLEMET, E., DARRIGO, C., PERCHAT, S., LERECLUS, D., COQUET, L., JOUENNE, T. and RAMARAO, N. 2018. InhA1-Mediated Cleavage of the Metalloprotease NprA Allows *Bacillus cereus* to Escape From Macrophages. *Front Microbiol*, 9, 1063.

HEILKENBRINKER, U., DIETRICH, R., DIDIER, A., ZHU, K., LINDBÄCK, T., GRANUM, P. E. and MÄRTLBAUER, E. 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.

HEINRICHS, J. H., BEECHER, D. J., MACMILLAN, J. D. and ZILINSKAS, B. A. 1993. Molecular cloning and characterization of the *hblA* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 175, 6760-6.

HELGASON, E., ØKSTAD, O. A., CAUGANT, D. A., JOHANSEN, H. A.,

FOUET, A., MOCK, M., HEGNA, I. and KOLSTØ, A. B. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2627-30.

HENKEL, J. S., BALDWIN, M. R. and BARBIERI, J. T. 2010. Toxins from bacteria. *Exs*, 100, 1-29.

HWANG, J. Y. and PARK, J. H. 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, 1652-60.

IKEDA, M., YAGIHARA, Y., TATSUNO, K., OKAZAKI, M., OKUGAWA, S. and MORIYA, K. 2015. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* blood stream infections. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 14, 43.

JESSBERGER, N., DIETRICH, R., BOCK, S., DIDIER, A. and MÄRTLBAUER, E. 2014. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*, 77, 49-57.

JESSBERGER, N., DIETRICH, R., SCHWEMMER, S., TAUSCH, F., SCHWENK, V., DIDIER, A. and MÄRTLBAUER, E. 2019. Binding to The Target Cell Surface Is The Crucial Step in Pore Formation of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel)*, 11.

JESSBERGER, N., KREY, V. M., RADEMACHER, C., BÖHM, M. E., MOHR, A. K., EHLING-SCHULZ, M., SCHERER, S. and MÄRTLBAUER, E. 2015. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol*, 6, 560.

JUNG, M. Y., KIM, J. S., PAEK, W. K., LIM, J., LEE, H., KIM, P. I., MA, J. Y., KIM, W. and CHANG, Y. H. 2011. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J Microbiol*, 49, 1027-32.

JUNG, M. Y., PAEK, W. K., PARK, I. S., HAN, J. R., SIN, Y., PAEK, J., RHEE, M. S., KIM, H., SONG, H. S. and CHANG, Y. H. 2010. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *J Microbiol*, 48, 867-71.

KIM, M. J., HAN, J. K., PARK, J. S., LEE, J. S., LEE, S. H., CHO, J. I. and KIM, K. S. 2015. Various Enterotoxin and Other Virulence Factor Genes Widespread Among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *J Microbiol Biotechnol*, 25, 872-9.

KINTZER, A. F., THOREN, K. L., STERLING, H. J., DONG, K. C., FELD, G. K., TANG, II, ZHANG, T. T., WILLIAMS, E. R., BERGER, J. M. and KRANTZ, B. A. 2009. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol*, 392, 614-29.

KLIMPEL, K. R., ARORA, N. and LEPPLA, S. H. 1994. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol*, 13, 1093-100.

KOTIRANTA, A., LOUNATMAA, K. and HAAPASALO, M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect*, 2, 189-98.

KRAMER, J. M. and GILBERT, R. J. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne bacterial pathogens*, 19, 21-70.

KRAUSE, N., MORAVEK, M., DIETRICH, R., WEHRLE, E., SLAGHUIS, J. and MÄRTLBAUER, E. 2010. Performance characteristics of the Duopath(R) cereus enterotoxins assay for rapid detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus* strains. *Int J Food Microbiol*, 144, 322-6.

KUMARI, S. and SARKAR, P. K. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69, 20-29.

KUROKI, R., KAWAKAMI, K., QIN, L., KAJI, C., WATANABE, K., KIMURA, Y., ISHIGURO, C., TANIMURA, S., TSUCHIYA, Y., HAMAGUCHI, I., SAKAKURA, M., SAKABE, S., TSUJI, K., INOUE, M. and WATANABE, H. 2009. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern Med*, 48, 791-6.

LEPPLA, S. H. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 3162-6.

LERECLUS, D., AGAÏSSE, H., GOMINET, M., SALAMITOU, S. and SANCHIS, V. 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol*, 178, 2749-56.

LERECLUS, D., AGAÏSSE, H., GRANDVALET, C., SALAMITOU, S. and GOMINET, M. 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol*, 290, 295-9.

LINDBÄCK, T., FAGERLUND, A., RØDLAND, M. S. and GRANUM, P. E. 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150, 3959-67.

LINDBÄCK, T., HARDY, S. P., DIETRICH, R., SØDRING, M., DIDIER, A., MORAVEK, M., FAGERLUND, A., BOCK, S., NIELSEN, C., CASTEEL, M., GRANUM, P. E. and MÄRTLBAUER, E. 2010. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect Immun*, 78, 3813-21.

LINDBÄCK, T., ØKSTAD, O. A., RISHOVD, A. L. and KOLSTØ, A. B. 1999. Insertional inactivation of *hblC* encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes. *Microbiology*, 145 ( Pt 11), 3139-46.

LINDQVIST, R., ANDERSSON, Y., DE JONG, B. and NORBERG, P. 2000. A summary of reported foodborne disease incidents in Sweden, 1992 to 1997. *Journal of food protection*, 63, 1315-1320.

LIU, B., LIU, G. H., HU, G. P., SENGONCA, C., LIN, N. Q., TANG, J. Y., TANG, W. Q. and LIN, Y. Z. 2014a. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105, 501-10.

LIU, S., MOAYERI, M. and LEPPLA, S. H. 2014b. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends Microbiol*, 22, 317-25.

LIU, Y., DU, J., LAI, Q., ZENG, R., YE, D., XU, J. and SHAO, Z. 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67, 2499-2508.

LIU, Y., LAI, Q., GOKER, M., MEIER-KOLTHOFF, J. P., WANG, M., SUN, Y., WANG, L. and SHAO, Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci Rep*, 5, 14082.

LUBENAU, C. 1906. *Bacillus peptonificans* als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie. *Zentralb. Bacteriol Parasitenkd Infektions-kr Hyg Abt*, 40, 433-437.

LUND, T., DE BUYSER, M. L. and GRANUM, P. E. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol*, 38, 254-61.

LUND, T. and GRANUM, P. E. 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett*, 141, 151-6.

MADEGOWDA, M., ESWARAMOORTHY, S., BURLEY, S. K. and SWAMINATHAN, S. 2008. X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins*, 71, 534-40.

MAHLER, H., PASI, A., KRAMER, J. M., SCHULTE, P., SCOGING, A. C., BAR, W. and KRAHENBUHL, S. 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N Engl J Med*, 336, 1142-8.

MILLER, R. A., BENO, S. M., KENT, D. J., CARROLL, L. M., MARTIN, N. H., BOOR, K. J. and KOVAC, J. 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66, 4744-4753.

MOAYERI, M., LEPPLA, S. H., VRENTAS, C., POMERANTSEV, A. P. and LIU, S. 2015. Anthrax Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 69, 185-208.

MORAVEK, M., DIETRICH, R., BUERK, C., BROUSSOLLE, V., GUINEBRETIERE, M. H., GRANUM, P. E., NGUYEN-THE, C. and MÄRTLBAUER, E. 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett*, 257, 293-8.

MORTIMER, P. R. and MCCANN, G. 1974. Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet*, 1, 1043-5.

MURPHY, K. and WEAVER, C. 2018. Janeway Immunologie. *Springer-Verlag*.

NAM, H., SEO, H. S., BANG, J., KIM, H., BEUCHAT, L. R. and RYU, J. H. 2014. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* spores attached to and in a biofilm on stainless steel. *Int J Food Microbiol*, 188, 122-7.

NARANJO, M., DENAYER, S., BOTTELDOORN, N., DELBRASSINNE, L., VEYS, J., WAEGENAERE, J., SIRTAINNE, N., DRIESEN, R. B., SIPIDO, K. R., MAHILLON, J. and DIERICK, K. 2011. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *J Clin Microbiol*, 49, 4379-81.

NGAMWONGSATIT, P., BANADA, P. P., PANBANGRED, W. and BHUNIA, A. K. 2008a. 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, 211-5.

NGAMWONGSATIT, P., BUASRI, W., PIANARIYANON, P., PULSRIKARN, C., OHBA, M., ASSAVANIG, A. and PANBANGRED, W. 2008b. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *Int J Food Microbiol*, 121, 352-6.

OKINAKA, R. T. and KEIM, P. 2016. The Phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Microbiol Spectr*, 4.

ØKSTAD, O. A., GOMINET, M., PURNELLE, B., ROSE, M., LERECLUS, D. and KOLSTØ, A. B. 1999. Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. *Microbiology*, 145 (Pt 11), 3129-38.

OUHIB-JACOBS, O., LINDLEY, N. D., SCHMITT, P. and CLAVEL, T. 2009. Fructose and glucose mediates enterotoxin production and anaerobic metabolism of *Bacillus cereus* ATCC14579. *J Appl Microbiol*, 107, 821-9.

OZKOCAMAN, V., OZCELIK, T., ALI, R., OZKALEMKAS, F., OZKAN, A., OZAKIN, C., AKALIN, H., URSAVAS, A., COSKUN, F., ENER, B. and TUNALI, A. 2006. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *J Hosp Infect*, 64, 169-76.

PEZARD, C., BERCHE, P. and MOCK, M. 1991. Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun*, 59, 3472-7.

PRIEST, F. G., BARKER, M., BAILLIE, L. W., HOLMES, E. C. and MAIDEN, M. C. 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol*, 186, 7959-70.



RAMARAO, N. and SANCHIS, V. 2013. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel)*, 5, 1119-39.

RASKO, D. A., ROISOVITZ, M. J., ØKSTAD, O. A., FOUTS, D. E., JIANG, L., CER, R. Z., KOLSTØ, A. B., GILL, S. R. and RAVEL, J. 2007. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J Bacteriol*, 189, 52-64.

REIS, A. L., MONTANHINI, M. T., BITTENCOURT, J. V., DESTRO, M. T. and BERSOT, L. S. 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, 1195-8.

REIS, A. L. S., PEREIRA, J. G., MONTANHINI, M. T. M., BITTENCOURT, J. V. M., DE ALMEIDA NOGUEIRA PINTO, J. P. and DOS SANTOS BERSOT, L. 2019. Presence of *nhe*, *cytK*, and *ces* in *Bacillus cereus* isolated from dairy products commercially available in Brazil. *Journal of Food Safety*, e12636.

RINK, L., KRUSE, A. and HAASE, H. 2012. Immunologie für Einsteiger. *Springer-Verlag*.

ROWAN, N. J., DEANS, K., ANDERSON, J. G., GEMMELL, C. G., HUNTER, I. S. and CHAITHONG, T. 2001. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl Environ Microbiol*, 67, 3873-81.

RYAN, P. A., MACMILLAN, J. D. and ZILINSKAS, B. A. 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 179, 2551-6.

RYU, J. H. and BEUCHAT, L. R. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based

sanitizer. *J Food Prot*, 68, 2614-22.

SAILE, E. and KOEHLER, T. M. 2002. Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator *abrB*. *J Bacteriol*, 184, 370-80.

SALUSTIANO, V. C., ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F., LIMA, J. C., BERNARDES, P. C., LUIZ, L. M. P. and FERNANDES, P. E. 2009. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control*, 20, 439-442.

SASTALLA, I., FATTAH, R., COPPAGE, N., NANDY, P., CROWN, D., POMERANTSEV, A. P. and LEPPLA, S. H. 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.

SEITZ, A. 1913. Pathogener *Bacillus subtilis*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, 70, 113-114.

SETLOW, P. 2014. Spore Resistance Properties. *Microbiol Spectr*, 2.

SHINAGAWA, K. 1990. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Int J Food Microbiol*, 10, 125-41.

SHINAGAWA, K., SUGIYAMA, J., TERADA, T., MATSUSAKA, N. and SUGII, S. 1991. Improved methods for purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 64, 1-5.

SILVA, H. O., LIMA, J. A. S., AGUILAR, C. E. G., ROSSI, G. A. M., MATHIAS, L. A. and VIDAL, A. M. C. 2018. Efficiency of Different Disinfectants on *Bacillus cereus* Sensu Stricto Biofilms on Stainless-Steel Surfaces in Contact With Milk. *Front Microbiol*, 9, 2934.

SMITH, H. 2002. Discovery of the anthrax toxin: the beginning of studies of

virulence determinants regulated in vivo. *Int J Med Microbiol*, 291, 411-7.

SMITH, H., TEMPEST, D. W., STANLEY, J. L., HARRIS-SMITH, P. W. and GALLOP, R. C. 1956. The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. VII. Two components of the anthrax toxin: their relationship to known immunising aggressins. *Br J Exp Pathol*, 37, 263-71.

SPIRA, W. M. and GOEPFERT, J. M. 1972. *Bacillus cereus*-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Appl Microbiol*, 24, 341-8.

STENFORS ARNESEN, L. P., FAGERLUND, A. and GRANUM, P. E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 579-606.

TAKABE, F. and OYA, M. 1976. An autopsy case of food poisoning associated with *Bacillus cereus*. *Forensic Sci*, 7, 97-101.

TALLENT, S. M., HAIT, J. M. and BENNETT, R. W. 2015. Analysis of *Bacillus cereus* toxicity using PCR, ELISA and a lateral flow device. *J Appl Microbiol*, 118, 1068-75.

TAUSCH, F., DIETRICH, R., SCHAUER, K., JANOWSKI, R., NIESSING, D., MÄRTLBAUER, E. and JESSBERGER, N. 2017. Evidence for Complex Formation of the *Bacillus cereus* Haemolysin BL Components in Solution. *Toxins (Basel)*, 9.

TAUSCH, F. F. 2016. Nachweis der Einzelkomponenten B, L1 und L2 des *Bacillus cereus* Enterotoxin-Komplexes Hämolysin BL: Entwicklung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern. *Diss. med. vet. Ludwig-Maximilians-Universität München*.

THOMASSIN, S., JOBIN, M. P. and SCHMITT, P. 2006. The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate

and intracellular pH. *Arch Microbiol*, 186, 229-39.

TODD, E. C. D. 1992. Foodborne disease in Canada-a 10-year summary from 1975 to 1984. *Journal of Food Protection*, 55, 123-132.

TOURASSE, N. J. and KOLSTØ, A. B. 2008. SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*). *Nucleic Acids Res*, 36, D461-8.

TRÜB, C. L. P. and WUNDRAM, G. 1942. Die Gemeinschaftsverpflegung in ihrer Beziehung zu den unspezifischen bakteriellen Lebensmittelvergiftungen. *Zentralbl Bakt I Abt Ref* 143, 241.

TURNBULL, P. C. 1981. *Bacillus cereus* toxins. *Pharmacol Ther*, 13, 453-505.

TURNBULL, P. C., JØRGENSEN, K., KRAMER, J. M., GILBERT, R. J. and PARRY, J. M. 1979. Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *J Clin Pathol*, 32, 289-93.

VAN DER VOORT, M. and ABEE, T. 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.

WATERHOUSE, A., BERTONI, M., BIENERT, S., STUDER, G., TAURIELLO, G., GUMIENNY, R., HEER, F. T., DE BEER, T. A. P., REMPFER, C., BORDOLI, L., LEPORE, R. and SCHWEDE, T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46, W296-w303.

WEHRLE, E., MORAVEK, M., DIETRICH, R., BÜRCK, C., DIDIER, A. and MÄRTLBAUER, E. 2009. Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. *J Microbiol Methods*, 78, 265-70.

WIJMAN, J. G., DE LEEUW, P. P., MOEZELAAR, R., ZWIETERING, M. H. and ABEE, T. 2007. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1481-8.

WILSON, J. S., CHURCHILL-ANGUS, A. M., DAVIES, S. P., SEDELNIKOVA, S. E., TZOKOV, S. B., RAFFERTY, J. B., BULLOUGH, P. A., BISSON, C. and BAKER, P. J. 2019. Identification and structural analysis of the tripartite alpha-pore forming toxin of *Aeromonas hydrophila*. *Nat Commun*, 10, 2900.

YAMAGIWA, M. and SAKAI, H. 2003. The role of helices of domain I for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin. *Memoirs of the Faculty of Engineering, Okayama University*, 37, 67-72.

YANG, I. C., SHIH, D. Y., WANG, J. Y. and PAN, T. M. 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, 2774-81.

YOONG, P. and TORRES, V. J. 2013. The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol*, 16, 63-9.

ZHU, K., DIDIER, A., DIETRICH, R., HEILKENBRINKER, U., WALTENBERGER, E., JESSBERGER, N., MÄRTLBAUER, E. and BENZ, R. 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, 613-8.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung des Nhe-Operons (nach Granum et al., 1999, Lindbäck et al., 2004). .....	15
<b>Abbildung 2:</b>	Schematische Darstellung des <i>hbl</i> -Operons (nach Økstad et al., 1999, Ryan et al., 1997, Sastalla et al., 2013).....	17
<b>Abbildung 3:</b>	(A) Detektion der rHbl-Komponenten in Western Blots mit StrepMAB-Classic (links) und Hbl spezifischen mAK 8B12 (L2), 1E9 (L1) und 1B8 (B) (rechts) (Tausch et al., 2017). (B) Detektion von NheA, B und C im Überstand von Stamm F837/76 im Western Blot durch mAk 1A8, 2B11 und 3D6. Keine Detektion im Überstand des Deletionsstammes (Tausch et al., 2017). .....	20
<b>Abbildung 4:</b>	Schematische Darstellung eines pASK-IBA Expressionsvektors mit ORI ( <i>origin of replication</i> , Replikationsursprung), AmpR (Ampicillin-Resistenz-Gen), TetR (Tetracyclin-Repressor-Gen), Promotorregion, Doxycyclin zur Freisetzung des Tetracyclin-Repressors und MCS ( <i>Multiple Cloning Site</i> ).....	35
<b>Abbildung 5:</b>	Strep-Tactin <sup>®</sup> Protein-Reinigung. (A) Bindung des rekombinanten Proteins an immobilisiertes Strep-Tactin <sup>®</sup> . (B) Elution des rekombinanten Proteins durch Desthiobiotin (Expression and purification of proteins using Strep-Tactin <sup>®</sup> A comprehensive manual, IBA Lifesciences). .....	43
<b>Abbildung 6:</b>	Beispiel eines WST-1-Bioassays. (A) nach 22-stündiger Inkubation. (B) zwei Stunden nach Zugabe des WST-1 Reagenz.....	49
<b>Abbildung 7:</b>	SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Quantifizierung der Konzentrationen von rHbl 3+L1, 3+B, 5+L1, 5+L2 und 5+B. E = Elutionsfraktion. Eine BSA-Standardkurve wurde zur Konzentrationsbestimmung mitgeführt. ....	54
<b>Abbildung 8:</b>	(A) Western Blot mit dem <i>E. coli</i> ZE (rHbl 3+L2) aus der Protein-Überexpression eine, zwei, drei und vier Stunden nach Induktion. Zur Detektion wurde der Hbl L2 spezifische mAk 1A12 verwendet. (B) Western Blot von rHbl 3+L2 mit den	

einzelnen Proteinreinigungsschritten: ZE, DF, W1 - 3, E1 - 5. DF = Durchfluss, W = Waschfraktion, E = Elutionsfraktion. Zur Detektion wurde der L2 spezifische mAk 1A12 verwendet. **(C)** WST-1-Bioassay auf Vero-Zellen mit dem ZE von rHbl 3+L2 1:10 verdünnt und der Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle. Der reziproke Titer wurde über diejenigen Verdünnungsstufen bestimmt, bei denen die Zellviabilität um 50 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert war. **(D)** PI-Test auf Vero-Zellen mit rHbl 3+L2 ZE, reinem *E. coli* BL21 ZE und der rHbl-Kombination 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017)..... 56

**Abbildung 9:** PI-Test auf Vero-Zellen. **(A)** Kulturüberstand von *B. cereus* F837/76 (braun) und F837/76  $\Delta$ *nheABC* (rot), sowie rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). **(B)** PI-Test in einem *Chamber Slide* System, detektiert mittels Fluoreszenzmikroskop..... 58

**Abbildung 10:** PI-Test auf Vero-Zellen. Verwendet wurden rHbl-Komponenten mit jeweils C- oder N-terminalen Strep-tags. **(A)** Austausch jeweils eines Strep-tags gegenüber der Ausgangs-Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). **(B)** Austausch jeweils zweier Strep-tags gegenüber der Ausgangs-Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). **(C)** Austausch aller Strep-tags gegenüber der Ausgangs-Kombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017). Die Gesamtfluoreszenz ist hier niedriger, da sie in einem unabhängigen Experiment ermittelt wurde. **(D)** Konsekutive Zugabe von rHbl 3+B oder 5+B, 3+L1 und 5+L2. 61

**Abbildung 11:** WST-1-Bioassay mit verschiedenen rHbl-Kombinationen auf Vero-Zellen..... 62

**Abbildung 12:** Hämolyseassay mit Schafsblut. Positivkontrolle: Erythrozyten in A. dest., auf 100 % gesetzt, Negativkontrolle: Erythrozyten-Salzpuffer-Lösung. *B. cereus* F837/76 und F837/76  $\Delta$ *nheABC* Kulturüberstände und die rHbl-Kombinationen 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und 3+L1, 5+L2, 3+B wurden

- getestet. .... 63
- Abbildung 13:** Overlay-Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von rHbl 5+B und 3+B auf Vero-Zellen. (A) rHbl 5+B und 3+B zu den Inkubationszeiten 30, 15 und 5 min (blaue Markierung grenzt FL1-positive Zellen ab). (B) rHbl 5+B und 3+B in jeweils einem Overlay-Histogramm zusammengefasst zu den Inkubationszeiten 30, 15 und 5 min. .... 65
- Abbildung 14:** (A) Ausschnitt aus pASK-IBA7plus mit Startcodon und Codierungssequenzen für Linker, Strep-tag, Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa und die Restriktionsenzyme Sac II und Sal I (IBA Lifesciences, data sheet pASK-IBA7plus). (B) SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Bestimmung der Konzentrationen von rHbl 7+L1, 7+L2 und 7+B. Eine BSA-Standardkurve wurde zur Konzentrationsbestimmung mitgeführt. .... 67
- Abbildung 15:** Western Blot von (A) rHbl 7+L1 detektiert mit mAk StrepMAB-Classic. Das Protein wurde zuvor für 3, 6 und 24 Stunden bei RT mit der Protease inkubiert (– = unverdautes Protein). (B) rHbl 7+L1, 7+L2 und 7+B nach sechs Stunden Verdau und unverdaut, detektiert mit mAk StrepMAB-Classic. (C) rHbl 7+L1, 7+L2 und 7+B detektiert mit den jeweils spezifischen mAk 1E9 (L1), 1A12 (L2), 1B8 (B). .... 69
- Abbildung 16:** PI-Test auf Vero-Zellen. (A) rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle, 7+ rHbl-Komponenten und 7+ rHbl-Komponenten ohne Strep-tag (Xa). (B) rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle und jeweils eine ausgetauschte Komponente. (C) rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) als Kontrolle und jeweils eine ausgetauschte Komponente ohne Strep-tag. (D) konsekutive Zugabe der Komponenten rHbl 7+B und 7+B Xa, 3+L1 und 5+L2. rHbl 7+B und 7+B Xa wurden für jeweils 20, 5 oder 4 min mit den Vero-Zellen inkubiert. .... 71
- Abbildung 17:** WST-1-Bioassay auf Vero-Zellen. .... 72
- Abbildung 18:** Hämolyseassay mit Schafsblut. Als Positivkontrolle dienten Erythrozyten in A. dest., auf 100 % gesetzt, als



- Negativkontrolle Erythrozyten-Salzpuffer-Lösung. Als Vergleich ist die Kombination 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) angegeben. .... 72
- Abbildung 19:** Overlay-Histogramme der Durchflusszytometrie. (A) FL1-positive Zellen nach 30-, 15- und 5-minütiger Inkubation mit rHbl 7+B (blaue Markierung grenzt FL-1 positive Zellen ab). (B) rHbl 7+B und 5+B in einem Overlay-Histogramm zusammengefasst nach einer Inkubationszeit von 5 min. .... 74
- Abbildung 20:** Schematische Darstellung der verkürzten Varianten der rHbl-Komponenten 3+L1, 5+L2 und 5+B. Die Ziffern geben jeweils die erste und letzte Aminosäure der Proteine an. .... 76
- Abbildung 21:** SDS-Gelelektrophorese und SYPRO Ruby-Protein-Färbung zur Kontrolle und Quantifizierung der rHbl-Varianten. BSA-Standardkurven wurden zur Konzentrationsbestimmung mitgeführt. .... 80
- Abbildung 22:** PI-Test auf Vero-Zellen mit den einzelnen, gekürzten rHbl-Varianten. (A) rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und rHbl 3+L1 Varianten. (B) rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und rHbl 5+L2 Varianten. (C) rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und rHbl 5+B Varianten. .... 82
- Abbildung 23:** PI-Test auf Vero-Zellen. (A) Ausgangskombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und jeweils zwei getauschte Varianten. (B) Ausgangskombination rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und jeweils drei getauschte Varianten. .... 83
- Abbildung 24:** Overlay-Histogramme. Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach Inkubation von Vero-Zellen mit je rHbl 5+B oder 5+B M1 für 30, 15 und 5 min (blaue Markierung grenzt FL-1 positive Zellen ab). .... 84
- Abbildung 25:** Indirekte EIA von rHbl 3+L1 und dessen verkürzten Varianten mit den mAk 1E9, 1G8, 1F8, 12D12 und 2A3. Die Absorption bei 450 nm ist bei den mAk 1E9 und 1F8 bei einer Antigenkonzentration von 0,36 fmol/µl, bei den mAk 1G8 und 12D12 bei einer Antigenkonzentration von 2,9 fmol/µl und bei dem mAk 2A3 bei einer Antigenkonzentration von

- 0,18 fmol/µl dargestellt. Rechts unten der Vergleich von rHbl 3+L1 und 5+L1 für mAk 2A3. .... 86
- Abbildung 26:** Indirekter EIA von rHbl 3+L1 und dessen verkürzten Varianten mit mAk StrepMAB-Classic. Die Absorption bei 450 nm ist bei einer Antigenkonzentration von 1,46 fmol/µl dargestellt..... 87
- Abbildung 27:** Indirekte EIA von rHbl 5+L2 und seinen verkürzten Varianten mit mAk 1D8, 1H9, 8B12 und StrepMAB-Classic. Die Absorptionswerte bei 450 nm der mAk 1D8 und 1H9 sind bei einer Antigenkonzentration von 0,16 fmol/µl, die der mAk 8B12 und StrepMAB-Classic bei einer Antigenkonzentration von 2,63 fmol/µl dargestellt..... 88
- Abbildung 28:** Sandwich-EIA von rHbl 5+L2 und seinen verkürzten Varianten mit mAk 1A12 sowie 1H9-HRP als Detektionsantikörper. Die Absorption bei 450 nm ist bei einer Antigenkonzentration von 0,33 fmol/µl gezeigt..... 89
- Abbildung 29:** Indirekter EIA von rHbl 5+B M4 mit mAk 1D12, 2G4, 11A5, 1G8, 12D12, 1D7, 1C12, 1B8 und StrepMAB-Classic. Die Absorption bei 450 nm ist bei einer Antigenkonzentration von 12,2 fmol/µl gezeigt..... 90
- Abbildung 30:** Indirekte EIA von rHbl 5+B und seinen verkürzten Varianten mit den mAk 1B8, 2G4, 1D12, 11A5, 1G8, 12D12, 1D7, 1C12 und StrepMAB-Classic. Dargestellt ist jeweils die maximale Absorption bei 450 nm bei einer Antigenkonzentration von 0,19, 0,38 bzw. 1,52 fmol/µl..... 92
- Abbildung 31:** Western Blots von rHbl 5+B und seinen verkürzten Varianten. (A) mit mAk 1B8. (B) mit mAk 2G4. .... 93
- Abbildung 32:** PI-Test zur Überprüfung der Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber rHbl 3+L1, 5+L2, 5+B (Tausch et al., 2017) und Kulturüberständen von *B. cereus* F837/76 und F837/76  $\Delta$ heABC. .... 95
- Abbildung 33:** Überprüfung der Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber Kulturüberständen von F837/76, F837/76  $\Delta$ heABC sowie rHbl anhand von WST-1-Bioassays. .... 97
- Abbildung 34:** Proteinsequenzen von rHbl 5+B (oben) und rHbl 7+B (unten)

---

	mit Strep-tag (gelb), Zwischenstück (grün) und Faktor Xa Erkennungssequenz (rot). .....	102
<b>Abbildung 35:</b>	3D-Proteinstruktur von Hbl B mit Markierung der Strep-tags für rHbl 5+B und 7+B (links) sowie 3+B (rechts) (anhand von <a href="https://swissmodel.expasy.org">https://swissmodel.expasy.org</a> ).....	102
<b>Abbildung 36:</b>	3D-Proteinstruktur von Hbl B mit Kopf- und Schwanzdomäne (Madegowda et al., 2008). .....	103
<b>Abbildung 37:</b>	3D-Proteinstrukturen der funktionellen, verkürzten Varianten rHbl 3+L1 M1, 5+L2 M1, 5+B M1 und M6, zum Vergleich die nicht funktionellen rHbl 5+B M3 und M4 (anhand von <a href="https://swissmodel.expasy.org">https://swissmodel.expasy.org</a> ).....	108

## X. TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b>	An die EFSA übermittelte lebensmittelbedingte Ausbrüche mit hoher Evidenz, nach Erregern, Deutschland 2017 (n = 49), BVL. ....	7
<b>Tabelle 2:</b>	Sequenzhomologien der Proteine der Hbl- und Nhe-Komplexe von <i>B. cereus</i> ATCC 14579 und Cytolysin A von <i>E. coli</i> (nach Fagerlund et al., 2008). ....	19
<b>Tabelle 3:</b>	In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien. ....	26
<b>Tabelle 4:</b>	Charakteristika der verwendeten Primer. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sal I und Sac II sind unterstrichen. ....	30
<b>Tabelle 5:</b>	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper gegen <i>B. cereus</i> Hbl-Komponenten. ....	31
<b>Tabelle 6:</b>	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien. ....	32
<b>Tabelle 7:</b>	Charakteristika der verwendeten <i>B. cereus</i> Stämme. ....	33
<b>Tabelle 8:</b>	Charakteristika der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme. ....	33
<b>Tabelle 9:</b>	rHbl-Proteine mit zugehörigen Expressionsvektoren und Lage der Affinitäts-tags. ....	34
<b>Tabelle 10:</b>	PCR-Programm zur Amplifikation von <i>hblD</i> , <i>hblC</i> und <i>hblA</i> . ....	39
<b>Tabelle 11:</b>	Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Vermessen wurden zwei biologische mit jeweils zwei technischen Replikaten. MW zeigen den prozentualen Anteil an fluoreszierenden Zellen. ....	64
<b>Tabelle 12:</b>	Ergebnisse der Durchflusszytometrie. rHbl 7+B und 5+B wurden für 30, 15 und 5 min mit Vero-Zellen inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Hbl B spezifischem mAk 1G8-F488. Dargestellt ist die Menge der jeweils FL1-positiven Zellen in Prozent. ....	73
<b>Tabelle 13:</b>	Ergebnisse der Durchflusszytometrie. rHbl 5+B und 5+B M1 wurden für 30, 15 und 5 min mit Vero-Zellen inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Hbl B spezifischem mAk 1G8-F488. Dargestellt ist die Menge der jeweils FL1-positiven Zellen in Prozent. ....	84



## **XI. DANKSAGUNG**

Großer Dank geht an erster Stelle an Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer für die mir gebotene Möglichkeit, am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch zu promovieren, für die Überlassung dieses interessanten Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Nadja Jeßberger für die hervorragende Betreuung, ihre Hilfestellung bei allen Problemen und für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Richard Dietrich für seine Unterstützung bei der Charakterisierung der Hbl spezifischen monoklonalen Antikörper.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Besonderer Dank gilt Gabi Açar für ihre unglaublich nette Art und Unterstützung in allen Bereichen. Auch Nele Maxseiner, die auf all meine Fragen immer eine hilfreiche Antwort parat hatte, möchte ich danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden Dr. Laura Gayk, Dr. Elena Feltl, Jonas Hofmayer, Valerie Schwenk und Klement Albrecht für die schöne Zeit am Lehrstuhl und ihre moralische Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern und meinen Geschwistern, die immer hinter mir stehen und für mich da sind. Insbesondere möchte ich mich bei meinem Opa für seine weisen Ratschläge bedanken, die mir stets eine große Hilfe waren. Ganz lieben Dank auch meiner Oma. Du hast dich in all meine Situationen hineinversetzt und bei allem mitgefiebert. Vielen Dank euch beiden! Ihr habt mir immer Mut zugesprochen. Lieber Opa, ruhe in Frieden!

Und zu guter Letzt: Lieber Christoph, vielen, vielen Dank für deine immerwährende Unterstützung, auch wenn ich mal nicht zu ertragen war. Danke, dass du mir zugehört hast, obwohl das Thema für jemanden fachfremden so schwierig zu verstehen ist. Vielen lieben Dank! Was wäre ein Leben ohne dich!