

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
- Prof. Dr. E. Märtlbauer -

Zellspezifische Wirkung von *Bacillus cereus* Zytotoxinen

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

von
Stefanie Elisabeth Bock
aus Bayreuth

München 2010

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. Werckenthin

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Meinem Vater in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Allgemeines	3
2.2	Krankheitsbilder	3
2.2.1	Extraintestinale Erkrankungen	3
2.2.2	Gastrointestinale Erkrankungen	5
2.3	Enterotoxine	6
2.3.1	Hemolysin BL (HBL)	6
2.3.2	Non-hemolytic enterotoxin (Nhe)	7
2.3.3	Cytotoxin K (CytK)	8
2.4	Nachweisverfahren für die <i>B. cereus</i> Enterotoxine	9
2.4.1	Zellkulturtests	9
2.5	Durchflusszytometrie	14
2.5.1	Allgemeines	14
2.5.2	Anwendungen	15
3	Eigene Untersuchungen	18
3.1	Materialien	18
3.1.1	Chemikalien und Biochemika	18
3.1.2	Bakterienstämme bzw.-isolate	19
3.1.3	Nährmedien	19
3.1.4	Puffer und Lösungen	20
3.1.5	Zellkultur	21
3.1.6	Immunreagenzien	22

3.1.7	Verbrauchsmaterialien	23
3.1.8	Geräte	23
3.1.9	Software	24
3.1.10	Sonstiges	24
3.2	Allgemeine Methodik	25
3.2.1	Anzucht von <i>B. cereus</i> in CGY-Bouillon	25
3.2.2	Immunaффinitätschromatographie	25
3.2.3	Indirekter Enzymimmuntest (EIA)	26
3.2.4	Westernblot	26
3.2.5	Zytotoxizitätstest	27
3.2.6	Kopplung der monoklonalen Antikörper an Alexa Fluoreszenz Farbstoffe	28
3.2.7	Immunfluoreszenz	28
3.2.8	Durchflusszytometrie	29
3.3	Ergebnisse	30
3.3.1	Charakteristika der verwendeten <i>B. cereus</i> Stämme	30
3.3.2	Zytotoxische Wirkung von <i>B. cereus</i> Enterotoxinen auf humane Zelllinien	32
3.3.2.1	Neutralisationstests	32
3.3.2.2	Subtraktive Immunaффinitätschromatographie	32
3.3.2.3	Vero-Zellen	33
3.3.2.4	Adhärente Zelllinien	38
3.3.2.5	Suspensionszelllinien	42
3.3.2.6	Endotheliale Primärzelllinie (HUVEC)	46
3.3.2.7	Vergleichende Darstellung der Zellkulturergebnisse	49
3.3.3	Immunfluoreszenz	52
3.3.4	Durchflusszytometrie	57
4	Diskussion	62
5	Zusammenfassung/Summary	70

6	Literaturverzeichnis	73
7	Anhang	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3-AcDON	3-Acetyldeoxynivalenol
BSA	Bovine serum albumin
CGY	Caseinhydrolysat-Glucose-Yeast
CytK	Cytotoxin K
DAPI	DNA-Fluoreszenzfarbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter/sorting
FCS	Fetal calf serum
HBL	Hemolysin-BL
HRP	Horseradish peroxidase
IAC	Immunaффinitätschromatographie
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal essential medium
MLT	Mouse lethality test
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium Bromid
Nhe	Non-hemolytic enterotoxin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PEMBA	Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RIL	Rabbit ileal loop test
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
VPR	Vascular permeability reaction
WST	Water soluble tetrazolium

1 Einleitung

Bacillus cereus ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes Bakterium, das sowohl in der Umwelt, als auch in verschiedenen Lebensmitteln nachgewiesen werden kann. Als Sporenbildner ist es in der Lage, die gängigen Pasteurisierungsverfahren zu überleben, darüber hinaus können sich psychrotrophe Stämme noch bei Kühlschranktemperatur vermehren. Deswegen ist *B. cereus* einer der wichtigsten Verderbserreger von Milch und nicht fermentierten Milcherzeugnissen (Süßgerinnung, Bitty cream), wird aber auch regelmäßig aus Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, sowie aus Fleisch (-gerichten) isoliert.

Daneben hat *B. cereus* als Gastroenteritis-Erreger zunehmend an Bedeutung gewonnen. Bei diesen Lebensmittelvergiftungen kann zwischen einer emetischen Form und einer Diarrhoe-Form unterschieden werden. Während die Erbrechenform von einem hitzestabilen, zyklischen Peptid (Cereulid; AGATA et al., 1995a) ausgelöst wird, werden derzeit die Zytotoxine Hemolysin-BL (HBL; BEECHER et al., 1995a), Non-hemolytic enterotoxin (Nhe; LUND & GRANUM, 1996) und Cytotoxin K (CytK; LUND et al., 2000) als ursächlich für die Verlaufsform mit dem Leitsymptom Durchfall angesehen. Während die Enteropathogenität für HBL im Tierversuch (BEECHER & WONG, 1994a; BEECHER et al., 1995a) bewiesen worden ist, fehlen solche *in vivo* Studien für Nhe und CytK. Nahezu alle *B. cereus* Stämme produzieren Nhe, während nur ca. die Hälfte der *B. cereus* Isolate die Gene für HBL besitzen (GUINEBRETIERE et al., 2002; EHLING-SCHULZ et al., 2005). Des Weiteren sind im Zusammenhang mit *B. cereus* verschiedene, zum Teil schwer verlaufende, nicht-gastrointestinale Erkrankungen bei Mensch und Tier beschrieben worden (DROBNIEWSKI, 1993; KOTIRANTA et al., 2000; ROWAN et al., 2003), wobei bis heute unklar ist, ob die o.a. Zytotoxine auch bei diesen Infektionen eine Rolle als Virulenzfaktor spielen.

Durch mehrere Studien in den letzten Jahren konnten die Enterotoxinkomplex-Bildner Nhe und HBL, sowie das Einzeltoxin CytK näher charakterisiert werden, dennoch ist zum Wirkungsmechanismus der Toxine auf zellulärer Ebene relativ wenig bekannt. Das zytotoxische Potential von *B. cereus* Isolaten (FLETCHER & LOGAN, 1999; GRAY et al., 2005; NGAMWONGSATIT et al., 2008a), sowie der präsumtiven Enterotoxine (DIETRICH et al., 1999; FAGERLUND et al., 2004; LINDBÄCK et al., 2004) ist in der Literatur bei verschiedenen Zelllinien beschrieben worden, allerdings fehlen vergleichende Studien mit

mehreren Zelllinien. Außerdem wurde noch kein Zelltyp gefunden, der resistent gegenüber diesen Zytolysinen ist, was die Suche nach einem potentiellen Toxin-Rezeptor deutlich vereinfachen würde. Zudem ist die zytotoxische Relevanz von Nhe und HBL noch nicht geklärt. So konnte gezeigt werden, dass die Nhe-, aber nicht die HBL-Konzentration mit der Virulenz von *B. cereus* Isolaten korreliert, und dass Stämme, die sowohl Nhe als auch HBL exprimieren, für Vero-Zellen nicht zytotoxischer sind als reine Nhe-Produzenten (MORAVEK et al., 2006).

In dieser Arbeit sollte daher mittels Zellkulturtests ein umfassender Überblick über die zytotoxische Aktivität von *B. cereus* Referenzstämmen mit unterschiedlichem Toxinprofil (Nhe bzw. Nhe und HBL bzw. CytK) bei humanen Zelllinien unterschiedlicher histogenetischer Herkunft gewonnen werden, was auch hinsichtlich der von *B. cereus* ausgelösten extraintestinalen Erkrankungen von Interesse ist. Des Weiteren sollten beim *B. cereus* Referenzstamm, der beide Toxin Komplexe – HBL und Nhe – gleichzeitig exprimiert, differenzierte Daten erhoben werden, inwieweit die beiden Toxine zur messbaren Gesamttoxizität bei verschiedenen Zelllinien beitragen. Darüber hinaus sollten mittels Immunfluoreszenz-Tests und Durchflusszytometrie die Bindung von NheB (Bindungskomponente von Nhe) an die Zelle näher charakterisiert werden, um Hinweise darüber zu erhalten, inwiefern diese Bindung für die Empfindlichkeit unterschiedlicher Zelllinien ausschlaggebend sein könnte.

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines

Bacillus cereus ist ein weit verbreitetes Bakterium, das sein Wachstum an die Gegebenheiten von Umwelt, Lebensmittel, sowie Gastrointestinaltrakt anpassen kann. *B. cereus* gehört zur morphologischen Gruppe 1A der Gattung *Bacillus*. Weitere Vertreter der sog. *B. cereus* Gruppe sind *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* und *B. weihenstephanensis*, welche anhand phänotypischer Eigenschaften unterschieden werden können. Genom-Sequenzierungen haben aber ergeben, dass *B. cereus*, *B. anthracis* und *B. thuringiensis* eng miteinander verwandt sind (HELGASON et al., 2000; RASKO et al., 2004). Die enge Verwandtschaft dieser Keime zeigt sich beispielsweise dadurch, dass bei mehreren Fällen von schweren und tödlich verlaufenden Pneumonien bei Metallarbeitern in den USA als auslösendes Agens ein *B. cereus* Stamm isoliert wurde, bei dem das die Anthrax-Toxine codierende Plasmid nachgewiesen werden konnte (HOFFMASTER et al., 2004 und 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass *B. thuringiensis* in der Lage ist, ähnliche Erkrankungen wie *B. cereus* auszulösen (SAMPLES & BUETTNER, 1983; JACKSON et al., 1995; DAMGAARD et al., 1997; HERNANDEZ et al., 1998; GHELARDI et al., 2007) und die damit in Zusammenhang gebrachten Toxine zu exprimieren (DAMGAARD, 1995; RIVERA et al., 2000; SWIECICKA et al., 2006). Deswegen wurde schon des Öfteren angeregt, die drei eng genetisch verwandten Spezies zusammenzufassen (DROBNIEWSKI, 1993; HELGASON et al., 2000; KOTIRANTA et al., 2000), diese Vorschläge wurden bislang aber nicht taxonomisch umgesetzt.

2.2 Krankheitsbilder

2.2.1 Extraintestinale Erkrankungen

B. cereus Infektionen beschränken sich nicht nur auf den Magen-Darm-Trakt. In der Literatur wurden zahlreiche Fälle beschrieben, in denen der Keim als Ursache für systemische Infektionen wie Sepsis und Bakteriämie (GINSBURG et al., 2003; HILLIARD et al., 2003), Meningitis (TOKIEDA et al., 1999; GAUR et al., 2001), Endokarditis (STEEN et al., 1992) und Pneumonie (FRANKARD et al., 2004; KATSUYA et al., 2009), sowie als Erreger

lokaler Wundinfektionen (DUBOUIX et al., 2005) und Endophthalmitiden (BEECHER et al., 1995b; BEECHER et al., 2000a; CALLEGAN et al., 2007; MOYER et al., 2008) identifiziert wurde. Unter den betroffenen Patienten sind v.a. immunsupprimierte Personen, wie z.B. sich in einer Chemotherapie befindliche Leukämie-Patienten oder Frühgeborene anzutreffen, aber auch Drogenabhängige, Alkoholiker, Patienten mit traumatischen oder operationsbedingten Wunden, sowie mit Verweilkathetern können betroffen sein (DROBNIIEWSKI, 1993; KOTIRANTA et al., 2000; HERNAIZ et al., 2003). Der Verlauf der systemischen, aber auch der lokalen Infektionen ist oft schwer und kann tödlich enden. Unklar ist, inwieweit die von *B. cereus* produzierten Exotoxine oder Enzyme an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt sind, allerdings wurde bereits von TURNBULL & KRAMER (1983) darauf hingewiesen, dass ein mit dem Diarrhoe-Syndrom von *B. cereus* in Zusammenhang stehendes Enterotoxin auch ein wichtiger Virulenzfaktor für nicht-gastrointestinalen Erkrankungen (TURNBULL et al., 1979) sein könnte. Ebenso konnten BEECHER et al. (2000a) zeigen, dass Hämolysin BL an der Entstehung der – fast immer zur Erblindung führenden – *B. cereus* Endophthalmitis beteiligt ist. Auffällig bei den in der Literatur beschriebenen klinischen Fällen ist auch, dass viele der Patienten mit Sepsis auch eine gastrointestinale Symptomatik zeigten (GAUR et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2005; KIYOMIZU et al., 2008). Auch im Zusammenhang mit der Aufnahme des emetischen Toxins wurden schwere Intoxikationen beschrieben, die z.T. in einer massiven Leberinsuffizienz mit letalem Ausgang resultierten (MAHLER et al., 1997; DIERICK et al., 2005).

Bei Rindern ist *B. cereus* als Erreger für Euterentzündungen beschrieben worden (TERPLAN, 1957; BROWN & SCHERER, 1957; PARKINSON et al., 1999; ROWAN et al., 2003). Nach Applikation von kontaminierten Trockensteller-Präparaten erkrankten Kühe an einer akuten Mastitis mit schweren Allgemeinsymptomen und z.T. tödlichem Verlauf (EWALD et al. 1985; GEDEK, 1986). Daneben wurde *B. cereus* auch bei Aborten von kleinen Wiederkäuern und Rindern isoliert (ROWAN et al., 2003).

2.2.2 Gastrointestinale Erkrankungen

Auf Grund des im Allgemeinen kurzen und milden Verlaufs einer Infektion mit *B. cereus* und da mit dem Nachweis dieses Erregers keine Meldepflicht nach Infektionsschutzgesetz verbunden ist, liegen nur unzureichende, statistisch nicht aussagekräftige Daten zur Inzidenz der durch *B. cereus* verursachten gastrointestinalen Erkrankungen vor. Tatsächlich steigen aber lebensmittelbedingte Erkrankungen, die durch *B. cereus* ausgelöst wurden, in den Industriestaaten kontinuierlich an (KOTIRANTA et al., 2000; EHLING-SCHULZ et al., 2004). Hierbei wird eine emetische Form und eine Diarrhoe-Form unterschieden. Die emetische Form wird durch ein gegen Hitze, Säure und proteolytische Enzyme resistentes Toxin, dem sog. Cereulid, ausgelöst (AGATA et al., 1995a), das im Lebensmittel präformiert vorliegt. Erste Krankheitssymptome, vor allem Übelkeit und Erbrechen, treten nach einer Inkubationsdauer von 0,5 - 6 Stunden auf, die nach 6 - 24 Stunden meist wieder abklingen (STENFORS ARNESEN et al., 2008). Cereulid-Intoxikationen treten vor allem nach dem Verzehr von kontaminierten, stärkehaltigen Lebensmitteln wie Reis und Nudeln auf (SCHOENI & WONG, 2005; GRANUM, 2007) und werden weltweit am häufigsten in Großbritannien und Japan beobachtet (STENFORS ARNESEN et al., 2008). Als wichtigste Differentialdiagnose für die Erbrechenform gilt die durch *S. aureus* Enterotoxine ausgelöste Lebensmittelvergiftung.

Die Diarrhoe-Form wird durch hitzelabile und trypsinempfindliche Enterotoxine ausgelöst, die erst nach dem Verzehr von mit vegetativen Bakterienzellen oder Sporen kontaminierten Lebensmitteln im Dünndarm gebildet werden (GRANUM et al., 1993; ANDERSSON et al., 1998; CLAVEL et al., 2004). Das Krankheitsbild ähnelt dem einer *C. perfringens* Infektion und ist vor allem geprägt durch Durchfall und abdominale Krämpfe, als Begleitsymptome wurden auch Übelkeit und Erbrechen beschrieben. Die Inkubationsdauer beträgt 8 - 16 Stunden, die Krankheitsdauer 12 - 14 Stunden (KRAMER & GILBERT, 1989). Die Diarrhoe-Form ist v.a. assoziiert mit dem Verzehr von proteinhaltigen Nahrungsmitteln wie Fleischerzeugnissen, Milchprodukten, Saucen, Suppen, Puddings und proteinreichem Gemüse (KRAMER & GILBERT, 1989; KOTIRANTA et al., 2000; GRANUM, 2007) und scheint vor allem in Nordeuropa und Nordamerika verbreitet zu sein (KOTIRANTA et al., 2000). Neben dem Menschen scheinen auch Hunde und Katzen empfänglich für diese Infektion zu sein. Nach Verabreichung von mit *B. cereus* belastetem Futter zeigten sie ähnliche gastrointestinale Symptome wie sie bei der Diarrhoe-Form des Menschen auftreten

(LUBENAU, 1906; NIKODEMUSZ, 1965 und 1967; NIKODEMUSZ und GONDA, 1966). Als ursächliches Agens für die Entstehung der Erkrankungen wurden verschiedene Enterotoxine wie das Hämolysin BL (HBL; BEECHER et al., 1995a), nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe; LUND & GRANUM, 1996), Cytotoxin K (CytK; LUND et al., 2000), Enterotoxin FM (EntFM; ASANO et al., 1997) bzw. Enterotoxin T (BceT; AGATA et al., 1995b) beschrieben. Allerdings wurde für die beiden letztgenannten Toxine nie eine Beteiligung an Lebensmittelinfektionen nachgewiesen und sie werden daher gegenwärtig nicht mehr als die für die Entstehung der Diarrhoe-Form wichtigen Faktoren angesehen (CHOMA & GRANUM, 2002).

2.3 Enterotoxine

2.3.1 Hemolysin BL (HBL)

Der aus den drei Proteinkomponenten B (Bindung), L₁ und L₂ (Lysis) bestehende Enterotoxinkomplex HBL wurde erstmals von BEECHER & MACMILLAN (1990) im *B. cereus* Stamm F837/76 nachgewiesen, der wiederum im Zusammenhang mit einer postoperativen Wundinfektion isoliert worden war (TURNBULL et al., 1979). Später konnte gezeigt werden, dass HBL im Tierversuch Charakteristika eines Enterotoxins aufweist (BEECHER & WONG, 1994a; BEECHER et al., 1995a) und identisch mit dem zuvor von THOMPSON et al. (1984) beschriebenen Toxin ist. Weiter wurden für dieses Toxin hämolytische Eigenschaften (BEECHER & MACMILLAN, 1990; BEECHER & WONG, 2000b), sowie zytotoxisches Potential bei Vero-Zellen nachgewiesen (LUND & GRANUM, 1997). Für die biologische Aktivität von HBL werden alle drei Komponenten benötigt (BEECHER et al., 1995a). Der molekulare Wirkungsmechanismus dieses Toxins ist unbekannt, gegenwärtig werden zwei Hypothesen diskutiert: (i) Die HBL-Komponenten binden unabhängig voneinander an die Zellmembran, oligomerisieren zu einem „membrane attack complex“ und bilden transmembranäre Poren (BEECHER & WONG, 1997), (ii) die B-Komponente bindet zuerst an die Zelle und schleust dadurch die beiden lytischen Komponenten ein, die dann metabolische Funktionen der Zelle stören oder mit der B-Komponente interagieren und Membranschäden verursachen (BEECHER & MACMILLAN, 1991). Zellrezeptoren für HBL wurden aber bis heute nicht entdeckt. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass ca. 50 % der *B. cereus* Isolate die Gene für HBL besitzen (PRÜSS et al., 1999; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; GUINEBRETIERE et al., 2002; EHLING-

SCHULZ et al., 2005; WEHRLE et al., 2009), wobei diese Stämme immer auch gleichzeitig Nhe exprimieren. „Reine“ HBL-Produzenten wurden bislang nicht gefunden (RUSUL & YAACOB, 1995; BEATTIE & WILLIAMS, 1999; GUINEBRETIERE et al., 2002; EHLING-SCHULZ et al., 2005). Die Expression von HBL, sowie von Nhe und CytK wird durch den PlcR-Regulator kontrolliert (AGAISSE et al., 1999; GOHAR et al., 2002), der es als Teil eines sog. „Quorum sensing“ Systems *B. cereus* erlaubt, die Expression der Virulenz-Gene in Abhängigkeit von der aktuellen Keimdichte zu regulieren.

2.3.2 Non-hemolytic enterotoxin (Nhe)

Nhe wurde das erste Mal im Zusammenhang mit einer Lebensmittelinfektion in Norwegen beschrieben. Hierbei wurde der *B. cereus* Stamm NVH 0075/95 isoliert, der kein HBL exprimiert (GRANUM et al., 1995; LUND & GRANUM, 1996). Wie HBL repräsentiert Nhe einen Enterotoxinkomplex, der sich aus drei Proteinkomponenten, nämlich NheA, NheB und NheC zusammensetzt. Die maximale biologische Aktivität wird nur entfaltet, wenn alle drei Komponenten in einem Mengenverhältnis von 10:10:1 vorliegen (LINDBÄCK et al., 2004). Die Nhe-Komponenten besitzen sowohl untereinander als auch zu den Komponenten des HBL strukturelle Ähnlichkeiten, wobei die Sequenzhomologien zwischen NheA und HBL-L₂, NheB und HBL-L₁, sowie NheC und HBL-B am ausgeprägtesten sind (GRANUM et al., 1999). Zum Wirkungsmechanismus auf zellulärer Ebene wurden Studien vor allem mit Vero-Zellen durchgeführt, wobei NheB als eine Bindungskomponente dieses Enterotoxins identifiziert werden konnte (LINDBÄCK et al., 2004). Nhe ist ein Poren bildendes Toxin, durch die Bildung transmembranärer Poren kommt es zum osmotisch bedingten Anschwellen der Zelle und schließlich zum Auflösen der Plasmamembran (FAGERLUND et al., 2008). Auf Grund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit der beiden *B. cereus* Enterotoxinkomplexe, Nhe und HBL, mit dem von einigen Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae* produzierten Cytolysin A (ClyA) wurde spekuliert, ob diese nicht eine neue Familie von Poren bildenden Zytotoxinen darstellen (FAGERLUND et al., 2008). Die Art und Weise, wie die Komponenten von Nhe dabei miteinander agieren, ist bislang unklar. Auf Grund der Tatsache, dass NheC für die maximale zytotoxische Aktivität von Nhe in äußerst geringen Mengen vorliegen muss, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei NheC um eine Art Katalysator handelt, der die anderen beiden Toxinproteine zusammenbringt, nachdem NheB an der Zelle gebunden hat oder bei ihnen Konformationsänderungen hervorruft (LINDBÄCK et al., 2004; FAGERLUND et al., 2008).

Neuere bislang unveröffentlichte Ergebnisse von DIETRICH et al., sowie LINDBÄCK et al., lassen aber darauf schließen, dass zuerst NheB und NheC an die Zelloberfläche binden und oligomerisieren, was es dann NheA ermöglicht an diesen Komplex zu binden. Wie bei HBL konnte bislang noch kein Zellrezeptor für Nhe identifiziert werden. Auf Grund der Tatsache, dass Nhe auch in synthetischen Lipiddoppelschicht-Membranen Poren zu bilden vermag, wurde vielmehr vermutet, dass Nhe auch ohne einen spezifischen Rezeptor an die Zellmembran binden kann (FAGERLUND et al., 2008; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Die Prävalenz der Gene für Nhe bei *B. cereus* Isolaten lag in mehreren Untersuchungen bei mehr als 90 % (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; GUINEBRETIERE et al., 2002).

2.3.3 Cytotoxin K (CytK)

Das Einzelprotein Cytotoxin K wurde aus dem *B. cereus* Stamm NVH 391/98 isoliert, der 1998 eine Lebensmittelvergiftung in Frankreich ausgelöst hatte. Dabei entwickelten die betroffenen Personen z.T. blutige Durchfälle, an denen auch drei Patienten starben (LUND et al., 2000).

Die Aminosäuresequenz von CytK zeigt Homologien zum Hämolyisin II von *B. cereus*, β -Toxin von *C. perfringens* und α -Hämolyisin von *S. aureus* (BAIDA et al., 1999; LUND et al., 2000). In Studien zum Verhalten von CytK *in vitro* wurde es als hämolytisches, Poren bildendes Toxin charakterisiert, das hochtoxisch für Vero- und CaCo-2-Zellen ist (LUND et al., 2000; HARDY et al., 2001). FAGERLUND et al. (2004) beschrieben eine Variante von CytK (CytK-2), die eine 89 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit dem zuerst isolierten CytK (CytK-1) aufweist. Die Stämme, bei denen diese Variante nachgewiesen wurde, exprimierten gleichzeitig auch HBL und/oder Nhe (STENFORS & GRANUM, 2001). CytK-2 hat ein deutlich geringeres toxisches Potential als CytK-1, ist aber ebenso in der Lage Poren zu bilden und ist auch zytotoxisch für Vero- und CaCo-2-Zellen (FAGERLUND et al., 2004). Das Gen für CytK-1 konnte bis jetzt nur bei drei Stämmen nachgewiesen werden, (FAGERLUND et al., 2007) während CytK-2-produzierende Stämme deutlich häufiger isoliert werden können (FAGERLUND et al., 2004; GUINEBRETIERE et al., 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008b).

2.4 Nachweisverfahren für die *B. cereus* Enterotoxine

Der Nachweis von Diarrhoe-Toxine basiert hauptsächlich auf molekularbiologischen und immunchemischen Methoden, sowie auf Zellkulturtests. Auf die beiden erstgenannten Methoden soll im Folgenden nur kurz eingegangen werden, die Zellkulturtests werden unter 2.4.1 näher beschrieben.

Bei den molekularbiologischen Methoden werden vor allem Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) beschrieben, wobei in den letzten Jahren Multiplex- und Real-time-PCRs an Bedeutung gewonnen haben (GUINEBRETIERE et al., 2002; PRIHA et al., 2004; YANG et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2006; FRICKER et al., 2007; MESSELHÄUSSER et al., 2007; WEHRLE et al., 2009). Als immunchemische Nachweisverfahren sind der BCET-RPLA Toxin Assay (Oxoid), ein reverser Latexagglutinationstest, der die L₂-Komponente des HBL nachweist (BEECHER & WONG, 1994c) und der TECRA-BDE, ein Sandwich-ELISA, der NheA nachweist (LUND & GRANUM, 1996), kommerziell verfügbar. Beide Tests basieren auf polyklonalen Antikörpern, die wie von BEECHER & WONG (1994c) gezeigt werden konnte, Kreuzreaktionen mit anderen *B. cereus* Exoproteinen aufweisen. Dies schränkt die Spezifität dieser Testsysteme erheblich ein. Die Entwicklung monoklonaler Antikörper (DIETRICH et al., 1999 und 2005) hat erheblich zur Verbesserung des spezifischen immunchemischen Nachweises von Nhe und HBL beigetragen. So konnte ein sog. Kolonieimmunoblot-Verfahren entwickelt werden, mit dem HBL- und/oder Nhe-produzierende Kolonien relativ schnell und einfach identifiziert werden können (MORAVEK et al., 2004). Basierend auf diesen Antikörpern wurde von der Fa. Merck ein immunchromatographischer Schnelltest (Duopath[®] Cereus Enterotoxins) entwickelt, mit dem die L₂-Komponente des HBL, sowie NheB parallel nachgewiesen werden können.

2.4.1 Zellkulturtests

Vor allem in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden Tierversuche zum Nachweis von *B. cereus* Enterotoxinen durchgeführt. Zu diesen *in vivo* Tests zählen der Darmschlingenligationstest (Rabbit ileal loop test = RIL-Test; SPIRA & GOEPFERT, 1972), der Mäuseletalitätstest (Mouse lethality test = MLT; GLATZ & GOEPFERT, 1973), die Gefäßpermeabilitäts-Reaktion (Vascular permeability reaction = VPR; GLATZ et al., 1974) und der Affenfütterungstest (MELLING et al., 1976).

Diese heute nicht mehr zeitgemäßen Versuche wurden durch *in vitro* Bioassays (Zellkulturtests) weitgehend abgelöst. Hierbei werden Zellen in der Regel mit sterilfiltrierten Kulturüberständen von *B. cereus* Anzuchten oder gereinigtem Enterotoxin inkubiert. Zur Untersuchung direkter Interaktionen zwischen Prokaryont und Eukaryont wurden Zellen aber auch direkt mit vegetativen Bakterienzellen oder Sporen behandelt. Die Auswertung erfolgt über eine Beurteilung der Vitalität der Zellen. Das kann entweder rein visuell (mikroskopisch) geschehen, wobei zytopathische Effekte, wie z.B. die Abkuglung der Zellen eines Monolayers beurteilt werden, oder objektiv durch Messung stoffwechselphysiologischer Parameter, wie im Kristallviolett-Test, MTT- bzw. WST- Test, Laktatdehydrogenase (LDH)-Test bzw. Alkalische Phosphatase (AP)-Test oder durch Bestimmung der Hemmung der Proteinsynthese. Im Kristallviolett-Test wird die intrazelluläre Konzentration des Farbstoffs spektrometrisch gemessen. Je größer die Vitalität der Zellen, desto höher die Farbstoffaufnahme (CHRISTIANSSON et al., 1989). Die metabolische Aktivität der Zelle kann im MTT- bzw. WST-Test objektiv beurteilt werden. Dabei werden durch zelluläre, mitochondriale Enzyme Tetrazoliumsalze zu Formazankristallen reduziert und der Farbumschlag colorimetrisch im ELISA-Reader gemessen. Die Vorteile des WST-Tests liegen in der einfacheren Durchführbarkeit und in den kürzeren Inkubationszeiten als beim MTT-Test (SEIDEL et al., 1996; DIETRICH et al., 1999). Im LDH-Test bzw. im AP-Test werden die extrazellulären Konzentrationen dieser, normalerweise nur im Zellinneren vorkommenden, Enzyme bestimmt. Somit kann eine Aussage hinsichtlich des Ausmaßes der Zellmembranschädigung durch Toxine getroffen werden (GRAY et al., 2005; FAGERLUND et al., 2008). Schließlich kann die Zytotoxizität über die Hemmung der Proteinsynthese quantifiziert werden. Die Proteinsynthesehemmung wird indirekt über die, bei geschädigten Zellen reduzierte, Aufnahme von Aminosäuren bestimmt. Dazu wird z.B. radioaktivmarkiertes Leucin verwendet (LINDBÄCK et al., 2004). Tab. 1 enthält eine Aufstellung verschiedener, zum Nachweis von *B. cereus* Toxinen eingesetzter Zellkulturtests und der dabei verwendeten Zelllinien.

Tabelle 1: Übersicht über in der Literatur beschriebene Zellkulturtests zum Nachweis von *B. cereus* Toxinen ^a

Zelllinien	Nachweis von	Untersuchungsmaterialien	Nachweisverfahren	Referenz
Vero, HeLa, HEL	Zytotoxizität von <i>B. cereus</i> Isolaten	Kulturüberstände	Kristallviolettfärbung	CHRISTIANSSON et al., 1989
Mc Coy	Zytotoxizität	Kulturüberstände von <i>Bacillus spp.</i>	MTT-Test	LINDSAY et al., 2000
CaCo-2	Zytotoxische Aktivität von CytK	Chromatographisch aufgereinigte Toxinproteine	Hemmung der Proteinsynthese	HARDY et al., 2001
CaCo-2, HEp-2	a) Zytotoxizität b) Adhäsion und Invasion (Zellinfektion)	a) Kulturüberstände von <i>Bacillus spp.</i> b) gewaschene Bakteriensuspensionen von <i>Bacillus spp.</i>	a) MTT-Test b) Ausplattieren und Zählen der an und in den Zellen vorhandenen Bakterien	ROWAN et al., 2001
Vero	Zytotoxische Aktivität von Nhe-Komponenten	Chromatographisch aufgereinigte und rekombinant hergestellte Toxin-Komponenten	Hemmung der Proteinsynthese	LINDBÄCK et al., 2004
CaCo-2, HeLa	Zytotoxizität	Kulturüberstände und Bakterien Suspensionen von <i>B. cereus</i> und <i>B. thuringiensis</i> Stämmen	Trypanblaufärbung	RAMARAO & LERECLUS, 2006
CHO	Zytotoxizität	Kulturüberstände von <i>Bacillus spp.</i>	WST und MTT (Vergleich)	NGAMWONGSATIT et al., 2008a

Fortsetzung Tab.1: Übersicht über in der Literatur beschriebene Zellkulturtests zum Nachweis von *B. cereus* Toxinen ^a

Zelllinien	Nachweis von	Untersuchungsmaterialien	Nachweisverfahren	Referenz
ARPE-19	Zytotoxizität	Bakterien Suspensionen von <i>B. cereus</i> Stämmen	a) Trypanblaufärbung b) LDH-Test	MOYER et al., 2008
Vero	Enterotoxin	Chromatographisch aufgereinigtes Toxin aus <i>Bacillus cereus</i> B-4ac	Mikroskopische Beurteilung der Zytotoxizität	THOMPSON et al., 1984
CHO	Diarrhoe-Toxine	Kulturüberstände und Zellextrakte von <i>B. cereus</i> Stämmen	Kristallviolett färbung	FERMANIAN et al., 1996
CHO	Emetisches und Diarrhoe-Toxin	Kulturüberstände von <i>Bacillus spp.</i> (erhitzt und unerhitzt)	MTT	BEATTIE & WILLIAMS, 1999
Mc Coy	Diarrhoe-Toxine	Kulturüberstände von <i>Bacillus spp.</i>	Mikroskopische Beurteilung bzw. Kristallviolett färbung	FLETCHER & LOGAN, 1999
Ped-2E9	Diarrhoe-Toxine	Kulturüberstände von <i>Bacillus spp.</i> (erhitzt und unerhitzt)	AP-Test	GRAY et al., 2005
Vero	Diarrhoe-Toxine (Nhe, HBL, CytK)	Kulturüberstände von <i>Bacillus cereus</i> Stämmen	WST	DIETRICH et al., 2005
HEp-2	Emetisches Toxin	Erhitzte Kulturüberstände von <i>B. cereus</i> und <i>Bacillus spp.</i> Isolaten	Mikroskopische Beurteilung der Zytotoxizität (Vakuolenbildung)	HUGHES et al., 1988

Fortsetzung Tab.1: Übersicht über in der Literatur beschriebene Zellkulturtests zum Nachweis von *B. cereus* Toxinen ^a

<i>Zelllinien</i>	<i>Nachweis von</i>	<i>Untersuchungsmaterialien</i>	<i>Nachweisverfahren</i>	<i>Referenz</i>
HEp-2	Emetisches Toxin	Autoklavierte Kulturüberstände von <i>B. cereus</i> Isolaten	a) Photometrische Messung des Farbumschlags im Zellkulturmedium b) Mikroskopische Beurteilung der Proliferationshemmung	MIKAMI et al., 1994
HEp-2	Emetisches Toxin	Autoklavierte Kulturüberstände von <i>B. cereus</i> und <i>Bacillus spp.</i> Isolaten	a) MTT-Test b) Mikroskopische Beurteilung der Zytotoxizität (Vakuolenbildung)	FINLAY et al., 1999
CaCo-2	Adhäsion	Sporen Suspensionen von <i>B. cereus</i> Isolaten	Phasenkontrastmikroskopie	ANDERSSON et al., 1998

^a Die Reihenfolge der aufgeführten Publikationen orientiert sich an der analytischen Fragestellung (Nachweis von zytotoxischen Effekten, Diarrhoe-Toxinen, emetischem Toxin bzw. Adhäsion)

Zur Etablierung der Zellkulturtests wurden verschiedene tierische (CHO, Mc Coy, Vero, Ped-2E9) und humane Zelllinien (CaCo-2, HEp-2, HeLa, HEL, APRE-19) verwendet. In der letzten Zeit haben aber die für *B. cereus* Toxine besonders empfindlichen Vero-Zellen (WONG et al., 1988) und die zur Beurteilung der Enteropathogenität von *B. cereus* Stämmen gut geeignete CaCo-2 Zelllinie (Colonkarzinomzellen), die im besonderen Maße empfindlich gegenüber CytK zu sein scheint (HARDY et al., 2001), immer mehr an Bedeutung gewonnen (FAGERLUND et al., 2004; LINDBÄCK et al., 2004; DIETRICH et al., 2005; MORAVEK et al., 2006; FAGERLUND et al., 2008). Die Präsenz von Enterotoxinen im untersuchten Probenmaterial wurde häufig parallel zu den beschriebenen Zellkulturtests mittels immunchemischer Verfahren wie beispielsweise dem BCET-RPLA oder dem TECRA-BDE nachgewiesen (FERMANIAN et al., 1996; BEATTIE & WILLIAMS, 1999; FLETCHER & LOGAN, 1999; ROWAN et al., 2001; GRAY et al., 2005). Auch PCRs zum Nachweis der Gene für die Diarrhoe-Toxine wurden durchgeführt (ROWAN et al., 2001; GRAY et al., 2005). In älteren Arbeiten wurde die Enteropatogenität der in die Zellkulturtests eingesetzten Toxine zudem mit *in vivo* Bioassays, wie dem RIL-Test oder der VPR, überprüft (THOMPSON et al., 1984; CHRISTIANSSON et al., 1989).

Nachteilig bei der Verwendung von ungereinigten Kulturüberständen in den Zellkulturtests ist, dass immer nur die Gesamtoxizität eines *B. cereus* Isolates nachgewiesen werden kann. Eine Differenzierung hinsichtlich der zytotoxischen Aktivitäten von ggf. im Überstand enthaltenen, verschiedenen Enterotoxinen ist kaum möglich, da bei der aufwändigen Aufreinigung der Toxine immer die Gefahr besteht, dass dabei ihre ursprüngliche biologische Aktivität vermindert wird oder verloren geht (LINDBÄCK et al., 2004).

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Allgemeines

In den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde das erste Durchflusszytometer gebaut, mit dem man basierend auf dem Prinzip der Lichtstreuung, Bakterienzellen in Aerosolen nachweisen konnte (GUCKER et al., 1947). Ende der 60er Jahre wurde dann das erste auf Fluoreszenzmessung basierende Durchflusszytometer entwickelt, das ab 1972 von der Firma Becton-Dickinson, ausgestattet mit einem Argonlaser, als erstes kommerziell erhältliches

Durchflusszytometer unter der Bezeichnung FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) vermarktet wurde (HERZENBERG et al., 2002). Das zu Grunde liegende Messprinzip ist hierbei, dass Zellen in einer Suspension vereinzelt an einem fokussierten Lichtstrahl (Laserstrahl) vorbeigeleitet werden. Dabei werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt, deren Rückkehr in einen energieärmeren Zustand mit der Emission von Licht verbunden ist. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist dabei länger als die der Anregungswellenlänge (PETIT et al., 1993). Das optische Signal wird von einem Photomultiplier detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Mit Hilfe spezieller Software können die Daten als Diagramme ausgewertet werden. Gleichzeitig mit der Fluoreszenz werden auch die Lichtbeugung (Forward Scatter; FSC) und Lichtbrechung (Side Scatter; SSC) an der Zelle erfasst. Damit können Aussagen hinsichtlich der Größe der Zellen (FSC) sowie deren Granularität und Form (SSC) gemacht werden (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000; BROWN & WITTEWER, 2000).

2.5.2 Anwendungen

Durch Entwicklung spezieller Fluoreszenzfarbstoffe ist es möglich, verschiedene strukturelle und funktionelle Parameter einer Zelle zu bestimmen. Zu den strukturellen Parametern zählen z.B. der DNA- oder RNA-Gehalt einer Zelle, Oberflächenantigene, intrazelluläre Antigene, Gesamtproteingehalt der Zelle etc. Funktionelle Messparameter sind u.a. Membranintegrität, intrazellulärer pH-Wert, zytoplasmatische Calcium-Konzentration, Zellrezeptoren, Enzymaktivität und oxidativer Metabolismus (SHAPIRO, 2003). Die Bestimmung mehrerer Parameter gleichzeitig ist möglich, wenn Fluoreszenzfarbstoffe mit verschiedenen Emissionsspektren, die sich nicht überlappen, verwendet werden (CRONIN & WILKINSON, 2009). Die Anwendung der Durchflusszytometrie ist heutzutage in der Klinik weit verbreitet. In der Onkologie kann die Prognose und Therapie von malignen Tumoren anhand von Messungen des DNA-Gehaltes der Tumorzelle mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) erstellt werden (DAVIDSON et al., 2007). Durch die Bestimmung der Oberflächenantigene (CD-Antigene) bei Leukozyten mittels spezifischer Fluoreszenz markierter Antikörper ist es möglich, bestimmte Leukozytenpopulationen im Blut nachzuweisen, was zum Beispiel zur Beurteilung des Verlaufs einer HIV-Infektion oder zur Bestimmung der Art einer Leukämieerkrankung genutzt wird (BROWN & WITTEWER, 2000). Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Mikrobiologie. Da der kulturelle Nachweis von Bakterien, Pilzen oder Viren sehr aufwändig und zeitintensiv ist, wird seit Ende der 90er

Jahren des letzten Jahrhunderts verstärkt Durchflusszytometrie in der Diagnostik von Mikroben eingesetzt (ALVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000). So können mittels spezifischer Fluoreszenz markierter Antikörper aus Proben wie Blut und anderen Körperflüssigkeiten spezielle Bakterienarten ebenso identifiziert werden (CLARKE & PINDER, 1998), wie auf der Oberfläche oder innerhalb einer Zielzelle befindliche Viren (LAFFIN & LEHMAN, 1994). Auch der Effekt einer antimikrobiellen Therapie und die Empfindlichkeiten auf bestimmte Antibiotika können mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Dazu werden Farbstoffe wie beispielsweise PI, das vermehrt durch geschädigte Membranen aufgenommen wird, oder Rhodamin 123, das sich nur in Zellen mit einem intakten transmembranären elektrochemischen Potential anlagert, eingesetzt (KAPRELYANTS & KELL, 1992; GANT et al., 1993).

In der Grundlagenforschung spielen Erkenntnisse über die Wirkungsmechanismen von bakteriellen Toxinen an eukaryontischen Zellen eine wichtige Rolle. Die Bestimmung bestimmter Zellparameter mittels Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt hierbei Rückschlüsse über bestimmte Mechanismen der von den Bakterien sezernierten Toxine. So kann mittels DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe wie PI, DAPI, Acridin-Orange bzw. Hoechst Farbstoffen der DNA-Gehalt bzw. die Zellzyklus-Phase von Zellen bestimmt werden (BERTHO et al., 2000). Dadurch können Aussagen über den Einfluss eines Toxins auf Zellzyklus und Zellproliferation gemacht werden (SHENKER et al., 2005; FALZANO et al., 2006; HAUGWITZ et al., 2006). Mittels DNA-spezifischer Farbstoffe wie PI und fluoreszenzmarkiertem Annexin-V kann zudem zwischen vitalen, apoptotischen oder nekrotischen Zellen unterschieden werden. PI kann durch die durchlässigen Membranen nekrotischer Zellen eindringen und die DNA anfärben. Bei apoptotischen Zellen ist die Anfärbbarkeit der DNA auf Grund ihrer beginnenden Fragmentierung vermindert. Somit sind lebende und apoptotische Zellen PI negativ. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, ein Phosphoglycerid, das physiologischerweise an der Innenseite der Lipiddoppelschicht der Zellmembran vorkommt und bei Umstrukturierungen während des programmierten Zelltods auf die Zelloberfläche transloziert wird. Das bedeutet, dass vitale Zellen Annexin-negativ sind, während die im Prozess der Apoptose begriffenen Zellen Annexin-positiv sind. Bei nekrotischen Zellen kann Annexin-V in die Zelle eindringen und sich an das an der Innenseite der Membran befindliche Phosphatidylserin binden (BERTHO et al., 2000). Solche „Zellvitalitätstests“ geben einen ersten Hinweis darauf, wie die zellulären Schäden entstanden sein könnten. So konnten beispielsweise FAGERLUND et al. (2008) für Nhe nachweisen,

dass es zur Porenbildung in Membranen von Zellen befähigt ist, da die mit dem Toxin behandelten Zellen vermehrt PI aufgenommen hatten, was zum Anstieg des Fluoreszenzsignals führte.

Einen weiteren Hinweis auf die Wirkungsmechanismen von bakteriellen Toxinen geben Versuche, die sich mit der Bindung des Toxins an die Zielzelle beschäftigen. Hierbei kann die Bindung entweder direkt durch Fluoreszenzmarkierung des Toxins (PARAJE et al., 2002; DESHPANDE et al., 2006) oder indirekt durch Zugabe toxinspezifischer, Fluoreszenz markierter Antikörper nachgewiesen werden (RAMEGOWDA & TESH, 1996; ARCE et al., 2005). Gängige Farbstoffe hierbei sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bzw. Alexa Fluor 488, die beide Licht im grünen Wellenlängenbereich emittieren. Durch solche Fluoreszenz-Tests ist es möglich, die Bindung eines Toxins an unterschiedliche Zelllinien quantitativ zu erfassen. Für die Bindungskomponente des Anthrax-Toxins, PA (Protective Antigen), wurde so gezeigt, dass die divergierende Toxinempfindlichkeit verschiedener Zelllinien von der Affinität der Bindung des Toxins an die Zelloberfläche abhängt. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass den in der Studie untersuchten Zelltypen bei der Pathogenese dieser Infektion eine unterschiedliche Rolle zukommt (PANDEY & WARBURTON, 2004).

Mit der Durchflusszytometrie kann man auch bei einer großen Probenanzahl, in verhältnismäßig kurzer Zeit, objektive und quantitative Erkenntnisse über die Zellbindung von Toxinen und die Expression möglicher Rezeptoren auf einer Zielzelle gewinnen. Die rezeptorvermittelte Bindung eines Toxins an eine Zelle kann dadurch nachgewiesen werden, dass der Einsatz steigender Toxinmengen ab einer bestimmten Konzentration in einer Sättigung der Zelloberfläche resultiert. Dies hat zur Folge, dass die gemessene Fluoreszenz ab einer bestimmten Toxinkonzentration nicht mehr ansteigt. Dagegen würde man bei einer unspezifischen Bindung einen linearen Verlauf der Kurve beobachten (DESHPANDE et al., 2006). Nach der Identifizierung des Toxinrezeptors ist es zudem mittels Fluoreszenz markierter Liganden – meist ein spezifischer Antikörper – der gegen den Rezeptor gerichtet ist möglich, dessen Expression auf verschiedenen Zellen nachzuweisen (LALLY et al., 1997; OHMI et al., 1998; MOROVA et al., 2008; SEWALD et al., 2008).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Alexa Fluor[®] Phalloidin (Invitrogen, A12379)
Alexa Fluor[®]488 Succinimidyl-Ester (Invitrogen; A 20000)
Alexa Fluor[®]555 Succinimidyl-Ester (Invitrogen; A 20009)
6-Aminocaprinsäure (Sigma, A-2504)
Bromphenolblau (Merck, 8122)
Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma, A 7030)
Casein (Sigma-Aldrich, C- 8654)
Caseinhydrolysat (Oxoid, L41)
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11 644 807 001)
CNBr-aktivierte Sepharose[®] 4B (Pharmacia Biotech, 71-7088-00)
Dulbecco's MEM Zellkulturmedium (Biochrom AG, F0435)
Endothelial cell basal medium (EBM) (Lonza, CC-3121)
Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, S 0115)
Fibronectin (Sigma-Aldrich, F2006)
D (+)-Glukose Monohydrat (Riedel- de Haën, 16301)
L-Glutamin (Biochrom AG, K0282)
Hefeextrakt (Oxoid, L21)
HEPES (Sigma-Aldrich, H4034)
Magnesiumsulfat (Fluka, 63138)
Mc Coy's 5A modifiziertes Zellkulturmedium (Biochrom AG, F1015)
MEM-EARLE Zellkulturmedium (Biochrom AG, FG0325)
Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, M-6250)
Natriumdodecylsulfat (SERVA Electrophoresis GmbH, 20765)
Natriumpyruvat (Biochrom AG, L 0473)
Paraformaldehyd (Fluka, 76240)
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml (Biochrom AG, A2212)
ProLong[®] Gold antifade mit DAPI (Invitrogen, P36931)
PEG (Fluka, 81300)

Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) (Sigma-Aldrich, P1585)
Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich, P-7170)
RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, FG1215)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, T-2885)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 93443)
Trizma Base (Sigma, T-1503)
Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich)
Tween 20 (Sigma-Aldrich, P-1379)
Wasserstoffperoxid 30 % (Merck, 1.07209.0250)

Alle anderen nicht eigens aufgeführten Laborchemikalien wurden in p.A. Qualität verwendet.

3.1.2 Bakterienstämme bzw. -isolate

B. cereus Referenzstämme

- DSM 4384 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig); HBL- und Nhe-Produzent
- NVH 0075/95 (GRANUM et al., 1996); Nhe-Produzent
- NVH 391/98 (LUND et al., 2000); CytK-Produzent

Sonstige Stämme

- MHI 1761 (Stammsammlung Institut); Nhe Mutante: NheA⁻, NheB⁺, NheC⁺
- MHI 1672 (Stammsammlung Institut); Nhe Mutante: NheA⁺, NheB⁺, NheC⁻

3.1.3 Nährmedien

Flüssiges Anreicherungsmedium für *B. cereus*

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

Feste Nährmedien für *B. cereus*

- Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid, PB 5039 A)
- PEMBA-Agar (Oxoid, PO 5048 A)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Enzymimmuntest (EIA)

Bicarbonatpuffer: 0,05 mol/l; pH 9,6

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

Citratpuffer: 0,21 mol/l mit Zusatz von 3,13 mmol/l H₂O₂; pH 3,95

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 0,013 mol/l Phosphatpuffer mit Zusatz von 0,12 mol/l Natriumchlorid; pH 7,3

Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB): 0,021 mol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 1 ml Aceton und 9 ml Methanol

Substrat-Chromogenlösung: 20 Teile Citratpuffer mit H₂O₂ Zusatz und 1 Teil TMB-Lösung

Schwefelsäure: 1 mol/l

Waschlösung: 0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung mit Zusatz von 0,025 % (v/v) Tween 20

Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese

Bromphenolblaulösung: 0,3 %

SDS-Puffer: 0,03 mol/l Tris/HCl Puffer (pH 8,0) mit Zusatz von 0,03 mol/l EDTA und 7,5 % SDS

Immunoblot

Anodenpuffer I: 18,6 g Trizma Base in 100 ml Methanol und 400 ml A. dest

Anodenpuffer II: 1,51 g Trizma Base in 100 ml Methanol und 400 ml A. dest

Kathodenpuffer: 2,62 g 6-Aminocapronsäure in 100 ml Methanol und 400 ml A. dest

Immunaффinitätschromatographie

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

PBS mit Zusatz von 0,1 % Natriumazid

Immunfluoreszenz

EC-Puffer (Extracellular bathing solution nach FAGERLUND et al., 2008): 0,14 mol/l Natriumchlorid, 0,015 mol/l Hepes, 0,001 mol/l Magnesiumchlorid, 0,001 mol/l Calciumchlorid, 0,01 mol/l Glucose; pH 7,2 (mit 1 mol/l Trizma Base einstellen)

Paraformaldehydlösung: 4 % (w/v) in PBS

BSA-PBS-Lösung: 1 % BSA (w/v) in PBS

Blockierungspuffer: 5 % (v/v) inaktiviertes Ziegen Serum in 1 % BSA-PBS

Triton-X-PBS-Lösung: 0,5 % Triton-X-100 (v/v) in PBS

Kopplungspuffer: 0,1 mol/l PBS; pH 8,2

Durchflusszytometrie

FACS-Puffer: 1 % BSA-PBS (steril) mit Zusatz von 0,1 % Natriumazid

3.1.5 Zellkultur

Zelllinien

African green monkey kidney cells: Vero Zellen (ECACC, 84113001)

Humane Colonkarzinomzellen: CaCo-2 Zellen (DSM, ACC 169)

Humane Leberkarzinomzellen: Hep-G2 Zellen (DSM, ACC 180)

Humane Larynxkarzinomzellen: HEp-2 Zellen (ECACC, 86030501)

Humane Lungenkarzinomzellen: A549 Zellen (DSM, ACC 107)

Humane Rhabdomyosarkomzellen: A204 Zellen (DSM, ACC 250)

Humane histiozytäre Lymphomzellen: U937 Zellen (DSM, ACC 5)

Humane T-Leukämiezellen: Jurkat Zellen (DSM, ACC 282)

Humane multiple Myelomzellen: RPMI 8226 Zellen (DSM, ACC 402)

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen: HUVEC Zellen (Cellsystems, S 200-05n)

Zellkulturmedien

Bis auf das EBM-Medium (Basalmedium für endotheliale Zellen) wurden alle Medien mit 1 % Natriumpyruvat versetzt. Details zu den verwendeten Zellkulturmedien und deren Zusätze sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Zelllinien	Medium	FCS-Zusatz (v/v)	L-Glutamin (v/v)	Pen./Strep. ¹ (v/v)
Vero	MEM-Earle	1 %	-	0,2 %
CaCo-2	MEM-Earle	10 %	-	-
Hep-G2	RPMI 1640 Medium	10 %	-	-
HEp-2	MEM-Earle	1 %	-	0,2 %
A549	Dulbecco's MEM	10 %	2 %	
A204	Mc Coy's 5A modifiziertes Medium	15 %	1 %	-
U937	RPMI 1640 Medium	10 %	-	-
Jurkat	RPMI 1640 Medium	10 %	-	-
RPMI 8226	RPMI 1640 Medium	10 %	-	-
HUVEC	EBM ²	2 %	-	-

¹ Pen./Strep. = Penicillin/Streptomycin

² Medium wurde mit weiteren Zusätzen (Hydrocortison, endothelialer Wachstumsfaktor, boviner Gehirnextrakt und nach Bedarf Gentamycinsulfat, Amphotericin-B) wie vom Hersteller angegeben (Lonza, Verviers, Belgien) supplementiert

3.1.6 Immunreagenzien

Alexa Fluor[®] 488-Maus IgG₁ Antikörper (Isotyp-Kontrolle; Invitrogen MG 120)

Kaninchen Anti-Maus HRP (Dako P 0161)

Schwein Anti-Kaninchen HRP (Dako P0217)

Kaninchenantiserum gegen CytK (Lehrstuhl für Milchhygiene)

mAk 5B2 gegen 3-Acetyldeoxynivalenol (Lehrstuhl für Milchhygiene)

Zum Nachweis der *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten standen folgende monoklonale Antikörper (mAk) zur Verfügung, die alle im Laufe der letzten Jahre am Lehrstuhl hergestellt worden sind (DIETRICH et al., 1999 und 2005):

Toxinkomplex	Exoprotein bzw. Antigen	Monoklonaler Antikörper
HBL	B-Komponente	HT-L1 II 1B8
	L ₂ -Komponente	45 I 8B12 bzw. 45 II 1A12
Nhe	NheB-Komponente	45 kD III 1E11 bzw. 39 II 2B11

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

B. cereus Exoprotein-Produktion

Cryo-Tubes, 1,8 ml (Nunc GmbH, 375418)

Sterilfilter Millex GV, 0,22 µm (Millipore, SLGV033RS)

Zellkultur

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

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm² (Nunc, 178905)

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

Gelelektrophorese und Immunoblot

Phastgel Probenauftragskämme 8/0,5 µl (GE Healthcare, 18-1617-01)

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

Phast Gel SDS Pufferstreifen (GE Healthcare, 17-0516-01)

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

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

Sonstige

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

Cell Star PP test tubes, steril, 50 ml (Greiner bio-one, 227 261)

Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl (Brand)

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

Amicon[®] Ultra Zentrifugalfilter, 4 ml, 30k (Millipore, UFC803024)

Amicon[®] Ultra Zentrifugalfilter, 15 ml, 30k (Millipore, UFC903024)

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

Mikrotiterplatten, 96 Loch (Nunc, 439454)

3.1.8 Geräte

Begasungsbrutschrank Typ B 5060-EC CO₂, 37°C (Heraeus)

Brutschrank (Mettler)

FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson)

Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence)

Inverses Mikroskop (Zeiss)

Kodak Image Station 200MM (Biostep)

Mikrotiterplattenlesegerät Sunrise Remote Control (Tecan)

Multiphor II Electrophoresis System and Electrophoresis Power Supply (Pharmacia Biottech)

Phastsystem Separation and Control Unit (Pharmacia)

Photometer UV -1601 (Shimadzu Corporation)

Schüttelwasserbad, GFL 1083 (Ges. für Labortechnik)

Sterilwerkbank HERA SAFE KS-12 (Kendro)

3.1.9 Software

KODAK 1D 3.6. software

Ridawin (R-Biopharm)

FCS Express software (De Novo software)

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

3.1.10 Sonstiges

Accu-Jet Pipettierhilfe

Dispenser mit 0,6 ml Sprizen (LKB Instrument)

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

Variable Zwölfkanalpipette 30 - 300 μ l (Eppendorf)

Zählkammer nach Thoma (Brand)

3.2 Allgemeine Methodik

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

Die Anzucht der *B. cereus* Stämme zur Produktion der Enterotoxine erfolgte standardmäßig in einer nach BEECHER & WONG (1994b) modifizierten CGY-Bouillon. Nach Voranreicherung einer auf Blutplatte gewachsenen Einzelkolonie in 20 ml Medium für 17 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad, wurden 200 µl der Voranreicherung in 20 ml CGY-Bouillon überführt (Verhältnis 1:100) und wiederum 6 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Der nach Zentrifugation gewonnene Kulturüberstand wurde sterilfiltriert, mit 1 mmol/l EDTA versetzt (um die von *B. cereus* produzierten Metalloproteasen zu inaktivieren), in Kryo-Tubes portioniert und bei -20 °C tief gefroren.

3.2.2 Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Zur Herstellung der Immunaффinitäts-Säulen (IAS) wurden die gegen die Enterotoxinkomplex-Komponenten NheB, HBL-L₂ und HBL-B gerichteten monoklonalen Antikörper (mAk) 1E11, 8B12 und 1B8 (siehe 3.1.6) wie bei STRICH (1999) beschrieben an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt (10 mg mAk/g Gel).

Zur sequentiellen Entfernung von Toxinkomponenten aus Kulturüberständen des *B. cereus* Stammes DSM 4384 wurden die IAC-Säulen zunächst mit 10 ml PBS (steril) gespült, um den Konservierungspuffer (PBS mit Zusatz von 0,05 % Natriumazid) zu entfernen. Die 1:10 in PBS verdünnten toxischen *B. cereus* Kulturüberstände wurden dann langsam (Durchflußrate 1 ml/min) über die Säulen gegeben, so dass die jeweiligen Toxinkomponenten an die kovalent gekoppelten Antikörper binden konnten. Die so gewonnenen Probanddurchläufe (*B. cereus* Kulturüberstände frei von NheB bzw. NheB und HBL-L₂ bzw. NheB, HBL-L₂ und HBL-B) wurden für Zytotoxizitätstests, sowie für EIA- und Westernblot-Analysen verwendet. Nach erneutem Waschen mit PBS, um ungebundene Toxinkomponenten aus dem Gel zu entfernen, wurden die an die Antikörper gebundenen Toxinkomponenten mit 10 ml Glycin/HCl-Puffer (pH 2,5) eluiert. Zur Gewinnung von gereinigtem NheB wurden 1:2 in PBS verdünnte Kulturüberstände des *B. cereus* Stammes MHI 1672 auf die 1E11-IAC-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule und Eluieren des gebundenen NheB mit Glycin-

HCl-Puffer wurde das Eluat mit Bicarbonatpuffer (20 ml zu 10 ml Eluat) neutralisiert, aufkonzentriert und zur Bestimmung der Proteinkonzentration die Absorption bei 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Nach dem Eluieren wurden die Säulen mit 10 ml PBS und Konservierungspuffer gespült und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Indirekter Enzymimmuntest (EIA)

Zum semiquantitativen Nachweis der *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten NheB bzw. HBL-L₂ sowie CytK in Kulturüberständen und Toxinpräparationen wurden indirekte Enzymimmuntests durchgeführt.

Dazu wurden Mikrotiterplatten mit seriellen Verdünnungsreihen der 1:5 in Bicarbonatpuffer verdünnten Proben (100 µl/Kavität) beschichtet. Nach Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer, wurden freie Bindungsstellen mit 3 % Casein/PBS (150 µl/Kavität) für 45 min blockiert. Danach wurden die Platten gewaschen und mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen NheB (mAk 1E11; 2 µg/ml) bzw. gegen HBL-L₂ (mAk 8B12; 1 µg/ml) sowie mit den gegen CytK gerichteten polyklonalen Antikörpern (Kaninchenantiserum gegen CytK; 1:500) versetzt (100 µl/Kavität) und für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde für eine Stunde Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Peroxidase bzw. Schwein-Anti-Kaninchen-Ig-Peroxidase (1:3000 bzw. 1:2000 in 1 % Casein/PBS; 100 µl/Kavität) zugegeben. Nach einem letzten Waschschrift wurde die Substrat/Chromogen-Lösung auf die Platten gegeben (100 µl/Kavität) und die Reaktion nach 20 Minuten mit 1 mol/l Schwefelsäure gestoppt (100 µl/Kavität). Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Extinktion wurde im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm gemessen. Zur Berechnung des Antigentiters wurde diejenige Verdünnungsstufe herangezogen deren Extinktion dem Wert 1,0 am nächsten kam. Der Titer ergab sich aus der Multiplikation dieser Extinktion mit der dazugehörigen reziproken Verdünnung.

3.2.4 Westernblot

Die elektrophoretische Auftrennung der *B. cereus* Exoproteine erfolgte mit SDS-PAGE unter Verwendung des PhastSystems von Pharmacia (Uppsala, Schweden).

Dazu wurden 20 µl der aufkonzentrierten Proben mit 10 µl SDS-Puffer und 2 µl Bromphenolblau versetzt und für 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wurden 0,5 µl des Probenansatzes auf Polyacrylamidgele (Gradient 10 - 15) aufgetragen und die Proteine bei 250 V, 10 mA, 3 W, 15 °C, 60 Vh aufgetrennt. Nach elektrophoretischen Transfer (600 V, 17 mA, 30 W, 1 h) der aufgetrennten Proteine auf Immobilon-P und orientierender Anfärbung der Eichproteinbanden mit Ponceau-Rot, wurde die Transfermembran über Nacht bei 4 °C in 3 % Casein-PBS- Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Zur Darstellung der toxinspezifischen Banden wurde die Membran mit den monoklonalen Antikörper (1E11 2 µg/ml; 8B12 1 µg/ml bzw. 1B8 3 µg/ml) für 60 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden peroxidasemarkierte Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Peroxidase; 1:3000) zugegeben und wieder eine Stunde inkubiert. Alle Antikörper wurden in 3 % (g/v) Casein-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween verdünnt. Danach wurde die Membran mit PBS gewaschen, dann mit Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat, Thermo Scientific) laut Herstelleranweisung versetzt und das entstehende Signal für drei Minuten mittels Imager erfasst.

3.2.5 Zytotoxizitätstest

Zur Beurteilung der zytotoxischen Aktivität der Kulturüberstände bzw. Enterotoxinkomplex-Komponenten wurde der von FELLA (1999) entwickelte, auf Vero-Zellen basierende WST-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Für den simultanen Ansatz wurde eine 96-Loch Platte mit Zellkulturmedium beschickt (100 µl/Kavität) und in den Spalten 1 - 10 eine log-2 Verdünnungsreihe der Proben angelegt (Doppelansatz). Die Spalten 11 und 12 der Platte wurden für die toxfreien Kontrollansätze (Negativkontrolle) verwendet. Die Reihen A und H wurden zur Vermeidung von Randeffekten nicht belegt. Danach wurden 100 µl Zellsuspension zugefügt. Die optimale Zellzahl für jede Zelllinie wurde zuvor in Vorversuchen bestimmt und betrug 1×10^4 Zellen/Kavität für Vero- und A204-Zellen, 2×10^4 Zellen/Kavität für A549-, CaCo-2-, Hep-G2-, HEp-2- und Jurkat-Zellen, $1,25 \times 10^5$ Zellen/Kavität für RPMI 8226-Zellen und 2×10^5 Zellen/Kavität für U937-Zellen. Nach Inkubation über 24 h bei 37 °C in 7 % CO₂-Atmosphäre wurde die Zellschädigung zunächst mikroskopisch beurteilt, bevor die Vitalität der Zellen über ihre Stoffwechselaktivität bestimmt wurde. Dazu wurden pro Vertiefung 100 µl Medium abgenommen und danach 10 µl WST-1 Reagenz zugegeben. Das Tetrazoliumsalz

WST wird durch metabolisch aktive Zellen zum Farbstoff Formazan reduziert, dessen Intensität photometrisch bei 450 nm gemessen werden kann. Als Zytotoxizitätstiter wurde diejenige Verdünnungsstufe der Präparationen definiert, die im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer 50 % Reduktion der Spaltungsaktivität der Zellen führte.

3.2.6 Kopplung der monoklonalen Antikörper an Alexa Fluoreszenz-Farbstoffe

Die zur Kopplung vorgesehenen, affinitätschromatographisch gereinigten und in PEG auf eine Konzentration von 2 mg/ml aufkonzentrierten Antikörper (1E11 bzw. 2B11) wurden über Nacht gegen 0,1 mol/l PBS (pH 8,2) dialysiert. Danach wurden die in DMSO gelösten Alexa Fluor-Succinimidyl-Ester (10 mg/ml) in einer Konzentration von 100 µg Farbstoff pro 1 mg Antikörper zugegeben und im Dunkeln unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nicht gekoppeltes Fluorochrom wurde dann durch Verdünnen des Ansatzes mit 10 ml PBS (pH 7,3) und Zentrifugieren in Amicon Ultra-Zentrifugationseinheiten (Ausschlußgewicht 30 kDa) bei 3000 x g für 30 Minuten bei 4 °C entfernt. Dieser Waschschrift wurde danach nochmals wiederholt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration und der Kopplungsrate, wurden die gekoppelten Antikörper mit 0,1 % Natriumazid konserviert, mit 1 % BSA stabilisiert und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

3.2.7 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz diente zum Nachweis von zellmembrangebundenem NheB. Dazu wurde in sog. „Chamber Slides“ 150 µl Zellsuspension (6×10^5 Zellen/Kammer) simultan mit in Zellkulturmedium verdünnten *B. cereus* Kulturüberständen (Endverdünnung 1:20 - 1:40; 150 µl/well) oder gereinigtem NheB (Endkonzentration 4 - 5 µg/ml; 150 µl/well) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen des gesamten Mediums wurde das Slide mit PBS gewaschen und danach die Zellen mit eiskaltem reinem Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Überschüssiges Methanol wurde durch Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellmembranen durch Zugabe von PBS mit Zusatz von 0,5 % (v/v) Triton-X-100 (300 µl/Kavität) permeabilisiert (10 min). Nach einem weiteren Waschschrift wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von Blockierungspuffer (300 µl/Kammer; 45 min) abgesättigt. Danach erfolgte die Zugabe (0,1 ml) der in 1 % BSA-PBS verdünnten fluoreszenzmarkierten mAks (2,5 - 3 µg pro Kavität). Nach 1 h Inkubationszeit wurde das Slide gewaschen und nach

Abnehmen der Kammern in PBS gebadet und luftgetrocknet. Abschließend erfolgte das Eindecken und die gleichzeitige Kernfärbung mittels ProLong Gold antifade mit DAPI. Die Objektträger wurden über Nacht zur vollständigen Trocknung dunkel bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden.

3.2.8 Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der Bindung von NheB an die Zelle erfolgte mit Hilfe der auf Fluoreszenz basierenden Durchflußzytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting). Die Toxinbindung an die Zellen wurde indirekt durch einen Fluoreszenz markierten monoklonalen Antikörper (1E11-Alexa Fluor 488) detektiert.

Dazu wurden 3×10^6 Zellen mit in 3 ml EC-Puffer verdünntem NheB ($2 \mu\text{g/ml}$), das aus der Aufreinigung von Kulturüberständen des *B. cereus* Stammes MHI 1672 mit der 1E11-IAC Säule gewonnen worden war, für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Wachsritt wurde $1 \mu\text{g}$ mit fluoreszierendem Farbstoff markierter Antikörper (1E11-Alexa Fluor 488) pro 1×10^6 Zellen zugegeben. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein identischer Ansatz, bei dem ein unspezifischer, an Alexa Fluor 488 gekoppelter IgG₁ Antikörper aus der Maus verwendet wurde, angelegt. Die Antikörper wurden bei 4°C für 1 h mit den Zellen inkubiert. Danach wurden ungebundene Antikörper gewaschen und je Ansatz 1×10^4 Zellen per Durchflußzytometer analysiert. FACS-Puffer wurde für sämtliche Waschschrte, sowie als Verdünnungslösung für die Antikörper verwendet. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit FCS Express Software. Basierend auf den (unspezifischen) Fluoreszenzintensitäten der Zellen, die mit den Kontrollantikörpern der Isotyp-Kontrolle behandelt worden waren, wurde ein Schwellenwert definiert, anhand dessen der Prozentsatz an spezifisch fluoreszenzmarkierten Zellen bestimmt werden konnte.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Charakteristika der verwendeten *B. cereus* Stämme

Zur Herstellung der toxinhaltigen Kulturüberstände wurden *B. cereus* Stämme in CGY-Bouillon angezüchtet und die Toxinbildung im indirektem ELISA überprüft. In Tab. 2 sind die Toxinprofile der in dieser Arbeit verwendeten Stämme, sowie deren Toxinproduktivität – dargestellt als die in den indirekten ELISAs ermittelten durchschnittlichen Antigentiter – zusammengefasst.

Unter der Verwendung gereinigter Toxinstandards konnte wie von MORAVEK et al. (2006) beschrieben die NheB- bzw. HBL-L₂-Konzentrationen in den Kulturüberständen der Referenzstämme NVH 0075/95 (Nhe⁺) und DSM 4384 (Nhe⁺/HBL⁺) quantitativ bestimmt werden. Die NheB-Konzentration in den Kulturüberständen des Nhe-Referenzstammes (NVH 0075/95) liegt demnach im Bereich von 10 µg/ml. Der HBL-Referenzstamm (DSM 4384) exprimiert NheB in niedrigeren Konzentrationen (7,4 µg/ml), der HBL-L₂ Gehalt beträgt 4,4 µg/ml. Dies bedeutet, dass bei beiden Referenzstämmen die in den Überständen nachweisbare Gesamttoxinmengen in einem ähnlichen Größenbereich liegen.

Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten *B. cereus* Stämme

Stämme	Toxinprofile							Antigentiter indirekter ELISA			Verwendet für
	Nhe			HBL			CytK	NheB	HBL-L ₂	CytK	
	A	B	C	B	L ₁	L ₂					
NVH 0075/95	+	+	+	-	-	-	-	1:2560	-	-	WST-Test Neutralisationstest
DSM 4384	+	+	+	+	+	+	-	1:1710	1:410	-	WST-Test IAC
NVH 391/98	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1:70	WST-Test
MHI 1761	-	+	+	-	-	-	-	1:1960	-	-	Immunfluoreszenz
MHI 1672	+	+	-	-	-	-	-	1:2710	-	-	Aufreinigung von NheB für Immunfluoreszenz und FACS

3.3.2 Zytotoxische Wirkung von *B. cereus* Enterotoxinen auf humane Zelllinien

Um einen umfassenden Überblick zur Wirkung der drei *B. cereus* Enterotoxine (HBL, Nhe, CytK) auf verschiedene humane Zelllinien zu erhalten, wurde der zur Untersuchung von Diarrhoe-Toxinen etablierte Vero-Zellkulturtest (WST-Test), wie in 3.2.5 beschrieben, verwendet. Dazu wurden Toxinüberstände der Nhe-, HBL- und CytK- Referenzstämme (NVH 0075/95, DSM 4384, NVH 391/98) mit den Zelllinien inkubiert. Vero-Zellen, deren Empfindlichkeit für o.g. Toxine bereits mit diesem Testsystem untersucht worden waren, dienten als Referenzzelllinie. Des Weiteren wurde die zytotoxische Aktivität der beiden Enterotoxin-Komplexe Nhe und HBL näher untersucht. Dazu wurden Neutralisationstests und die subtraktive Immunaффinitätschromatographie eingesetzt.

3.3.2.1 Neutralisationstest

Im Neutralisationstest wurde getestet, inwieweit der am Lehrstuhl vorhandene mAk 1E11 in der Lage ist, die toxische Aktivität des Nhe-Referenzstammes bei den verschiedenen Zelllinien zu hemmen. Dazu wurde der affinitätschromatographisch gereinigte mAk zunächst mit Amicon Ultra-Zentrifugationseinheiten auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Zu log-2-Verdünnungsreihen des Nhe-Referenzstammes wurden dann 10 µg Antikörper/Kavität zugegeben, der weitere Ablauf entsprach dem des in 3.2.5 beschriebenen Zytotoxizitätstests. Dass die angegebenen Antikörperkonzentrationen in der Lage sind, die toxische Wirkung von Nhe zu neutralisieren, wurde bereits in einer früheren Arbeit (WEGSCHEIDER, 2004) mit Vero-Zellen gezeigt. Als Kontrolle wurden in einem Parallelansatz irrelevante (unspezifische) monoklonale Antikörper (3-AcDon-BSA II 5B2) eingesetzt.

3.3.2.2 Subtraktive Immunaффinitätschromatographie

Mittels subtraktiver Immunaффinitätschromatographie war es möglich, die durch Kulturüberstände des *B. cereus* Referenzstammes DSM 4384 (HBL-Referenzstamm), der sowohl HBL als auch Nhe exprimiert, bei den Zellen hervorgerufene zytolytische Wirkung auf die spezifische Aktivität von Nhe bzw. HBL zurückzuführen. Diese Vorgehensweise war nötig, da wie eingangs beschrieben bisher keine Stämme isoliert werden konnten, die nur HBL exprimieren. Dazu wurden die 1:10 verdünnten Kulturüberstände des Referenzstammes,

wie in 3.2.2 angegeben, sequentiell über drei Immunaффinitäts-Säulen (IAS), an die jeweils die mAk 1E11, 8B12 bzw. 1B8 gekoppelt waren, gegeben. Dabei wurde aus den Überständen zunächst NheB (1E11), dann HBL-L₂ (1A12) und zuletzt HBL-B (1B8) entfernt. Durch Auffangen der Probendurchläufe der drei Säulen konnten somit toxinhaltige Präparationen mit folgenden Profilen gewonnen werden: (i) NheB⁻/HBL⁺; (ii) NheB⁻/HBL-L₂⁻; (iii) NheB⁻/HBL-L₂⁻/HBL-B⁻. Die toxische Aktivität dieser Präparationen wurde dann mittels Zellkulturtest bestimmt, wobei zu Vergleichszwecken jeweils parallel ein unbehandelter Originalüberstand des HBL-Referenzstammes untersucht wurde.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der o.g. Versuchsansätze für die Referenzzelllinie (Vero), für die adhärenenten Zellen, für die in Suspension wachsenden Zellen und für die endotheliale Primär-Zelllinie HUVEC im Einzelnen kurz dargestellt und dabei auf etwaige Besonderheiten eingegangen. Danach erfolgt eine vergleichende Zusammenfassung für alle Zelllinien.

3.3.2.3 Vero-Zellen

Zur besseren Vergleichbarkeit und Verifizierung der Ergebnisse mit den humanen Zelllinien wurden alle Zytotoxizitätstests parallel mit Vero-Zellen durchgeführt. Hierbei konnten die Ergebnisse früherer Studien bestätigt werden: Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes NVH 0075/95 (Nhe⁺) waren deutlich toxischer als die des HBL-Referenzstammes DSM 4384 (Nhe⁺/HBL⁺), während die Kulturüberstände des CytK-Stammes ein vergleichsweise geringes toxisches Potential aufwiesen. Abb. 1 zeigt die mit den Referenzstämmen durchschnittlich erzielten reziproken Zytotoxizitätstiter, sowie den Titer des Nhe-Referenzstammes nach Neutralisation. Hierbei konnte mit dem gegen NheB gerichteten monoklonalen Antikörper 1E11 eine durchschnittliche Hemmung der zytotoxischen Aktivität um 97 % erreicht werden.

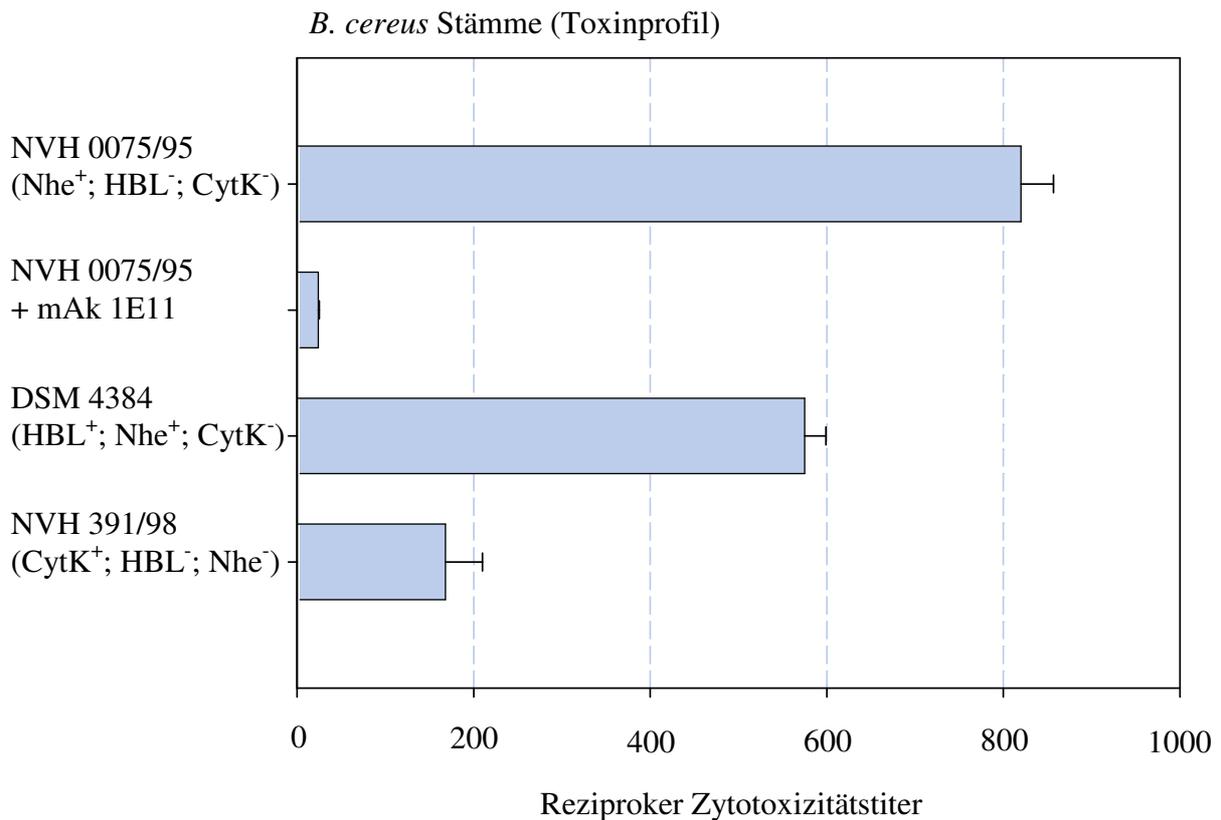


Abbildung 1: Durchschnittlich nachweisbare zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen der *B. cereus* Referenzstämmen bei Verwendung von Vero-Zellen (n = 3)

Um beim HBL-Referenzstamm, der beide Toxinprofile Nhe und HBL exprimiert, den Beitrag der Toxine zur Gesamtoxizität quantitativ zu erfassen, wurde wie in 3.3.2.2 beschrieben die IAC eingesetzt.

Um die Funktionalität der Immunaффinitätschromatographiesäulen zu überprüfen, wurde die Eliminierung der Toxinprofile NheB, HBL-L₂ und HBL-B aus den Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes (DSM 4384) mittels Westernblot und Enzymimmuntests verifiziert. Zunächst wurde die Zuverlässigkeit aller drei verwendeten Säulen vorab mittels Westernblot qualitativ (Abb. 2) überprüft. Dazu wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Exoprotein-Präparationen der Proben, wie unter 3.2.4 beschrieben, mit den monoklonalen Antikörpern 1E11, 8B12 und 1B8 beprobt. Wie in Abb. 2 gezeigt, konnte für alle eingesetzten Immunabsorbentien die Funktionalität bewiesen werden. Nach Passieren der jeweiligen Säule waren in den Durchläufen die entsprechenden Zielantigene (NheB, HBL-L₂ bzw. HBL-B) mittels Immunoblot nicht mehr nachweisbar.

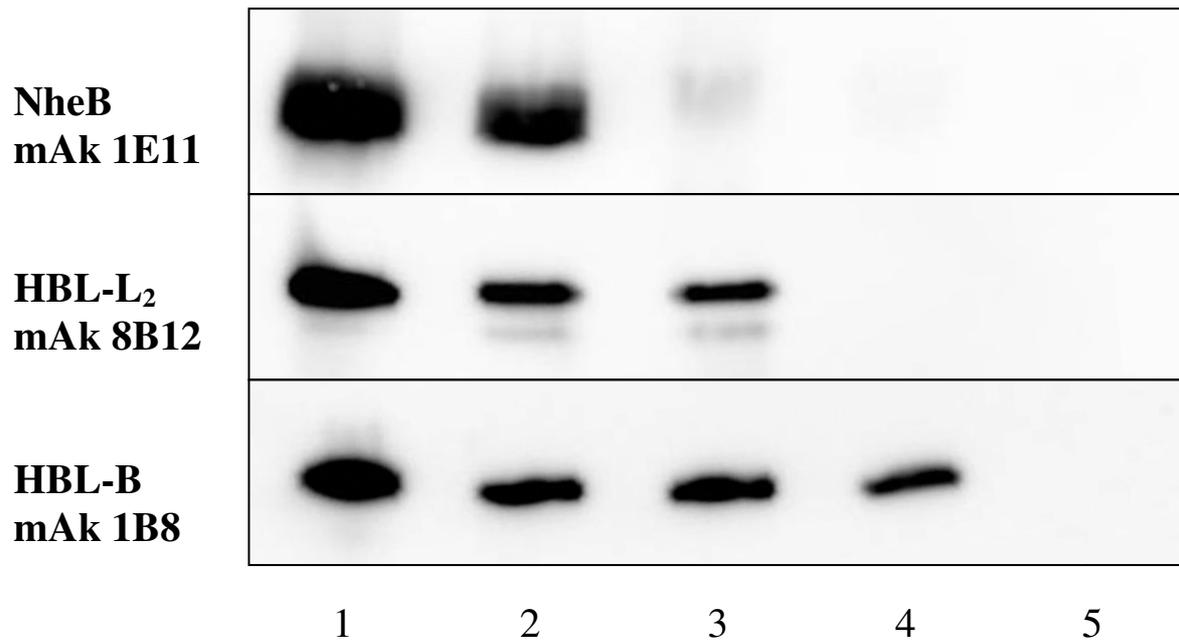


Abbildung 2: Überprüfung der Effektivität der IAC-Säulen mittels Westernblot.

- (1): Positiv Kontrolle (unverdünnter Kulturüberstand des Stammes DSM 4384)
- (2): DSM 4384 (1:10 für IAC verdünnt) = Probenauftrag
- (3): Probendurchlauf nach Entfernen von NheB
- (4): Probendurchlauf nach Entfernen von HBL-L₂
- (5): Probendurchlauf nach Entfernen von HBL-B

Diese Ergebnisse konnten in weiteren Versuchen, bei denen die Toxinkomponenten mittels sensitiver, indirekter ELISAs quantitativ nachgewiesen wurden, bestätigt werden (Tab. 3). Durchschnittlich wurden durch die 1E11-IAC-Säule 99 % des in den Kulturüberständen vorhandenen NheBs gebunden, für HBL-L₂ lagen die Werte ebenfalls bei über 90 %. Auf die Bestimmung eines HBL-B-Titers wurde verzichtet, da nach Entfernen der HBL-L₂-Komponente entweder keine oder nur mehr eine geringe Resttoxizität nachweisbar war.

Tabelle 3: Funktionsüberprüfung der IAC-Säulen: Von allen aufgeführten Präparationen (Original bzw. Durchläufe der IAC-Säulen) wurde der Antigentiter mittels indirektem ELISA bestimmt

<i>Präparationen</i>	<i>Toxinprofile</i>	<i>Antigentiter</i>	
		<i>mAk 1E11</i>	<i>mAk 8B12</i>
Originalüberstand	Nhe ⁺ /HBL ⁺	1:2514	1:203
Nach 1E11-IAC	NheB ⁻ /HBL ⁺	1:26	1:167
Nach 1A12-IAC	NheB ⁻ /HBL-L ₂ ⁻	1:25	1:13

Die Ergebnisse der Zellkulturtests mit Vero-Zellen nach konsekutivem Entfernen der Enterotoxinkomplex-Komponenten NheB, HBL-L₂ und HBL-B aus Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes (DSM 4384) ist in Abb. 3 dargestellt. Hierbei kam es nach Entfernen von NheB zu einem Rückgang der Gesamtoxizität von 1:442 auf 1:168. Nach Entfernen der L₂-Komponente des HBL sank die messbare Zytotoxizität unterhalb der Nachweisgrenze (Titer < 1:20). Der relative Beitrag der Enterotoxinkomplexe zur Gesamtoxizität wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Titer nach 1E11-IAC}}{\text{Titer Original Kulturüberstand}} \times 100 = \text{relativer HBL-Anteil (in \%)}$$

$$100 - \text{relativer HBL-Anteil (\%)} = \text{relativer Nhe-Anteil (in \%)}$$

Somit trägt bei Vero-Zellen Nhe zu 62 % und HBL zu 38 % zur gemessenen Gesamtzytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei. Dieser Anteil stimmt mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein (WEGSCHEIDER, 2004).

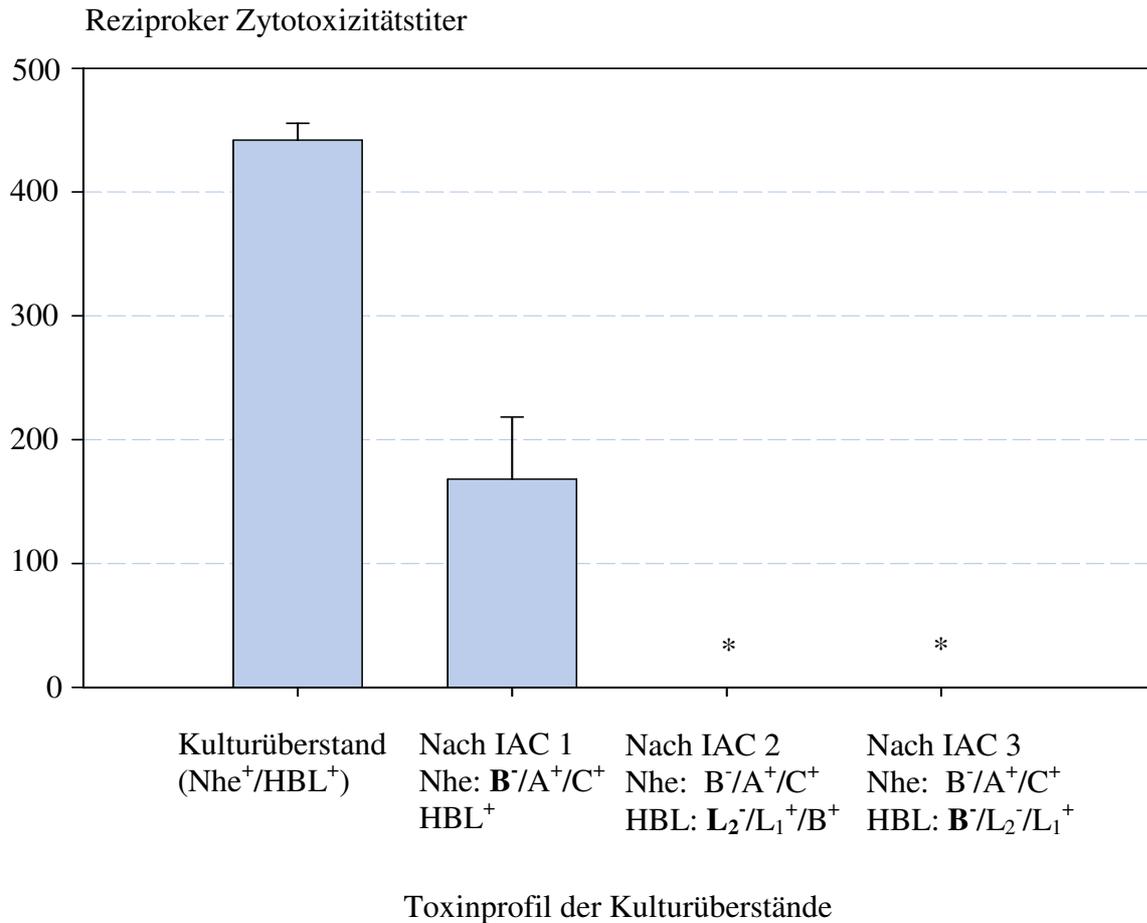


Abbildung 3: Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten mittels IAC auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei Verwendung von Vero-Zellen (n = 2). NheB wurde in einem ersten Schritt mittels 1E11-IAC (IAC 1) entfernt, danach HBL-L₂ mittels 1A12-IAC (IAC 2) und letztlich HBL-B mittels 1B8-IAC (IAC 3)

* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

3.3.2.4 Adhärenz Zelllinien

Auch hier wurde zunächst die Reaktion der entsprechenden Zelllinien HEp-2, Hep-G2, CaCo-2, A549 und A204 auf eine Behandlung mit Kulturüberständen der Referenzstämme untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 zusammengefasst.

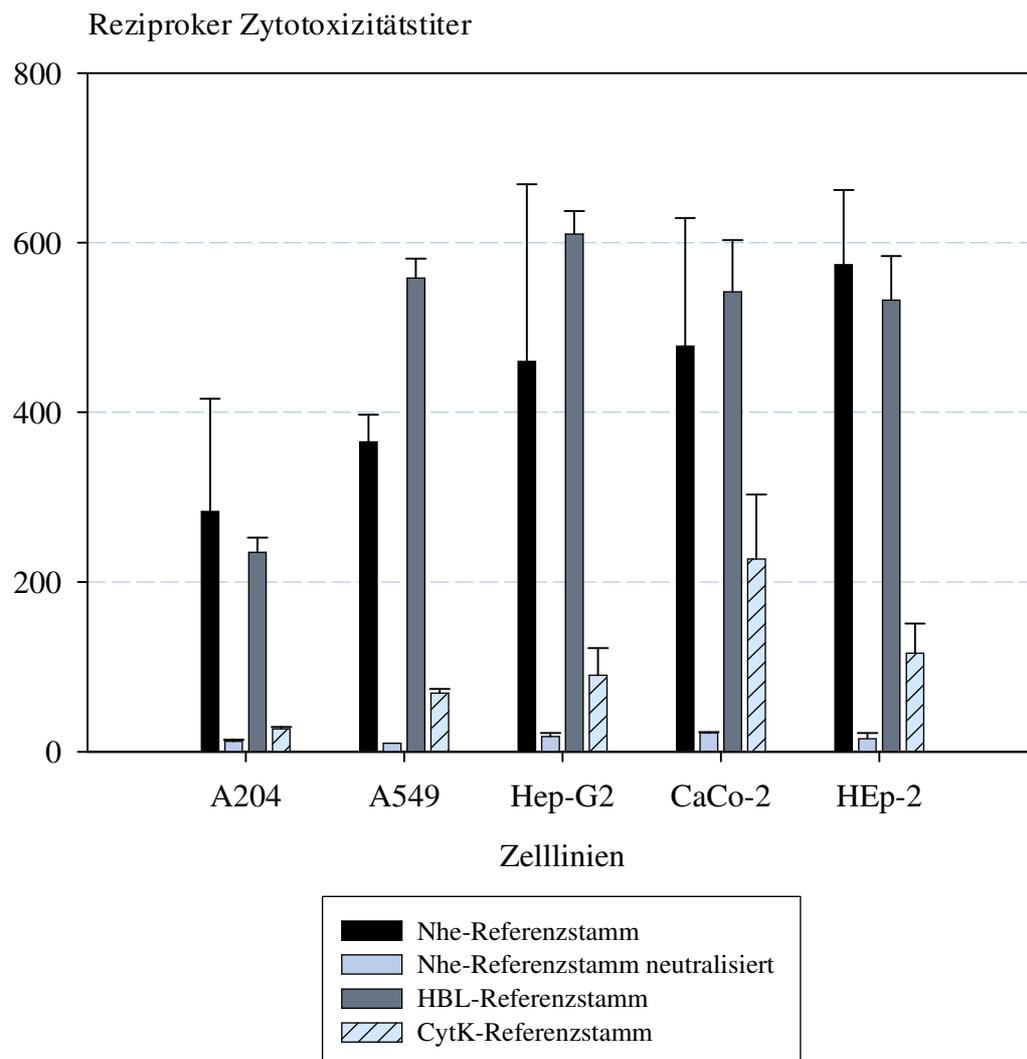


Abbildung 4: Durchschnittlich nachweisbare zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen von *B. cereus* Referenzstämmen bei Verwendung verschiedener adhärenz wachsender Zelllinien (n = 3)

Von den untersuchten adhärenz wachsenden Zelllinien zeigte die Rhabdomyosarkomzelle A204 (mesenchymaler Herkunft) die geringste Empfindlichkeit gegenüber Kulturüberständen der drei *B. cereus* Referenzstämmen. Des Weiteren waren grundsätzlich Kulturüberstände des

CytK-Stammes im Vergleich zu den beiden anderen Referenzstämmen deutlich weniger toxisch, wobei bei den CaCo-2 Zellen die höchsten Titer für dieses Toxin gemessen wurden (1:151 – 1:303). Tendenziell konnten bei den adhärenen Zelllinien, im Gegensatz zu den Vero-Zellen, keine ausgeprägten Unterschiede in der Empfindlichkeit auf die Kulturüberstände des Nhe- bzw. HBL-Referenzstammes detektiert werden. Die Ausnahme hierbei bildeten die Hep-G2- und die A549-Zellen, bei denen die höchsten Zytotoxizitätstiter mit dem HBL-Referenzstamm gemessen wurden. Bei Einsatz der Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes konnte bei allen Zelllinien nach Neutralisation mit mAk 1E11 eine durchschnittliche Abnahme der zytotoxischen Aktivität um 96 % beobachtet werden.

Um bei den Kulturüberständen des *B. cereus* Stammes DSM 4384 (HBL- und Nhe-Produzent) die toxische Gesamtaktivität den beiden Enterotoxinkomplexen besser zuordnen zu können, wurde die subtraktive Immunaффinitätschromatographie eingesetzt. Auch hier konnte, wie bei den Vero-Zellen, bei allen Zelllinien eine sukzessive Abnahme der Zytotoxizität beobachtet werden. Die Ergebnisse für die CaCo-2-, A204- und A549-Zellen sind in Abb. 5 - 7 zusammengefasst. Da bei den Zelllinien HEp-2 (Larynxkarzinomzellen) und Hep-G2 (Leberkarzinomzellen) die Aktivität der beiden Toxinkomplexe wie bei den Vero-Zellen im Bereich von 60 % für Nhe und 40 % für HBL lag, wurde auf die graphische Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet. Die bei diesen Zellen nach Entfernen von HBL-L₂ verbleibende, geringe Restzytotoxizität (Titer 1:21 bei Hep-G2 bzw. 1:22 bei HEp-2), verschwand vollständig nach der 1B8-IAC.

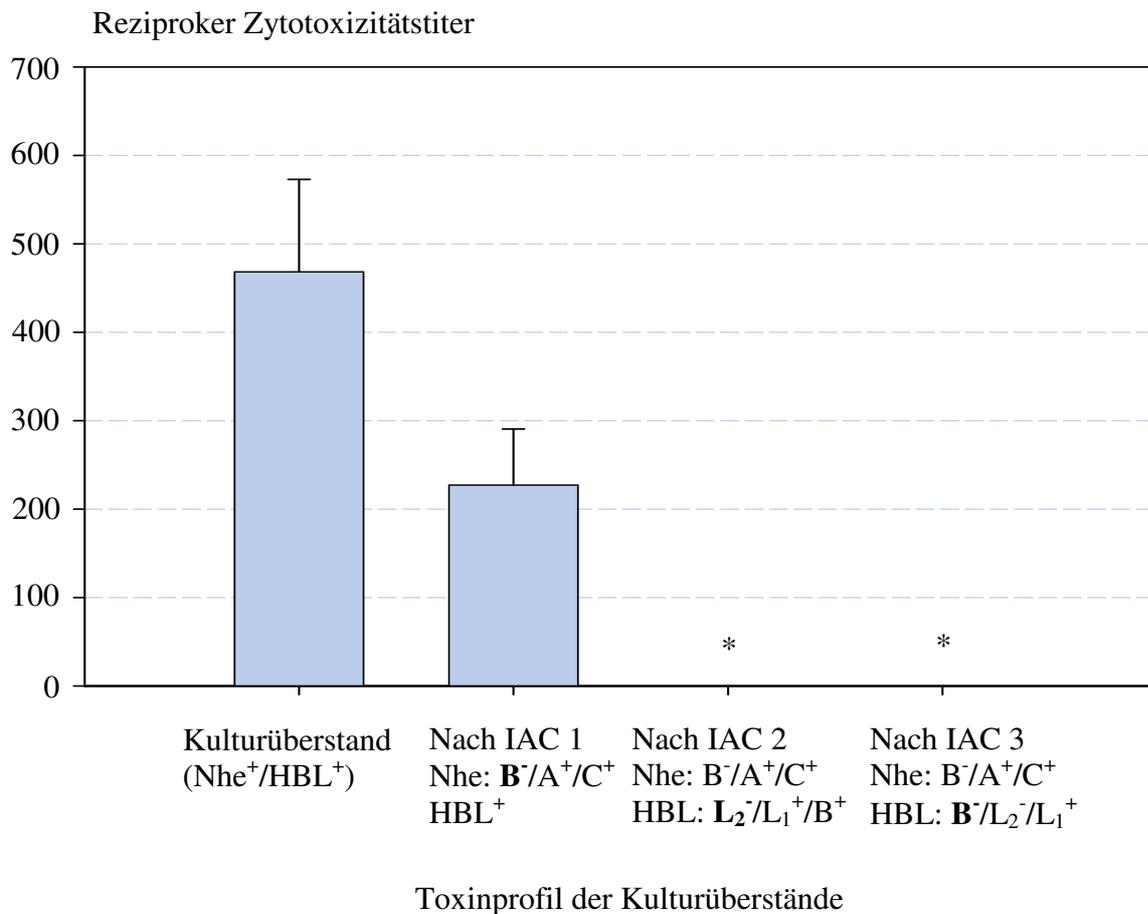


Abbildung 5: Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei CaCo-2-Zellen (n = 2)

* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

Der reziproke Zytotoxizitätstiter des HBL-Referenzstammes sank nach Entfernen von NheB bei den Colonkarzinomzellen (CaCo-2) auf etwa die Hälfte seines Ausgangswertes, nach Entfernen von HBL-L₂ war keine messbare Zytotoxizität mehr vorhanden (Titer < 1:20) (Abb. 5). Somit konnte die durch Kulturüberstände des Stammes DSM 4384 hervorgerufene zytotoxische Aktivität zu 52 % bzw. 48 % auf die Wirkung von Nhe bzw. HBL zurückgeführt werden.

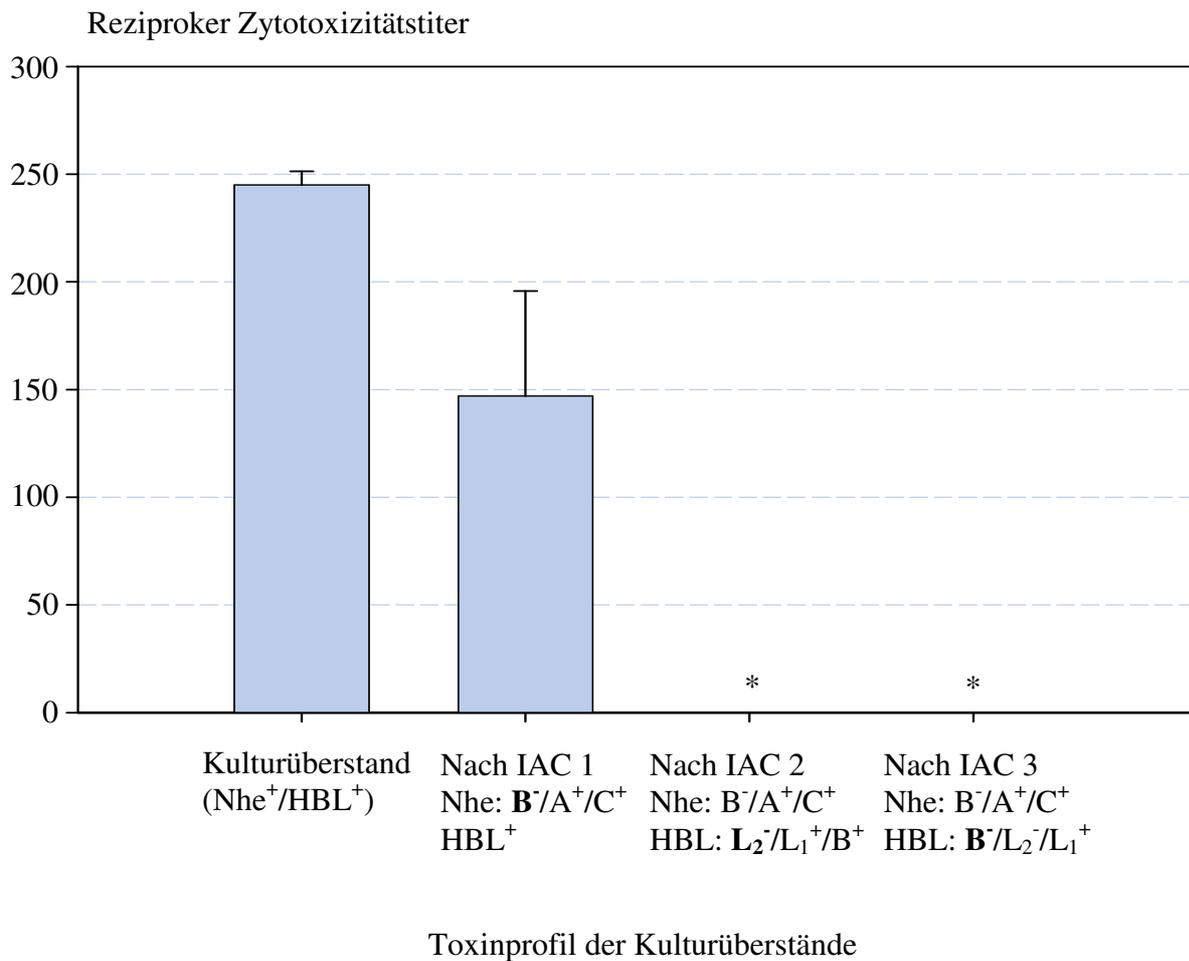


Abbildung 6: Zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei A204-Zellen nach Entfernen von Toxinkomponenten (n = 2)
* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

Bei den A204-Zellen hingegen lagen die entsprechenden Prozentsätze bei 40 % (Nhe) bzw. 60 % (HBL). Somit weist diese Zelllinie, im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Zellen, eine höhere Sensitivität für HBL als für Nhe auf (Abb. 6). Ausgeprägter noch war die Empfindlichkeit für HBL bei den Lungenkarzinomzellen (A549). Hier konnten 75 % der zytotoxischen Aktivität auf HBL zurückgeführt werden und nur 25 % auf Nhe (Abb. 7). Somit konnte im Rahmen der Untersuchungen erstmals eine Zelllinie, die besonders empfindlich auf das HBL-Toxin reagiert, identifiziert werden.

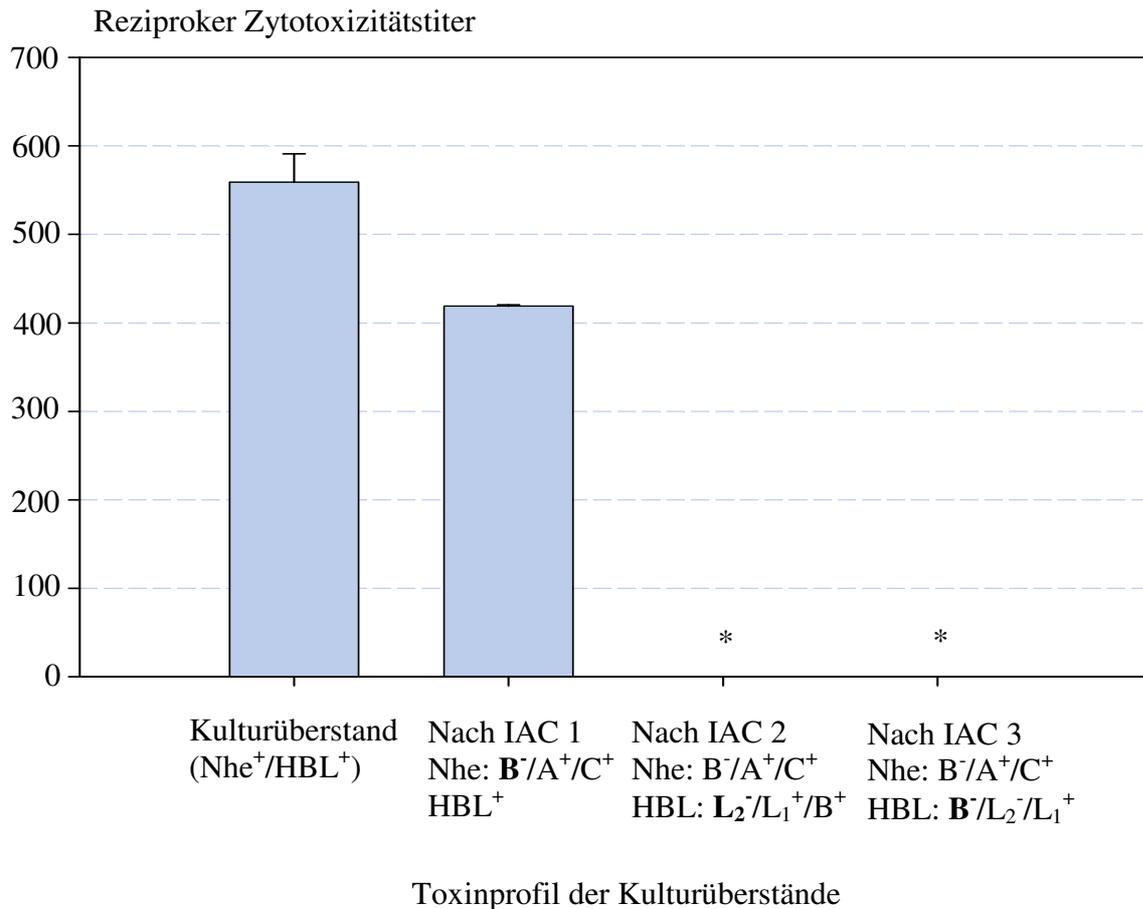


Abbildung 7: Zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei A549-Zellen nach Entfernen von Toxinkomponenten (n = 2)
* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

3.3.2.5 Suspensionszelllinien

Die in Abb. 8 dargestellten Empfindlichkeiten der in Suspension wachsenden Zelllinien Jurkat, U937 und RPMI 8226 gegenüber den Kulturüberständen der drei Referenzstämme waren im Vergleich zu den meisten adhärent wachsenden Zellen tendenziell geringer. Dies war am deutlichsten ausgeprägt bei der U937-Zelllinie (histiozytäre Lymphomzellen), die sich insbesondere gegenüber der Wirkung von Nhe als sehr resistent erwies. So wurde für den Nhe-Referenzstamm bei U937 ein durchschnittlicher Zytotoxizitätstiter von 1:51 ermittelt, während die gemessenen Titer bei Jurkat (T-Leukämiezellen) und RPMI 8226 (multiple Myelomzellen) im Bereich von 1:273 bis 1:307 lagen.

Für Kulturüberstände des HBL-Referenzstammes waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Suspensionszellen hingegen nicht so deutlich. Gegenüber dem CytK-Referenzstamm zeigten alle Suspensionszellen eine sehr geringe Empfindlichkeit.

Mit der Ausnahme von U937, konnte auch hier die Zytotoxizität des Nhe-Referenzstammes mit dem 1E11 Antikörper fast vollständig (95 %) neutralisiert werden.

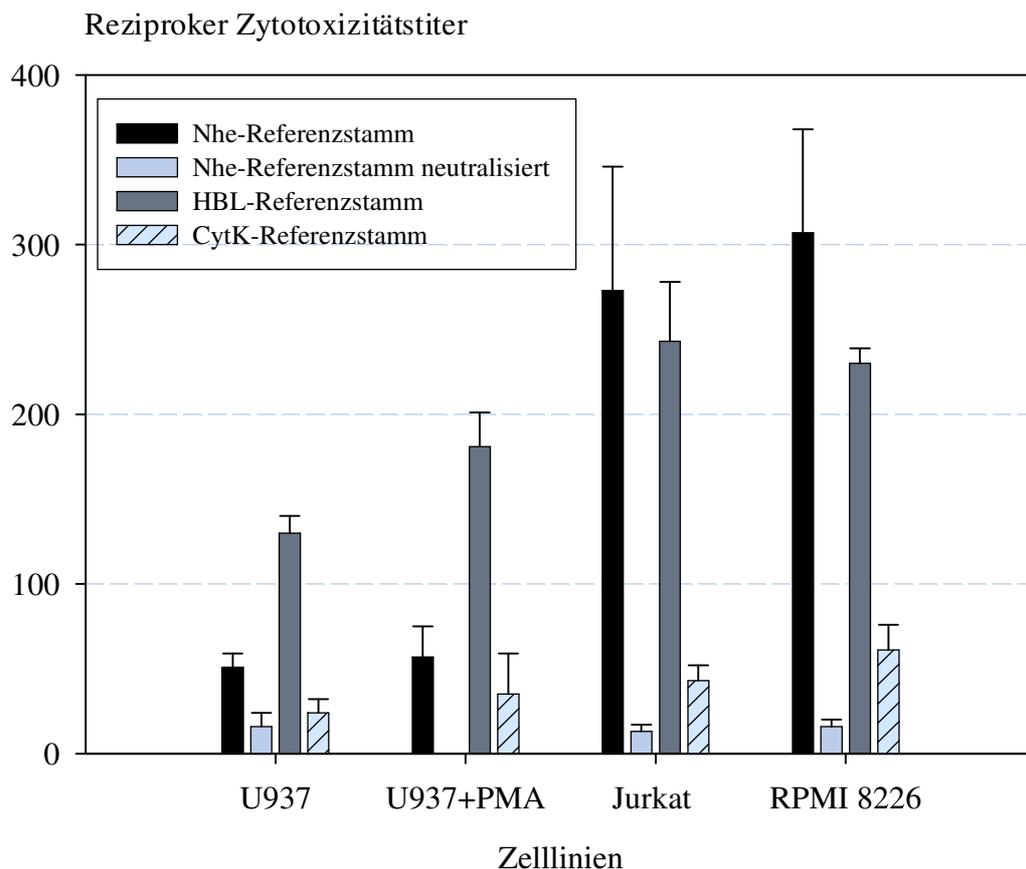


Abbildung 8: Durchschnittliche nachweisbare zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen von *B. cereus* Referenzstämmen bei Verwendung verschiedener in Suspension wachsender Zelllinien (n = 3)

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die ausgeprägte Unempfindlichkeit der Suspensionszellen, insbesondere die der Zelllinie U937, auf die fehlende Expression einer extrazellulären Matrix zurückzuführen ist, wurden die monozytären U937-Zellen mit dem Phorbol-Ester PMA zu adhärenenten Makrophagen differenziert. Dazu wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 1×10^5 Zellen (100 μ l/Vertiefung) beschickt und für 48 Stunden bei 37 °C zusammen mit PMA (12 ng/ml; 100 μ l/well) inkubiert. Danach wurden nicht adhärenente

Zellen durch Waschen entfernt, die verbleibenden Zellen mit log-2-Verdünnungsreihen der Kulturüberstände der Referenzstämmen behandelt (200 µl/Kavität) und für weitere 24 h inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem in 3.2.5 beschriebenen WST-Test. Wie in Abb. 8 ersichtlich, hatte die Differenzierung aber kaum einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen. Verglichen mit den unbehandelten Zellen kam es am ehesten beim HBL-Referenzstamm zu einem geringen, statistisch nicht signifikanten Anstieg der Empfindlichkeit (Titer 1:181).

Auch bei Suspensionszelllinien wurde mit Hilfe der subtraktiven Immunaффinitätschromatographie untersucht, inwieweit Nhe und HBL zur Gesamtzytotoxizität des HBL-Referenzstammes beitragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 - 11 dargestellt.

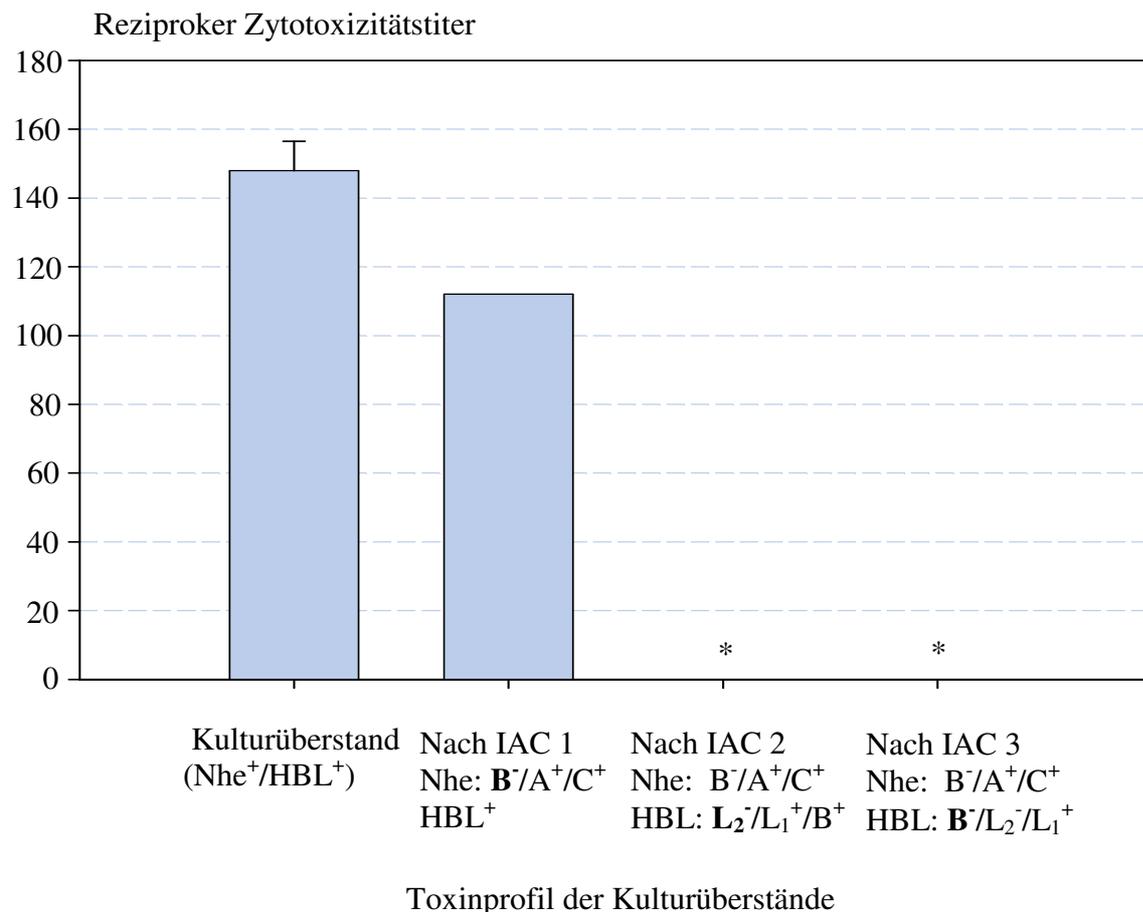


Abbildung 9: Zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei U937-Zellen nach Entfernen von Toxinkomponenten (n = 2)

* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

Die relativ geringe Zytotoxizität des HBL-Referenzstammes konnte bei der Zelllinie U937 nach Entfernen von NheB nur geringfügig gesenkt werden, zytotoxische Aktivitäten waren aber nach Entfernen von HBL-L₂ nicht mehr nachweisbar (Abb. 9). Die berechnete relative zytotoxische Aktivität von Nhe betrug somit bei U937-Zellen nur 24 %, was die geringe Empfindlichkeit dieser Zellen für Nhe, die sich bereits in den vorangegangenen Zellkulturtests angedeutet hatte, bestätigt.

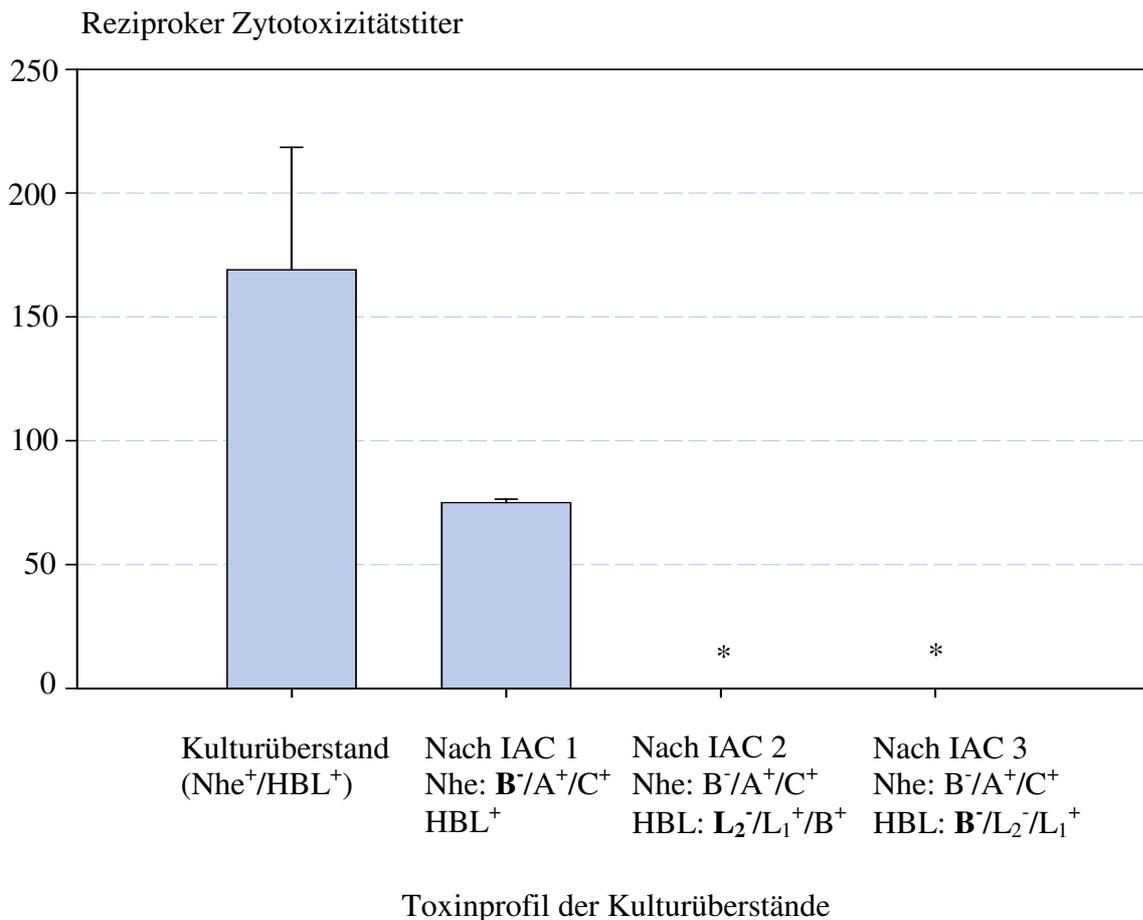


Abbildung 10: Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei Jurkat-Zellen (n = 2)

* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

Bei den beiden anderen Suspensionszelllinien, Jurkat bzw. RPMI 8226, war nach Entfernen von NheB mittels IAC eine deutliche Reduktion der toxischen Aktivität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes festzustellen. Bei Jurkat-Zellen waren 56 %

der Gesamtoxizität auf die Wirkung von Nhe zurückzuführen, bei RPMI 8226 lag der entsprechende Prozentsatz bei 44 %. Bei den RPMI 8226-Zellen wurde, im Gegensatz zur Jurkat-Zelllinie (Abb. 10), nach Entfernen von HBL-L₂ eine geringe Restzytotoxizität (1:21) gemessen, die aber nach Entfernen von HBL-B nicht mehr nachweisbar war (Abb. 11).

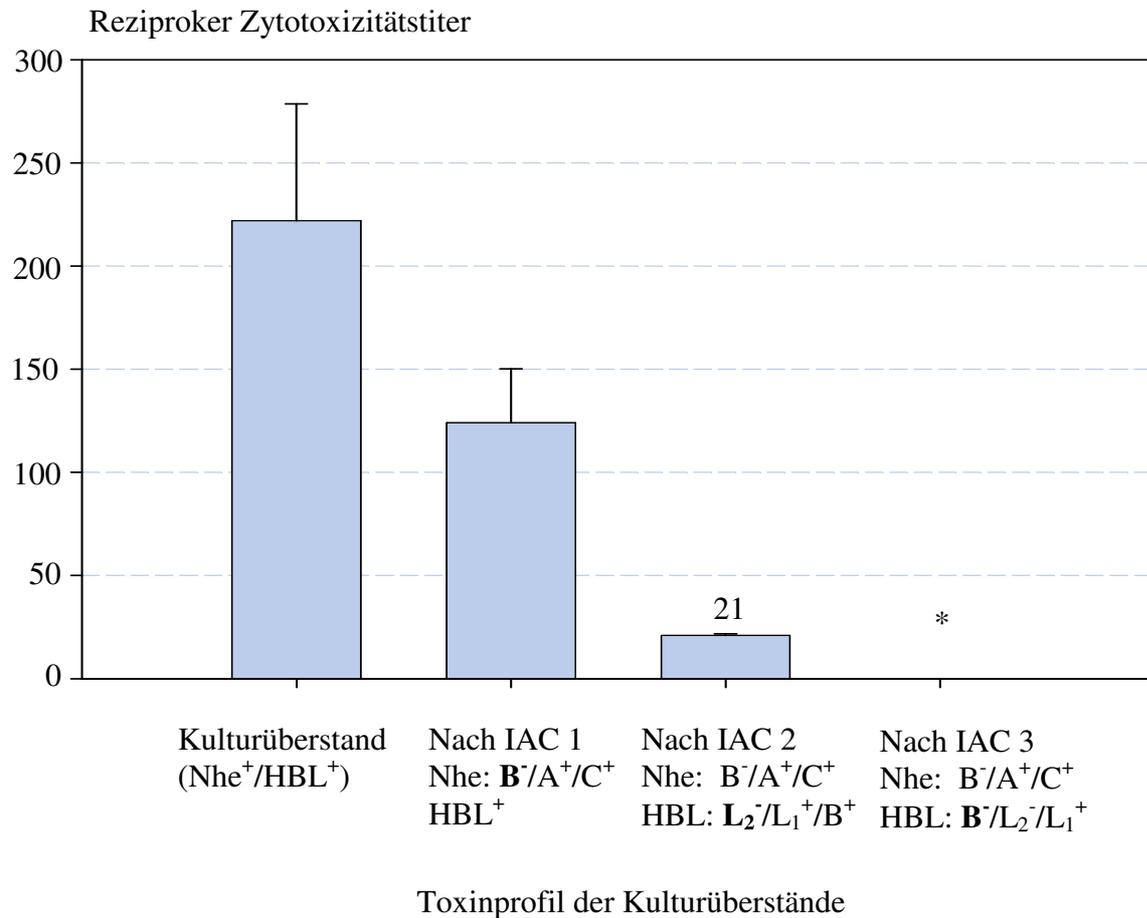


Abbildung 11: Effekt des konsekutiven Entfernen von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei RPMI 8226-Zellen (n = 2)

* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

3.3.2.6 Endotheliale Primärzelllinie (HUVEC)

Für die Zellkulturtests mit *B. cereus* Toxinen wurden in früheren Arbeiten nur Tumorzelllinien verwendet, die sich per Definition wegen der fehlenden Kontaktinhibition

nahezu unendlich oft teilen können. Tumorzellen sind des Weiteren stark dedifferenziert, d.h. sie haben zum Teil bestimmte Eigenschaften und Funktionen von normalen Zellen verloren. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit neben den Tumorzelllinien auch primäre Zellen, nämlich humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC), verwendet. Zur Durchführung der Zytotoxizitätstests wurden maximal 2×10^3 Zellen/Kavität in die Mikrotiterplatten ausgesät, um eine Entdifferenzierung der Zellen zu vermeiden. Erst nach einer Kultivierung von ca. drei Tagen im Brutschrank, wurden die Zellmonolayer mit Verdünnungsreihen toxinhaltiger Überstände der *B. cereus* Referenzstämmen für 24 h inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

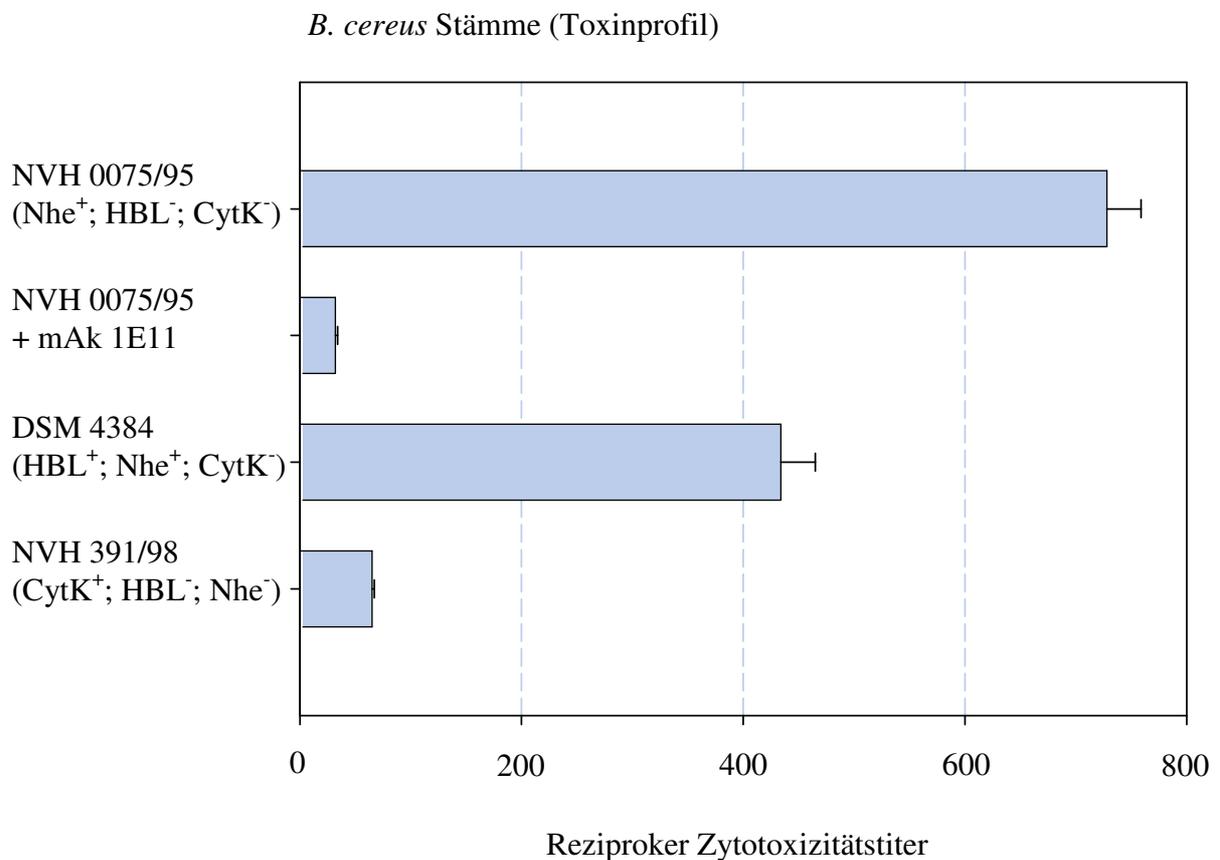


Abbildung 12: Durchschnittlich nachweisbare zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen der *B. cereus* Referenzstämmen bei HUVEC-Zellen (n = 3)

Die Empfindlichkeit gegenüber dem Nhe-Referenzstamm war deutlich ausgeprägter (Zytotoxizitätstiter 1:728) als die gegenüber dem HBL-Referenzstamm (Titer 1:434), während

für den CytK-produzierenden Referenzstamm nur relativ niedrige Titer von 1:65 erhalten wurden. Im Neutralisationstest konnte durch Zugabe des Anti-NheB-Antikörpers eine Abnahme der Toxizität um 96 % erreicht werden (Abb. 12).

Des Weiteren wurde die toxische Wirkung der durch subtraktive IAC gewonnenen Proben auch bei den HUVEC-Zellen mittels WST-Test bestimmt (Abb. 13). Dabei konnte eine ausgeprägte Sensitivität für Nhe festgestellt werden, 87 % der Gesamtoxizität ließen sich auf die Wirkung von Nhe zurückführen, nur 13 % auf die von HBL. Damit weisen die HUVEC-Zellen, im Vergleich zu allen anderen im Laufe der Untersuchung eingesetzten Zelllinien, ein einzigartiges Empfindlichkeitsmuster auf.

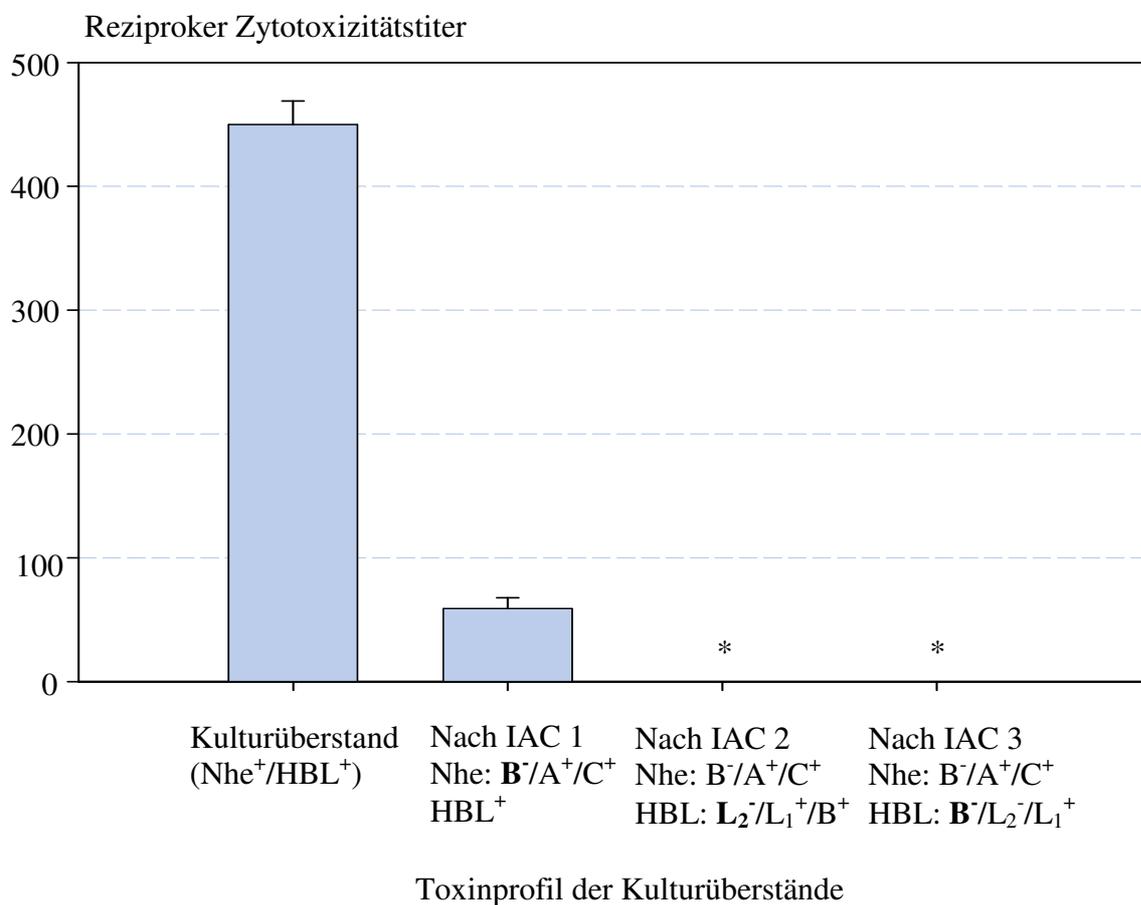


Abbildung 13: Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei HUVEC-Zellen (n = 2)

* = negativ in der ersten Verdünnungsstufe

3.3.2.7 Vergleichende Darstellung der Zellkulturergebnisse

Ziel der Zellkulturtests war es, einen umfassenden Überblick über die zytotoxische Aktivität der drei von *B. cereus* Stämmen produzierten, mutmaßlichen Enterotoxine Nhe, HBL und CytK zu bekommen. Tab. 4 enthält eine Übersicht über die reziproken Zytotoxizitätstiter, die bei den verschiedenen Zelllinien unter Verwendung von toxinhaltigen Kulturüberständen der *B. cereus* Stämme NVH 0075/95 (Nhe-Referenzstamm), DSM 4384 (HBL-Referenzstamm) und NVH 391/98 (CytK-Referenzstamm) erzielt wurden.

Tabelle 4: Empfindlichkeiten der Zelllinien gegenüber Kulturüberständen von *B. cereus* Stämmen. Die von den Stämmen produzierten Enterotoxine sind in Klammern angegeben

Zelllinien	Stamm NVH 0075/95 (Nhe ⁺)		Stamm DSM 4384 (Nhe ⁺ /HBL ⁺)	Stamm NVH 391/98 (CytK ⁺)
	Original Kulturüberstände	Kulturüberstände neutralisiert		
Vero	820 ^a	24 ^b	575	168
CaCo-2	478	22	542	227
Hep-G2	460	18	610	90
HEp-2	547	15	532	116
A549	365	10	558	69
A204	283	12	235	27
U937	51	16	130	24
U937, PMA behandelt	57	n.d. ^c	181	35
Jurkat	273	13	243	43
RPMI 8226	307	16	230	61
HUVEC	728	32	434	65

^a Durchschnittlicher reziproker Zytotoxizitätstiter (n = 3)

^b Neutralisation der zytotoxischen Wirkung mittels mAk 1E11(Anti-NheB)

^c n.d. = nicht durchgeführt.

Beim Vergleich der Ergebnisse für die Zelllinien ist auffällig, dass Suspensionszellen (U937, Jurkat, RPMI 8226) im Allgemeinen weniger empfindlich auf die toxinhaltigen

Kulturüberstände der *B. cereus* Referenzstämme reagierten als die meisten der adhären wachsenden Zelllinien. Eine Ausnahme bildet hierbei die Zelllinie A204, die vergleichbare Ergebnisse wie die beiden Suspensionszellen Jurkat und RPMI 8226 lieferte. Bei den A204-Zellen handelt es sich um Rhabdomyosarkomzellen, die im Gegensatz zu den epithelialen Zelllinien mesenchymalen Ursprungs sind. Des Weiteren konnte generell mit CytK-haltigen Überständen nur eine vergleichsweise geringe Zytotoxizität bei den Zelllinien induziert werden. Allerdings wurde die CytK-Produktion dieses Stammes nur qualitativ mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen das heißt, es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die geringe Zytotoxizität auf die geringe CytK-Produktion dieses Stammes zurückzuführen ist. Prinzipiell konnte aber die bereits in anderen Arbeiten beschriebene hohe Empfindlichkeit der Vero- und CaCo-2-Zelllinien für CytK bestätigt werden (LUND et al., 2000; FAGERLUND et al., 2004). Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes erwiesen sich insbesondere bei den Zelllinien Vero und HUVEC als hoch toxisch. Umgekehrt verhielt es sich bei den U937-Zellen: während die Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes bei dieser Zelllinie nur eine äußerst geringe zytotoxische Wirkung hatten, konnten bei den Zellkulturtests mit dem HBL-Referenzstamm 2,5fach höhere Titer gemessen werden. Trotz dieser etwas höheren toxischen Wirkung HBL-haltiger Kulturüberstände zeigten im Vergleich aller getesteten Zelllinien die U937-Zellen die geringste Empfindlichkeit für *B. cereus* Enterotoxine.

Ein detaillierterer Einblick in die zytotoxische Aktivität der beiden Toxin-Komplexe Nhe und HBL war durch die subtraktive IAC möglich. In Abb. 14 sind vergleichend für alle Zelllinien die absoluten und relativen Anteile der beiden Toxinkomplexe (Nhe und HBL) an der durch Kulturüberstände des HBL-Referenzstammes induzierten Gesamtzytotoxizität dargestellt. Die sich schon in den Zellkulturtests mit dem Nhe-Referenzstamm abzeichnende hohe bzw. geringe Empfindlichkeit für Nhe bei den Zelllinien HUVEC bzw. U937 wurde dabei bestätigt. So beruhte die bei HUVEC-Zellen gemessene zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen des Stammes DSM 4384 zu 87 % auf der Wirkung von Nhe, während bei A549 und U937 Nhe nur zu ca. 25 % zur Gesamttoxizität des HBL-Referenzstammes beitrug. Unter Berücksichtigung der absoluten Zytotoxizitätstiter konnte somit gezeigt werden, dass die Lungenkarzinom-Zelllinie A549 eine hohe Empfindlichkeit für die toxische Wirkung von HBL aufweist. Bei allen anderen Zelllinien lag die zytotoxische Aktivität von Nhe und HBL im Bereich von 40 - 60 %.

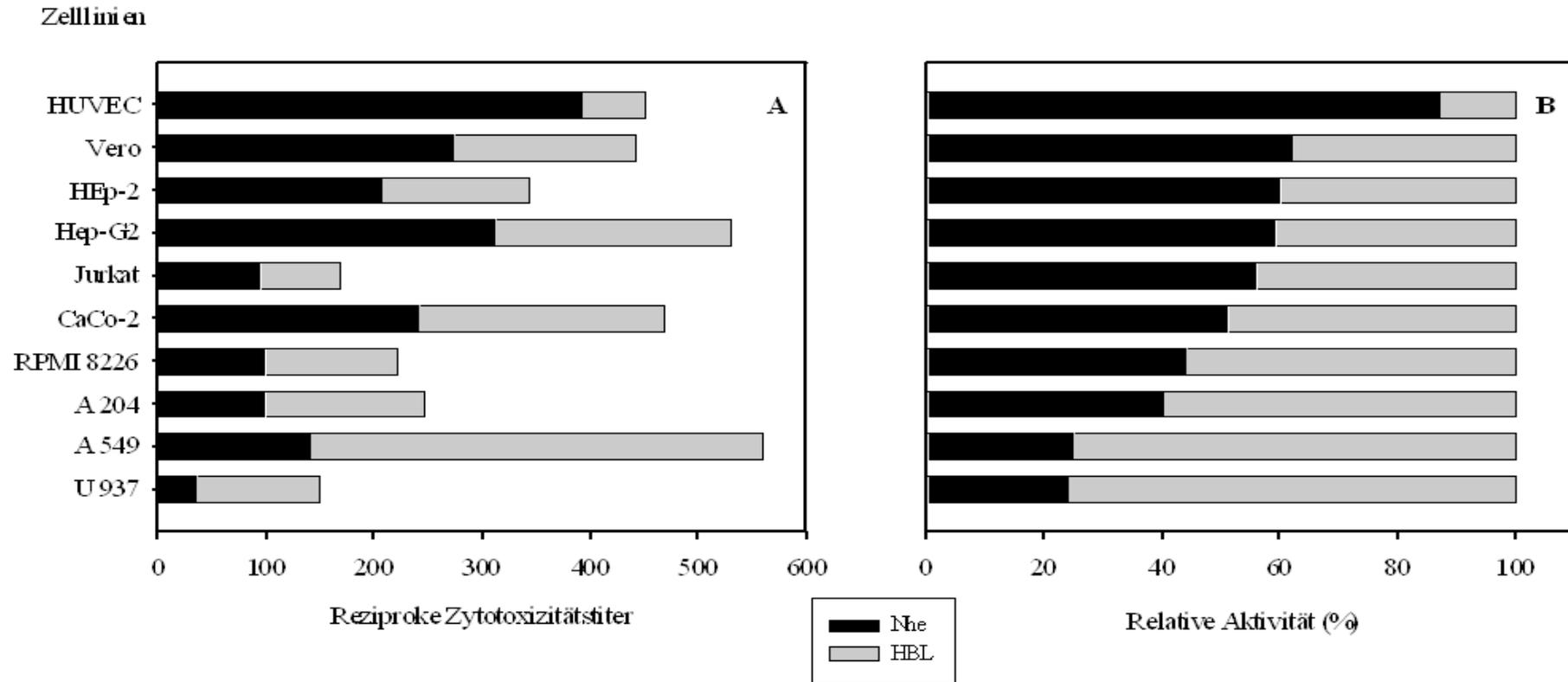


Abbildung 14: Absoluter (A) und relativer (B) Beitrag der beiden Enterotoxinkomplexe Nhe und HBL zu den durch Kulturüberstände des HBL-Referenzstammes (Nhe und HBL Produzent) bei den Zelllinien induzierten toxischen Effekten. Die Daten wurden in unabhängigen Versuchen erhoben und differieren deswegen von den in Tab. 4 angegebenen Werten

3.3.3 Immunfluoreszenz

Bislang publizierte Daten deuten darauf hin, dass NheB bzw. HBL-B diejenigen Komponenten der Enterotoxinkomplexe darstellen, die an die Zelloberfläche binden. Da für diese Hypothese allerdings nur indirekte Beweise vorlagen, sollte im Rahmen der Untersuchungen mittels spezifischer, an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelter, monoklonaler Antikörper die Bindung dieser Toxinkomponenten an die Zelloberfläche demonstriert werden. Allerdings zeigte sich in Vorversuchen, dass die am Institut vorhandenen monoklonalen Antikörper gegen HBL-B für diesen methodischen Ansatz nicht geeignet sind, so dass sich die folgenden Versuche auf die Bindung von NheB konzentrieren. Dazu wurden die Nhe-sensitiven Vero-Zellen zunächst mit verdünnten Überständen (1:20 - 1:40) einer *B. cereus* Mutante inkubiert, die NheB und NheC, aber kein NheA exprimiert (MHI 1761). So konnte einerseits die Atoxizität der Kulturüberstände gewährleistet werden, andererseits konnte so die Bindung von NheB unter „physiologischen“ Bedingungen erfolgen. Physiologisch deswegen, weil in neueren, bislang unveröffentlichten Studien von DIETRICH et al. (2009), sowie LINDBÄCK et al. (2009) gezeigt werden konnte, dass neben NheB auch NheC initial an den Zellen zu binden vermag. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wurde die Bindung mit den gegen NheB gerichteten, Fluoreszenz markierten, monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Neben dem neutralisierenden, mit Alexa Fluor 488 (grüne Fluoreszenz) markierten mAk 1E11 kam der gleichfalls gegen NheB gerichtete, aber hinsichtlich seiner Neutralisationskapazität nicht ganz so effektive mAk 2B11 zum Einsatz, wobei letzterer mit Alexa Fluor 555 (rote Fluoreszenz) markiert worden war. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen anstatt mit Toxin nur mit Zellkulturmedium inkubiert (für Details siehe 3.2.7). In Abb. 15 sind einige der mit dem Fluoreszenzmikroskop erhaltenen Bilder zu sehen. Bei Überlagerung der drei Bilder A - C (Overlay) ist deutlich erkennbar, dass die Antikörper 1E11 und 2B11 gemeinsam an NheB binden können, da sich die grüne Fluoreszenz von 1E11 und die rote von 2B11 dabei nach dem Gesetz der additiven Farbmischung zu einer gelben Fluoreszenz zusammenfügen lassen. (Bild D). Es ist zudem erkennbar, dass NheB an jede der abgebildeten Vero-Zellen gebunden hat. Die dadurch entstandenen rundlichen „Spots“ sind homogen über die Zelloberfläche verteilt und von ungefähr gleicher Größe. Die mit beiden Antikörpern erreichten Fluoreszenzsignale sprechen dafür, dass beide gleich gut für die Immunfluoreszenzstudien geeignet sind. Bild E zeigt das Overlay der Negativkontrolle, mit der gezeigt werden kann, dass die beiden Antikörper nicht unspezifisch an die Zelloberfläche gebunden haben.

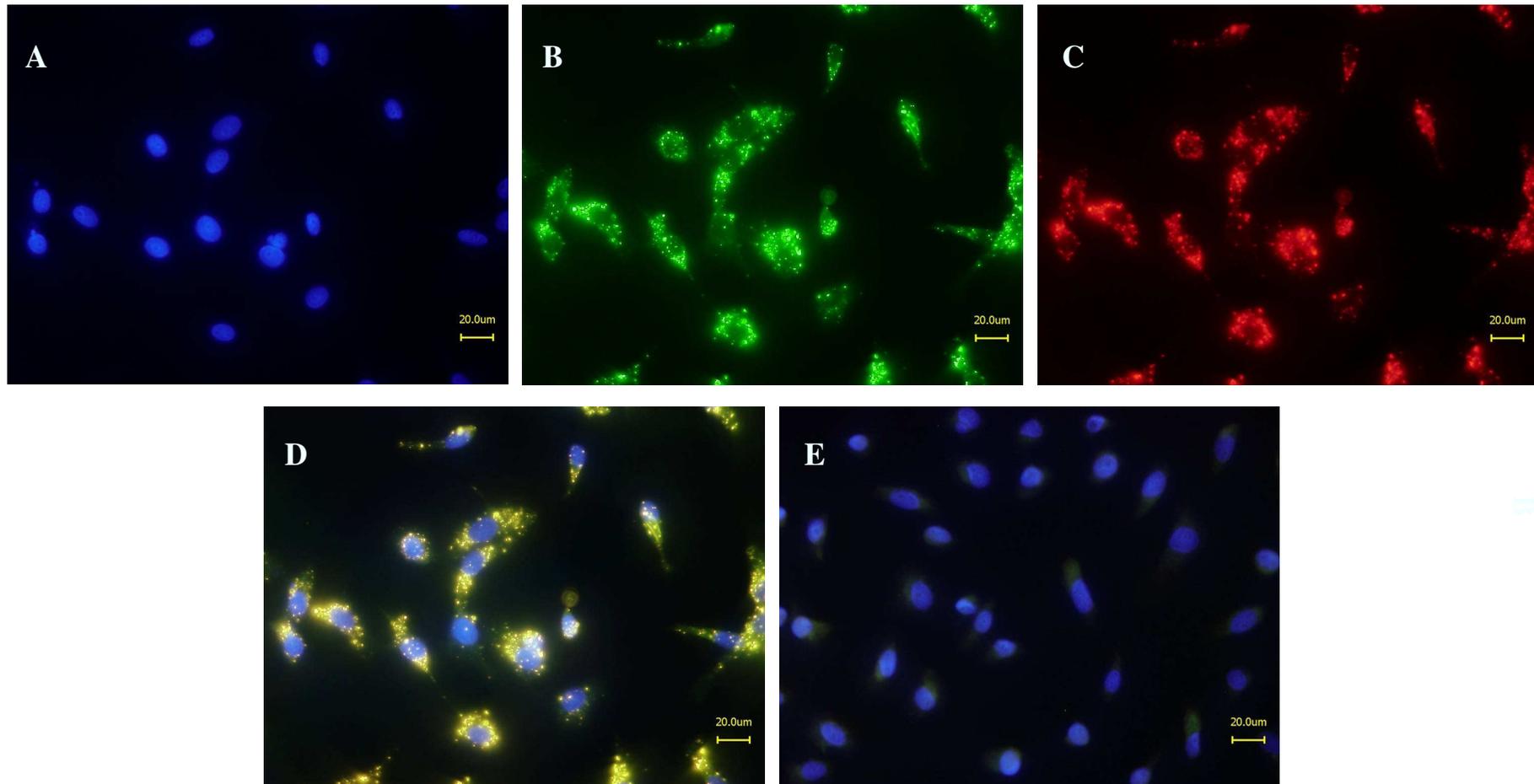


Abbildung 15: Nachweis der Bindung von NheB an Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz: Zellkernfärbung mit DAPI (A), Nachweis der Bindung von NheB mit mAk 1E11 (B) und mAk 2B11 (C), Overlay von Bild A, B und C (D), Overlay-Bild der Negativkontrolle (E)

In weiteren Versuchen wurden die Zellen auch mit gereinigtem NheB behandelt. Zur Aufreinigung des NheB wurde der *B. cereus* Stamm MHI 1672, eine Mutante, die NheA und B, aber kein NheC exprimiert, verwendet. Dadurch konnte vermieden werden, dass das Eluat noch Spuren von NheC enthält, da NheB und C gerne in Lösung miteinander interagieren. Abb. 16 zeigt eine Übersichtsaufnahme und eine Vergrößerung von Vero-Zellen, die mit NheB (5 µg/ml) inkubiert worden waren. Die Bindung an die Zelle wurde mit dem an den roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten 2B11-Antikörper (2B11-F555) dargestellt.

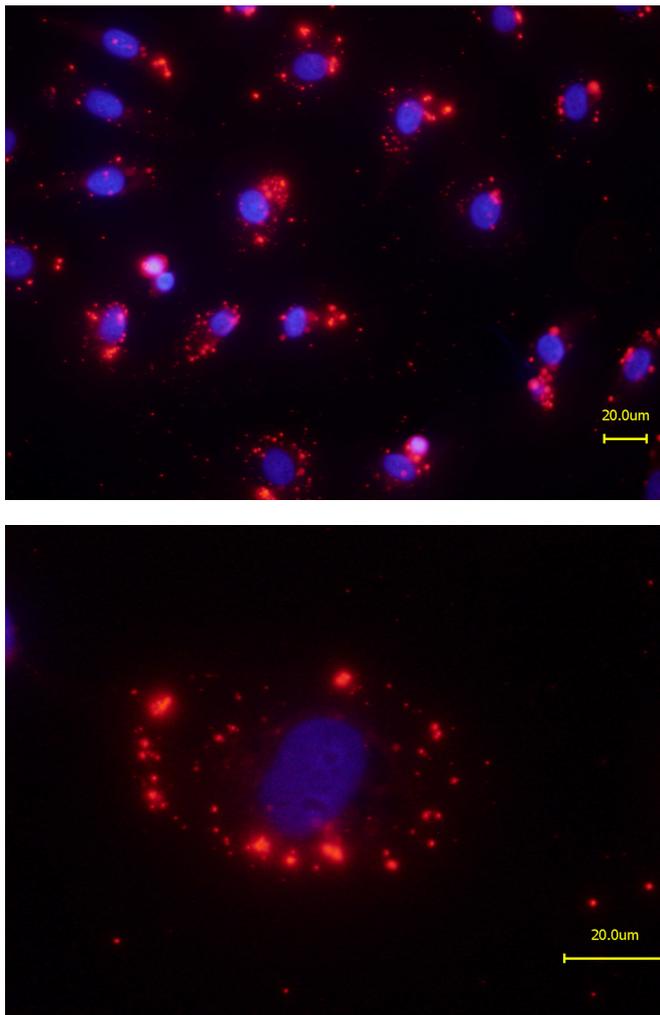


Abbildung 16: Bindung von immunaffinitätschromatographisch aufgereinigtem NheB an Vero-Zellen (Overlay-Bilder)

Es zeigte sich ein ähnliches Bindungsmuster wie bei der Inkubation mit MHI 1761, allerdings waren die „Spots“ zum einen nicht ganz so homogen über die Zelloberfläche verteilt und zum anderen waren z.T. sehr große fluoreszierende Areale auf den Zellen zu beobachten.

Generell war es auch möglich, bei anderen Zelllinien wie beispielsweise CaCo-2 oder A549 zellgebundenes NheB mittels Immunfluoreszenz-Tests nachzuweisen. Allerdings mussten die Objektträger dazu vor dem Aussäen der Zellen mit Fibronectin (4 $\mu\text{g}/\text{well}/200 \mu\text{l}$) beschichtet werden, um eine gleichmäßigere Verteilung und Haftung der Zellen zu erreichen. Beispielsweise für diese Versuchsreihen ist die Bindung von gereinigtem NheB (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) an die CaCo-2- bzw. A549-Zellen in Abb. 17 dargestellt. Für den Nachweis des zellgebundenen NheB wurden hier wieder die mit rotem bzw. grünem Fluoreszenzfarbstoff markierten mAbs 2B11 bzw. 1E11 parallel eingesetzt.

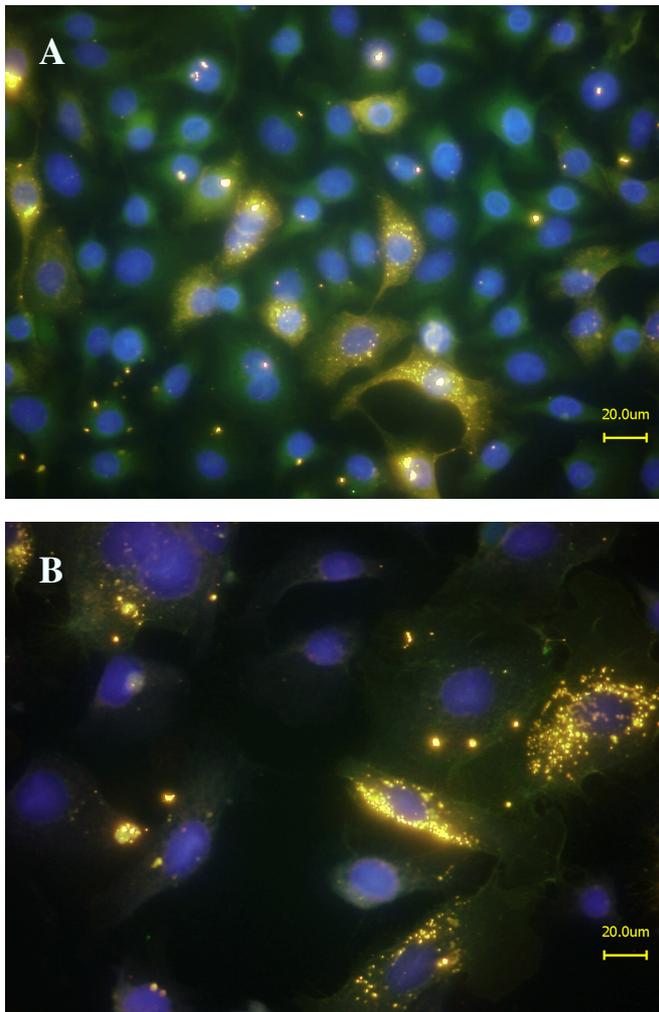


Abbildung 17: Bindung von NheB an die Zelllinien A549 (A) bzw. CaCo-2 (B)

Die Immunfluoreszenzbilder der Zelllinien A549 und CaCo-2 zeigen bei manchen Zellen eine deutliche Bindung von NheB, während bei anderen Zellen keine bzw. nur eine geringe

Fluoreszenzintensität nachweisbar ist. Bei den Vero-Zellen hingegen war Bindungsstärke und -verteilung von NheB deutlich homogener (Abb. 16).

Um einen besseren Eindruck zu gewinnen, wo NheB an der Zelle bindet, wurde in einem weiteren Versuch das Zytoskelett der Vero-Zellen mit Alexa Fluor 488 markiertem Phalloidin gefärbt. Zur Zellfixierung wurde hier aber anstatt Methanol, das die Aktinfilamente der Zelle zerstören würde, 4 % Paraformaldehyd verwendet. Das an die Zelle gebundene NheB des MHI-Stammes 1761 (Endverdünnung 1:20) wurde mit dem an Alexa Fluor 555 gekoppelten 2B11-Antikörper nachgewiesen. Die Overlay-Bilder mit den Toxin-behandelten und unbehandelten (Negativkontrolle) Zellen sind in Abb. 18 dargestellt.

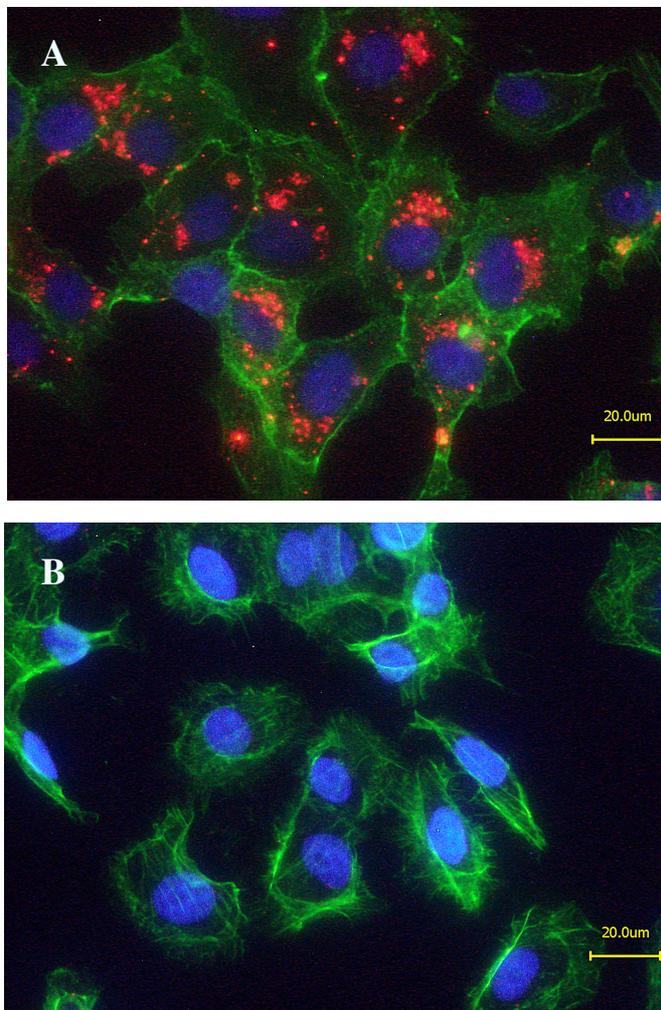


Abbildung 18: Lokalisation der Bindung von NheB an Vero Zellen: mit Toxin behandelte Zellen (A), unbehandelte Zellen (B). Rot: Nachweis der Bindung von NheB mittels mAk 2B11-F555; grün: Alexa Fluor 488 Phalloidin gefärbte Aktinfilamente; blau: Zellkernfärbung mit DAPI

Die grün gefärbten Aktinfilamente und die durch den 2B11-Antikörper rot gefärbten NheB-Bindungsstellen bilden einen guten Kontrast. Es entsteht der Eindruck, als ob NheB vorzugsweise an Regionen nahe des Zellkerns binden würde. Dies konnte allerdings in anderen Versuchen, bei denen die Zellen kürzer mit den Toxinüberständen inkubiert worden waren, nicht bestätigt werden (siehe 3.3.4). Deutlich erkennbar ist, dass die Bindung von NheB keinen Einfluß auf die Organisation und Integrität des Zytoskelettes der Zelle hat.

3.3.4 Durchflusszytometrie

Die Versuche unter der Verwendung der Immunfluoreszenz vermittelten einen ersten Eindruck über die Zellbindung von NheB, waren aber nicht dafür geeignet, objektiv bewerten zu können, ob diese Toxinkomponente unterschiedlich stark an die verschiedenen Zelllinien bindet und ob dadurch die unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber Nhe erklärt werden könnten. Daher wurde mit der auf Fluoreszenz basierenden Durchflusszytometrie (FACS) versucht, quantitative Aussagen über die Bindung von NheB zu erhalten. Da mittels FACS mit verhältnismäßig wenig Aufwand viele Proben, d.h. auch mehrere Zelllinien, parallel an einem Versuchstag untersucht werden können, war es möglich, vergleichbare Daten zu diesen Fragestellungen zu erhalten.

Da die Inkubationszeiten von Zellen und Toxinen sowohl bei den Zellkulturtests, als auch bei den bisherigen Fluoreszenztests, auf 24 Stunden ausgelegt waren, wurden als Vorversuche Zeitkinetikstudien in Form von Immunfluoreszenz-Tests durchgeführt, um festzustellen, nach welcher Zeitdauer die maximale Bindung von NheB an die Zelle erreicht wird. Dazu wurden Vero-Zellen ausgesät (6×10^5 Zellen pro Kammer) und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Zellmonolayer wurden nach Abnahme des Zellkulturmediums mit Kulturüberständen (1:40 verdünnt in EC-Puffer) der Nhe-Mutante 1761 für 5, 15, 30 und 60 min inkubiert. Als Negativkontrolle wurden mit toxinfreiem EC-Puffer behandelte Zellen verwendet. Die weitere Durchführung des Fluoreszenz-Tests erfolgte wie unter 3.2.7 beschrieben. Die NheB Bindung wurde mit dem Fluoreszenz markierten 1E11 Antikörper sichtbar gemacht (Abb. 19).

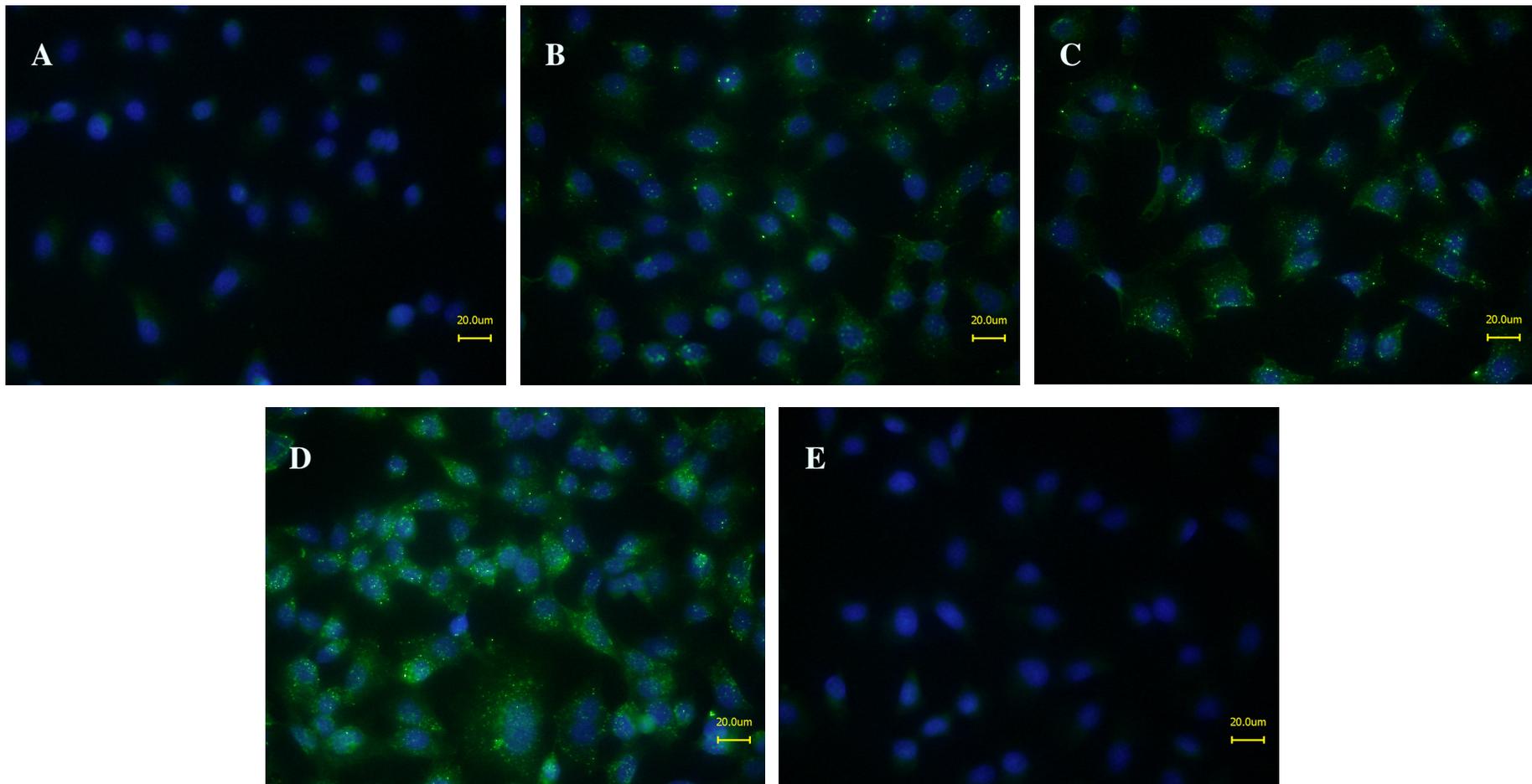


Abbildung 19: Zeitkinetikstudien zur Bindung von NheB an Vero-Zellen: NheB wurde nach 5 (A), 15 (B), 30 (C) und 60 (D) min. Inkubationszeit mittels Alexa Fluor 488-markierten mAk 1E11 nachgewiesen. Bild E zeigt das Overlay der Negativkontrolle

Die Bilder in Abb. 19 lassen eine Bindung des Toxins bereits nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten erkennen, die ihr Maximum nach 60 Minuten erreicht. Längere Inkubationszeiten erhöhten die Mengen an zellgebundenen NheB nicht mehr. Basierend auf diesen Versuchen wurde die Inkubationszeit von Toxin und Zellen für die folgenden Durchflusszytometrie-Versuche auf 60 Minuten festgelegt.

Für die Durchflusszytometrie-Versuche wurden repräsentativ fünf Zelllinien ausgesucht, die im WST-Test unterschiedliche Empfindlichkeiten für Nhe gezeigt hatten und sich auch vom Wachstumsverhalten unterscheiden. Als Vertreter der adhärent wachsenden Zellen wurden die Referenzzelllinie Vero, die sehr empfindlich für den Nhe-Referenzstamm war und die Zelllinien CaCo-2 und A549, die eine mittlere Empfindlichkeit im Zellkulturtest aufwiesen, ausgewählt. Bei den Suspensionszellen wurden die Zelllinie RPMI 8226 und die für Nhe weitgehend resistente Zelllinie U937 für die Versuche verwendet. Wie in 3.2.8 beschrieben, wurden die Zellen mit immunaffinitätschromatographisch gereinigtem NheB behandelt und die Bindung an die Zellen mit dem an Alexa Fluor 488 gekoppelten 1E11-Antikörper im Durchflusszytometer (FACSscan) nachgewiesen. Anhand ihrer im so genannten Forward- und Side-Scatter bestimmten morphologischen Merkmale wurde eine homogene Population an Zellen eingegrenzt und deren Fluoreszenzintensitäten im Kanal 1 (FL1-H) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 1×10^4 Zellen analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit einer speziellen Software (FCS Express, De Novo software). Um eine unspezifische Bindung des Fluoreszenz markierten Antikörpers 1E11 erkennen zu können, wurde bei jeder Zelllinie ein Parallelansatz mit einem irrelevanten, an Alexa Fluor 488 gekoppelten IgG₁ Antikörper mitgeführt. Mit Hilfe dieser Isotyp-Kontrolle konnte für jede Zelllinie ein Fluoreszenzintensitätsbereich (M1) festgelegt werden, der spezifisch für die Bindung von mAk 1E11 an zellgebundenes NheB war. In Abb. 20 sind die Ergebnisse für alle Zelllinien in Form von Histogrammen dargestellt. Die Histogramme der Isotyp-Kontrolle und die des 1E11-Ansatzes wurden jeweils übereinander gelegt.

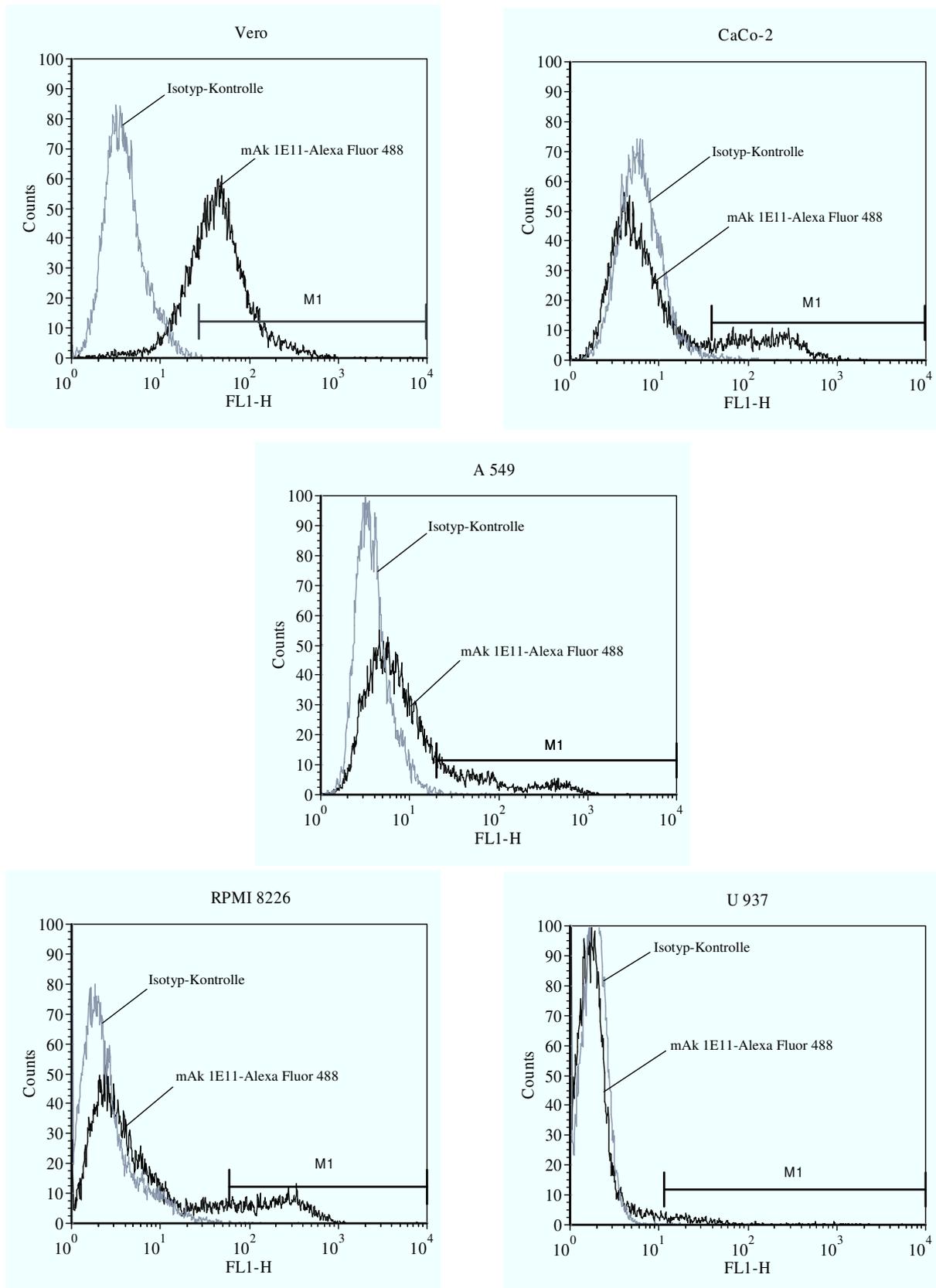


Abbildung 20: Analyse (n = 3) der Bindung von NheB an verschiedene Zelllinien mittels auf Fluoreszenz basierender Durchflusszytometrie (FACS)

Im Vergleich der Zelllinien wird deutlich, dass NheB an einen Großteil (ca. 70 %) der Vero-Zellen binden konnte. Dadurch war auch die Abgrenzung zur unspezifischen Fluoreszenz der Isotyp-Kontrolle bei dieser Zelllinie am einfachsten. Bei den Zelllinien CaCo-2, A549 und RPMI 8226 hingegen war nur bei einem deutlich geringeren Anteil der Zellen Fluoreszenz nachweisbar. Auffällig war auch, dass die spezifischen Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Zelllinien sehr variierten, da hier neben Zellen, an die nur wenig NheB gebunden hatte (Fluoreszenzintensität $< 10^2$), auch Zellen vorhanden waren, die mittlere (10^2) bis starke (10^3) Fluoreszenzintensitäten aufwiesen. Bei U937 wiederum ist beim 1E11-Ansatz nur ein marginaler Anteil der Zellen spezifisch Fluoreszenz markiert.

Angaben über die Prozentzahlen an Zellen, an die NheB gebunden hat, sind in Tab. 5 vergleichend für die Zelllinien dargestellt. Im Vergleich mit den Zytotoxizitätstiter des Nhe-Referenzstammes fällt auf, dass tendenziell ein Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit einer Zelllinie gegenüber Nhe und dem Prozentsatz an Zellen, an die NheB gebunden hat, besteht. Das heißt, dass die unterschiedlichen Sensitivitäten der Zelllinien darauf zurück zu führen sein können, dass die Bindungskomponente von Nhe unterschiedlich an den Zelloberflächen anhaften kann.

Tabelle 5: Vergleich der zytotoxischen Aktivität des Nhe-Referenzstammes NVH 0075/95 mit der Bindung von NheB an verschiedene Zelllinien

Zelllinien	Reziproker Zytotoxizitätstiter mit NVH 0075/95	Prozentualer Anteil an Zellen mit gebundenem NheB
Vero	820±37	69.8±3
CaCo-2	478±151	16.2±3
A549	365±32	18.4±4
RPMI 8226	307±61	16.5±5
U937	51±8	2.9±1

4 Diskussion

Die durch *B. cereus* ausgelösten Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen gewinnen zunehmend an Bedeutung (KOTIRANTA et al., 2000; EHLING-SCHULZ et al., 2004). Daneben finden sich in der Literatur aber auch immer wieder Fallbeschreibungen schwerwiegender nicht-gastrointestinaler Erkrankungen, bei denen *B. cereus* als auslösendes Agens isoliert wurde (DROBNIEWSKI, 1993; KOTIRANTA et al., 2000). Im Zusammenhang mit den von *B. cereus* ausgelösten Durchfallerkrankungen sind in den letzten Jahren vor allem die Enterotoxine Nhe, HBL und CytK beschrieben worden (BEECHER et al., 1995a; LUND & GRANUM, 1996; LUND et al., 2000). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass diese Zytotoxine auch bei der Pathogenese extraintestinaler Erkrankungen eine Rolle spielen (TURNBULL & KRAMER, 1983; DROBNIEWSKI, 1993; BEECHER et al., 2000; ROWAN et al., 2003). Zu den Wirkungsmechanismen der Toxine auf zellulärer Ebene ist wenig bekannt, zwar konnte für alle drei präsumtiven Enterotoxine nachgewiesen werden, dass sie Poren in Zellmembranen bilden können (BEECHER & WONG, 1997; HARDY et al., 2001; FAGERLUND et al., 2008), wie sich aber die Toxine bzw. ihre Proteinkomponenten dazu formieren müssen, und ob dazu ein spezifischer Rezeptor an der Zielzelle vorhanden sein muss, ist bis heute unklar. Zudem beschränkten sich diese Studien zumeist auf die Verwendung der für *B. cereus* Toxine besonders sensitiven Vero- bzw. CaCo-2-Zellen (FAGERLUND et al., 2004; LINDBÄCK et al., 2004; MORAVEK et al., 2006; FAGERLUND et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit sollten nun durch die Verwendung von neun humanen Zelllinien unterschiedlicher histogenetischer Herkunft und mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten belastbares Datenmaterial zur Toxinaktivität von Nhe, HBL und CytK gewonnen werden. Als Referenzzelllinie wurden Vero-Zellen verwendet. Üblicherweise werden bei Studien zur Wirkung mikrobieller Toxine auf Zellen rekombinant hergestellte Toxine oder klassisch chromatographisch aufgereinigte Toxinpräparationen eingesetzt. Allerdings ist es bislang nicht gelungen, mittels rekombinanter DNA-Technologien alle Komponenten der beiden *B. cereus* Enterotoxinkomplexe, HBL und Nhe, als funktionell aktive Proteine herzustellen. So konnten zwar vom Nhe-Komplex aktives NheA und NheC in *E. coli* exprimiert werden, die Expression von NheB in *B. subtilis* erwies sich jedoch als instabil (LINDBÄCK et al., 2004). Beim HBL wurde vor kurzem die Herstellung einer rekombinanten HBL-B-Komponente beschrieben, deren Funktionalität wurde jedoch nicht

gezeigt (MADEGOWDA et al., 2008). Auch die Isolierung der Toxinkomponenten aus *B. cereus* Überständen mittels klassisch chromatographischer Verfahren ist mit erheblichen Problemen verbunden (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM 1996). Zum einen ist dieser Ansatz mit einem nicht unerheblichen Arbeitsaufwand verbunden, da die *B. cereus* Enterotoxin-Komplexe Nhe und HBL aus jeweils drei Einzelkomponenten bestehen, was dieses Bakterium in dieser Hinsicht einzigartig macht, da andere beschriebene Zytotoxine aus maximal zwei Komponenten bestehen, wie zum Beispiel die so genannten binären Toxine von *Bacillus anthracis* (YOUNG & COLLIER, 2007) oder *Vibrio cholerae* (VANDEN BROECK et al., 2007). Zum anderen ist die Reproduzierbarkeit der beschriebenen chromatographischen Verfahren für *B. cereus* Enterotoxine limitiert, die Reinigung resultiert oft in einem beträchtlichen Verlust der Toxinaktivität und zudem sind die erhaltenen Toxinpräparationen instabil (BEECHER & WONG, 1994b; LUND & GRANUM, 1996). Vor dem Hintergrund dieser Problematik wurden in der vorliegenden Arbeit ungereinigte Kulturüberstände von *B. cereus* Referenzstämmen zur Untersuchung der Toxinaktivitäten verwendet. Mittels Neutralisationstests und durch das selektive Entfernen einzelner Toxinkomponenten mittels Immunaффinitätschromatographie (IAC) konnte gezeigt werden, dass die zytotoxischen Effekte der Kulturüberstände auf die Aktivität von Nhe bzw. HBL zurückzuführen sind und nicht auf andere von *B. cereus* als Exoproteine sezernierte Toxine oder Enzyme.

Bei den Zytotoxizitätstests mit den drei Referenzstämmen ergaben sich für die Zelllinien sehr unterschiedliche Empfindlichkeiten. Gegenüber Kulturüberständen des Nhe-Referenzstammes (NVH 0075/95) erwiesen sich die Vero-Zellen und die endotheliale Primär-Zelllinie HUVEC am empfindlichsten. Interessanterweise waren die Sensitivitäten für den sowohl HBL- als auch Nhe-exprimierenden Stamm DSM 4384 (HBL-Referenzstamm) bei diesen Zelllinien im Vergleich zu den anderen Zellen geringer ausgeprägt. Die durch Kulturüberstände des CytK-Referenzstammes hervorgerufene Zytotoxizität war bei allen Zelllinien vergleichsweise gering, die bekannt höhere Empfindlichkeit der Vero- und CaCo2-Zellen für dieses Toxin konnte jedoch bestätigt werden (LUND et al., 2000; FAGERLUND et al., 2004). Die monozytäre Zelllinie U937 war unter allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien am unempfindlichsten für die Kulturüberstände der drei Referenzstämme, insbesondere für Nhe konnte eine ausgeprägte Resistenz dieser Zelllinie beobachtet werden. Vergleichbare Angaben aus anderen Studien zur Empfindlichkeit humaner Monozyten gegenüber *B. cereus* Enterotoxinen liegen nicht vor. Eine ähnlich hohe Resistenz gegen Nhe wurde in einer

früheren am Lehrstuhl angefertigten Dissertationsarbeit (WEGSCHEIDER, 2004) für Maus-Hybridomzellen (Fusionsprodukt aus Myelomzelle und B-Lymphozyt) beschrieben. Interessanterweise reagierten aber in der vorliegenden Arbeit die verwendeten humanen Myelomzellen (RPMI 8226) vergleichsweise empfindlich. Dies galt sowohl für HBL- als auch für Nhe-haltige *B. cereus* Kulturüberstände und deutet darauf hin, dass das Wachstumsverhalten von Zellen (Monolayer- bzw. Suspensionskulturen) nicht mit der Toxinempfindlichkeit der Zelllinien korreliert. Zwar konnte für die in Suspension wachsende Zelllinie U937 eine geringe Empfindlichkeit für *B. cereus* Enterotoxine festgestellt werden, gleichzeitig wurden aber vergleichsweise wenig sensitive adhärente Zellen wie A204 (Rhabdomyosarkomzellen) identifiziert, die sogar weniger empfindlich auf Kulturüberstände des Nhe-Referenzstammes reagierten als die in Suspension wachsende Myelom-Zelllinie RPMI 8226.

Zur Empfindlichkeit verschiedener humaner Zelllinien gegenüber *B. cereus* Toxinen liegen nur wenige vergleichende Daten vor. In einer Studie von ROWAN et al (2001), bei der u.a. die Empfindlichkeiten von CaCo-2- und HEp-2-Zellen gegenüber Kulturüberständen von *B. cereus* Isolaten verglichen wurden, konnten keine signifikante Unterschiede hinsichtlich der Sensitivitäten dieser Zelllinien festgestellt werden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden mit den beiden Zelllinien bei der Untersuchung von Kulturüberständen des Nhe- bzw. HBL-Referenzstammes annähernd gleiche Ergebnisse erhalten. In einer weiteren Studie von CHRISTIANSSON et al. (1989) reagierten Vero-Zellen empfindlicher auf Kulturüberstände verschiedener *B. cereus* Isolate als HeLa-Zellen (Cervixkarzinom-Zellen). Angaben zum Toxinprofil der untersuchten Stämme lagen allerdings nicht vor. Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erwiesen sich Vero-Zellen im Vergleich zu HEp-2-Zellen – bei denen es sich um eine Variante der HeLa-Zelllinie handelt – als deutlich sensitiver gegenüber Nhe-haltigen Kulturüberständen, bei HBL-haltigen Kulturüberständen wurden allerdings vergleichbare Empfindlichkeiten festgestellt.

Um ausschließen zu können, dass die geringe Sensitivität der U937-Zellen auf die fehlende Expression von Adhäsionsproteinen zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit Phorbol-Estern behandelt (PMA). Dadurch wurde eine Differenzierung der monozytären U937-Zellen zu adhärent wachsenden Makrophagen induziert, was mit der Expression von β 2-Integrinen auf der Zelloberfläche verbunden ist (GARCIA et al., 1999; SHELLEY et al., 2002). *In vivo* vermitteln Integrine die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix, was beispielsweise die

Migration von Makrophagen aus den Blutgefäßen zu den Entzündungsherden im Gewebe ermöglicht. β 2-Integrine von Leukozyten sind aber auch als Rezeptoren für verschiedene bakterielle Toxine beschrieben worden. RTX- (Repeats in Toxin) Toxine wie die Leukotoxine von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (LALLY et al., 1997) und *Mannheimia haemolytica* (DASSANAYAKE et al., 2007), das hämolytische Adenylatcyclase-Toxin von *Bordetella pertussis* (MOROVA et al., 2008), sowie das vakuolisierende Cytotoxin (VacA) von *Helicobacter pylori* (SEWALD et al., 2008) binden an β 2-Integrine, um dann zytotoxisch aktiv zu werden. Interessanterweise bilden alle o.g. Toxine auch Poren in Zellmembranen. Speziell für U937 und andere monozytäre Zelllinien wurde beschrieben, dass diese nach einer PMA-induzierten Differenzierung zu Makrophagen eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber dem Lethalitätsfaktor (LT) von *Bacillus anthracis* aufwiesen (KASSAM et al., 2005). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass auch die andere von *B. anthracis* produzierte Toxinkomponente, das protektive Antigen, vermehrt an die Zelloberfläche von adhären U937-Zellen binden konnte (DESHPANDE et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit mit PMA behandelten U937-Zellen waren allerdings nicht empfindlicher für die *B. cereus* Toxine als die unbehandelten Zellen, was dafür spricht, dass zum einen diese Zytolysine nicht in Interaktion mit β 2-Integrinen treten, und dass zum anderen die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen keinen Einfluß auf die Anzahl potentieller toxinspezifischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche hatte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, das zytotoxische Potential von Nhe und HBL differenzieren zu können. Da bisher, wie eingangs erwähnt, noch keine Stämme isoliert wurden, die nur HBL exprimieren und die Herstellung rekombinanter Toxine, sowie die Aufreinigung von Toxinkomponenten keinen brauchbaren methodischen Ansatz darstellten, wurde in der vorliegenden Arbeit die subtraktive Immunaффinitätschromatographie als alternatives Verfahren eingesetzt. Dabei wurden selektiv die Toxinkomponenten NheB, HBL-L₂ bzw. HBL-B aus Kulturüberständen des *B. cereus* Referenzstammes, der beide Toxinkomplexe gleichzeitig exprimiert, durch – an eine Gelmatrix immobilisierte – toxinspezifische, monoklonale Antikörper sequentiell entfernt. Dabei wurde bei allen Zelllinien nach Entfernen von NheB ein deutlich geringeres zytotoxisches Potential der Kulturüberstände beobachtet, spätestens nach der Säule mit dem Antikörper gegen HBL-B erwiesen sich die Präparationen als atoxisch. Dieses Vorgehen ermöglichte es, den relativen Beitrag von Nhe bzw. HBL zur Gesamtzytotoxizität des HBL-Referenzstammes zu bestimmen.

Kulturüberstände des HBL-Referenzstammes (DSM 4384) produzieren etwa 4,4 µg HBL-L₂/ml und 7,4 µg/ml NheB, die NheB-Expression des Nhe-Referenzstammes (NVH 0075/95) hingegen liegt im Bereich von 10 µg/ml. Dies bedeutet, dass bei beiden Referenzstämmen die in den Überständen nachweisbaren Gesamttoxinnmengen in einem ähnlichen Größenbereich liegen. Allerdings wurden mit Vero und HUVEC Zelllinien identifiziert, die deutlich empfindlicher auf den HBL-negativen Stamm (NVH 0075/95) reagierten, als auf den HBL-Referenzstamm, der beide Enterotoxinkomplexe produziert. Dies bedeutet, dass synergistische Interaktionen zwischen den beiden Toxinkomplexen unwahrscheinlich sind, da ansonsten der HBL-Referenzstamm bei den Zellen ein tendenziell höheres toxisches Potential als der Nhe-Referenzstamm aufweisen müsste. Antagonistische Effekte können mit der hier verwendeten Methode allerdings nicht ausgeschlossen werden, zumal zwischen den Proteinkomponenten von Nhe und HBL deutliche Sequenzhomologien existieren (GRANUM et al., 1999). Mit der IAC wurde vom Nhe-Komplex nur NheB entfernt, das heißt, dass die im Kulturüberstand verbleibenden Toxinkomponenten NheA bzw. NheC mit dem strukturverwandten HBL-L₂ bzw. HBL-B interagieren könnten. Allerdings sind die erzielten Ergebnisse insofern in sich schlüssig, als dass es nach Entfernen von NheB zu einer beachtlichen Reduktion der Zytotoxizität kam, die auf eine Inaktivierung des Nhe-Komplexes zurückgeführt werden kann. Würden Nhe und HBL um Bindungsstellen konkurrieren, würde sich die Zytotoxizität nach Entfernen von NheB hingegen nicht so deutlich reduzieren.

In Untersuchungen von LUND & GRANUM (1997) zur zytotoxischen Relevanz der beiden Enterotoxinkomplexe, in der die Aktivität von Nhe und HBL bei Vero-Zellen miteinander verglichen wurde, zeigte sich, dass beide Toxinkomplexe vergleichbares toxisches Potential aufweisen. Allerdings konnten MORAVEK et al. (2006) zeigen, dass sich die zytotoxische Aktivität von Stämmen, die beide Toxinkomplexe exprimieren, nicht erheblich von der reiner Nhe-Produzenten unterscheidet. Bei den Kulturüberständen von 100 untersuchten *B. cereus* Isolaten wurde eine gute Korrelation zwischen NheB-Konzentration und zytotoxischer Aktivität erhalten, während diese Übereinstimmung bei HBL-L₂ fehlte. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass das toxische Potential von *B. cereus* Kulturüberständen bei Vero-Zellen durch die Aktivität von Nhe dominiert wird. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für diese Zelllinie bestätigt werden. Bei den meisten anderen Zelllinien konnten 40 - 60 % der Gesamttoxizität des HBL-Referenzstammes entweder auf die Aktivität von Nhe oder HBL zurückgeführt werden.

Ein anderes Bild wurde hingegen bei den Zelllinien HUVEC, U937 und A549 (Lungenkarzinomzellen) erhalten. Bei den HUVEC-Zellen wurde die Zytotoxizität zu fast 90 % durch Nhe verursacht. Dies hatte sich tendenziell schon in den Versuchen mit dem Nhe-Referenzstamm, der sich ebenfalls als hochtoxisch für die HUVEC-Zellen erwiesen hatte, angedeutet. Diese Ergebnisse sind auch unter dem Aspekt interessant, dass bislang immer nur HBL als das Toxin beschrieben wurde, das die Gefäßpermeabilitäts-Reaktion (Vascular permeability reaction = VPR; Glatz et al., 1974) in der Haut von Kaninchen auslöst (BEECHER & WONG, 1994b). Wenn man allerdings die außerordentliche Empfindlichkeit der endothelialen Zelllinie (HUVEC) für Nhe in Betracht zieht, scheint es so, als ob dieses Toxin auch ursächlich an der durch Kulturüberstände von *B. cereus* hervorgerufenen VPR-Reaktion beteiligt sein könnte. Diese Hypothese muss natürlich in weiteren Untersuchungen noch verifiziert werden. Die Zelllinie U937 erwies sich als überaus resistent gegen Nhe. Mittels IAC konnte gezeigt werden, dass die nachweisbare toxische Aktivität der Kulturüberstände des HBL-Referenzstammes bei diesen Zellen zum größten Teil auf HBL zurückzuführen ist. Ebenso wurde bei den A549-Zellen die Zytotoxizität eindeutig von HBL dominiert. Die relative zytotoxische Aktivität von HBL bei dieser Zelllinie lag bei ca. 75 %. Mit HUVEC, A549 und U937 wurden somit erstmals Zelllinien identifiziert, die eine besondere Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber einem der beiden *B. cereus* Enterotoxinkomplexe aufweisen. Obwohl bis heute weder für HBL noch für Nhe Zellrezeptoren identifiziert werden konnten, sprechen die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der hier untersuchten Zelllinien jedoch für deren Existenz. Dies gilt im besonderen Maße für Nhe, da mit HUVEC eine besonders sensitive und mit U937 eine fast resistente Zelllinie gefunden wurde. Auf Grund der Tatsache, dass Nhe auch Poren in synthetischen Lipiddoppelschicht-Membranen bilden kann (FAGERLUND et al., 2008), war man bislang jedoch der Meinung, dass Nhe auch ohne einen spezifischen Rezeptor an Zellen binden kann (STENFORS ARNESEN et al., 2008).

In weiteren Untersuchungen sollte nun der Frage nachgegangen werden, worauf die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Zelllinien zurückzuführen sein könnte. Basierend auf der Studie von MORAVEK et al. (2006), in der eine Korrelation zwischen NheB-Konzentration und Zytotoxizität bei den Kulturüberständen von *B. cereus* Stämmen nachgewiesen worden war, wurde versucht ob mittels Immunfluoreszenz bzw. FACS-Analysen bei den Zelllinien Unterschiede hinsichtlich der Interaktion von NheB mit der Zielzelle zu erkennen sind. Mittels Immunfluoreszenz konnte die Bindung von NheB an

verschiedene Zellen zum ersten Mal direkt nachgewiesen werden. Zudem konnte die zeitabhängige Bindung von NheB an die Zelloberfläche gezeigt werden. Dabei wurden die Zellen sowohl mit Kulturüberständen eines *B. cereus* Stammes, der NheB und NheC exprimiert (MHI 1761), als auch mit gereinigtem NheB behandelt. Unveröffentlichten Ergebnissen zweier Studien (DIETRICH et al., LINDBÄCK et al.) zufolge, ist die gleichzeitige, initiale Bindung von NheB als auch NheC an die Zielzelle notwendig, damit der Enterotoxinkomplex Nhe seine volle biologische Wirkung entfalten kann. Generell konnte bei der Inkubation der Zellen mit gereinigtem NheB bzw. mit den Kulturüberständen von MHI 1761 ein ähnliches Bindungsmuster beobachtet werden. Allerdings entstanden bei der Behandlung mit reinem NheB größere, nicht ganz so homogen über die Zelloberfläche verteilte Fluoreszenz markierte Areale. Diese Aggregatbildung von NheB könnte zum einen durch die Lipophilie dieser Enterotoxinkomponente bedingt sein, zum anderen aber auch durch das Fehlen von NheC und der damit einhergehenden fehlerhaften Anordnung von NheB an der Zelle. Für die Durchführung der Durchflusszytometrie-Versuche wurde trotzdem gereinigtes NheB verwendet, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass durch die gleichzeitige Bindung von NheB und C bereits strukturelle Änderungen der Zellmorphologie, insbesondere bei RPMI 8226-Zellen, induziert wurden.

Erste Ergebnisse von Immunfluoreszenz-Tests, bei denen tendenzielle Unterschiede hinsichtlich der Bindung von NheB an die Zelllinien Vero, CaCo-2 und A549 erkennbar waren, konnten bei fünf repräsentativ ausgewählten Zelllinien mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden. Die Durchflusszytometrie ist eine häufig angewandte Methode, um quantitativ beurteilen zu können, welche Mengen eines bakteriellen Toxins an Zellen gebunden sind (PANDEY & WARBURTON, 2004; DESHPANDE et al., 2006). Häufig werden dazu parallel Zellkulturtests durchgeführt, um feststellen zu können, ob ein Zusammenhang zwischen Toxinbindung und Empfindlichkeit verschiedener Zelltypen besteht (OHMI et al., 1998; PANDEY & WARBURTON, 2004). Für die hier untersuchten Zelllinien ergab sich, dass bei ca. 70 % der für den Nhe-Referenzstamm sehr empfindlichen Vero-Zellen gebundenes NheB nachgewiesen werden konnte, aber nur bei ca. 3 % der Nhe-resistenten U937-Zellen. Die Prozentzahlen für die anderen Zelllinien (CaCO-2, A549 und RPMI 8226) mit mittleren Empfindlichkeiten für Nhe lagen im Bereich von 16 - 18 %. Diese Daten deuten darauf hin, dass zum einen die zytotoxische Aktivität von Nhe bei den unterschiedlichen Zelllinien davon abhängig ist, wie viel NheB an die Zelloberfläche bindet und dass zum anderen NheB an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche bindet. Diese Hypothese muß

allerdings noch in weiteren Versuchen bestätigt werden, wobei insbesondere interessant ist, ob durch steigende Toxinkonzentrationen eine Sättigung der NheB-Bindung an die Zellen erreicht werden kann.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bilden einen guten Ausgangspunkt, um in weiteren Untersuchungen den Wirkungsmechanismus der *B. cereus* Toxine auf zellulärer Ebene näher identifizieren zu können. Mit HUVEC bzw. A549 wurden Zelllinien identifiziert, die eine ausgeprägte Empfindlichkeit für Nhe bzw. HBL haben. Diese Zelllinien könnten zukünftig in Studien, die sich explizit mit der Wirkungsweise von Nhe oder HBL beschäftigen, als Referenzzelllinien genutzt werden. Des Weiteren steht mit der Zelllinie U937, die sich als Nhe-resistent erwies, ein interessantes Modell zur Verfügung, das die Suche nach dem mutmaßlichen Nhe-Zellrezeptor erleichtern könnte. Vorstellbar wären hierbei beispielsweise vergleichende Studien zur Expression zellwandständiger Proteine bei resistenten und hoch empfindlichen Zelllinien. In diesem Zusammenhang konnte mit der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass der mögliche Rezeptor für Nhe nicht unter den Adhäsionsproteinen zu finden ist.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der *in vitro* Aktivität von drei *B. cereus* (Enterotoxinen) auf zellulärer Ebene. Dabei wurden zunächst die zytotoxischen Effekte der Enterotoxinkomplexe Hemolysin BL (HBL) und Non-hemolytic enterotoxin (Nhe), sowie des Einzelproteins Cytotoxin K (CytK) bei neun humanen Zelllinien (A204, A549, Caco-2, HEp-2, Hep-G2, HUVEC, Jurkat, RPMI 8226 und U937) und Vero-Zellen verglichen. Zu diesem Zweck wurden ungereinigte Kulturüberstände von drei *B. cereus* Referenzstämmen, die Nhe (NVH 0075/95), Nhe und HBL (DSM 4384) bzw. CytK (NVH 391/98) produzierten, in Zellkulturtests eingesetzt. Die vergleichende Untersuchung resultierte in folgenden Ergebnissen: (i) bei A204, Caco-2, HEp-2, Jurkat und RPMI 8226-Zellen wurden durch Kulturüberstände des Nhe- (NVH 0075/95) bzw. HBL-Referenzstammes (DSM 4384) vergleichbare zytotoxische Effekte induziert; (ii) die primäre Zelllinie HUVEC und Vero-Zellen reagierten besonders empfindlich auf Überstände des *B. cereus* Stammes NVH 0075/95, während humane Monozyten (U937) auch nach Differenzierung zu Makrophagen kaum geschädigt wurden; (iii) bei A549, Hep-G2 und U937-Zellen zeigten HBL-haltige Kulturüberstände (DSM 4384) ein höheres toxisches Potential als HBL-freie Präparationen (NVH 0075/95); (iv) CytK-haltige Überstände waren vergleichsweise gering zytotoxisch, die höchste Empfindlichkeit zeigten Vero- und CaCo-2-Zellen.

Mittels subtraktiver Immunaффinitätschromatographie war es möglich, die durch Kulturüberstände des *B.cereus* Referenzstammes DSM 4384 bei den Zellen hervorgerufene zytotoxische Wirkung auf die spezifische Aktivität von Nhe bzw. HBL zurückzuführen. Bei A549-Zellen lag die berechnete relative Aktivität von HBL bei 75 %, während bei HUVEC-Zellen toxische Wirkungen fast vollständig (ca. 90 %) durch Nhe induziert wurden. Die Resistenz der U937-Zellen gegen Nhe zeigte sich auch in diesen Versuchen. Bei den anderen untersuchten Zelllinien waren Nhe und HBL nahezu gleich an der messbaren Gesamtzytotoxizität beteiligt.

Unter Verwendung fluoreszenzmarkierter, monoklonaler Antikörper war es möglich, die Bindung der Nhe-Komponente NheB an verschiedene Zelllinien mittels Immunfluoreszenztests nachzuweisen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die unterschiedliche Bindung von NheB an die Zelllinien Vero, A549, CaCo-2, RPMI 8226 und U937 demonstriert. Erwartungsgemäß war die Bindung von NheB an Vero-Zellen am

ausgeprägtesten (70 % fluoreszenzmarkierte Zellen), während diese Bindung bei nur 3 % der für Nhe weitgehend resistenten U937-Zellen beobachtet werden konnte. Darüber hinaus wurde bei 16 - 18 % der Zellen der drei anderen untersuchten Zelllinien, die mittlere Empfindlichkeiten für Nhe-haltige Kulturüberstände gezeigt hatten, eine NheB-Bindung nachgewiesen.

Summary

Cell-specific effects of *Bacillus cereus* cytotoxins

This work deals with the *in vitro* activity of *B. cereus* (entero-)toxins at the cellular level. At first cytotoxic effects of the enterotoxin-complexes Hemolysin BL (HBL) and non-hemolytic enterotoxin (Nhe) as well as the single protein Cytotoxin K (CytK) on nine human cell lines (A204, A549, Caco-2, HEp-2, Hep-G2, HUVEC, Jurkat, RPMI 8226 und U937) were compared with Vero cells. For this purpose, crude culture supernatants of three *B. cereus* reference strains producing Nhe (NVH 0075/95), Nhe and HBL (DSM 4384) and CytK (NVH 391/98) respectively were analyzed by cell culture assays. The following results were obtained: (i) in A204, Caco-2, HEp-2, Jurkat and RPMI 8226 cells comparative cytotoxic effects were induced by culture supernatants of the Nhe- (NVH 0075/95) and HBL reference strain (DSM 4384); (ii) primary endothelial cells (HUVEC) and Vero cells were highly susceptible to supernatants of *B. cereus* strain NVH 0075/95, whereas human monocytes (U937) were hardly damaged even after differentiation to macrophages; (iii) in A549, Hep-G2 and U937 cells, HBL containing supernatants (DSM 4384) exhibited a higher toxic potential than HBL-negative preparations (NVH 0075/95); (iv) supernatants containing CytK were comparatively low cytotoxic, Vero- and Caco-2 cells showed the highest susceptibility.

Using immunoaffinity chromatography it was possible to ascribe cytotoxic effects of culture supernatants of strain DSM 4384 to the specific action of Nhe and HBL. For A549, estimated relative activity of HBL was at 75 %, whereas toxic effects induced in HUVEC cells were nearly completely (about 90 %) attributable to Nhe. These experiments also confirmed that U937 cells are resistant to Nhe. In all other tested cell lines, Nhe and HBL participated more or less equally to the measurable overall cytotoxicity.

Using fluorescence-labelled monoclonal antibodies it was possible to detect binding of the Nhe-component NheB on different cell lines. With flow cytometry different cell surface binding of NheB to cell lines Vero, A549, Caco-2, RPMI 8226 and U937 was demonstrated. Vero cells showed, as expected, the most NheB binding (70 % fluorescent cells), whereas toxin binding was observed in only 3 % of U973 cells which are highly resistant to Nhe. Furthermore, 16 - 18 % of the cells of the three other cell lines tested, showing mean susceptibilities to Nhe containing culture supernatants, were positive for NheB binding.

6 Literaturverzeichnis

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

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI & M. ISOBE (1995a):
A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 129, 17 - 19

AGATA, N., M. OHTA, Y. ARAKAWA & M. MORI (1995b):
The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein
Microbiol. 141, 983 - 988

ALVAREZ-BARRIENTOS, A., J. ARROYO, R. CANTON, C. NOMBELA & M.
SANCHEZ-PEREZ (2000):
Applications of flow cytometry to clinical microbiology
Clin. Microbiol. Rev. 13, 167 - 195

ANDERSSON, A., P. E. GRANUM & U. RONNER (1998):
The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence
mechanism
Int. J. Food Microbiol. 39, 93 - 99

ARCE, S., H. F. NAWAR, M. W. RUSSELL & T. D. CONNELL (2005):
Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and of cholera toxin
elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells
Infect. Immun. 73, 2718 - 2727

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

BAIDA, G., Z. I. BUDARINA, N. P. KUZMIN & A. S. SOLONIN (1999):
Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from
Bacillus cereus
FEMS Microbiol. Lett. 180, 7 - 14

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

BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1990):
A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 58, 2220 - 2227

BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1991):
Characterization of the components of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 59, 1778 - 1784

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1994a):
Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous
hemolytic pattern in blood agar
Appl. Environ. Microbiol. 60, 1646 - 1651

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1994b):
Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic
vascular permeability factor from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 62, 980 - 986

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1994c):
Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus*
diarrheal enterotoxin immunoassay kits
Appl. Environ. Microbiol. 60, 4614 - 4616

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

Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*

Infect. Immun. 63, 4423 - 4428

BEECHER, D. J., J. S. PULIDO, N. P. BARNEY & A. C. L. WONG (1995b):

Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL

Infect. Immun. 63, 632 - 639

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

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

J. Biol. Chem. 272, 233 - 239

BEECHER, D. J., T. W. OLSEN, E. B. SOMERS & A. C. L. WONG (2000a):

Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis

Infect. Immun. 68, 5269 - 5276

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

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

Microbiol. 146, 3033 - 3039

BERTHO, A. L., M. A. SANTIAGO & S. G. COUTINHO (2000):

Flow cytometry in the study of cell death

Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95, 429 - 433

BROWN, M. & C. WITTEWER (2000):

Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology

Clin. Chem. 46, 1221 - 1229

BROWN, R. W. & R. K. SCHERER (1957):

A report on two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*

Cornell Vet. 47, 226 - 240

CALLEGAN, M. C., M. S. GILMORE, M. GREGORY, R. T. RAMADAN, B. J. WISKUR,
A. L. MOYER, J. J. HUNT & B. D. NOVOSAD (2007):

Bacterial endophthalmitis: Therapeutic challenges and host-pathogen interactions

Prog. Retin. Eye Res. 26, 189 - 203

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 217, 115 - 119

CHRISTIANSSON, A., A. S. NAIDU, I. NILSSON, T. WADSTROM & H. E.
PETTERSSON (1989):

Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures

Appl. Environ. Microbiol. 55, 2595 - 2600

CLARKE, R. G. & A. C. PINDER (1998):

Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers

J. Appl. Microbiol. 84, 577 - 584

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

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

J. Appl. Microbiol. 97, 214 - 219

CRONIN U.P. & M.G. WILKINSON (2009):

The potential of flow cytometry in the study of *Bacillus cereus*

J. Appl. Microbiol. (DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04370.x)

DAMGAARD, P. H. (1995):

Diarrheal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis* based insecticides

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 12, 245 - 250

DAMGAARD, P. H., P. E. GRANUM, J. BRESCIANI, M. V. TORREGROSSA, J.

EILENBERG & L. VALENTINO (1997):

Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18, 47 - 53

DASSANAYAKE, R. P., S. K. MAHESWARAN & S. SRIKUMARAN (2007):

Monomeric expression of bovine beta(2)-Integrin Subunits reveals their role in *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced biological effects

Infect. Immun. 75, 5004 - 5010

DAVIDSON, B., H. P. DONG, A. HOLTH, A. BERNER & B. RISBERG (2007):

Flow cytometric immunophenotyping of cancer cells in effusion specimens: Diagnostic and research applications

Diagn. Cytopathol. 35, 568 - 578

DESHPANDE, A., R. J. HAMMON, C. K. SANDERS & S. W. GRAVES (2006):

Quantitative analysis of the effect of cell type and cellular differentiation on protective antigen binding to human target cells

FEBS Lett. 580, 4172 - 4175

DIERICK, K., E. VAN COILLIE, I. SWIECICKA, G. MEYFROIDT, H. DEVLIEGER, A.

MEULEMANS, G. HOEDEMAEKERS, L. FOURIE, M. HEYNDRICKX & J. MAHILLON

(2005):

Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning

J. Clin. Microbiol. 43, 4277 - 4279

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

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

Appl. Environ. Microbiol. 65, 4470 - 4474

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

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

Appl. Environ. Microbiol. 71, 8214 - 8220

DROBNIEWSKI, F. A. (1993):

Bacillus cereus and related species

Clin. Microbiol. Rev. 6, 324 - 338

DUBOUIX, A., E. BONNET, M. ALVAREZ, H. BENSAFI, M. ARCHAMBAUD, B.

CHAMINADE, G. CHABANON & N. MARTY (2005):

Bacillus cereus infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices

J. Infect. 50, 22 - 30

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

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

Mol. Nutr. Food Res. 48, 479 - 487

EHLING-SCHULZ, M., B. SVENSSON, M. H. GUINEBRETIERE, T. LINDBACK, M.

ANDERSSON, A. SCHULZ, M. FRICKER, A. CHRISTIANSSON, P. E. GRANUM, E.

MARTLBAUER, C. NGUYEN-THE, M. SALKINOJA-SALONEN & S. SCHERER (2005):

Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains

Microbiol. 151, 183 - 197

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

Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 260, 232 - 240

EWALD, C., A. HEER, L. HEIKING, G. MOLL (1985):

Mastitiden durch *Bacillus cereus* bei medikamentell trockengestellten Milchkühen
Prakt. Tierarzt 66, 1025 - 1028

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

Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*
Microbiol. 150, 2689-2697

FAGERLUND, A., J. BRILLARD, R. FURST, M. H. GUINEBRETIERE & P. E. GRANUM (2007):

Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group
BMC Microbiol. 7: 43

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

Bacillus cereus Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia
Microbiol. 154, 693 - 704

FALZANO, L., P. FILIPPINI, S. TRAVAGLIONE, A. G. MIRAGLIA, A. FABBRI & C. FIORENTINI (2006):

Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G(2)/M transition in uroepithelial cells
Infect. Immun. 74, 3765 - 3772

FELLA, C. (1999):

Nachweis von *Bacillus cereus* Entertoxinen mittels monoklonaler Antikörper
Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

FERMANIAN, C., C. LAPEYRE, J. M. FREMY & M. CLAISSE (1996):

Production of diarrheal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*

Int. J. Food Microbiol. 30, 345 - 358

FINLAY, W. J. J., N. A. LOGAN & A. D. SUTHERLAND (1999):

Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin

Appl. Environ. Microbiol. 65, 1811 - 1812

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

Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin

Lett. Appl. Microbiol. 28, 394 - 400

FRANKARD, J., R. LI, F. TACCONE, M. J. STRUELENS, F. JACOBS & A. KENTOS
(2004):

Bacillus cereus pneumonia in a patient with acute lymphoblastic leukemia

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23, 725 - 728

FRICKER, M., U. MESSELHAUSSER, U. BUSCH, S. SCHERER & M. EHLING-SCHULZ
(2007):

Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks

Appl. Environ. Microbiol. 73, 1892 - 1898

GANT, V. A., G. WARNES, I. PHILLIPS & G. F. SAVIDGE (1993):

The application of flow-cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics

J. Med. Microbiol. 39, 147 - 154

GARCIA, A., A. SERRANO, E. ABRIL, P. JIMENEZ, L. M. REAL, J. CANTON, F.
GARRIDO & F. RUIZ-CABELLO (1999):

Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression

Exp. Hematol. 27, 353 - 364

GAUR, A. H., C. C. PATRICK, J. A. MCCULLERS, P. M. FLYNN, T. A. PEARSON, B. I. RAZZOUK, S. J. THOMPSON & J. L. SHENEP (2001):

Bacillus cereus bacteremia and meningitis in immunocompromised children
Clin. Infect. Dis. 32, 1456 - 1462

GEDEK, W. (1986):

Bacillus cereus-Mastitiden beim Rind als Folge einer Arzneimittelkontamination
Tierärztl. Umsch. 41, 526 - 530

GHELARDI, E., F. CELANDRONI, S. SALVETTI, E. FISCARELLI & S. SENESI (2007):

Bacillus thuringiensis pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils
Microbes Infect. 9, 591-598

GINSBURG, A. S., L. G. SALAZAR, L. D. TRUE & M. L. DISIS (2003):

Fatal *Bacillus cereus* sepsis following resolving neutropenic enterocolitis during the treatment of acute leukemia
Am. J. Hematol. 72, 204 - 208

GLATZ, B. A. & J. M. GOEPFERT (1973):

Extracellular factor synthesized by *Bacillus cereus* which evokes a dermal reaction in guinea pigs
Infect. Immun. 8, 25-29

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

Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species
Infect. Immun. 10, 229 - 303

GOHAR, M., O. A. OKSTAD, N. GILOIS, V. SANCHIS, A. B. KOLSTO & D. LERECLUS (2002):

Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon
Proteomics 2, 784 - 791

GRANUM, P. E., S. BRYNESTAD, K. OSULLIVAN & H. NISSEN (1993):
Enterotoxin from *Bacillus cereus* -Production and biochemical characterization
Neth. Milk Dairy J 47, 63 - 70

GRANUM, P. E., A. NAESTVOLD & K. N. GUNDERSBY (1995):
An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning during the Norwegian ski championships for juniors
Norsk Veterinaertidsk. 107, 945 - 948

GRANUM, P. E., A. ANDERSSON, C. GAYTHER, M. T. GIFFEL, H. LARSEN, T. LUND & K. OSULLIVAN (1996):
Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 141, 145 - 149

GRANUM, P. E., K. O'SULLIVAN & T. LUND (1999):
The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 177, 225 - 229

GRANUM, P.E. (2007)

Bacillus cereus

In: M. P. DOYLE & L. R. BEUCHAT (Hrsg): Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3rd Ed., pp. 445 - 455
ASM Press, Washington, D.C.

GRAY, K. M., P. P. BANADA, E. O'NEAL & A. K. BHUNIA (2005):
Rapid Ped-2E9 cell-based cytotoxicity analysis and genotyping of *Bacillus species*
J. Clin. Microbiol. 43, 5865 - 5872

GUCKER, F. T., C. T. OKONSKI, H. B. PICKARD & J. N. PITTS (1947):
A photoelectric counter for colloidal particles
J. Am. Chem. Soc. 69, 2422 - 2431

GUINEBRETIERE, M. H., V. BROUSSOLLE & C. NGUYEN-THE (2002):
Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains
J. Clin. Microbiol. 40, 3053 - 3056

GUINEBRETIERE, M. H., A. FAGERLUND, P. E. GRANUM & C. NGUYEN-THE
(2006):
Rapid discrimination of cytK-1 and cytK-2 genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex
PCR system
FEMS Microbiol. Lett. 259, 74 - 80

HANSEN, B. M. & N. B. HENDRIKSEN (2001):
Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis
Appl. Environ. Microbiol. 67, 185 - 189

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

HAUGWITZ, U., W. BOBKIEWICZ, S. R. HAN, E. BECKMANN, G. VEERACHATO, S.
SHAID, S. BIEHL, K. DERSCH, S. BHAKDI & M. HUSMANN (2006):
Pore-forming *Staphylococcus aureus* alpha-toxin triggers epidermal growth factor receptor-
dependent proliferation
Cell Microbiol. 8, 1591 - 1600

HELGASON, E., O. A. OKSTAD, D. A. CAUGANT, H. A. JOHANSEN, A. FOUET, M.
MOCK, I. HEGNA & A. B. KOLSTO (2000):
Bacillus anthracis, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of
genetic evidence
Appl. Environ. Microbiol. 66, 2627 - 2630

HERNAIZ, C., A. PICARDO, J. I. ALOS & J. L. GOMEZ-GARCES (2003):
Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient
Clin. Microbiol. Infect. 9, 973 - 975

HERNANDEZ, E., F. RAMISSE, J. P. DUCOUREAU, T. CRUEL & J. D. CAVALLO (1998):
Bacillus thuringiensis subsp. konkukian (serotype H34) superinfection: Case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice
J. Clin. Microbiol. 36, 2138 - 2139

HERZENBERG, L. A., D. PARKS, B. SAHAF, O. PEREZ & M. ROEDERER (2002):
The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: A view from Stanford
Clin. Chem. 48, 1819 - 1827

HILLIARD, N. J., R. L. SCHELONKA & K. B. WAITES (2003):
Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate
J. Clin. Microbiol. 41, 3441 - 3444

HOFFMASTER, A. R., J. RAVEL, D. A. RASKO, G. D. CHAPMAN, M. D. CHUTE, C. K. MARSTON, B. K. DE, C. T. SACCHI, C. FITZGERALD, L. W. MAYER, M. C. J. MAIDEN, F. G. PRIEST, M. BARKER, L. X. JIANG, R. Z. CER, J. RILSTONE, S. N. PETERSON, R. S. WEYANT, D. R. GALLOWAY, T. D. READ, T. POPOVIC & C. M. FRASER (2004):
Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 8449 - 8454

HOFFMASTER, A. R., K. K. HILL, J. E. GEE, C. K. MARSTON, B. K. DE, T. POPOVIC,
D. SUE, P. P. WILKINS, S. B. AVASHIA, R. DRUMGOOLE, C. H. HELMA, L. O.
TICKNOR, R. T. OKINAKA & P. J. JACKSON (2006):

Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes
J. Clin. Microbiol. 44, 3352 - 3360

HUGHES, S., B. BARTHOLOMEW, J. C. HARDY & J. M. KRAMER (1988):

Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning
FEMS Microbiol. Lett. 52, 7 - 11

JACKSON, S. G., R. B. GOODBRAND, R. AHMED & S. KASATIYA (1995):

Bacillus cereus and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation
Lett. Appl. Microbiol. 21, 103 - 105

KAPRELYANTS, A. S. & D. B. KELL (1992):

Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry
J. Appl. Bacteriol. 72, 410 - 422

KASSAM, A., S. D. DER & J. MOGRIDGE (2005):

Differentiation of human monocytic cell lines confers susceptibility to *Bacillus anthracis* lethal toxin
Cell Microbiol. 7, 281 - 292

KATSUYA, H., T. TAKATA, T. ISHIKAWA, H. SASAKI, K. ISHITSUKA, Y.
TAKAMATSU & K. TAMURA (2009):

A patient with acute myeloid leukemia who developed fatal pneumonia caused by carbapenem-resistant *Bacillus cereus*
J. Infect. Chemother. 15, 39 - 41

KIYOMIZU, K., T. YAGI, H. YOSHIDA, R. MINAMI, A. TANIMURA, T. KARASUNO & A. HIRAOKA (2008):

Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia

J. Infect. Chemother. 14, 361 - 367

KOBAYASHI, K., M. KAMI, M. IKEDA, Y. KISHI, N. MURASHIGE, R. TANOSAKI, S.-I. MORI & Y. TAKAUE (2005):

Fulminant septicemia caused by *Bacillus cereus* following reduced-intensity umbilical cord blood transplantation

Haematologica 90, e13 – e14

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

Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections

Microbes Infect. 2, 189 - 198

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

Bacillus cereus and other *Bacillus* species

In: M. P. DOYLE (Hrsg): Foodborne Bacterial Pathogens, pp. 21 - 70

Marcel Dekker, New York

LAFFIN, J. & J. M. LEHMAN (1994):

Detection of intracellular virus and viral products

In: Z. DARZYNKIEWICZ, J. P. ROBINSON & H. A. CRISSMANN (Hrsg): Methods in

Cell Biology: Flow Cytometry, Vol 41, pp. 543 - 557

Academic Press Inc, San Diego

LALLY, E. T., I. R. KIEBA, A. SATO, C. L. GREEN, J. ROSENBLOOM, J. KOROSTOFF, J. F. WANG, B. J. SHENKER, S. ORTLEPP, M. K. ROBINSON & P. C. BILLINGS (1997):

RTX toxins recognize a beta 2 integrin on the surface of human target cells

J. Biol. Chem. 272, 30463 - 30469

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

Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin

Microbiol. 150, 3959 – 3967

LINDSAY, D., F. M. MOSUPYE, V. S. BROZEL & A. VON HOLY (2000):

Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus spp.*

Lett. Appl. Microbiol. 30, 364 - 369

LUBENAU (1906):

Bacillus peptonificans als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie

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

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

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

FEMS Microbiol. Lett. 141, 151 - 156

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

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

Microbiol. 143, 3329 - 3336

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

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

Mol. Microbiol. 38, 254 - 261

MAHLER, H., A. PASI, J. M. KRAMER, P. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BAR & S.

KRAHENBUHL (1997):

Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*

N. Engl. J. Med. 336, 1142 - 1148

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

X-ray crystal structure of B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*
Proteins 71, 534 - 540

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

Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*
J. Clin. Pathol. 29, 938 - 940

MESSELHÄUSSER, U., M. FRICKER, M. EHLING-SCHULZ, H. ZIEGLER, D. ELMER-ENGLHARD, W. KLEIH & U. BUSCH (2007):

Real-time-PCR-System for detection of *Bacillus cereus* (emetic type) in the food
J. Verbrauch. Lebensm. 2, 190 - 193

MIKAMI, T., T. HORIKAWA, T. MURAKAMI, T. MATSUMOTO, A. YAMAKAWA, S. MURAYAMA, S. KATAGIRI, K. SHINAGAWA & M. SUZUKI (1994):

An improved method for detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples
FEMS Microbiol. Lett. 119, 53 - 57

MORAVEK, M., M. WEGSCHEIDER, A. SCHULZ, R. DIETRICH, C. BÜRK & E. MÄRTLBAUER (2004):

Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*
FEMS Microbiol. Lett. 238, 107 - 113

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

Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses
FEMS Microbiol. Lett. 257, 293 - 298

- MOROVA, J., R. OSICKA, J. MASIN & P. SEBO (2008):
RTX cytotoxins recognize beta(2) integrin receptors through N-linked oligosaccharides
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 5355 - 5360
- MOYER, A. L., R. T. RAMADAN, J. THURMAN, A. BURROUGHS & M. C. CALLEGAN (2008):
Bacillus cereus induces permeability of an in vitro blood-retina barrier
Infect. Immun. 76, 1358 - 1367
- NGAMWONGSATIT, P., P. P. BANADA, W. PANBANGRED & A. K. BHUNIA (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 - 215
- NGAMWONGSATIT, P., W. BUASRI, P. PIANARIYANON, C. PULSRIKAM, M. OHBA, A. ASSAVANIG & W. PANBANGRED (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 - 356
- NIKODÉMUSZ, I. (1965):
Die Reproduzierbarkeit der von *Bacillus cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen bei Katzen
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 196, 81 - 87
- NIKODÉMUSZ, I & G. GONDA (1966):
Die Wirkung langfristiger Verabreichung von *B. cereus* verunreinigten Lebensmitteln bei Katzen
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 199, 64 - 67
- NIKODÉMUSZ, I. (1967):
Die enteropathogene Wirkung von *Bacillus cereus* bei Hunden
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 202, 533 - 538

OHMI, K., N. KIYOKAWA, T. TAKEDA & J. FUJIMOTO (1998):
Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins
Biochem, Biophys, Res, Commun, 251, 137 - 141

PANDEY, J. & D. WARBURTON (2004):
Knock-on effect of anthrax lethal toxin on macrophages potentiates cytotoxicity to endothelial cells
Microbes Infect. 6, 835 - 843

PARAJE, M. G., P. IRIBARREN & I. ALBESA (2002):
Interaction of bacterial toxin with leukocytes measured by flow cytometry
Curr. Microbiol. 45, 171 - 174

PARKINSON, T. J., M. MERRALL & S. G. FENWICK (1999):
A case of bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*
N. Z. Vet. J. 47, 151 - 152

PETIT, J. M., M. DENISGAY & M. H. RATINAUD (1993):
Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow-cytometry
Biol. Cell. 78, 1 - 13

PRIHA, O., K. HALLAMAA, M. SAARELA & L. RAASKA (2004):
Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31, 161 - 169

PRÜSS, B. M., R. DIETRICH, B. NIBLER, E. MÄRTLBAUER & S. SCHERER (1999):
The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group
Appl. Environ. Microbiol. 65, 5436 - 5442

RAMARAO, N. & D. LERECLUS (2006):
Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively
Microbes Infect. 8, 1483 - 1491

RAMEGOWDA, B. & V. L. TESH (1996):

Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines

Infect. Immun. 64, 1173 - 1180

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

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

Nucleic Acids Res. 32, 977 - 988

RIVERA, A. M. G., P. E. GRANUM & F. G. PRIEST (2000):

Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*

FEMS Microbiol. Lett. 190, 151 - 155

ROWAN, N. J., K. DEANS, J. G. ANDERSON, C. G. GEMMELL, I. S. HUNTER & T. CHAITHONG (2001):

Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus spp.* after growth in reconstituted infant milk formulae

Appl. Environ. Microbiol. 67, 3873 - 3881

ROWAN, N. J., G. CALDOW, C. G. GEMMELL & I. S. HUNTER (2003):

Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus species* associated with nongastrointestinal infections

Appl. Environ. Microbiol. 69, 2372 - 2376

RUSUL, G. & N. H. YAACOB (1995):

Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA

Int. J. Food Microbiol. 25, 131 - 139

SAMPLES, J. R. & H. BUETTNER (1983):

Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*)

Am. J. Ophthalmol. 95, 258 - 259

SCHOENI, J. L. & A. C. L. WONG (2005):

Bacillus cereus food poisoning and its toxins

J. Food. Prot. 68, 636 – 648

SEIDEL, K.E., C. PFISTERER, S. HÖRMANSDORFER & J. BAUER (1996):

Zum Nachweis toxinogener *Bacillus cereus*-Stämme

J. Vet. Med. 43, 421 - 428

SEWALD, X., B. GEBERT-VOGL, S. PRASSL, I. BARWIG, E. WEISS, M. FABBRI, R. OSICKA, M. SCHIEMANN, D. H. BUSCH, M. SEMMRICH, B. HOLZMANN, P. SEBO & R. HAAS (2008):

Integrin subunit CD18 is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin

Cell Host Microbe 3, 20 - 29

SHAPIRO, H.M. (2003):

Practical flow cytometry, 4th Ed., pp. 285 - 306

John Wiley & Sons Inc., Hoboken (USA)

SHELLEY, C. S., J. M. TEODORIDIS, H. PARK, O. C. FAROKHZAD, E. P. BOTTINGER & M. A. ARNAOUT (2002):

During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta(2) integrin gene promoter

J. Immunol. 168, 3887 - 3893

SHENKER, B. J., D. BESACK, T. MCKAY, L. PANKOSKI, A. ZEKAVAT & D. R. DEMUTH (2005):

Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity

J. Immunol. 174, 2228 - 2234

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

Bacillus cereus-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops

Appl. Microbiol. 24, 341 - 348

STEEN, M. K., L. A. BRUNOMURTHA, G. CHAUX, H. LAZAR, S. BERNARD & C. SULIS (1992):

Bacillus cereus endocarditis-report of a case and review

Clin. Infect. Dis. 14, 945 - 946

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

Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*

FEMS Microbiol. Lett. 197, 223 - 228

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

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

FEMS Microbiol. Rev. 32, 579 - 606

STRICH, S. (1999):

Untersuchungen zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung von *Bacillus cereus*-Exoproteinen

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

SWIECICKA, I., G. A. VAN DER AUWERA & J. MAHILLON (2006):

Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals

Microb. Ecol. 52, 544 - 551

TERPLAN, G. (1957):

Saprophyten als Mastitiserreger

Arch. Lebensmittelhyg. 8, 37 - 38

THOMPSON, N. E., M. J. KETTERHAGEN, M. S. BERGDOLL & E. J. SCHANTZ (1984):
Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 43, 887 - 894

TOKIEDA, K., Y. MORIKAWA, K. MAEYAMA, K. MORI & K. IKEDA (1999):
Clinical manifestations of *Bacillus cereus meningitis* in newborn infants
J. Paediatr. Child Health. 35, 582 - 584

TURNBULL, P. C. B., K. JORGENSEN, J. M. KRAMER, R. J. GILBERT & J. M. PARRY
(1979):
Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of
exotoxins
J. Clin. Pathol. 32, 289 - 293

TURNBULL, P. C. B. & J. M. KRAMER (1983):
Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an analysis of exotoxin production by strains
isolated over a two-year period
J. Clin. Pathol. 36, 1091 - 1096

VANDEN BROECK, D., C. HORVATH & M. J. S. DE WOLF (2007):
Vibrio cholerae: Cholera toxin
Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 1771 - 1775

WEGSCHEIDER, M. (2004):
Untersuchungen zu *Bacillus cereus* Enterotoxin-Komplexen auf zellulärer Ebene
Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

WEHRLE, E., M. MORAVEK, R. DIETRICH, C. BÜRCK, A. DIDIER & E. MÄRTLBAUER
(2009):
Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the
detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*
J. Microbiol. Methods 78, 265 - 270

WONG, H. C., Y. L. CHEN & C. L. F. CHEN (1988):

Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products

J. Food Prot. 51, 707 - 710

YANG, I. C., D. Y. C. SHIH, T. P. HUANG, Y. P. HUANG, J. Y. WANG & T. M. PAN
(2005):

Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species
in the *Bacillus cereus* group

J. Food Prot. 68, 2123 - 2130

YOUNG, J. A. T. & R. J. COLLIER (2007):

Anthrax toxin: Receptor binding, internalization, pore formation, and translocation

Annu. Rev. Biochem. 76, 243 - 265

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Durchschnittlich nachweisbare zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen der <i>B. cereus</i> Referenzstämmen bei Verwendung von Vero-Zellen	34
Abb. 2	Überprüfung der Effektivität der IAC-Säulen mittels Westernblot	35
Abb. 3	Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten mittels IAC auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei Verwendung von Vero-Zellen	37
Abb. 4	Durchschnittlich nachweisbare zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen von <i>B. cereus</i> Referenzstämmen bei Verwendung verschiedener adhärent wachsender Zelllinien	38
Abb. 5	Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei CaCo-2-Zellen	40
Abb. 6	Zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei A204-Zellen nach Entfernen von Toxinkomponenten	41
Abb. 7	Zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei A549-Zellen nach Entfernen von Toxinkomponenten	42
Abb. 8	Durchschnittlich nachweisbare zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen von <i>B. cereus</i> Referenzstämmen bei Verwendung verschiedener in Suspension wachsender Zelllinien	43
Abb. 9	Zytotoxische Aktivität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei U937-Zellen nach Entfernen von Toxinkomponenten	44
Abb. 10	Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei Jurkat-Zellen	45
Abb. 11	Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei RPMI 8226-Zellen	46

Abb. 12	Durchschnittlich nachweisbare zytotoxische Aktivität in Kulturüberständen der <i>B. cereus</i> Referenzstämme bei HUVEC-Zellen	47
Abb. 13	Effekt des konsekutiven Entfernens von Toxinkomponenten auf die messbare Zytotoxizität von Kulturüberständen des HBL-Referenzstammes bei HUVEC-Zellen	48
Abb. 14	Absoluter und relativer Beitrag der beiden Enterotoxinkomplexe Nhe und HBL zu den durch Kulturüberstände des HBL-Referenzstammes (Nhe und HBL Produzent) bei den Zelllinien induzierten toxischen Effekten	51
Abb. 15	Nachweis der Bindung von NheB an Vero-Zellen mittels Immunfluoreszenz	53
Abb. 16	Bindung von immunaffinitätschromatographisch aufgereinigtem NheB an Vero-Zellen	54
Abb. 17	Bindung von NheB an die Zelllinien A549 bzw. Caco-2	55
Abb. 18	Lokalisation der Bindung von NheB an Vero-Zellen	56
Abb. 19	Zeitkinetikstudien zur Bindung von NheB an Vero-Zellen	58
Abb. 20	Analyse der Bindung von NheB an verschiedene Zelllinien mittels auf Fluoreszenz basierender Durchflusszytometrie (FACS)	60

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über in der Literatur beschriebene Zellkulturtests zum Nachweis von <i>B. cereus</i> Toxinen	11
Tab. 2	Charakteristika der verwendeten <i>B. cereus</i> Stämme	31
Tab. 3	Funktionsüberprüfung der IAC-Säulen	36
Tab. 4	Empfindlichkeiten der Zelllinien gegenüber Kulturüberständen von <i>B. cereus</i> Stämmen	49
Tab. 5	Vergleich der zytotoxischen Aktivität des Nhe-Referenzstammes NVH 0075/95 mit der Bindung von NheB an verschiedene Zelllinien	61

Danksagung

Herrn Professor Dr. E. Märtlbauer danke ich für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dietrich für seine hervorragende Betreuung, die große Sorgfalt bei der Durchsicht der Arbeit, die zahlreichen Anregungen sowie die jederzeit gewährte geduldige und humorvolle Hilfe.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft danken, insbesondere bei Frau B. Minich, Frau Dr. C. Nielsen sowie den ehemaligen Mitarbeiterinnen Frau C. Ehlich und Frau D. Steinhart (geb. Herrmann).

Bei den Doktoranden des Instituts bedanke ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit und ihre freundschaftliche Verbundenheit.

Herrn Professor Dr. H. Zerbe und Herrn Dr. F. Weber danke ich für die Bereitstellung des Durchflusszytometers und die Hilfestellung bei der Untersuchung der Proben.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie dafür bedanken, dass sie stets an meiner Seite war und immer an mich geglaubt hat. Insbesondere Raphael danke ich auch für die Hilfe am Computer, das mehrmalige Durchsehen der Arbeit, die aufmunternden Worte und vor allem für seine Liebe.