

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Quantifizierung, Lokalisation und Export

des emetischen Toxins Cereulid

aus humanpathogenen *Bacillus cereus*

ANDREA RÜTSCHLE

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. U. Kulozik

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

2. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Die Dissertation wurde am 01.06.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.09.2015 angenommen.



---

**Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung .....	1
Summary .....	3
<b>I. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1. Die Mitglieder der <i>Bacillus cereus</i> Gruppe .....	5
2. Verbreitung von <i>B. cereus</i> .....	6
3. <i>B. cereus</i> als Lebensmittelpathogen.....	7
4. Wirkung von Cereulid.....	8
5. Das emetische Toxin Cereulid.....	9
6. Das Cereulidsynthetase-Operon .....	10
7. Regulation der <i>ces</i> Genexpression .....	11
8. Methoden zur Detektion emetischer <i>B. cereus</i> Stämme und Cereulid.....	12
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
1. Mikrobiologische Techniken .....	14
1.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	14
1.2 Medien und Medienzusätze.....	15
1.3 Puffer .....	18
1.4 Kultivierungsbedingungen .....	18
1.5 Wachstumsanalysen.....	19
1.6 Wachstumsversuche mit externem Cereulid und <i>cesCD</i> Überexpressionsmutanten.....	19
1.7 Gewinnung und Aufreinigung von <i>B. cereus</i> Sporen.....	19
1.8 Hydrophobizitätsbestimmung von <i>B. cereus</i> Sporen (nach Rosenberg <i>et al.</i> , 1980) .....	20
1.9 Hitzeresistenztests mit <i>B. cereus</i> Sporen .....	20
1.10 Nachweis der Biofilmbildung .....	21
1.11 Cereulidextraktionsversuche von Oberflächen vegetativer Zellen und Sporen .....	22
1.12 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation (nach Reddy <i>et al.</i> , 2007) .....	23
1.13 Herstellung von Cereulid und <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Cereulid.....	23

2. Cereulidmessmethoden .....	24
2.1 Cereuliddetektion mittels UPLC-ESI <sup>+</sup> -TOF MS .....	24
2.2 Cereulidquantifikation mittels HPLC oder UPLC-MS/MS SIVA.....	24
2.3 Biologische Cereulidquantifikation mittels HEp-2 Cytotoxizitätstest (nach Finlay <i>et al.</i> , 1999) .....	26
3. Phospholipidanalyse (nach Bligh & Dyer, 1959) .....	27
4. Molekularbiologische Methoden.....	28
4.1 Standard Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	28
4.2 Oligonukleotide.....	29
4.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	29
4.4 Herstellung und Transformation kompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	30
4.5 Herstellung und Transformation kompetenter <i>B. cereus</i> Zellen.....	30
4.6 Herstellung von <i>B. cereus</i> und <i>B. subtilis cesCD</i> Überexpressionsmutanten.....	31
4.7 RNA-Isolation .....	31
4.8 Reverse Transkription.....	32
4.9 Quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	32
4.10 Transkriptomanalyse mittels Next-Generation Sequencing (NGS) .....	33
5. Proteinbiochemische Methoden .....	36
5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli 1970) .....	36
5.2 Western Blot .....	36
5.3 Slot Blot.....	37
6. Transelektronenmikroskopie (TEM).....	39
6.1 TEM-Probenpräparation (nach M. Hartmann, 2012) .....	40
6.2 Puffer und Lösungen für die Elektronenmikroskopie.....	42
<b>III. Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
<b>Teil I</b> .....	<b>43</b>
1. Phänotypische Charakterisierung eines emetischen <i>B. cereus</i> Stammsets hinsichtlich Cereulidproduktion, Sporeneigenschaften und Biofilmbildung.....	43
1.1 Etablierung einer Hochdurchsatz-Cereuliddetektionsmethode .....	43

---

1.2 Klassifizierung emetischer <i>B. cereus</i> Stämme nach ihrem Cereulidproduktionsvermögen.....	44
1.3 Vergleich der Hochdurchsatz-Quantifizierungsmethode mit der HPLC-MS/MS-SIVA .....	46
1.4 Cereulidproduktion in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium .....	48
1.5 Analyse der Sporen emetischer Stämme hinsichtlich Hydrophobizität und Hitzeresistenz....	52
1.6 Biofilmbildung und Cereulidproduktion .....	53
<b>Teil II</b> .....	56
2. Untersuchungen zum potentiellen Toxintransporter CesCD und zur zellulären Lokalisation von Cereulid und dessen Synthetasekomplex.....	56
2.1 Zelluläre Lokalisation und Verbreitung von Cereulid .....	56
2.2 Lokalisation von Cereulid in Zellfraktionen vegetativer Zellen .....	56
2.3 Versuche zur Cereulidextraktion von der Oberfläche vegetativer Zellen .....	60
2.3.1 Extraktion von Cereulid mittels Ethanol .....	60
2.3.2 Zellschonende Cereulidextraktionsmethoden.....	61
2.4 Potentielle Cereulidbindung und -verbreitung durch Sporen .....	63
2.5 Analyse des putativen ABC-Transporters CesCD.....	64
2.5.1 <i>In silico</i> Analyse von CesCD .....	64
2.5.2 Charakterisierung der Deletionsmutante F48 $\Delta$ cesCD hinsichtlich Wachstum und Cereulidbildung.....	65
2.5.3 Vergleich der Transkriptionsrate des Synthetasegens <i>cesB</i> .....	67
2.5.4 Expressionsanalyse des Cereulidsynthetase moduls CesB1 .....	68
2.5.5 Cereulidproduktion von <i>cesCD</i> Überexpressionsmutanten.....	70
2.5.6 Einfluss von externem Cereulid in Zusammenhang mit dem potentiellen Transporter CesCD .....	71
2.5.7 Vergleichende Transkriptomstudien von F4810/72 und F48 $\Delta$ cesCD .....	74
2.6 Untersuchungen zur Lokalisation der Cereulidsynthetase .....	77
2.6.1 Detektion der Synthetase in Zellfraktionen im Wachstumsverlauf .....	77
2.6.2 Immunogoldlokalisierung der Cereulidsynthetase .....	78

---

<b>IV. Diskussion</b> .....	81
<b>Teil I</b> .....	81
1.1 Erfolgreiche Anwendung einer neuen UPLC-ESI <sup>+</sup> -TOF MS-Methode zur Analyse des Cereulidproduktionsverhaltens von 77 emetischen <i>B. cereus</i> Stämmen .....	81
1.2 Einfluss des Kultivierungsmediums auf das stammspezifische Cereulidbildungsvermögen ...	83
1.3 Hitzeresistenz sowie Hydrophobizität der Sporen von emetischen <i>B. cereus</i> Stämmen mit unterschiedlichem Cereulidbildungspotential.....	84
1.4 Analyse der Korrelation von Biofilmbildung und Toxinproduktionsvermögen.....	86
<b>Teil II</b> .....	87
2.1 Lokalisation von Cereulid an der Oberfläche von vegetativen Zellen und Sporen .....	87
2.2 Die essentielle Bedeutung des putativen ABC-Transporters CesCD für die Cereulidsynthese.....	89
2.3 Rolle des Transporters CesCD bei der Toxinproduktion unabhängig von der Transkription und Translation des Cereulidsynthetasegens <i>cesB</i> .....	91
2.4 Transporter CesCD übernimmt scheinbar keine Resistenzfunktion gegenüber Cereulid .....	93
2.5 Geringe Unterschiede im Transkriptom von F4810/72 und F48 $\Delta$ cesCD .....	94
<b>V. Literatur</b> .....	97
<b>VI. Anhang</b> .....	105
1. <i>B. cereus</i> Stammset.....	105
2. Vergleich des Cereulidproduktionspotentials von neun <i>B. cereus</i> Stämmen .....	108
3. Publikationen.....	110
Danksagung .....	111

## Zusammenfassung

Endosporen bildende *B. cereus* werden zunehmend als Verursacher von Lebensmittelkontaminationen und -vergiftungen identifiziert. Ein hohes Risiko geht dabei vom emetischen Toxin Cereulid aus, das von einigen *B. cereus* Stämmen mittels einer nichtribosomalen Peptidsynthetase gebildet wird und bei Verzehr teilweise zu schwerwiegenden Intoxikationen führen kann. Um Cereulidvergiftungen vorzubeugen und das Toxin im Ernstfall schnell zu detektieren, besteht zum einen der Bedarf den Cereulidbildungsprozess besser zu verstehen, zum anderen wird ein Toxinnachweissystem benötigt, mit dem es möglich ist auch große Probenanzahlen zuverlässig untersuchen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine neu entwickelte UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode angewendet, um 77 emetische *B. cereus* Stämme hinsichtlich der produzierten Cereulidmenge zu klassifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Cereulidproduktionsvermögen der emetischen Stämme stark unterscheidet und sich die angewendete Methode sehr gut eignet, um sowohl Hoch- als auch Niedrigcereulidproduzenten zu identifizieren. Anhand eines Vergleichs der neu etablierten UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Technik mit einer massenspektrometrischen und einer biologischen Cereulidquantifizierungsmethode bestätigte sich die gute Einsatzfähigkeit der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode für die semiquantitative Bestimmung von Cereulid. Bei weiterführenden Untersuchungen des emetischen Stammsatzes in Bezug auf die stammspezifische Cereulidsynthese wurde deutlich, dass die Kultivierungsbedingungen die Toxinbildung zwar stark beeinflussen, aber die Tendenz viel oder wenig Cereulid zu produzieren für die Mehrzahl der Stämme erhalten blieb und somit genetisch festgelegt zu sein scheint. Bei Analysen der Sporen starker und schwacher Cereulidbildner hinsichtlich ihrer Hydrophobizität sowie Hitzeresistenz zeigte sich zwar kein Zusammenhang dieser Sporeneigenschaften mit dem Toxinbildungsvermögen der Stämme, aber die getesteten *B. cereus* Sporen erwiesen sich als recht hitzeresistent und äußerst hydrophob, was vermuten lässt, dass sie als mögliche Cereulidträger dienen könnten. In Bezug auf das Biofilmbildungsvermögen der starken und schwachen Cereulidbildner war keine Korrelation zwischen Toxinproduktion und der stammspezifischen Biofilmbildung zu erkennen. Darüber hinaus schien eine externe Cereulidzugabe die Biofilmproduktion der getesteten Stämme nicht zu beeinflussen, was insgesamt darauf schließen lässt, dass der komplexe Biofilmbildungsprozess unabhängig von der Cereulidsynthese reguliert wird.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellten die Untersuchungen zur zellulären Lokalisation des Cereulids und dessen Synthetase sowie die Analyse des potentiellen Toxintransporters CesCD dar. Dabei zeigte sich, dass Cereulid vorwiegend an der Zelloberfläche sowie in der Zellwand, jedoch nur in geringen Mengen in der Zellmembran detektierbar war. Die Versuche zur Lokalisation der Peptidsynthetase ergaben, dass das CesB1-Synthetasemodul hauptsächlich im Cytosol der Zelle

lokalisiert ist. Daher bleibt eine mögliche Interaktion des Enzymkomplexes mit dem in der Membran verankerten ABC-Transporter CesCD weiterhin fraglich. Die essentielle Rolle von CesCD in der Cereulidproduktion konnte bestätigt werden, da sowohl die Deletion der Transportergene zu einem toxineffizienten Phänotyp führte, als auch die Überexpression von *cesCD* eine leichte Steigerung der Cereulidproduktion zur Folge hatte. Weiterhin wurde gezeigt, dass CesCD in die Toxinsynthese eingreift, ohne die Transkription oder Translation der Synthetasegene zu beeinflussen. Ein Nachweis über die vermutete Funktion von CesCD, als Immunitätsfaktor gegenüber dem Toxin zu dienen, konnte aber nicht erbracht werden, da sowohl die Deletion als auch die Überexpression von *cesCD* keine Wirkung auf das Wachstumsverhalten verschiedener Stämme in Medium mit extern zugegebenem Cereulid zeigte. Zusätzlich wurde mittels Next-Generation Sequencing eine Gesamttranskriptomanalyse des emetischen Referenzstammes F4810/72 und der Deletionsmutante F48 $\Delta$ *cesCD* durchgeführt. Dabei ergaben sich nur geringe Unterschiede in Bezug auf die regulierten Gene, die eventuell Hinweise auf die Funktion von CesCD liefern könnten.



## Summary

Endospore forming *B. cereus* are increasingly being found to cause food contaminations and intoxications. A high risk rises from the emetic toxin cereulide which is produced by several *B. cereus* strains through a nonribosomal peptide synthetase and to some extent provokes serious intoxications after consumption. In order to prevent cereulide intoxications and to detect the toxin quickly in case of emergency, a better understanding of the cereulid production process is necessary. On the other hand, a toxin detection system which can be used to reliably analysis a high number of samples is required. In this study, a newly developed UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS method was used for the first time to classify 77 emetic *B. cereus* strains with regard to the amount of cereulide they produce. It was possible to demonstrate that the cereulide synthesis capability of the emetic strains is highly diverse. Moreover, the study showed that the used method is suitable for the detection of high and low cereulide producers. The excellent capability of the UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS method for detection and semiquantitative cereulide determination was proven by comparing this newly established technique with a mass spectrometric method and a biological cereulide quantification method. In further studies with the emetic strain set regarding strain specific cereulide production it was demonstrated that the cultivation conditions strongly influence the toxin production process. Nevertheless, the tendency to produce high or small amounts of cereulide stays the same for the majority of the strains and seems to be genetically determined. Additionally, spores of strong and weak cereulide producers were analysed under consideration of spore hydrophobicity and heat resistance but no correlation between these characteristics was found. On the other hand, the tested *B. cereus* spores were shown to be highly heat resistant and quite hydrophobic, which leads to the conclusion that they can possibly serve as cereulide transporter. Regarding the biofilm producing capacity of strong and weak cereulide producers no connection between toxin generation and strain specific biofilm production could be seen. Furthermore, external cereulide supplementation seems to have no influence on the biofilm production process of the tested strains. This could indicate that the complex biofilm production process is regulated independently of the cereulide synthesis.

Further studies of cellular localisation of cereulide and its synthetase as well as the analysis of the potential toxin transporter CesCD were key aspects of this work. Here, it was shown that cereulide is predominantly detectable at the cell surface and in the cell wall fraction but only in little amounts in the cell membrane. With experiments on the localisation of the peptid synthetase, it was demonstrated that the CesB1-synthetase module was mainly detectable in the cytosol of the cell. Because of this, a possible interaction of the enzyme complex with the membrane anchored ABC transporter CesCD remains doubtful. The essential role of CesCD in the cereulide production process could be confirmed by showing that the deletions of the transporter genes lead to a toxin deficient

phenotype and the overexpression of *cesCD* resulted in a light increase of cereulide production. Furthermore, it was determined that CesCD influences the toxin synthesis without affecting the transcription and translation of the synthetase genes. A confirmation of the evidence that CesCD has an immunity function against the toxin was not possible because the deletion as well as *cesCD* overexpression did not have an effect on the growth behaviour of different strains during cultivation with external cereulide supplementation. Additionally, a whole transcriptome analysis of the emetic reference strain F4810/72 and the deletion mutant F48 $\Delta$ *cesCD* was made through Next-Generation Sequencing. As a result, only few differences between the two transcriptomes could be detected, which might be useful for further studies about the function of CesCD.

## I. Einleitung

### 1. Die Mitglieder der *Bacillus cereus* Gruppe

*Bacillus cereus* (sensu stricto) ist ein fakultativ anaerobes, bewegliches, grampositives Stäbchenbakterium, das zur Sporulation fähig ist. Es ist Namensgeber der *Bacillus cereus* (sensu lato) Gruppe, zu der neben *Bacillus anthracis* und *Bacillus thuringiensis* auch *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus cytotoxicus* und *Bacillus toyonensis* zählen. (Guinebretiere *et al.*, 2013; Jimenez *et al.*, 2013; Lechner *et al.*, 1998; Nakamura, 1998; Priest & Alexander, 1988). Alle acht Spezies dieser Gruppe sind genetisch eng miteinander verwandt und weisen eine starke Ähnlichkeit ihrer 16S rRNA sowie ein hohes Maß an Syntenie in ihrer chromosomalen DNA auf. Diese und andere genetische Vergleichsanalysen führten daher zur Frage, inwieweit sich die Mitglieder der *B. cereus* Gruppe überhaupt als einzelne Spezies voneinander abgrenzen lassen (Ash *et al.*, 1991; Ehling-Schulz, 2011; Ivanova *et al.*, 2003). Zieht man jedoch die phänotypischen und häufig plasmidcodierten virulenten Eigenschaften zur Differenzierung in Betracht, zeigen sich wiederum relativ eindeutige Unterscheidungsmöglichkeiten (Guinebretiere *et al.*, 2008; Rasko *et al.*, 2004). *B. cereus*, *B. anthracis* und *B. thuringiensis* Stämme weisen beispielsweise eine 99 %ige Identität ihrer 16S rDNA auf, besitzen aber jeweils charakteristische Virulenzplasmide, anhand derer sie sich klar voneinander differenzieren lassen (Ash *et al.*, 1991). So sind in *B. thuringiensis* unter anderem Gene auf relativ großen Plasmiden lokalisiert, die für kristalline  $\delta$ -Endotoxine mit insektizider Wirkung codieren (Aronson & Shai, 2001; Helgason *et al.*, 2000). *B. anthracis* ist Verursacher der für Mensch und Tier tödlichen Infektionskrankheit Anthrax. Entscheidend für die Virulenz dieses Organismus sind hier die zwei extrachromosomalen Plasmide pXO1 (182 kb) und pXO2 (96 kb) (Mock & Fouet, 2001). Auch einige *B. cereus* Stämme tragen ein Megaplasmid, welches Ähnlichkeiten zu pXO1 besitzt. Auf diesem sind unter anderem Gene lokalisiert, die den Organismus zur Synthese eines emetischen Toxins befähigen und ihn somit zu einem ernstzunehmenden Lebensmittelpathogen machen (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Neben den emetischen Toxinproduzenten existieren auch *B. cereus* Stämme, die ein oder mehrere chromosomal codierte Enterotoxine bilden können und beim Menschen nach Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln Diarrhö auslösen (Beecher & Wong, 1997). Abgesehen von diesen gastrointestinalen Erkrankungen kann *B. cereus* aber auch lokale und systemische Infektionen wie Lungenentzündung, Blutvergiftung oder Wund- und Augeninfektionen hervorrufen (Akeesson *et al.*, 1991; David *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1997). Ein weiteres Lebensmittelpathogen der *B. cereus* Gruppe ist die Spezies *B. cytotoxicus*, welche über die Fähigkeit verfügt Cytotoxin K1 (CytK1) zu produzieren, das beim Menschen Diarrhö verursachen kann (Lund *et al.*, 2000). Untersuchte Isolate aus kontaminierten

Lebensmitteln zeigten zwar bei der 16S rRNA-Sequenzanalyse eine 97-98 %ige Übereinstimmung mit *B. cereus* (sensu lato), doch mittels Multi Locus Sequence Typing (MLST) und aufgrund seines thermotoleranten Wachstumsverhaltens ließ sich *B. cytotoxicus* gut von den sieben anderen Spezies abgrenzen (Guinebretiere *et al.*, 2013). Die Arten *B. pseudomycooides* und *B. mycooides* sind nicht pathogen und unterscheiden sich von den anderen Spezies vor allem durch ihre charakteristische rhizoide Koloniemorphologie, die sie auf Festmedien ausbilden (Franco, 2002; Nakamura, 1998). Ebenso wie *B. mycooides* ist die lebensmittelverderbende Spezies *B. weihenstephanensis* psychrotolerant und zeichnet sich durch die Besonderheit aus bei 7 °C wachsen zu können (Lechner *et al.*, 1998). Bei *B. toyonensis* handelt es sich um eine Spezies, die ursprünglich als *B. cereus* var. *toyoi* beschrieben wurde und deren Sporen als Probiotika in Tierfutter Verwendung fanden (Hong *et al.*, 2005). Durch Genomvergleiche innerhalb der *B. cereus* Gruppe und durch Average Nucleotide Identity-Berechnungen (ANI) konnte *B. toyonensis* als eigene Spezies innerhalb der *Bacillus* Gruppe definiert werden (Jimenez *et al.*, 2013).

## 2. Verbreitung von *B. cereus*

*Bacillus cereus* (sensu stricto) ist ubiquitär verbreitet und konnte vor allem aus unterschiedlichen Boden- oder insbesondere Rhizosphärenproben, verschiedenen Lebensmitteln und Pflanzen isoliert werden (Hoorstra *et al.*, 2013; Rosenquist *et al.*, 2005; von Stetten *et al.*, 1999). Die Sporen des Organismus spielen bei der Verbreitung eine bedeutende Rolle. In Bodenproben wurden *B. cereus* Sporen in Konzentrationen von  $10^3$  bis zu  $10^7$  Zellen pro Gramm Probe nachgewiesen (von Stetten *et al.*, 1999). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Ernte von pflanzlichen Nahrungsmitteln *B. cereus* Zellen daran haften bleiben und auf diese Weise in Umgebungen gelangen, in denen Lebensmittel verarbeitet oder produziert werden (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Dort und auch an den Nahrungsmitteln selbst, stellen gerade Sporen als metabolisch inaktive Überdauerungsform eine ernstzunehmende Kontaminationsgefahr dar, da sie aufgrund ihres Aufbaus extrem resistent gegenüber sauren Bedingungen, dem Prozess des Einfrierens oder der Trocknung sind. Zudem ist bekannt, dass Sporen von cereulidproduzierenden *B. cereus* Stämmen hitzeresistenter sind, als die von Nichtcereulidproduzenten. Die Resistenzmechanismen können mitunter dazu führen, dass es zu einer Anreicherung von Sporen emetischer Stämme in Nahrungsmitteln kommen kann (Carlin *et al.*, 2006; Setlow *et al.*, 2006). Zusätzlich verfügt *B. cereus* über die Fähigkeit zum Beispiel auf Oberflächen von Nahrungsmittelproduktionsanlagen Biofilme auszubilden. Darin werden vegetative Zellen sowie Sporen durch eine extrazelluläre Matrix aus Exopolysacchariden und Proteinen zusammengehalten. In diesem Verbund sind sie dann relativ gut vor der Zerstörung durch

Desinfektions- und Reinigungsmaßnahmen geschützt und stellen eine permanente Kontaminationsgefahr dar (Peng *et al.*, 2001).

### 3. *B. cereus* als Lebensmittelpathogen

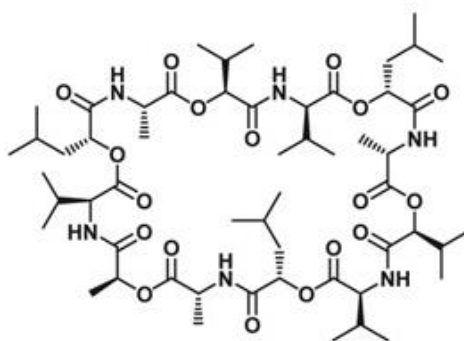
In den Industrieländern stieg die Zahl der durch *B. cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen in den letzten Jahren an. Allein im Jahr 2012 wurde in Europa von insgesamt 259 Vergiftungen berichtet bei denen die Analyse ergab, dass sie durch *Bacillus*-Toxine verursacht wurden (Anonymous, 2014). Die genaue Anzahl an Erkrankungsfällen ist jedoch nicht bekannt. Grund hierfür ist zum einen, dass durch *B. cereus* ausgelöste Lebensmittelvergiftungen nicht meldepflichtig sind und zum anderen vermutlich oftmals falsch diagnostiziert werden, da andere Erreger wie zum Beispiel *Clostridium perfringens* oder *Staphylococcus aureus* in der Lage sind sehr ähnliche Krankheitsbilder hervorzurufen (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Kotiranta *et al.*, 2000). Durch *B. cereus* können zwei Formen von Lebensmittelvergiftungen ausgelöst werden, deren charakteristische Symptome entweder Diarrhö und Bauchschmerzen (Diarrhö Syndrom) oder Übelkeit und Erbrechen (Emetisches Syndrom) sind. Beide Erkrankungen werden durch verschiedene Toxine verursacht (Ehling-Schulz *et al.*, 2004a; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Beim Diarrhö-Syndrom handelt sich dabei um chromosomal codierte Toxine, wie den hämolytischen Toxinkomplex (HBL), einen nicht hämolytischen Toxinkomplex (NHE) und ein zytotoxisches Protein (CytK) (Beecher & Wong, 1997; Granum *et al.*, 1996; Lund *et al.*, 2000). Diese Toxine gehören zur Gruppe der porenbildenden Toxine, welche in Zellmembranen eindringen können. Ihre Wirkung beruht darauf, dass durch die entstandenen Poren das elektrochemische Potential der Zellen zerstört wird und diese aufgrund des dadurch bedingten Wassereinstroms aufplatzen (Fagerlund *et al.*, 2008). Gelangen *B. cereus* Zellen nun also durch Verzehr von kontaminierten Speisen in den Dünndarm des Menschen und produzieren dort eine oder mehrere Sorten dieser hitzelabilen Enterotoxine, werden die Darmepithelzellen geschädigt. Dies führt nach einer Inkubationszeit von 8 bis 16 Stunden zu Durchfall und Bauchschmerzen. Im Allgemeinen verläuft die Erkrankung meist mild und heilt nach 12 bis 24 Stunden von selbst aus (Fagerlund *et al.*, 2008; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Das Emetische Syndrom wiederum kann durch sogenannte emetische *B. cereus* Stämme verursacht werden. In diesem Fall spricht man von einer klassischen Lebensmittelintoxikation. Sie resultiert aus dem Verzehr von kontaminierten Speisen, in denen vegetative Bakterienzellen das Toxin Cereulid produziert haben. Cereulid kann nach Aufnahme in den Körper Übelkeit und Erbrechen auslösen (Melling & Capel, 1978; Shinagawa *et al.*, 1995). Häufig verzehrte Lebensmittel, die mit Cereulidvergiftungen in Verbindung gebracht werden, sind Reis, Nudeln, Milchprodukte, getrocknete Pilze und Tee (Dierick *et al.*, 2005; Messelhauser *et al.*, 2014).

#### 4. Wirkung von Cereulid

Durch Cereulid verursachte Vergiftungssymptome wie Übelkeit und Erbrechen können beim Menschen 30 Minuten bis 6 Stunden nach Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln auftreten. In der Regel sind die Symptome relativ mild und verschwinden nach 24 Stunden wieder von selbst. Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen die Cereulidvergiftung Organversagen hervorrief und tödlich endete oder nur durch drastische Maßnahmen, wie Organtransplantationen behandelt werden konnte (Mahler H. & Pasi Aurelio., 1997; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; Tschiedel *et al.*, 2014). In Tierversuchen lag die infektiöse Dosis bei 8 bis 10 µg Toxin pro kg Körpergewicht. Die Menge an Cereulid, welche mindestens aufgenommen werden muss, damit es zu Symptomen kommt, wurde mit  $\leq 8$  µg/kg Körpergewicht beschrieben (Agata *et al.*, 1994; Jaaskelainen *et al.*, 2003b). Der genaue Wirkmechanismus von Cereulid im menschlichen Körper ist noch nicht bekannt. Bis jetzt konnte nur in Versuchen mit Moschusspitzmäusen (*Suncus murinus*) gezeigt werden, dass durch die Bindung von Cereulid an den Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>3</sub> der afferente Vagus Nerv stimuliert und ein Brechreiz ausgelöst wird (Agata *et al.*, 1995). Neben der Eigenschaft Erbrechen hervorzurufen können toxische Effekte von Cereulid auf die ionophore Wirkung des Giftes zurückgeführt werden. Diese ist ähnlich zu der des strukturverwandten Antibiotikums Valinomycin, das von *Streptomyces spec.* produziert wird. Aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit hat Cereulid neben einer hohen Bindungsaffinität für K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>- und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen einen stark hydrophoben Charakter (log K<sub>wo</sub> 5,96) und ist somit befähigt durch Zellmembranen zu diffundieren und den dort herrschenden elektrochemischen Gradienten zu zerstören (Mikkola *et al.*, 1999; Teplova *et al.*, 2006). Durch Versuche an humanen Zelllinien (HeLa, CaCo-2, Calu-3 und Paju) oder mit Eberspermien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Cereulid Mitochondrienmembranen depolarisiert, wodurch die aerobe ATP-Synthese unterbunden wird und letale Zellschädigungen entstehen können (Jaaskelainen *et al.*, 2003b; Teplova *et al.*, 2006). Außerdem wurde nachgewiesen, dass schon sehr geringe Konzentrationen von 5 ng/ml Cereulid ausreichend sind, um bei murinen Beta-Zellen durch mitochondriale Fehlfunktion Apoptose auszulösen. In diesem Zusammenhang liegt sogar der Verdacht vor, dass die regelmäßige Aufnahme von geringen Mengen an Cereulid, die beispielsweise in Reisgerichten oder Wurzelgemüse enthalten sein können, in Verbindung mit Diabetes Typ 1 stehen (Hoorstra *et al.*, 2013; Vangoitsenhoven *et al.*, 2014).

## 5. Das emetische Toxin Cereulid

Die Struktur des Toxins wurde mittels alkalischer Hydrolyse und NMR Spektroskopie aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass Cereulid mit der Molekülformel  $C_{57}H_{96}O_{18}N_6$  aus drei Wiederholungen der folgenden Aminosäuresequenz  $[D\text{-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val}]_3$  zusammengesetzt ist. Die  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Hydroxysäure-Monomere des Moleküls sind dabei alternierend durch sechs Amid- und sechs Esterbindungen zu einem zyklischen, sehr hydrophoben Dodekadepsipeptid verknüpft (Abb. 1) (Agata *et al.*, 1994; Suwan *et al.*, 1995; Teplova *et al.*, 2006). Aufgrund dieser molekularen Zusammensetzung und der cyclischen Struktur, welche durch Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonyl- und Aminogruppen stabilisiert wird, ist Cereulid extrem resistent gegen den Abbau durch Proteasen wie Pepsin, Trypsin oder Proteinase K (Andersson *et al.*, 1998; Melling & Capel, 1978; Shinagawa *et al.*, 1995). Darüber hinaus schädigt Hitzeeinwirkung von 121 °C über eine Dauer von 120 Minuten, bei pH 7 das Toxin ebenso wenig, wie ein saures oder basisches Milieu im pH-Bereich von 2 bis 11 (Melling *et al.*, 1976; Rajkovic *et al.*, 2008). Folglich kann Cereulid, sobald es in einem mit *B. cereus* kontaminierten Lebensmittel gebildet wurde und dort akkumuliert, weder durch Verarbeitungsschritte, wie Braten, Rösten oder Erhitzen inaktiviert, noch in der Magen-Darmpassage zerstört werden (Agata *et al.*, 2002). Neben der enormen Stabilität ist Cereulid mit einer Masse von 1152 Da ein verhältnismäßig kleines Peptid, das nicht einmal durch Filtration aus Nahrungsmitteln eliminiert werden kann (Pitchayawasin *et al.*, 2004). Seine molekularen Eigenschaften machen dieses Toxin somit zu einem sehr ernstzunehmenden Lebensmitteltoxin und es besteht dringend Bedarf mehr über den Toxinsyntheseprozess herauszufinden sowie verlässliche Detektionsmethoden zu etablieren.



**Abb. 1:** Struktur des hydrophoben Dodekadepsipeptids Cereulid, das aus einer dreifachen Wiederholung der Aminosäuresequenz  $[D\text{-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val}]_3$  aufgebaut ist (Agata *et al.*, 1994; Ehling-Schulz *et al.*, 2004a).

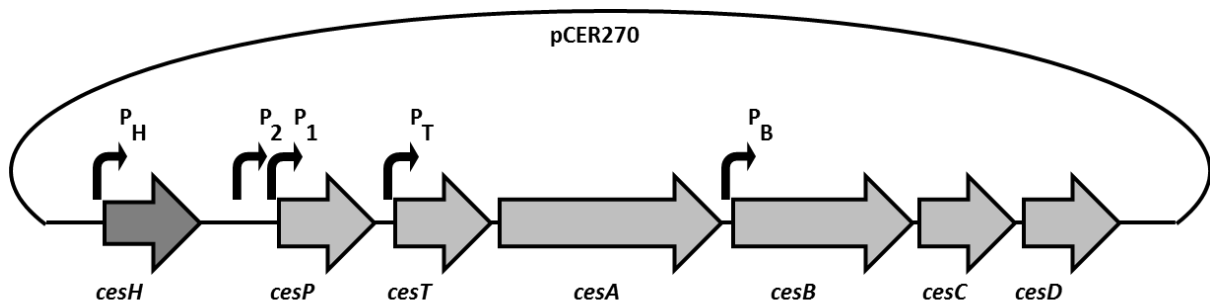
## 6. Das Cereulidsynthetase-Operon

Cereulid wird durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) gebildet, die durch das Cereulid Synthetase Gencluster codiert wird und deren Gene auf dem 270 kb großen Megaplasmid pCER270 lokalisiert sind (Abb. 2) (Ehling-Schulz *et al.*, 2005; Horwood *et al.*, 2004; Rasko *et al.*, 2007). Ähnlich wie Cereulid werden auch einige Biomoleküle anderer *Bacillus* Spezies durch NRPS hergestellt. So produzieren beispielsweise manche *Bacillus subtilis* Stämme die Antibiotika Surfactin und Bacitracin oder *Bacillus brevis* Stämme das Antibiotikum Gramicidin ebenfalls nichtribosomal durch spezielle Synthetaseenzymkomplexe (Bernlohr & Novelli, 1963; Bruner *et al.*, 2002; Kessler *et al.*, 2004). Allgemein sind NRPS aus sich wiederholenden Modulen aufgebaut, die selektiv Aminosäuren,  $\alpha$ -Hydroxysäuren oder Carboxylsäuremonomere zu einem Peptidprodukt aneinanderreihen (Marahiel *et al.*, 1997). Die NRPS-Module liegen oft colinear mit der Primärstruktur des zu synthetisierenden Peptids vor und können in katalytische Domänen unterteilt werden (von Döhren *et al.*, 1997). Diese Domänen existieren in allen bekannten NRPS und sind entscheidend für die Aktivierung der Monomere (Aminosäuren, Hydroxysäuren oder Carboxylsäuren) durch Adenylierung (A Domäne), den Weitertransport der wachsenden Peptidkette (PCP Domäne) und die Kondensation der Aminosäuren an der C Domäne, welche die Bildung von Amid- oder Esterbindungen und somit die Verlängerung der Molekülkette katalysiert. Eine weitere vierte essentielle Domäne ist die Thioesterase-Einheit (TE Domäne), welche sich im Endmodul befindet und an der die Peptidfreisetzung entweder durch Hydrolyse oder Makrozyklisierung erfolgt und die Peptidsynthese abgeschlossen wird (Strieker *et al.*, 2010).

In emetischen *B. cereus* bilden die sechs Cereulid NRPS Gene *cesPTABCD* gemeinsam ein 23 kb großes Operon, welches von einem Hauptpromotor ( $P_1$ ) transkribiert wird, der in Richtung des 5'Endes von *cesP* liegt. Das Gen *cesH* hingegen, das sich als erstes Gen am 5'Ende des *ces* Locus befindet, besitzt einen eigenen Promotor ( $P_H$ ). Es kodiert für eine putative Hydrolase, deren Funktion in Bezug auf die Cereulidsynthese noch nicht geklärt ist (Dommel *et al.*, 2010; Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Das Gen *cesP* codiert für eine 4'Phosphopantetheinyl Transferase. Generell sind diese Enzyme in Zusammenhang mit NRPS entscheidend für den Transfer von 4'Phosphopantetheine Resten eines Coenzym A auf einen konservierten Serin Rest der PCP Domäne, wodurch das Apo-Carrier Protein in seine aktive Holo-Form umgewandelt wird (Lambalot *et al.*, 1996). Von *cesT* wird eine mögliche Typ II Thioesterase gebildet, die eventuell eine Korrekturfunktion übernimmt, indem sie falsch eingebaute Monomere entfernt und die katalytischen Domänen der NRPS reaktiviert (Schwarzer *et al.*, 2002). Nachfolgend kommen die Strukturgene *cesA* und *cesB*. Sie codieren für die NRPS Module CesA (3391 Aminosäuren) und CesB (2681 Aminosäuren), welche dafür sorgen, dass die Monomere D-O-Leu und D-Ala durch CesA und L-O-Val und L-Val durch CesB nacheinander aktiviert und in die Peptidkette



eingebaut werden (Ehling-Schulz *et al.*, 2006; Magarvey *et al.*, 2006). Die Gene *cesC* und *cesD* sind die letzten zwei am 3'Ende des *ces* Operons und codieren für einen vermeintlichen Transporter der ABC-Familie. Bei *CesC* könnte es sich um ein ATP-Bindeprotein und bei *CesD* um ein Transmembranprotein handeln. Beide Proteine scheinen eine essentielle Rolle bei der Cereulidproduktion zu spielen (Lücking, 2009a).



**Abb. 2:** Skizze des Cereulidsynthetase-Genclusters auf dem Plasmid pCER270 mit allen identifizierten Promotorregionen (Dommel *et al.*, 2010). Die Gene des *ces* Lokus codieren für eine putative Hydrolase (*cesH*), eine 4'-Phosphopantetheinyl Transferase, eine Typ II Thioesterase (*cesT*), zwei NRPS Module (*cesA* und *cesB*) und einen ABC-Transporter (*cesC* und *cesD*). Die Gene *cesPTABCD* werden als polycistronisches Operon ausgehend vom gemeinsamen Promotor  $P_1$  transkribiert, während *cesH* einen eigenen Promoter ( $P_H$ ) besitzt. Die genaue Funktion der weiteren Promotoren  $P_2$ ,  $P_T$  und  $P_B$  ist noch unbekannt (Dommel *et al.*, 2010).

## 7. Regulation der *ces* Genexpression

Verschiedene emetische *B. cereus* Stämme können ein stark unterschiedliches Cereulidbildungspotential besitzen, obwohl ihre Gensequenzen des Synthetase Operons nur geringe molekulare Unterschiede aufweisen (Carlin *et al.*, 2006; Ehling-Schulz *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2013). Die Regulationsmechanismen, die diese stammspezifische Toxinproduktion oder *ces* Genexpression verursachen, sind bislang ungeklärt, aber es wurde bereits eine Reihe von Faktoren beschrieben, welche die Cereulidsynthese bei allen emetischen Stämmen beeinflussen. Neben extrinsischen Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert oder Nährstoffangebot, tragen auch genetische Parameter zur komplexen Regulation der Cereulidsynthetasegenexpression bei, welche eventuell auch die stammspezifischen Unterschiede in der Cereulidproduktion begründen könnten (Ceuppens *et al.*, 2011; Dommel *et al.*, 2011). Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Cereulidsynthese durch das Spo0A-AbrB Regulon kontrolliert wird und nicht durch den Hauptvirulenzregulator PlcR, der wiederum die Enterotoxinproduktion in *B. cereus* steuert. Der sogenannte Zustandsübergangsregulator AbrB scheint die Transkription der *ces* Gene in der frühen Wachstumsphase (Lag-

Phase) zu unterdrücken. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase wird dann durch den Sigmafaktor A ( $\sigma^A$ ) die Expression des Regulators Spo0A induziert, welcher wiederum die Transkription von *abrB* inhibiert. Dies hat zur Folge, dass die Konzentration an AbrB sinkt und der hemmende Effekt auf die Cereulidgenstranskription aufgehoben wird (Lücking *et al.*, 2009b). Der Konzentrationsabfall von AbrB wirkt sich gleichzeitig auch auf den alternativen Sigmafaktor H ( $\sigma^H$ ) aus. Dieser übernimmt besonders in der Anfangsphase der Sporulation eine bedeutende Rolle, da er die Transkription einiger sporulationsspezifischer Gene wie *spo0A* direkt aktiviert (Britton *et al.*, 2002). Der Sporulationsprozess selbst, der von Spo0A reguliert wird, scheint aber in vegetativen *B. cereus* Zellen nicht essentiell für die Cereulidsynthese zu sein (Dommel *et al.*, 2011; Lücking *et al.*, 2009b). Neben Spo0A und AbrB ist mit CodY noch ein weiterer globaler Regulator bekannt, der Einfluss auf die Produktion des emetischen Toxins nimmt, indem er die Transkription der NRPS Gene in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Nährstoffangebot negativ regulieren kann (Frenzel *et al.*, 2012).

## **8. Methoden zur Detektion emetischer *B. cereus* Stämme und Cereulid**

Es existiert bereits eine Reihe an molekularbasierten Nachweistechniken, die zur Identifikation emetischer *B. cereus* Stämme in Lebensmittelproben dienen. So können beispielsweise emetische *B. cereus* Stämme von nicht emetischen Stämmen oder anderen lebensmittelverderbenden Bakterien mittels einer PCR Methode mit spezifischen Primern für die *ces* Gene unterschieden werden (Ehling-Schulz *et al.*, 2004b). Ebenso war es möglich zur schnellen Identifikation von emetischen *B. cereus* in Lebensmitteln eine quantitative Real-Time PCR Methode zu etablieren (Fricker *et al.*, 2007). Durch die PCR basierten Methoden können emetische *B. cereus* zwar erkannt werden, doch der bloße Nachweis von Cereulidproduzenten reicht für eine Risikobewertung der Stämme nicht aus, da über das Toxinbildungspotential keine Aussage getroffen werden kann (Carlin *et al.*, 2006). Für den Nachweis von Cereulid wurden daher biologische und chemische Detektionstechniken entwickelt. Bei biologischen Cereulidetektionsmethoden macht man sich den cytotoxischen Effekt von Cereulid basierend auf der Depolarisierung der Mitochondrienmembran zunutze. Ein gebräuchlicher Nachweis ist ein Zellkulturtest mit humanen Kehlkopfkarcinomzellen (HEp-2), in dem die Zellschädigung durch Verwendung eines Tetrazoliumsalzes sichtbar gemacht und die in der Probe enthaltene Toxinmenge relativ gut gemessen werden kann (Finlay *et al.*, 1999; Hughes, 1988). Des Weiteren existieren Detektionstests mit Rattenleberzellen oder Eberspermien (Hoonstra *et al.*, 2003; Kawamura-Sato *et al.*, 2005). Alle diese zellbasierten Nachweismethoden sind arbeitsintensiv, liefern meist nur subjektive Ergebnisse, da sie auf der toxischen Aktivität von Cereulid

beruhen und ermöglichen keine direkte Toxinquantifikation. Zusätzlich könnten andere Inhaltsstoffe der zu analysierenden Probe das Ergebnis beeinflussen, was gerade in der Lebensmittelanalytik problematisch werden kann, da auch hier komplexe Texturen verlässlich untersucht werden müssen (Bauer *et al.*, 2010). Genauer sind quantitative chemische Tests, bei denen die Cereulidkonzentrationen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Ionenfallen-Massenspektrometer oder Singlequadrupol-Massenspektrometern analysiert, sowie anhand eines mitgeführten Standards quantifiziert werden können. Bei diesen Methoden wird oft Valinomycin als Referenzsubstanz zur Cereulidquantifizierung verwendet (Bauer *et al.*, 2010; Häggblom *et al.*, 2002; Jaaskelainen *et al.*, 2003a). Trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit eluiert Valinomycin aber nicht zeitgleich mit Cereulid, was die Messung ebenso verfälschen kann wie der Einfluss von Matrixeffekten, die durch die Beschaffenheit der Probe während der Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektroskopie (LC-MS/MS) auftreten können. Als vorteilhafter erwies sich daher die Verwendung eines  $^{13}\text{C}_6$ -markierten Cereulidstandards, der für die sogenannte Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA) und Quantifikation von Cereulid in Proben verschiedenster Herkunft erfolgreich eingesetzt werden kann (Bauer *et al.*, 2010). Die Sensitivität der Methode und die Probenaufarbeitung müssen jedoch für einen routinetauglichen Gebrauch optimiert werden. Hinzu kommt, dass die Herstellung des isotoopenmarkierten Standards relativ kostenintensiv ist und sich daher weniger für die Analyse von großen Probenmengen eignet.

## II. Material und Methoden

### 1. Mikrobiologische Techniken

#### 1.1 Bakterienstämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurde mit einem Set von insgesamt 77 emetischen *B. cereus* Stämmen gearbeitet, die mit Hilfe einer neu etablierten UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode (Kap. II. 2.1) nach ihrem Cereulidbildungspotential klassifiziert wurden. Ausschlaggebend für die Auswahl des Teststammsets waren unter anderem Toxingenprofile, molekulare Marker sowie die Herkunft des Isolats. Die Stämme wurden im Rahmen des FEI/AiF Projektes 16845N von Frau Professor Ehling-Schulz (Veterinärmedizinische Universität Wien) aus einer umfangreichen Sammlung von *B. cereus* Stämmen mittels einer Access Datenbankanwendung ausgewählt. Alle 77 Stämme sind im Anhang mit der verwendeten Nummerierung unter Angabe des Isolationsorts in Tab. A1 aufgeführt. In den nachfolgenden Tabellen sind weitere verwendete Bakterienstämme (Tab. 1) sowie Plasmide aufgelistet (Tab. 2).

**Tab. 1:** *B. cereus*, *E. coli* und *B. subtilis* Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Stamm	Beschreibung	Referenz
<b><i>B. cereus</i></b>		
F4810/72 (AH187)	emetischer Referenzstamm	Turnbull <i>et al.</i> 1979
ATCC 10987 (BC 143)	enterotoxischer Stamm	Ehling-Schulz <i>et al.</i> 2006a
F48ΔcesCD	<i>cesCD</i> Deletionsmutante von <i>B. cereus</i> F4810/72	Lücking 2009a
F48comCD	F48ΔcesCD komplementiert mit pAD/cesCD/Pces; (Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Spc <sup>r</sup> )	Lücking 2009a
F48ΔcesP/polar	<i>cesP</i> Deletionsmutante von <i>B. cereus</i> F4810/72 mit polarem Effekt auf den gesamten <i>ces</i> Locus (Spc <sup>r</sup> )	Lücking 2009a
F48pMMcesCD	<i>B. cereus</i> F4810/72 komplementiert mit dem Plasmid pMMcesCD zur Überexpression von <i>cesCD</i> (Tet <sup>r</sup> )	diese Arbeit
F48ΔcesCD/pMMcesCD	F48ΔcesCD komplementiert mit dem Plasmid pMMcesCD zur Überexpression von <i>cesCD</i> (Tet <sup>r</sup> )	diese Arbeit

Stamm	Beschreibung	Referenz
<b><i>B. subtilis</i></b>		
<i>B. subtilis</i> 168		Stammsammlung Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie TUM
<i>B. subtilis</i> 168/pMMcesCD	<i>B. subtilis</i> 168 komplementiert mit dem Plasmid pMMcesCD zur Überexpression von <i>cesCD</i> ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )	diese Arbeit
<b><i>E. coli</i></b>		
TOP10	Stamm für Klonierungen	Invitrogen
INV110	nicht methylierender Stamm für Klonierungen	Invitrogen

**Tab. 2:** Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMM1522	xyloseinduzierbarer Promotor ( <i>xylA</i> ) vor der multiplen Klonierungsstelle	MoBiTec GmbH
pMMcesCD	Plasmid für die <i>cesCD</i> Überexpression	diese Arbeit

## 1.2 Medien und Medienzusätze

In dieser Arbeit wurden abhängig von den Versuchszielen verschiedene Medien zur Bakterienkultivierung verwendet. Eingesetzt wurden unterschiedliche Vollmedien (LB, LB<sub>80</sub>, LBB, BHI, TSA) in flüssiger oder fester Form. Die Komponenten der Medien wurden in H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> gelöst, bei 121 °C für 17 Minuten autoklaviert und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur oder im Falle von Agarplatten bei 4 bis 8 °C gelagert.

### Luria Bertani (LB) -Medium

5 g/l NaCl  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l Pepton (aus Casein, enzymatisch verdaut)  
ggf. 15 g/l Agar

### LB<sub>80</sub>-Medium

5 g/l NaCl  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l Pepton (aus Casein, enzymatisch verdaut)  
0,2 % Glucose (Zugabe nach dem Autoklavieren)

**Brain Heart Infusion (BHI) -Medium**

37 g/l BHI (Merck, Millipore)

**TSA-Agarplatten**

15 g/l Trypton  
 5 g/l Sojapepton  
 5 g/l NaCl  
 15 g/l Agar

**Blutagarplatten (Oxoid)**

23 g/l Pepton  
 1 g/l Stärke  
 5 g/l NaCl  
 10 g/l Agar  
 Schafsblut

Neben den bereits aufgeführten gängigen Medien wurde unter anderem auch ein spezielles Sporulationsmedium (2 x SG-Medium) verwendet. Des Weiteren wurden die Medien LBB- und EPS für Biofilmversuche eingesetzt.

**LBB-Medium (Auger *et al.*, 2006)**

10 g/l Bactopepton  
 5 g/l NaCl  
 5 g/l Hefeextrakt

**EPS-Medium (Hsueh *et al.*, 2006)**

7 g/l  $K_2HPO_4$   
 3 g/l  $KH_2PO_4$   
 1,0 g/l Glucose  
 0,1 g/l NaCl  
 0,1 g/l  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
 0,125 g/l Hefeextrakt  
 0,01 g/l  $CaCl_2$   
 0,001 g/l  $FeSO_4$

**2 x SG-Medium**

10 g/l Pepton aus Casein  
 6 g/l Fleischextrakt  
 2 g/l KCl  
 0,5 g/l  $MgSO_4 \times 7 H_2O$

Alle Substanzen wurden gelöst und der pH-Wert auf 7 eingestellt. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe folgender sterilfiltrierter Substanzen:

1 ml 1 M  $Ca(NO_3)_2$   
 1 ml 1 M  $MgCl_2 \times 4 H_2O$   
 1 ml 1 mM  $FeSO_4$   
 2 ml 50 % (w/v) Glucose

**MOD-Medium**

Zusätzlich zu den Voll- und Spezialmedien wurde insbesondere zur Herstellung von  $^{13}\text{C}_6$ -Cereulid das MOD-Minimalmedium (Glatz & Goepfert, 1976; Rosenfeld *et al.*, 2005) eingesetzt. Für das MOD-Medium wurden alle benötigten Aminosäuren eingewogen und gemeinsam mit dem Grundmedium in 982 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,2 eingestellt und das Medium anschließend für 10 Minuten bei 110 °C autoklaviert. Die Spurenelemente wurden einzeln als 1000fach konzentrierte Stocklösungen angesetzt und bei 121 °C für 17 Minuten autoklaviert. Kurz vor Gebrauch wurde dem Medium 1 ml aus jeder Stocklösung eines Spurenelements zugegeben. Von der C-Quelle wurde eine 2 M Lösung hergestellt, sterilfiltriert und 10 ml davon dem Medium beigemischt.

**Aminosäuren**

2 g/l L-Glutaminsäure  
 0,39 g/l L-Glycin  
 0,91 g/l L-Valin  
 0,91 g/l L-Threonin  
 0,4 g/l L-Methionin  
 0,36 g/l L-Histidin  
 0,46 g/l L-Arginin  
 0,91 g/l L-Asparaginsäure  
 0,04 g/l L-Cystein  
 0,7 g/l L-Isoleucin  
 1,37 g/l L-Leucin  
 0,28 g/l L-Phenylalanin  
 1,18 g/l L-Lysin  
 0,66 g/l L-Serin  
 0,042 g/l L-Tyrosin

**Grundmedium**

6 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
 40 mg/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   
 1 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

**Spurenelemente**

675 µg/l  $\text{FeCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
 50 µg/l  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$   
 30 µg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
 85 µg/l  $\text{ZnCl}_2$   
 275 µg/l  $\text{CaCl}_2$   
 30 µg/l  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
 40 µg/l  $\text{CuSO}_4$   
 24 µg/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$

**C-Quelle**

20 mmol/l Glucose

### **Antibiotikazusätze**

Nach Bedarf wurden den Flüssigmedien die in Tab. 3 aufgeführten Antibiotikazusätze kurz vor Gebrauch zugegeben. Bei der Herstellung von Agarplatten wurde das gewünschte Antibiotikum vor dem Gießen der Platten in den autoklavierten, leicht abgekühlten Agar eingerührt.

**Tab. 3:** Eingesetzte Antibiotika und Angabe der verwendeten Endkonzentration

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>
Spectinomycin	100 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml
Erythromycin	5 µg/ml

### **1.3 Puffer**

Ein Puffer, der häufig zum Einsatz kam, war PBS-Puffer, der aus unten aufgeführten Komponenten bestand und verdünnt als 1 x PBS verwendet wurde.

#### **10 x PBS-Puffer**

80 g/l NaCl

2 g/l KCl

26,8 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

2,4 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,4 eingestellt, der Puffer anschließend autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### **1.4 Kultivierungsbedingungen**

Die verwendeten *B. cereus* Bakterienstämme wurden auf LB-Platten im Allgemeinen für 14 bis 16 Stunden bei 30 °C kultiviert. Zur Anzucht in Flüssigkultur wurde eine Vorkultur hergestellt, bei der 3 ml LB-Medium mit einer Kolonie von der Platte beimpft und unter Schütteln (120-150 rpm) bei 30 °C für 14 bis 16 Stunden inkubiert wurde. Mit 100 µl der 1:100 verdünnten Vorkultur wurden dann 100 ml LB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben beimpft und für 14 bis 24 Stunden bei 30 °C auf dem Schüttler (120-150 rpm) kultiviert. In bestimmten Versuchen wurde *B. cereus* bei 24 °C kultiviert anstatt bei 30 °C oder es wurde LB<sub>80</sub>-Medium an Stelle von LB-Medium verwendet. Diese Variationen sind bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen angemerkt.



### 1.5 Wachstumsanalysen

Das Wachstum von Kulturen in Flüssigmedien konnte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) verfolgt werden. Verwendet wurde hierzu ein GeneQuant pro Spektralphotometer (Biochrom). Sobald die Kulturen eine  $OD_{600}$  von 1,0 überschritten hatten, wurden die Proben vor der Messung im Verhältnis 1:20 verdünnt. Zellmorphologie und Sporulationsfortschritt von Bakterienkulturen wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Olympus) analysiert, an dem auch Lebendzellzahlbestimmungen mit einer Neubauerzählkammer durchgeführt wurden. Gesamtkeimzahlen wurden klassisch durch Ausplattieren von mindestens drei unterschiedlichen Verdünnungsstufen einer Probe bestimmt.

### 1.6 Wachstumsversuche mit externem Cereulid und *cesCD* Überexpressionsmutanten

Um zu untersuchen, ob externes Cereulid in Zusammenhang mit dem potentiellen Transporter CesCD einen Einfluss auf das Wachstum von F4810/72, F48 $\Delta$ cesCD und *B. subtilis* 168 sowie den entsprechenden *cesCD* Überexpressionsmutanten F48/pMMcesCD, F48 $\Delta$ cesCD/pMMcesCD und *B. subtilis* 168/pMMcesCD hat, wurden Vorkulturen (3 ml BHI-Medium, 30°C, 17 Stunden) dieser zu testenden Stämme hergestellt. Die Proben wurden auf die gleiche Zellkonzentration ( $OD_{600}$  2) eingestellt und davon anschließend 42  $\mu$ l mit 778,8  $\mu$ l BHI-Medium (pH 8,5), 10  $\mu$ l Ethanol oder Cereulid (in Ethanol gelöst, Endkonzentrationen von 5,5  $\mu$ g/ml bis 120  $\mu$ g/ml), 8,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O oder Xylose und 0,8  $\mu$ l Tetracyclin oder Ethanol in einem Eppendorftube gemischt. Aus den Tubes wurden pro Stamm 200  $\mu$ l in vier Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Kultivierung erfolgte unter kontinuierlichem Schütteln bei 30 °C im Bioscreen C Reader (Oy Growth curves Ab Ltd, Helsinki). Dokumentiert wurde das Wachstum mittels der dazugehörigen Software (Transcalatic Ltd, Helsinki).

### 1.7 Gewinnung und Aufreinigung von *B. cereus* Sporen

Um *B. cereus* zur Sporulation zu bringen, wurden die Kulturen in LB- oder 2 x SG-Medium bei 30 °C für 48 Stunden auf dem Schüttler (120 rpm) inkubiert, bis ca. 90 bis 98 % freie Sporen vorhanden waren. Zur Abtrennung der restlichen vegetativen Zellen in der Sporensuspension wurde eine Dichtegradientenzentrifugationstechnik mit Percoll (GE Healthcare) etabliert. Dafür wurden zuerst 15 ml Sporenkultur abzentrifugiert (4 000 rpm, 4 °C, 7 Minuten) und das entstandene Pellet in 10 ml 20 % SIP-Lösung resuspendiert. In einem Ultra-Clear-Zentrifugen-Röhrchen (Beckman Coulter) wurde dann ein Gradient erstellt, indem 2 ml SIP-Lösung in das Röhrchen pipettiert und darüber 3 ml 90 % SIP-Lösung geschichtet wurden. Auf diese zwei Schichten wurden dann die 10 ml 20 % SIP-Lösung mit den Sporen gegeben. Die Probe wurde anschließend in einer Ultrazentrifuge

(Beckman L7) für 30 Minuten (9 000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich drei Schichten: eine Bande mit vegetativen Zellen, eine Bande mit vegetativen Zellen sowie Endosporen und ein Pellet, das zu 99 % aus freien Sporen bestand. Die Reinheit der Sporen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop (Olympus) überprüft und das gewonnene Sporenpellet zweimal mit Sporenpuffer gewaschen, um Percollreste zu entfernen. Die Sporen wurden in Sporenpuffer bei 4 bis 8 °C gelagert.

**Sporenpuffer**

990 ml H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>

2 ml 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Alle Substanzen autoklavieren und vermischen.

Bei 4°C lagern.

**SIP-Lösung (isotonische Percollstocklösung)**

9 Teile Percoll

1 Teil NaCl (1,5 M)

**90 % SIP-Lösung**

9 Teile 100 % SIP-Lösung

1 Teil NaCl (0,15 M)

**20 % SIP-Lösung**

2 Teile 100 % SIP-Lösung

8 Teile NaCl (0,15 M)

**1.8 Hydrophobizitätsbestimmung von *B. cereus* Sporen (nach Rosenberg *et al.*, 1980)**

Zur Bestimmung der Hydrophobizität von *B. cereus* Sporen wurde die zu testende Sporensuspension mit Sporenpuffer auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt (OD<sub>A</sub>). Anschließend wurden 2 ml der Probe auf Raumtemperatur gebracht und mit 1 ml 99 % n-Hexadecan (Alfa Aesar) auf dem Vortexer für 5 Minuten gut vermischt. Es folgte eine Inkubation der Suspension für 10 Minuten bei Raumtemperatur, während der sich die Mischung in zwei Phasen auftrennte. Mit einer Pasteurpipette wurden dann ca. 1,5 ml von der unteren wässrigen Phase abgenommen und in ein frisches Eppendorftube überführt. Um sicherzustellen, dass sich keine Hexadecanreste mehr in der Probe befanden, wurde die Probe erneut für 10 Minuten inkubiert, bevor daraus 1 ml entnommen und photometrisch vermessen wurde (OD<sub>E</sub>). Anhand der Trübung der wässrigen Phase (OD<sub>E</sub>) und der eingestellten OD<sub>A</sub> zu Beginn des Versuchs wurde dann die Hydrophobizität der Sporen mit Hilfe folgender Formel berechnet:  $((OD_A - OD_E) / (OD_A)) \times 100 \%$

**1.9 Hitzeresistenztests mit *B. cereus* Sporen**

Zur Analyse der Hitzeresistenz von *B. cereus* Sporen wurden Sporensuspensionen ausgewählter Stämme mit Sporenpuffer auf eine OD<sub>600</sub> von 0,17 eingestellt. Von diesen Sporensuspensionen wurden jeweils 200 µl auf sieben Eppendorftubes verteilt. Sechs Proben wurden anschließend in den 90 °C heißen Heizblock gestellt. Von der Probe t<sub>0</sub>, welche nicht im Heizblock inkubiert wurde, wurde

eine Verdünnungsreihe hergestellt. Jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  wurden dann auf BHI-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach 10, 20, 30, 60, 120 und 180 Minuten wurde jeweils eine Probe aus dem Heizblock entnommen, auf Eis gekühlt und anschließend wie für Probe  $t_0$  beschrieben verdünnt und ausplattiert. Zur Auswertung wurden die Kolonien welche auf den Agarplatten gewachsen waren ausgezählt. Koloniezahlen, die zwischen 10 und 150 lagen wurden für die Berechnung der Gesamtkeimzahl pro ml miteinbezogen. Der dekadische Logarithmus der Gesamtkeimzahlen wurde in einem Diagramm gegen die Zeitpunkte  $t_0$ - $t_{180}$  aufgetragen. Im Diagramm wurde eine lineare Regressionsgerade erstellt und deren Steigung zur Berechnung des D-Werts verwendet ( $D = -1/\text{Steigung}$ ). Unter dem D-Wert versteht man die Zeit, die bei einer bestimmten Temperatur benötigt wird um 90 % der Versuchsorganismen abzutöten.

### 1.10 Nachweis der Biofilmbildung

Für den Nachweis der Biofilmbildung wurden von den zu untersuchenden *B. cereus* Stämmen Übernachtskulturen in EPS- oder LBB-Medium angesetzt (3 ml, 24 °C, 120 rpm). Die Vorkulturen wurden 1:100 verdünnt und davon je 200 µl in drei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde bei 24 °C für 24 oder 48 Stunden inkubiert und im Anschluss daran die  $OD_{600}$  der Kulturen in den Wells mit Hilfe des Wallac Victor<sup>3</sup> Photometers (Perkin Elmer) bestimmt. Nach der Messung wurde das Medium abgenommen und jedes Well zweimal mit 230 µl PBS-Puffer gewaschen, bevor die Platte für 20 Minuten bei 60°C getrocknet wurde. Zur Färbung des Biofilms wurden dann 200 µl 0,1 % Kristallviolett-Lösung in jedes Well pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde anschließend abgenommen und es folgten zwei Waschschriffe mit je 230 µl  $H_2O_{MQ}$ . Um das an den adherenden Zellen haftende Kristallviolett zu lösen wurden in jedes Well 200 µl einer Mischung aus 20 % Aceton und 80 % Ethanol pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die  $OD_{600}$  in den Wells dann erneut im Wallac Victor<sup>3</sup> Photometer gemessen, um die Menge des gebildeten Biofilms zu quantifizieren. Zusätzlich wurden auch Versuche unter Verwendung von extern zugegebenem Cereulid durchgeführt. Dazu wurde zu den Kulturen in den Wells zusätzlich 2 µl in Ethanol gelöstes Cereulid gegeben, sodass die Endkonzentration 5 bzw. 10 µM betrug. Um nachzuweisen, dass die Zugabe von Ethanol keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Kulturen hatte, wurden Ansätze mit äquivalenten Mengen an Ethanol als Kontrollen mitgeführt.

### 1.11 Cereulidextraktionsversuche von Oberflächen vegetativer Zellen und Sporen

Damit genauer analysiert werden konnte, ob Cereulid an der Außenseite von vegetativen Zellen und Sporen haftet, wurden die Zellen unterschiedlich lange mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelt. Für die Versuche mit den vegetativen Zellen wurde der *B. cereus* Stamm F4810/72 für ca. 14 Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 12 bis 14 in LB-Medium kultiviert (30°C, 120 rpm). Anschließend wurden 1 ml Aliquote aus der Kultur entnommen und die Zellen pelletiert (13 000 rpm, 4 Minuten). Sporen des Stammes F4810/72 wurden nach 48-stündiger Kultivierung in LB-Medium bei 30 °C, wie unter Kap. II. 1.7 beschrieben, gewonnen und für den Versuch auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt. Die Pellets der vegetativen Zellen wurden dann entweder mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ethanol (10, 30, 50, 70, 100 %) oder DMSO (50, 100 %) für 5 Minuten oder 10 Minuten oder 15 Stunden behandelt. Die Sporen wurden für 5 Minuten, 10 Minuten oder 15 Stunden mit 100 % Ethanol behandelt. Nach der Inkubation mit den Lösungsmitteln wurden die Zellen abzentrifugiert (13 000 rpm, 4 Minuten) und zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl ausplattiert. Die ethanolischen Extrakte wurden mit 1 ng <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulidstandard versetzt sowie mittels UPLC-MS/MS SIVA vermessen, um die Cereulidkonzentration zu bestimmen. DMSO-Extrakte wurden eingetrocknet (SpeedVac, Eppendorf), der Rückstand in Ethanol gelöst und die darin enthaltene Cereulidmenge ebenfalls anhand zugesetztem <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulidstandard und UPLC-MS/MS SIVA bestimmt.

Zur Cereulidextraktion von der Oberfläche vegetativer Zellen wurden zusätzlich spezielle magnetische Silika-Kugeln (Magnetic Silica Beads C18, MoBiTec) eingesetzt. Die Silika-Kugeln sind mit C18-Alkylgruppen ummantelt, folglich hydrophob und speziell für die Aufreinigung von kleinen, hydrophoben Peptiden geeignet. Für den Versuch wurde der Stamm F4810/72 für 14 Stunden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Aus der Kultur wurde 1 ml Probe abgenommen und abpelletiert (13 000 rpm, 4 Minuten). Anschließend wurden 50 µl Silika-Kugeln dreimal mit 500 µl PBS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und mit dem in 1 ml Adsorptionspuffer resuspendierten Zellpellet vermischt sowie für eine Stunde rotierend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Silika-Kugeln dann für 2 Minuten mittels eines Magneten (MagnaRack, Invitrogen) von der Zellsuspension getrennt und die Silika-Kugeln, nach Abnahme der Zellsuspension zweimal mit 250 µl Adsorptionspuffer gewaschen. Die Silika-Kugeln wurden dann in 1 ml Ethanol resuspendiert, das daran haftende Cereulid extrahiert und die Zellsuspension zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl ausplattiert.

#### Adsorptionspuffer

0,01 % TFA in 200 mM NaCl

### 1.12 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation (nach Reddy *et al.*, 2007)

Zur einfachen Zellseparation und der Gewinnung eines Zellpellets sowie des Kulturüberstandes wurde eine 1 ml Probe aus einer Kultur, die 14 Stunden bei 30 °C in LB-Medium inkubiert wurde, für 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert. Das Zellpellet und der abgenommene Kulturüberstand wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur differentiellen Zentrifugation wurden die Zellen einer 1 ml Kulturprobe zunächst durch viermalige Behandlung mit der French-Press (800 psi) aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde dann bei 3 000 g für 7 Minuten zentrifugiert, um intakte Zellen und größere Zellbruchstücke zu pelletieren. Die im Überstand verbleibenden Zellwandfragmente wurden anschließend durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 20 000 g pelletiert, um eine Zellwandfraktion zu erhalten. Durch eine weitere Behandlung des Überstandes bei 100 000 g für 1 Stunde in der Ultrazentrifuge (4 °C) konnte ein Membranpellet gewonnen werden. Der resultierende Überstand wurde als cytosolische Fraktion definiert.

### 1.13 Herstellung von Cereulid und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulid

Die Produktion von Cereulid und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulid wurde nach dem Protokoll von Bauer *et al.* 2010 durchgeführt. Cereulid wurde gewonnen, indem 100 ml LB-Medium mit 0,2 % Glucose in einem 500 ml Schikanekolben mit 100 µl einer 100fach verdünnten Übernachtskultur von *B. cereus* F4810/72 angeimpft und inkubiert (24 Stunden, 120 rpm, 24 °C) wurde. Für die Produktion von <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulid wurde das normalerweise im MOD-Medium enthaltene L-Valin mit <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-L-Valin (Cambridge Isotope Laboratories) substituiert, eine C-Quelle wurde nicht zugemischt. Mit 365 µl einer 10fach verdünnten Übernachtskultur (3 ml MOD-Medium, 24 °C) von *B. cereus* F4810/72 wurden 365 ml MOD-Medium in einem 2 L Kolben beimpft und inkubiert (48 Stunden, 120 rpm, 24 °C). Nach der Inkubation wurden die Kulturen autoklaviert (15 Minuten, 121 °C), abzentrifugiert (9500 rpm, 10 Minuten) und die Pellets nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -20 °C gelagert. Zur Cereulid- oder <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulidextraktion wurden die entsprechenden Pellets aufgetaut, mit 10 ml Ethanol (>99,8 %, Baker) resuspendiert und für 15 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Das Extrakt wurde abzentrifugiert (9500 rpm, 10 Minuten) und filtriert (0,2 µm, PTFE-Filter, Phenomenex). Im Anschluss daran wurde das gewonnene Extrakt am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik der TUM mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (40 °C) auf ca. 15 ml Rohextrakt eingengt und über SPE-Kartuschen (Strata C18-E, 60 ml) aufgereinigt. Nach einer weiteren Aufkonzentration im Rotationsverdampfer erfolgte ein Aufreinigungsschritt mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Die Struktur der aufgereinigten Cereulidmoleküle wurde mittels

Massenspektrometrie (MS) und Kernresonanzspektroskopie (NMR) überprüft. Die Reinheit des isolierten Cereulids wurde durch H-qNMR bestimmt (Pauli *et al.*, 2005).

## 2. Cereulidmessmethoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Messmethoden wurden in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik der Technischen Universität München erarbeitet und auch dort ausgeführt.

### 2.1 Cereuliddetektion mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS

Für die Einteilung der 77 verschiedenen *B. cereus* Stämme (Tab. A1) hinsichtlich ihres Cereulidbildungsvermögens wurden 100 ml LB<sub>80</sub>-Medium mit 100 µl 1:100 verdünnter Vorkultur angeimpft und inkubiert (24 Stunden, 24 °C, 120 rpm). Nach der Bestimmung ihrer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) wurden die Kulturen autoklaviert (15 Minuten, 121 °C), anschließend abzentrifugiert (7800 g, 12 Minuten) und die Pellets bei -20 °C gelagert. Zur Cereulidextraktion wurden die Pellets aufgetaut, in 10 ml Ethanol (>99,8 %, Baker) resuspendiert und auf dem Schüttler extrahiert (15 Stunden, Raumtemperatur). Das Extrakt wurde abzentrifugiert (7800 g, 12 Minuten) und filtriert (0,2 µm, PTFE-Filter Phenomenex), um restliche Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurden Aliquote (3 µl) der Extrakte mittels des UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF Massenspektrometers, das mit einer HSS T3 C18 Säule (2 x 150 mm, 1,8 µm,) ausgestattet war, nach dem Protokoll von Stark *et al.*, 2013 vermessen. Als Resultat aus den Messungen ergab sich für jedes Extrakt ein Chromatogramm, das bei Vorhandensein von Cereulid einen charakteristischen Peak bei 5,5 Minuten aufwies. Alle Extrakte wurden insgesamt jeweils fünfmal injiziert. Für den Vergleich der Toxinmengen in den Extrakten der Stämme wurden dann die Mittelwerte der Peakflächen des Natrium-Adduktes von Cereulid aus den fünf Messungen errechnet und durch die OD<sub>600</sub> der jeweiligen Kultur geteilt, um Schwankungen des Cereulidgehalts in den Proben zu berücksichtigen, die möglicherweise durch unterschiedliches Wachstumsverhalten verursacht wurden .

### 2.2 Cereulidquantifikation mittels HPLC oder UPLC-MS/MS SIVA

Zur Quantifikation von Cereulidmengen in Kulturen wurde 1 ml Kultur abgenommen, abzentrifugiert (13 000 rpm, 4 Minuten) und ggf. bei -20 °C gelagert. Zur Cereulidextraktion wurde das Zellpellet in 1 ml Ethanol (>99,8 %, Baker) resuspendiert, mit 1 bis 5 ng <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulidstandard versetzt und rotierend inkubiert (15 Stunden, Raumtemperatur). Im Anschluss folgte ein Zentrifugationsschritt

(13 000 rpm, 4 Minuten). Zur Entfernung von restlichen Zellpartikeln wurde der ethanolische Extrakt gefiltert (0,22 µm, PTFE-Filter, Berrytec) und je nach enthaltener Cereulidmenge 1:100 oder 1:1000 verdünnt. Die Analyse der Cereulidmengen erfolgte dann mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High oder Ultra Performance Liquid Chromatography, HPLC oder UPLC), Massenspektroskopie (MS) und einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) (Bauer *et al.*, 2010; Stark *et al.*, 2013). Die HPLC-MS/MS Quantifikationsmethode wurde nur für die Validierung der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode verwendet. Hier wurde mit dem Agilent 1200 HPLC System gearbeitet, das mit einer Synergi Fusion-RP, 2 x 150 mm, 4 µm, Säule (Phenomenex) ausgestattet und an ein API 4000 QTrap LC-MS/MS gekoppelt war. Zusätzliche Angaben zu Kalibriergerade, dem HPLC Gradient, den verwendeten Lösungsmitteln etc. sind in Stark *et al.*, 2013 aufgeführt.

Alle weiteren Cereulidquantifikationen wurden mittels UPLC-MS/MS durchgeführt. Hier wurden 1 µl Aliquote der Proben für die Messung in das Xevo TQ-S ACQUITY Massenspektrometer (Waters) injiziert, das mit einer UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) Säule ausgestattet war. Gearbeitet wurde mit einer Flussrate von 1,0 ml/min bei einer Temperatur von 50 °C. Für die Chromatographie wurde folgender Gradient genutzt: ausgehend von einer Mischung (90/10, v/v) aus Methanol und 10 mMol Ammoniumformiat wurde der Methanolgehalt innerhalb von 0,5 Minuten auf 100 % erhöht, 0,3 Minuten konstant gehalten und dann innerhalb von 0,1 Minuten auf 90 % reduziert. Darauf folgte eine 0,09-minütige Re-Equilibration zurück zu den Ausgangsbedingungen. Die Messungen wurden unter Verwendung einer positiven Elektrospray-Ionisation (ESI) und einem quantitativen Kalibriermodus mit folgenden Ionenquellenparametern durchgeführt : +3,5 kV Kapillarspannung, 30 V Probenkonus, 30 V Quellenoffset, 150 °C Quelltemperatur, 600 °C Desolvatisierungstemperatur, 150 l/h Gaskonus, 1000 l/h Desolvatisierungsgas, 0,15 ml/min Kollisionsgasfluss und 6,5 bar Verneblergasfluss. Die Kalibrierung des TQ-S im Bereich von m/z 40 bis 1963 wurde mit Phosphorsäure (0,1 % in Acetonitril) durchgeführt. Zur Steuerung der UPLC und des Xevo TQ-S Systems wurde die MassLynx<sup>TM</sup> 4.1 SCN 813 Software (Waters) verwendet. Die Datenverarbeitung sowie -analyse erfolgten mit der TargetLynx Software (Waters). Mittels multiplen Reaktionsmonitorings (MRM) wurden die Ammoniumaddukte von Cereulid (Qualifier: m/z 1170,7→172,2; 1170,7→357,2; Quantifier: m/z 1170,7→314,2) und <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulid (m/z 1176,7→173,2; 1176,7→316,3 ; 1176,7→358,3) für die Quantifizierung verwendet und anhand der in Klammern angegebenen Massenübergänge analysiert. ESI<sup>-</sup> Massen- und Ionenproduktspektren wurden mittels direktem Infusionsfluss unter Verwendung von IntelliStart (Waters) erhalten. Die MS/MS Parameter wurden auf jede individuelle Komponente abgestimmt, um die Zerstückelung der molekularen [M-H]<sup>-</sup> -Ionen in spezifischen Produktionen nach der Kollision mit Argon zu detektieren. Für die Auswertung der Messdaten wurde eine Eichgerade erstellt. Hierfür wurde verschiedene Konzentrationen an Cereulid (10; 7,5; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 ng/ml) mit 1 ng <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulidstandard in

1 ml Ethanol (>99,8 %, Baker) vereinigt und anschließend dreimal vermessen. Die Kalibrationskurve wurde dann aus den Mittelwerten der Messung mittels linearer Regression erstellt. Hierfür wurde die integrierte Peakfläche des Analyten durch die des Standards dividiert und gegen den Quotient der Konzentrationen des Analyten und des internen Standards aufgetragen. Die Gleichung, welche für die zu quantifizierenden Massenübergänge (1170,7→357,2 und 1176,7→358,3) erhalten wurde lautete:  $y = 2,001x - 0,003$  (Cereulid/[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Cereulid, R=0,9996).

### **2.3 Biologische Cereulidquantifikation mittels HEp-2 Cytotoxizitätstest (nach Finlay *et al.*, 1999)**

Die von verschiedenen *B. cereus* Stämmen produzierte Cereulidmenge wurde mit dem HEp-2 Cytotoxizitätstest bestimmt. Hierfür wurde von zu testenden Kulturen 1 ml abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Vor der Verwendung im Zellkulturtest wurden die zu testenden Proben autoklaviert (15 Minuten, 121 °C), um hitzelabile Toxine zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben seriell in einer 96-Well-Platte mit Eagle Minimum Essential Medium (Biochrom) verdünnt. Zum Medium wurden zuvor noch 1 % Natrium-Pyruvat, 1 % fötales Kälberseum, 0,4 % Penicillin-Streptomycin (Roche) zugegeben. Zur besseren Lösung des Cereulids wurden zusätzlich noch 2 % Ethanol supplementiert. Jede Probe wurde im Parallelansatz pipettiert, um eine Doppelbestimmung durchführen zu können. Als interner Standard diente aufgereinigtes Cereulid (50 ng/ml, in Ethanol gelöst), welches ebenfalls seriell verdünnt wurde. Die HEp-2 Zellen wurden auf eine Konzentration von  $6 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 150 µl in jedes Well der Platte gegeben und der gesamte Ansatz inkubiert (48 Stunden, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Zur Auswertung wurden 100 µl Medium aus jedem Well entfernt und dafür 10 µl des Tetrazoliums Salzes WST-1 (Roche) zugegeben. WST-1 wird von metabolisch aktiven Zellen zu dunkelrotem Formazan umgesetzt und dient somit nach Inkubation (1 Stunde, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit den Zellen als Indikator für deren Vitalität. Die Farbintensität in den einzelnen Wells wurde photometrisch mit dem Tecanreader (Messfilter = 450 nm, Referenzfilter = 620 nm) gemessen. Für die Auswertung wurde zunächst eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, anhand der für jede Probe die Verdünnung bestimmt wurde, die zum 50 %igen Verlust der Mitochondrienaktivität führte (50 % inhibitory values). Mit Hilfe dieses Werts und der aufgestellten Cereulid-Standard-Eichkurve konnten dann die Toxinkonzentrationen in den Proben bestimmt werden (Dietrich *et al.*, 1999).



### 3. Phospholipidanalyse (nach Bligh & Dyer, 1959)

Zum Nachweis von Phospholipiden in Zellfraktionen (siehe Kap. II. 1.11) wurden die Pellets in 3 ml einer 1:2 Mischung aus Chloroform und Methanol gelöst, für eine Minute gevortext und auf dem Horizontalschüttler (250 Umdrehungen/Minute) für 10 Minuten gemischt. Anschließend wurden 1,8 ml Wasser und 1 ml Chloroform zugegeben. Diese Mischung wurde für eine Minute gevortext und abzentrifugiert (4 000 rpm, 10 Minuten), wobei sich zwei Phasen bildeten. Die untere der beiden Phasen wurde unter N<sub>2</sub>-Luftstrom eingetrocknet und dann in 200 µl einer 1:9 Mischung aus Chloroform und Methanol gelöst. Anschließend wurden Aliquote (2 µl) der Extrakte mittels hochauflösender Massenspektrometrie (UPLC-ESI-TOF MS) an einem Synapt G2 HDMS-Massenspektrometer (Waters), das mit einem Acquity UPLC Core System (Waters) bestehend aus binärem Solvent Manager, Sample Manager und Säulenofen gekoppelt war, vermessen. Gearbeitet wurde mit einer Flussrate von 0,3 ml/Minuten bei 55 °C. Für die Chromatographie wurde folgender Gradient verwendet: ausgehend von einer Mischung (50/50, v/v) aus wässrigem MeCN (50 % in H<sub>2</sub>O) und Isopropanol wurde der Isopropanolgehalt innerhalb von 10 Minuten auf 99 % erhöht, für 3 Minuten konstant gehalten, innerhalb von 0,5 Minuten auf 50 % reduziert und dann für 1,5 Minuten konstant auf 50 % gehalten. Die Messzeit für die MS<sup>e</sup> Methode (zentriert) wurde auf 0,1 Sekunden gesetzt. Die Analysen wurden im negativen ESI- und hochauflösendem Modus durchgeführt, bei dem folgende Parameter verwendet wurden: -2 kV Kapillarspannung, 20 V Probenkonus, 30 V Quellenspannung, 120 °C Quellentemperatur, 400 °C Desolvatisierungstemperatur, 0 l/h Gaskonus, 6,5 bar Verneblergasfluss und 800 l/h Desolvatisierungsgas. Die Datenverarbeitung und akkurate Massenbestimmung erfolgte mittels des Programms MassLynx 4.1 SCN 9.16 (Waters). Alle Daten wurden mittels dem Pentapeptid Leucin-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, *m/z* 554.2615, [M-H]<sup>-</sup>), von dem 1 ng/µl in einer Mischung aus MeCN und 1 % HCO<sub>2</sub>H (1/1, v/v) gelöst war, um die Lock-Masse korrigiert. Die Messzeit für die Lock-Masse wurde auf 0,3 Sekunden und ein Intervall auf 15 Sekunden gesetzt. Drei Messungen wurden mit einem Massenfenster von ± 0,3 Da gemittelt. Die Kalibrierung der Synapt G2-S im Bereich von *m/z* 50 bis 1300 wurde unter Verwendung einer Lösung aus Natriumformiat (5 mmol/L) und 2-Propanol/H<sub>2</sub>O (9/1, v/v) durchgeführt. Das UPLC und das Synapt G2-S System wurden mit der MassLynx<sup>TM</sup> Software (Waters) gesteuert. Die Kollisionsenergie wurde während der MS<sup>e</sup> Messung von 20 auf 40 eV erhöht. Im Chromatogramm, das aus der Messung resultierte, wurden die Flächen der Peaks von sechs Markerphospholipiden bestimmt: drei Phosphoethanolamine (*m/z*: 690,5074 (berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>8</sub>P; 690,5074; Δ + 1,2 ppm); *m/z*: 662,4751 (berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>8</sub>P; 662,4751; Δ + 0,6 ppm); *m/z*: 676,4971 (berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>8</sub>P; 676,4971; Δ + 0,2 ppm)) und zwei Phosphatidylglycerole (*m/z*: 721,5020 (berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>74</sub>NO<sub>10</sub>P; 721,5020; Δ - 0,1 ppm);

m/z: 693,4707 (berechnet für (C<sub>36</sub>H<sub>70</sub>NO<sub>10</sub>P); 693,4707; Δ + 0,2 ppm) wobei von (C<sub>36</sub>H<sub>70</sub>NO<sub>10</sub>P) zwei Isomere für die Auswertung herangezogen wurden (Haque & Russell, 2004).

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1 Standard Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die PCR verwendet. Für eine Standard PCR-Reaktion wurden in 50 µl Ansätzen folgende Komponenten gemischt:

10 µl GoTaq Flexi Puffer (Promega)  
 5 µl 2mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 µl 200 µM dNTP  
 1 µl 50 pmol Vorwärtsprimer  
 1 µl 50 pmol Rückwärtsprimer  
 1 µl Template DNA  
 0,1 µl GoTaq Flexi-Polymerase (5 Units/µl) (Promega)

---

Σ 50 µl

Die PCR-Reaktionen wurden in Thermocyclern (Primus 25 advanced Peqlab) mit einem Programm durchgeführt, dessen Elongationszeit jeweils auf die Größe des zu amplifizierenden Fragments angepasst wurde.

#### **Programm:**

Initiale Denaturierung	2 Minuten, 95 °C	
Denaturierung	3 Minuten, 95 °C	} 30 Zyklen
Annealing	(Primer Annealingtemperatur), 30 Sekunden	
Elongation	1 Minute/kb, 72 °C	
Finale Elongation	2 Minuten, 72 °C	
Abkühlen	8 °C ∞	

## 4.2 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab.4 unter Angabe der Sequenz, Schmelztemperatur und Fragmentlänge verzeichnet.

**Tab. 4:** In dieser Arbeit verwendete Oligonucleotide

Bezeichnung	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge (bp)	Schmelztemperatur
16SA1	<i>rrn</i>	GGAGGAAGGTGGGGATGACG <sup>A1</sup>	241	63 °C
16SA2	<i>rrn</i>	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG <sup>A2</sup>		63 °C
16s rDNA_rev	<i>rrn</i>	CGGCTACCTTGTTACGAC <sup>B1</sup>	1200	68 °C
16s rDNA_for	<i>rrn</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTC <sup>B2</sup>		68 °C
cesB_for	<i>cesB</i>	TTAGATGGTATTCTTCACTTGGC <sup>C1</sup>	308	57 °C
cesB_rev	<i>cesB</i>	TTGATACAAATCGCATTCTTATAACC <sup>C2</sup>		57 °C
cesC_RT for	<i>cesC</i>	ACCGAGCACAGGTCTTGAT	294	57 °C
cesC_RT rev	<i>cesC</i>	AGTCGCAACCAGATTCTCC		57 °C
cesD_RT for	<i>cesD</i>	CAACGATTAAGTTGGTGACAAG	294	57 °C
cesD_RT rev	<i>cesD</i>	TAAGCTTTCTGTATTGCAACC		57 °C
cesCD-spe-for	<i>cesCD</i>	GTGACTAGTATGATTAATAAGAGG	1689	51 °C
cesCD-sph-rev	<i>cesCD</i>	TTAGCATGCTTATAAGTTCAAATCTTAT		51 °C

<sup>A1/A2</sup> (Martineau *et al.*, 1996), <sup>B1/B2</sup> (Liesack & Stackebrandt, 1992), <sup>C1/C2</sup> (Dommel, 2008)

## 4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um einzelne DNA-Fragmente aufzureinigen oder deren Größe zu bestimmen, wurde eine Gelelektrophorese in 2 %igen Agarosegelen durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden 6 µl der DNA-Proben mit 1 µl 6 x DNA-Auftragspuffer (Fermentas) vermischt und dann für 45 Minuten bei 100 V in einer mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (Peqlab) aufgetrennt. Zur Bestimmung von DNA-Fragmentgröße und Menge wurden entweder der Marker GeneRuler 100 bp (Fermentas) oder der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Zur Detektion der Banden wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter einer UV-Licht-Kamera (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) analysiert und

fotografiert. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel-Extraktionskits (Omega Bio-Tek) nach Herstellerangaben isoliert. Dabei wurde die Agarose geschmolzen und anschließend an eine Silika-Matrix gebunden, dort gewaschen und nach der Reinigung eluiert.

#### **10 x TAE-Puffer (pH 8,3)**

2 M Tris Base  
5,71 % (v/v) Eisessig (Sigma-Aldrich)  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (pH 8)

#### **Agarosegele**

2 % (w/v) Agarose in  
1 x TAE-Puffer aufgekocht

### **4.4 Herstellung und Transformation kompetente *E. coli* Zellen**

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur beimpft und auf dem Schüttler (120 rpm, 37 °C) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,35 bis maximal 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (2700 g, 4 °C, 10 Minuten), in 40 ml kalter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>- und 20 ml kalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen und dann in 1 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Aliquote zu je 100 µl wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert (Sambrook & Russell, 2001). Zur Transformation wurden 100 µl kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 bis 100 ng Plasmid DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden im Heizblock und eine sofortige Kühlung auf Eis. Zu den Zellen wurden dann 800 µl vorgewärmtes LB-Medium gegeben und der Ansatz bei 37 °C für 1 Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation auf einer LB-Platte mit adäquatem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### **4.5 Herstellung und Transformation kompetenter *B. cereus* Zellen**

Zur Herstellung von elektrokompenten *B. cereus* Zellen wurde 1 ml Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium mit 2% (w/v) Glycin überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Nach dem Abzentrifugieren (3500 g, 4 °C, 10 Minuten) wurden die Zellen in jeweils 15 ml kaltem H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> mit 2,5 %, 5 % und 10 % Glycerin gewaschen, bevor sie in 10 % glycerinhaltigem H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> aufgenommen wurden. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden 100 µl elektrokompente Zellen mit 1 µg entsalzter Plasmid DNA in einer Küvette (0,4 cm) vermischt und im Gene Pulser (BioRad) behandelt (2,0 kV, 25 µF, 200 Ω, 4,6-4,8 ms). Nach der Elektroporation wurden die Zellen in LB-Medium resuspendiert

und für 2 Stunden bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert, bevor sie auf einer Agarplatte mit dem notwendigen Selektivantibiotikum ausplattiert und bei 30 °C über Nacht inkubiert wurden.

#### 4.6 Herstellung von *B. cereus* und *B. subtilis cesCD* Überexpressionsmutanten

Die Gensequenz *cesCD*, welche beide putativen Transportergene umfasst, wurde mit den Primern *cesCD-spe-for* und *cesCD-sph-rev* (Tab. 4) mittels PCR amplifiziert, um das gewünschte Insert zu gewinnen. Die Länge der Fragmente (295 bp) sowie deren Amplifikation wurde anhand einer Gelelektrophorese kontrolliert. Nach Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem E.Z.N.A. Gel-Extraktionskit (Omega Bio-Tek) wurde die DNA-Konzentration mittels des NanoDrop (Pqlab) bestimmt. Anschließend wurden 200 ng DNA mit jeweils 1-2 Units der Restriktionsenzyme *SpeI* und *SphI* (Fermentas) im dafür geeigneten Puffer (Fermentas) bei 37 °C für 1,5 Stunden verdaut. Der Vektor *pMM1522* (MoBiTec), bei dem es sich um einen xyloseinduzierbaren Expressionsvektor handelt, wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SphI* (Fermentas) verdaut und zur Prävention einer Religation mit 2 Units alkalischer Phosphatase (SAP, Fermentas) für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. 1 µg des verdauten DNA-Inserts wurden nach einem erneuten Aufreinigungsschritt mit 3 Units T4-Ligase (Roche) hinter den xyloseinduzierbaren Promotor *xylA* des Vektors *pMM1522* (1 µg) über Nacht bei 20 °C ligiert. Der komplette Ligationsansatz wurde anschließend zur Amplifikation in kompetente *E. coli* TOP10 Zellen über Hitzeschock transformiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz bei *B. cereus* wurde das hergestellte Konstrukt (*pMMcesCD*) zunächst in den nicht methylierenden *E. coli* Stamm INV110 transformiert, reisoliert und anschließend mittels Elektroporation in die kompetenten *B. cereus* Stämme F4810/72 und F48Δ*cesCD* sowie *B. subtilis* 168 eingebracht. Die erfolgreiche Generierung der Mutanten F48/*pMMcesCD*, F48Δ*cesCD*/*pMMcesCD* und 186/*pMMcesCD* wurde durch das Wachstum der Zellen auf tetracylinhaltigen Selektionsagarplatten, PCR und einer DNA-Sequenzierung (GATC Biotech AG) der in den Vektor eingebauten Gensequenz überprüft.

#### 4.7 RNA-Isolation

Zur Probengewinnung wurden von *B. cereus* Kulturen zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten 1 bis 2 ml Kulturproben entnommen, pelletiert (13 000 rpm, 4 Minuten, 4 °C), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Für die RNA-Extraktion wurden die Pellets in 1 ml TRIzol (Invitrogen) resuspendiert und in einem Schraubröhrchen mit Zirconia/Silika-Perlen (0,1 mm Carl Roth GmbH) mittels Ribolyser (Hybaid) aufgeschlossen. Zu dem Zelllysat wurden 200 µl Chloroform geben. Nach Inkubation (3 Minuten bei Raumtemperatur) und Zentrifugation (12 000 g, 15 Minuten,

4 °C) der Probe wurde die wässrige Phase mit der RNA in ein neues 1,5 ml Eppendorftube überführt. Die RNA wurde mit 500 µl eiskaltem 100 %igem Isopropanol vermischt, zur Fällung inkubiert (10 Minuten, Raumtemperatur) und abzentrifugiert (12 000 g, 15 Minuten, 4 °C). Das RNA Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (7 500 g, 5 Minuten, 4 °C), an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der isolierten RNA wurde spektralphotometrisch (NanoDrop, Peqlab) bestimmt. Zum Abbau der sich noch in der Probe befindlichen DNA wurden 5 µg RNA mit 10 µl RQ1 DNase, 10 µl des dazugehörigen Puffers (Promega) und DEPC-Wasser (ad 100 µl) vermischt und inkubiert (45 Minuten, 37 °C). Zur Proteinentfernung wurden 100 µl Chloroform zugegeben und alles zentrifugiert (15 000 g, 15 Minuten, 4°C). Die RNA wurde mit 11 µl Natriumacetat (pH 5,2) und 1 ml 100 % Ethanol gefällt, dann zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet anschließend an der Luft getrocknet. Von der in DEPC-Wasser gelösten RNA wurde die Reinheit und Konzentration bestimmt (NanoDrop, Peqlab). Zusätzlich wurde der Erfolg des DNA-Verdaus mittels PCR-Protokoll und 16S rDNA Primern (Tab. 4) und RNA als Template überprüft.

#### 4.8 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden 100 ng RNA (10 µl) mit 4 µl QScript cDNA SuperMix (Quanta) und 6 µl DEPC-Wasser vermischt. Die Transkription erfolgte anschließend bei folgendem Programm im Thermocycler: 5 Minuten bei 25 °C, 30 Minuten bei 42 °C, 5 Minuten bei 85 °C, finaler Schritt zum Abkühlen bei 8 °C. Die cDNA-Proben wurden mit DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

#### 4.9 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die für die qPCR verwendeten Primer sind in Tab. 4 aufgelistet. Um die Primereffizienzen der Oligonukleotide zu bestimmen, wurden mit den Primern zunächst eine Standard PCR (siehe Kap. II. 4.1) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit DEPC-Wasser von  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  verdünnt und als Template für die qPCR eingesetzt. Aus den erhaltenen Ct-Werten wurde eine Standardkurve erstellt und die Primereffizienz (E) mit der Formel:  $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$  (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001) berechnet. Primer mit einer hohen Linearität ( $r > 0,990$ ), und mit einer Primereffizienz zwischen 1,6 und 2,1 wurden für die qPCR eingesetzt. Für die Transkriptionsanalyse mittels qPCR wurden Reaktionsansätze mit 1 µl cDNA (äquivalent zu 10 ng RNA), 2 pmol der genspezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 12,5 µl SYBR Green Mix (Abgene) und 10,5 µl  $H_2O_{MQ}$  in speziellen Reaktionsgefäßen (Peqlab) zusammengemischt. Die Real-Time-PCR-Reaktion wurde im SmartCycler von Cepheid

(Peqlab) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Polymeraseaktivierung bei 95 °C für 15 Minuten, 40 Amplifikationszyklen mit jeweils 95 °C für 30 Sekunden, Annealingtemperatur für 30 Sekunden und finale Elongation bei 72 °C für 45 Sekunden. Die Spezifität der Reaktion wurde mittels Schmelzkurvenanalyse verifiziert.

Die Datenauswertung zur Bestimmung der relevanten Expressionsraten der untersuchten Zielgene erfolgte mittels REST (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl, 2001). Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurde hier das Referenzgen *rrn* (16S rDNA) verwendet und als Kalibrator dienen die Ct-Werte des Stammes *B. cereus* F4810/72 bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0.

#### **4.10 Transkriptomanalyse mittels Next-Generation Sequencing (NGS)**

Für den Vergleich des Transkriptoms des emetischen Wildtypstamms F4810/72 mit dem der Mutante F48ΔcesCD wurde die NGS Methode angewendet. Das gesamte Transkriptom wurde revers in einzelsträngige cDNA transkribiert. Die cDNA wurde sequenziert, gegen das Referenzgenom von F4810/72 gemappt und die Countzahl der DNA-Fragmente für die Gene ermittelt. Über den Vergleich der Counts pro Gen beider Stämme konnten die Unterschiede in der Genexpression bestimmt werden.

#### **RNA und rRNA Verdau**

Zur Vorbereitung der Proben für die NGS Transkriptomsequenzierung wurde zunächst RNA aus dem Probenmaterial isoliert (siehe Kap. II 6.7). Das dabei gewonnene luftgetrocknete RNA-Pellet wurde in 80 µl nukleasefreiem Wasser (Ambion Life Technologies) gelöst. Die noch in der Probe vorhandene DNA wurde mittels RQ1 DNase Kit (Promega) entfernt. Dazu wurden 80 µl RNA Probe mit 10 µl DNase und 10 µl Puffer für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Probe mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen). Die RNA wurde am Ende mit 35 µl nukleasefreiem Wasser (Ambion Life Technologies) eluiert und die RNA Qualität mit Hilfe des Agilent RNA 600 Nano Kits und dem Agilent Bioanalyzer (beides Agilent Technologies) überprüft. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop (Peqlab) bestimmt. Zur Entfernung der rRNA wurden 5 µg RNA mit dem MICROBExpress Kit (Ambion Life Technologies) nach Herstellerprotokoll behandelt und der Erfolg der rRNA-Eliminierung erneut mit dem Agilent RNA 600 Nano Kits sowie dem Agilent Bioanalyzer kontrolliert. Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit dem Qubit RNA Kit unter Verwendung des Qubit Fluorometers (beides Invitrogen) bestimmt.

---

### **Librarygenerierung und Sequenzierung**

Von der gereinigten RNA wurden 300 ng in einem Volumen von 50 µl nukleasefreiem Wasser (Ambion Life Technologies) durch eine Behandlung im Covaris E220 (Covaris) fragmentiert. Dazu wurden bei einer gewünschten Fragmentlänge von 150 bp folgende Einstellungen gewählt: 180 Sekunden, 10 % Duty Cycle, 175 Watt, 200 Cycles/Burst. Die fragmentierte RNA wurde anschließend nach folgendem Ansatz dephosphoryliert:

50 µl 300 ng fragmentierte RNA  
6,5 µl Antarktische Phosphatase Puffer 10 x (New England BioLabs)  
3,0 µl Antarktische Phosphatase (New England BioLabs)  
3,3 µl SuperaseIN (Ambion)  
2,7 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O (Ambion)

---

Σ 65 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten. Anschließend wurde die Probe mittels miRNeasy Mini Kits (Quiagen) aufgereinigt und mit 35,5 µl RNase-freiem Wasser (Quiagen) eluiert. Die aufgereinigte RNA wurde anschließend mit folgenden Komponenten phosphoryliert:

35,5 µl Probe  
5 µl T4 Polynukleotidkinase Puffer 10 x (New England BioLabs)  
5 µl ATP (10 mM)  
2 µl T4 Polynukleotidkinase (New England BioLabs)  
2,5 µl SuperaseIN (Ambion)

---

Σ 50 µl

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits (Quiagen) aufgereinigt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser (Quiagen) eluiert. Nach der Konzentrationsbestimmung (Qubit RNA Kit, Qubit Fluorometer) wurden 100 ng RNA eingetrocknet (SpeedVac, Eppendorf) und dann in 5 µl RNase-freiem Wasser (Quiagen) gelöst. Anschließend wurden die Herstellerangaben im TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit Protokoll (Illumina, Februar 2013) befolgt, um die für die Sequenzierungsreaktion nötigen Adaptoren an die RNA-Fragmente zu ligieren, die Fragmente revers zu transkribieren und mittels PCR zu amplifizieren. Die daraus resultierenden cDNA-Konstrukte wurden mit 6 % Novex TBE Polyacrylamidgelen (Invitrogen) aufgetrennt (45 Minuten, 145 V). Zur Detektion der cDNA wurde das Gel für 2 Minuten mit 5 µl SYBR Gold in 50 ml TBE Puffer (beides Invitrogen) gefärbt und die Fragmente mit einer Größe von 200 bis 300 bp auf dem UV-Tisch ausgeschnitten.



Die Gelstückchen wurden zerkleinert, die cDNA mit 300 µl Wasser über Nacht aus dem Gel eluiert und nach Reinigung über 0,22 µm Spin-X Cellulose-Acetat-Filter (Costar) und einer Ethanol-fällung in 10 µl Tris-HCL-Puffer (pH 8,5; Quiagen) resuspendiert. Die Qualität und Konzentration der cDNA wurde mit dem Agilent High Sensitivity DNA Kit sowie dem Agilent Bioanalyzer (beides Agilent Technologies) und dem Qubit Fluorometer (Invitrogen) gemessen. Anschließend wurde die cDNA mit 0,1 N NaOH denaturiert und mit HT1- Puffer (Illumina) auf eine Konzentration von 10 pM gebracht. Für die Sequenzierung im MiSeq Sequenziergerät (Illumina) wurde nach den Angaben im MiSeq Benutzerhandbuch gearbeitet und das MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina) verwendet.

### **Transkriptomdatenauswertung**

Die Sequenzdaten wurden im FASTQ-Format mit Hilfe des FTP-Programms FileZilla auf den Galaxy Server (<https://usegalaxy.org/>) geladen. Die FASTQ-Formate wurden zunächst mit dem Programm FASTQ-Groomer bearbeitet und anschließend mit Bowtie für Illumina auf das Genom von *B. cereus* F4810/72 (NCBI, FASTA-Format) gemappt. Die so verarbeiteten Sequenzen wurden mit den „SAM Tools“ in SAM-Dateien konvertiert, gefiltert und anschließend in BAM-Formate umgewandelt. Die BAM-Formate konnten vom Server geladen werden und mit dem Programm „Picard Tools“ in BAM.BAI Dateien umgeschrieben werden. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit der Artemis-Software (Rutherford *et al.*, 2000). Zur weiteren Datenverarbeitung wurde das Statistikprogramm R mit den Paketen edgeR und limma verwendet (Robinson *et al.*, 2010). Als Parameter für die Detektion von signifikant unterschiedlich regulierten Genen diente zum einen der LogFC-Wert ( $\log_2$ -fold change) der entweder  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  sein musste und zum anderen der p-Wert der höchstens 0,05 betragen durfte.

## 5. Proteinbiochemische Methoden

### 5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli 1970)

Die SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht verwendet. Sie wurde mit 8 %igen, 0,75 mm Polyacrylamidgelen durchgeführt. Für das Trenngel und das Sammelgel wurden folgende Komponenten gemischt:

#### Trenngel

7,25 ml H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>  
 3,75 ml Tris (1,5M)  
 4,00 ml Acrylamid  
 150 µl SDS (10 %)  
 75 µl APS (10 %)  
 7,5 µl TEMED

#### Sammelgel

4,34 ml H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>  
 1,75 ml Tris (0,5 M)  
 0,91 ml Acrylamid  
 64 µl SDS (10 %)  
 35 µ APS (10 %)  
 7 µl TEMED

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit Lämmli-puffer im Verhältnis 1:1 vermischt und für 5 bis 10 Minuten aufgeköcht. Als Marker dienten 8 µl des Spectra Multicolor High Range Protein Ladder 40 bis 300 kDa (Thermo). Die Gele wurden in einer mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Kammer eingespannt und beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte erst bei 100 V, bis die Proben in das Trenngel gelaufen waren und wurde dann ca. 2 Stunden bei 120 V fortgeführt.

#### Lämmli-puffer

62,5 mM TrisHCl (pH 8)  
 1 g Glycin  
 2 ml 10 % SDS  
 500 µl β-Mercaptoethanol  
 Spatelspitze Bromphenolblau

#### 10 x SDS Laufpuffer

250 mM Tris  
 1,92 M Glycin  
 1 % (w/v) SDS  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>  
 pH 8,3

### 5.2 Western Blot

Für den Immunoblot wurden die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine mit dem Semi-Dry-System (PHASE GmbH) vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore) übertragen. Die Membran und Filterpapiere (Whatman, Roth) wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und nach Aktivierung der Membran (15 Sekunden Methanol, 2 Minuten H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>) in 1 x Blotpuffer äquilibriert. Das SDS-Gel wurde ebenfalls in 1 x Blotpuffer inkubiert und anschließend mit der Membran und dem Filterpapier luftblasenfrei wie folgt auf die Kathode geschichtet: 3 Filterpapiere, SDS-Gel, PVDF-Membran, drei Filterpapiere. Der Proteintransfer erfolgte für 2 Stunden bei 120 mA (max. 20 V) in Richtung der Anode.

**10 x Blotpuffer**

500 mM Tris  
 390 mM Glycin  
 0,039 % (w/v) SDS  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>

**1 x Blotpuffer**

100 ml 10 x Blotpuffer  
 200 ml Methanol  
 700 ml H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>

Für den immunologischen Nachweis der geblotteten Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Milchpulverlösung abgesättigt. Im Anschluss daran folgte die Behandlung mit dem Primärantikörper (Tab. 5), der in Milchpulverlösung verdünnt mit der Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nicht gebundener Antikörper wurde durch fünfmal 5-minütige Waschschriffe mit TBS-Puffer entfernt. Danach wurde ein peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (Tab. 5) in Milchpulverlösung verdünnt und mit der Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut fünfmal 5 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend nach Herstelleranleitung mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Thermo) behandelt. Die Signale wurden mittels eines Röntgenfilms (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche) detektiert.

**1 x TBS-Puffer**

50 mM Tris  
 150 mM NaCl  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>  
 pH 7,5

**Milchpulverlösung**

5 g Milchpulver (Blotting Grade, Roth)  
 100 ml TBS Puffer

**5.3 Slot Blot**

Zur Detektion von CesB wurde neben dem Western Blot Verfahren auch das Slot Blot Verfahren angewendet. Dafür wurden die Proteinkonzentrationen der zu testenden Proben mit Hilfe des Roti-Quant Kits (Carl Roth) nach Herstellerprotokoll quantifiziert und vorbereitend mit Puffer verdünnt. Überstandproben wurden mit Puffer B auf eine Gesamtproteinkonzentration von 25 µg/µl in einem Probenvolumen von 100 µl verdünnt. Membranpellets wurden mit Puffer B plus 2 % SDS und 8 M Urea 1:100 verdünnt und für 10 Minuten bei 100 °C inkubiert. Nach der Probenvorbereitung wurde eine PVDF-Membran (Merck Millipore) nach Herstelleranweisung aktiviert und anschließend auf fünf Filterpapiere, die zuvor in 1 x TBS-Puffer eingeweicht wurden, in die Slot-Blot Apparatur (Merck Millipore) gelegt. An das Gerät wurde ein Vakuum angelegt und nach Absaugen des überschüssigen TBS-Puffers je 100 µl Probe in die vorgesehenen Vertiefungen geladen und mit Unterdruck auf die Membran gezogen. Es folgte noch ein Waschschriffe mit 100 µl 1 x TBS-Puffer, bevor die Membran für 2 Stunden in 5 % Milchpulverlösung geblockt wurde. Nach diesem

Inkubationsschritt wurde die Membran mit in Milchpulver verdünnten monoklonalen Maus-anti-CesB5-6-3-4 Primärantikörper (Tab. 5) bei 4 °C über Nacht behandelt. Am nächsten Tag folgten vier Waschschriffe mit 30 ml 1 x TBS-Puffer für je 5 Minuten, bevor der Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper (Tab. 5) für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran in Milchpulver inkubiert wurde. Nach vier weiteren Waschschriffen mit 30 ml 1 x TBS-Puffer für 5 Minuten folgte die Behandlung zur Signalentwicklung. Wurde der mit alkalischer Phosphatase-konjugierte Sekundärantikörper verwendet, so wurde die Membran mit 10 ml Substratlösung für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Reaktions-Stopplösung gewaschen. Wurde der peroxidase-gekoppelte Antikörper gewählt, erfolgte die Proteindetektion mittels des West Pico Kits (Thermo) und Röntgenfilmentwicklung. Alternativ zur Röntgenfilmentwicklung konnte das Chemilumineszenzsignal auf der Membran auch mit Hilfe einer ICCD-Kamera (Hamamatsu Photonics) analysiert werden. Die Intensität der Chemilumineszenz wurde dafür mittels der dazugehörigen Analysesoftware Living Image 2.10 (Caliper Life Sciences) erfasst und konnte durch Detektion der Intensität von Lichtpunkten in einer genau definierten Region (ROI) auch quantifiziert werden.

### **Puffer B**

50 mM Tris  
2 mM Na<sub>2</sub> EDTA,  
1 mM Pefabloc (Merck)

### **Stammlösungen (Stabilität bei +4 °C ein Jahr)**

0,5 g NBT (Roth) in  
10 ml 70 % Dimethylformamid (Sigma)  
und  
0,5 g BICP-p-Toluidinsalz (Roth)  
in 10 ml 100 % Dimethylformamid (Sigma)

### **Substratlösung**

66 ml NBT-Stammlösung mit 10 ml  
Inkubationspuffer gut vermischen und 33 µl  
BCIP-Stammlösung hinzugeben

### **Inkubationspuffer für alkalische Phosphatase**

100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM TRIS (pH 9,5)

### **Reaktions-Stopplösung**

PBS-Puffer mit 20 mM EDTA

**Tab. 5:** Auflistung der Primär- und Sekundärantikörper, welche für die Immunoblots verwendeten wurden

<b>Primär-/ Sekundärantikörper</b>	<b>Information/ eingesetzte Verdünnung</b>	<b>Funktion</b>
Primärantikörper	polyklonal, <b>Kaninchen-anti-AtpB</b> (AS05 085-10; Agrisera) Verdünnung: 1: 5 000	Proteinladekontrolle
Sekundärantikörper	<b>alkalische Phosphatase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen IgG</b> (Cat. No. 111-055-003; Dianova) Verdünnung: 1: 3 000	Signalentwicklung mittels BICP/NBT- Lösung
Primärantikörper	monoklonaler <b>Maus-anti-CesB5-6-3-4</b> (G. Lücking <i>et al.</i> , 2015) Verdünnung: 1:2 000	Detektiert das erste CesB-Modul der Cereulid Synthetase bestehend aus Adenylation, Ketoreduktase und der Peptidyl Carrier Protein Domäne der CesB NRPS (Ehling-Schulz <i>et al.</i> , 2006).
Sekundärantikörper	Meerrettichperoxidase ( <b>HRP</b> )- <b>konjugierter Ziege-anti-Maus IgG</b> (Cat. No. 115-035-062; Dianova) Verdünnung: 1: 20 000	Signalentwicklung mittels SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Thermo)
Sekundärantikörper	<b>alkalische Phosphatase-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG</b> (Cat. No. 115-055-003; Dianova) Verdünnung: 1:10 000	Signalentwicklung mittels BICP/NBT- Lösung

## 6. Transelektronenmikroskopie (TEM)

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in Zusammenarbeit mit Dr. Mareike Hartmann (Lehrstuhl für Biochemie und Institut für Biologische Grenzflächen, Prof. A. Ulrich) oder an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) mit freundlicher Unterstützung von Heidemarie Gensler (Lehrstuhl für Systematische Zoologie, Prof. G. Haszprunar) durchgeführt. Um die Cereulidsynthetase in emetischen *B. cereus* Zellen zu visualisieren und zu lokalisieren, wurden Ultradünnschnitte von Bakterienpräparaten hergestellt, die nach der Behandlung mit dem CesB Antikörper sowie dem mit 10 nm Goldpartikeln konjugierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, Sigma-Aldrich, G7652) im Elektronenmikroskop untersucht werden konnten.

### **6.1 TEM-Probenpräparation (nach M. Hartmann, 2012)**

Für die Probenpräparation wurden der emetische Referenzstamm F4810/72 und der Stamm ATCC 10987 (BC 143) als Negativkontrolle verwendet. Zur Kultivierung wurden 100 ml LB-Medium in einem 500 ml Schikanekolben mit 100 µl einer 1:100 vorverdünnten Vorkultur (3 ml LB-Medium) angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 7 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde von jeder Kultur jeweils 1 ml abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 6 000 rpm zentrifugiert. Mit den daraus erhaltenen Pellets wurden dann nacheinander folgende Inkubationsschritte durchgeführt:

#### **Fixierung in Glutaraldehyd**

Jedes Pellet wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze vorsichtig in 1 ml 2 %iger Glutaraldehyd-Lösung verrührt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 3 000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 0,15 M SPB verrührt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Über Nacht wurde das Pellet in 1 %  $OsO_4$  bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dehydriert und kontrastiert. Dafür wurden die Zellpellets 2 x für 5 Minuten in 0,15 M SPB, dann 2 x für 5 Minuten in 30 % Ethanol inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 2 Stunden in 3 % Uranylacetat (gelöst in 30 % EtOH) und dann jeweils zwei Inkubationsschritte für 10 Minuten einmal in 50 % und einmal in 70 % Ethanol. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen immer für 5 Minuten bei 3 000 rpm abzentrifugiert und dann wieder mit der Pipettenspitze verrührt. Bis auf den Dehydrierungsschritt in 70 % Ethanol, der bei 4 °C durchgeführt wurde, erfolgten alle anderen Inkubationen bei Raumtemperatur.

#### **Einbettung in Harz**

Vor der Einbettung in das Harz (LR-White, medium grade, Polysciences) wurden die dehydrierten und kontrastierten Zellen zweimal für 10 Minuten, bei 4 °C in 100 % Ethanol gewaschen, um noch vorhandenes Restwasser zu entfernen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, dann erst für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 1 ml LR-White und anschließend über Nacht bei 4 °C in 1 ml frischem LR-White inkubiert. Am nächsten Tag wurde das LR-White gewechselt und die Zellen anschließend noch mal für 1 Stunde bei Raumtemperatur in LR-White eingelagert. Im Anschluss an die Einbettung in das Harz wurde das behandelte Zellmaterial abzentrifugiert und in pyramidenförmige BEEM-Kapseln (Plano GmbH) überführt. Diese wurden mit LR-White bis zum Rand der Kapsel überschichtet und der Deckel zusätzlich mit einem Parafilm umwickelt. Die Proben wurden dann im Thermoblock 24 Stunden bei 60 °C auspolymerisiert.

### **Herstellung von Ultradünnschnitten und immunologische Behandlung**

Nach dem Auskühlen konnten die Blöcke mit einem Skalpell aus der Plastikkapsel gelöst und im Dunkeln aufbewahrt werden. Zur Herstellung von Ultradünnschnitten wurden die Blöcke zuerst mit einem Glasmesser pyramidal getrimmt. Anschließend wurden mit einem Diamantmesser (35° Neigung) Ultradünnschnitte mit einer Dicke von maximal 65 nm hergestellt. Diese wurden auf Kupfer-Netzchen (Formvar-Film auf 200 mesh-Netzchen, Plano GmbH) aufgefischt und getrocknet. Für die immunologische Färbung wurden Tropfen der jeweiligen Lösung auf Parafilm aufgetropft. Die Netzchen wurden mit der Schnittseite nach unten darauf gelegt und inkubiert. Zuerst wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 2 %ige fettfreie BSA-Lösung für 15 Minuten blockiert. Der Primärantikörper wurde in PBS mit 0,5 %iger fettfreier BSA-Lösung verdünnt (1:50; 1:100; 1:1000 oder 1:20 000) und zur Inkubation mit den Schnitten auf den Netzen auf Parafilm aufgetropft. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer mit Parafilm abgedichteten Schale in der der Boden mit feuchtem Küchentuch ausgelegt war, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Anschließend wurden die Präparate fünfmal mit Puffer B gewaschen und mit dem sekundären goldgekoppelten Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG, 10 nm Goldpartikel, Sigma-Aldrich), der zuvor 1:50 in PBS mit 0,5 % iger fettfreier BSA-Lösung verdünnt wurde, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten fünfmaliges Waschen mit PBS, dreimal waschen mit Wasser und eine Kontrastierung mit einer 1 % iger wässrigen Uranylacetatlösung für 3 Minuten. Weiterführend wurden die Dünnschnitte dreimal mit Wasser gewaschen, die Netzchen getrocknet und dunkel aufbewahrt. Für die Kontrastierung ohne Immunogold-Färbung wurden die Netzchen für 15 Minuten mit einer 3 %igen Uranylacetatlösung in 30 % Ethanol inkubiert und anschließend fünfmal mit Wasser gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschrufen wurde das Wasser von den Netzchen immer vorsichtig mit Filterpapier vom Rand her abgesaugt. Die Dünnschnitte wurden im Anschluss bei 80 bis 120 kV unter dem Elektronenmikroskop betrachtet. Hierfür wurde am KIT mit einem FEI Tecnai G<sup>2</sup> F20 X-TWIN Transelektronenmikroskop gearbeitet, an der LMU mit dem Model FEI Morgagni.

## 6.2 Puffer und Lösungen für die Elektronenmikroskopie

### Natriumphosphatpuffer (SPB, 0,3 M)

8,52 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
auf 200 ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  auffüllen  
8,28 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
auf 200 ml mit bidest. $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen  
im Verhältnis 1:3 mischen, sodass ein pH = 7,2  
bei 25 °C erreicht wird

### Natriumphosphatpuffer (SPB, 0,15 M)

0,3 M Puffer 1:1 mit bidest. $\text{H}_2\text{O}$  verdünnen

### Puffer B

1 l 1 x PBS  
500  $\mu\text{l}$  Tween 20

### Puffer B + 0,5 M NaCl

0,36 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
1,37 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
3,13 g NaCl  
500  $\mu\text{l}$  Tween 20  
mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  auf 1 L auffüllen, pH = 7,2

### 0,5 % und 2 % fettfreies BSA

0,05 oder 0,2 g BSA (Sigma Aldrich A3803)  
in 10 ml 1 x PBS lösen

### Glutaraldehyd-Lösung (2 %)

10 ml Glutaraldehyd, EM Grade 8 %  
(Polysciences)  
20 ml 0,3 M SPB  
10 ml bidest. $\text{H}_2\text{O}$

### Osmiumtetroxid-Lösung (1 %)

2 ml  $\text{OsO}_4$ -Lösung 2% (Polysciences)  
2 ml 0,3 M SPB

### Uranylacetat-Lösung (in EtOH, 3 %)

0,6 g Uranylacetat 98 % (Polysciences)  
in 200 ml 30 % EtOH lösen und sterilfiltrieren,  
vor Gebrauch zentrifugieren und lichtgeschützt  
aufbewahren

### Uranylacetat-Lösung (wässrig, 1 %)

0,2 g Uranylacetat  
in 20 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  lösen und sterilfiltrieren, vor  
Gebrauch zentrifugieren und lichtgeschützt  
aufbewahren!



---

## III. Ergebnisse

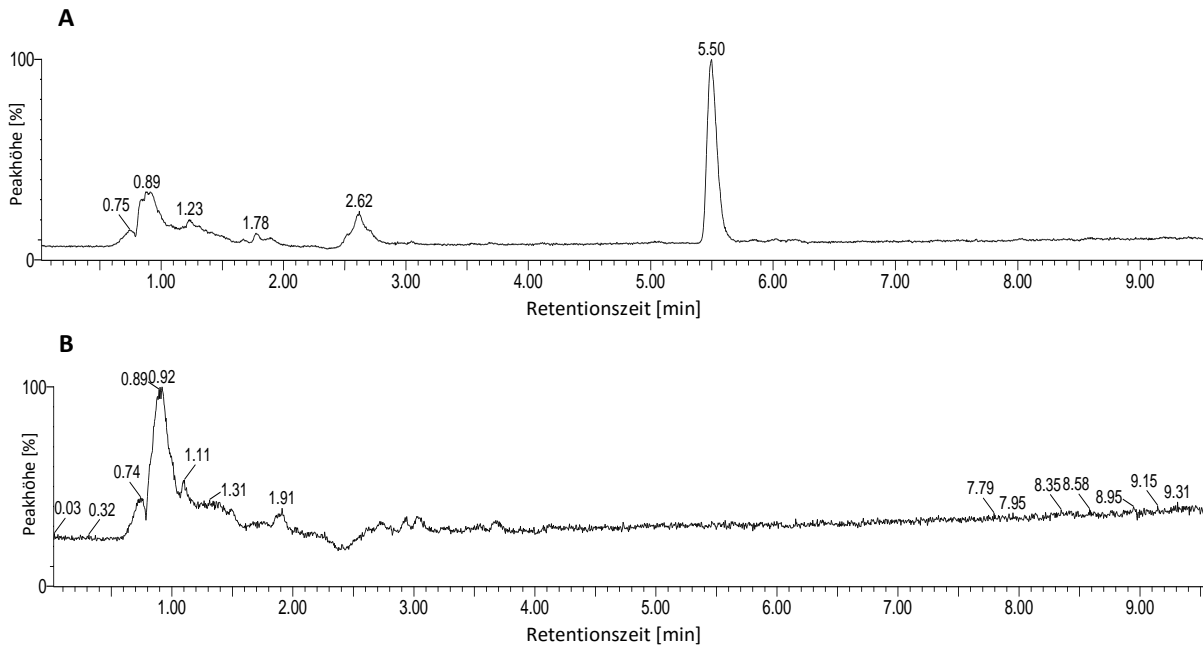
### Teil I

#### 1. Phänotypische Charakterisierung eines emetischen *B. cereus* Stammsets hinsichtlich Cereulidproduktion, Sporeneigenschaften und Biofilmbildung

##### 1.1 Etablierung einer Hochdurchsatz-Cereuliddetektionsmethode

Zur Quantifizierung von Cereulid existieren bereits einige Messmethoden (siehe Kap. I. 8.), alle Techniken erfordern jedoch einen relativ hohen Zeit- oder Materialaufwand. Zur Analyse einer großen Anzahl von *B. cereus* Stämmen war es daher zunächst erforderlich eine unkomplizierte Cereuliddetektionsmethode zu etablieren, die es ermöglicht in relativ kurzer Zeit viele unterschiedliche *B. cereus* Stämme nach ihrem Cereulidproduktionsvermögen zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür in enger Kooperation mit dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der Technischen Universität München eine sensitive UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Cereuliddetektionsmethode entwickelt, die eine schnell durchführbare, semiquantitative Detektion von Cereulid mit einem hohen Probendurchsatz ermöglicht.

Um die Proben für die UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode vorzubereiten, wurden die zu untersuchenden *B. cereus* Stämme zunächst für 24 Stunden in 100 ml LB<sub>80</sub>-Medium bei 24 °C kultiviert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Kulturen bestimmt, bevor diese für einen besseren Zellaufschluss autoklaviert und dann abzentrifugiert wurden. Aus den gewonnenen Zellpellets wurden ethanolische Extrakte hergestellt und mittels der neu etablierten UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode (siehe Kap. II. 2.1) vermessen. Als Ergebnis erhielt man für jeden Stamm ein spezifisches Chromatogramm. Zwei Beispiele hierfür sind in Abb. 3 gezeigt. Ein Chromatogramm resultierte aus der Analyse des Extraktes von *B. cereus* Stamm 64 und wies einen definierten Cereulid-Natrium-Addukt-Peak bei einer Retentionszeit von 5,5 Minuten auf (Abb. 3 A). Die Vermessung des Extraktes von Stamm 70 ergab ein Chromatogramm ohne Cereulidpeak (Abb. 3 B). Zur semiquantitativen Bestimmung der im Extrakt enthaltenen Cereulidmenge wurde die Fläche der im Chromatogramm ersichtlichen Cereulidpeaks integriert und unter Berücksichtigung der OD<sub>600</sub> für einen Vergleich des Toxinproduktionsvermögens der einzelnen Stämme herangezogen.

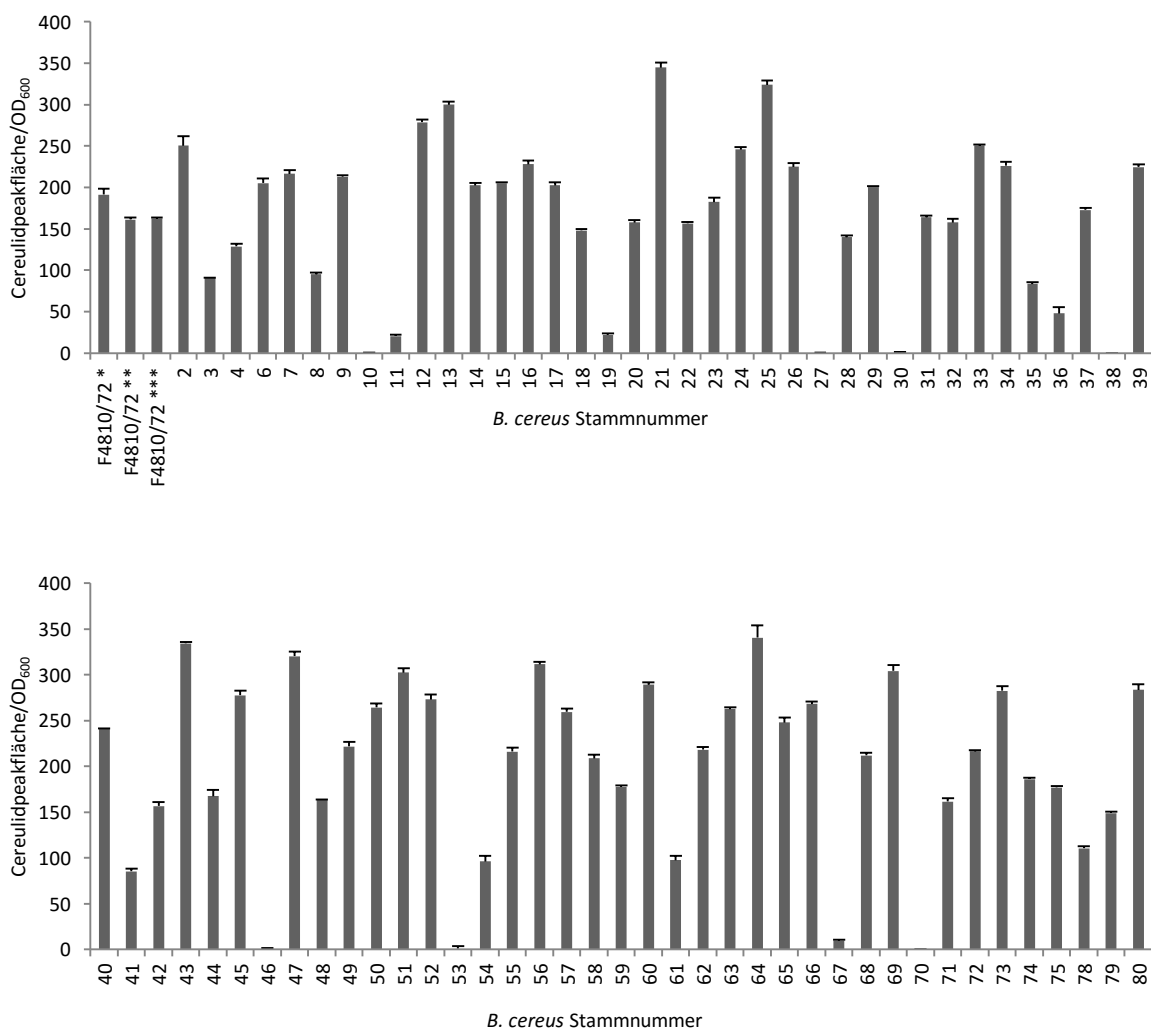


**Abb. 3:** UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Analyse von ethanolischen Extrakten zweier verschiedener *B. cereus* Stämme. **A)** Chromatogramm eines Extraktes des cereulidproduzierenden *B. cereus* Stammes 64, mit einem Cereulidpeak bei 5,5 Minuten. **B)** Chromatogramm des Extraktes von Stamm 70 der unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Cereulid produzierte.

## 1.2 Klassifizierung emetischer *B. cereus* Stämme nach ihrem Cereulidproduktionsvermögen

Zur Etablierung der neuen UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode und zur Detektion von Hoch- und Niedrigtoxinproduzenten sollten 77 verschiedene *B. cereus* Stämme nach ihrem Toxinbildungsvermögen eingestuft werden. Um eine möglichst große Stammdiversität repräsentieren zu können, wurde ein Set aus insgesamt 53 Lebensmittelisolaten, 19 klinischen Isolaten und 5 Isolaten aus anderen Quellen zusammengestellt (Tab. A1). Für den Toxinproduktionsvergleich wurden alle 77 Stämme in LB<sub>80</sub>-Medium angezogen (siehe Kap. II. 1.4) und die produzierte Cereulidmenge in ethanolischen Extrakten mittels der neu etablierten UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode detektiert. Um die Reproduzierbarkeit der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode zu gewährleisten, wurde jede Probe fünfmal vermessen. Von Stamm F4810/72 wurden zusätzlich drei unabhängige biologische Proben analysiert. Für den Vergleich der Daten wurde von jedem Stamm der Mittelwert der Fläche des Cereulid-Natrium-Addukt-Peaks aus den fünf Messungen errechnet und durch die OD<sub>600</sub> der Kulturen geteilt (Abb. 4). Im Schnitt lag die OD<sub>600</sub> der Stämme nach 24 Stunden Inkubation im Bereich zwischen 14 und 19 (Mittelwert 16,5 ± 1,8). Für den emetischen Referenzstamm F4810/72 konnte auf diese Weise eine Cereulidmenge von 171,7 Peakfläche/OD<sub>600</sub> ermittelt werden. Die Standardabweichung der drei biologischen Replikate betrug 8,8 %. Ebenso wie

Stamm F4810/72 zeigten 45 weitere der 77 Stämme unter den gewählten Versuchsbedingungen eine mittlere Toxinbildungskapazität mit einem Verhältnis von Cereulidpeakfläche/OD<sub>600</sub> im Bereich zwischen 50 bis 250. In den Extrakten von 11 Stämmen waren dagegen keine oder nur geringe Mengen an Cereulid nachweisbar und bei 20 Stämmen lag das Verhältnis von Peakfläche zu OD<sub>600</sub> über 250, was bedeutete, dass diese Stämme unter den Kultivierungsbedingungen vergleichsweise hohe Toxinmengen gebildet hatten. Es zeigte sich deutlich, dass das sehr unterschiedliche Toxinproduktionsverhalten der ausgewählten Stämme mit der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Messmethode erfasst und verglichen werden konnte.



**Abb. 4:** Cereulidscreening von 77 emetischen *B. cereus* Stämmen mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS. Dargestellt ist das Verhältnis der Fläche des massenspektrometrisch ermittelten Cereulid-Natrium-Addukt-Peaks und der Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) der Stämme nach Kultivierung in LB<sub>80</sub>-Medium. Von Stamm F4810/72 wurden drei biologische Replikate (F4810/72\*/\*\*/\*\*\*) jeweils fünfmal vermessen. Für alle anderen Stämme sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf technischen Replikaten gezeigt.

Anhand der gewonnenen Daten wurden die 77 getesteten Stämme anschließend in folgende drei Klassen unterteilt: keine bis geringe Cereulidproduzenten (Cereulidpeakfläche/  $OD_{600} \leq 50$ ), mittlere Cereulidproduzenten (Cereulidpeakfläche/  $OD_{600} \geq 50$  und  $\leq 250$ ) und hohe Cereulidproduzenten (Cereulidpeakfläche/  $OD_{600} \geq 250$ ).

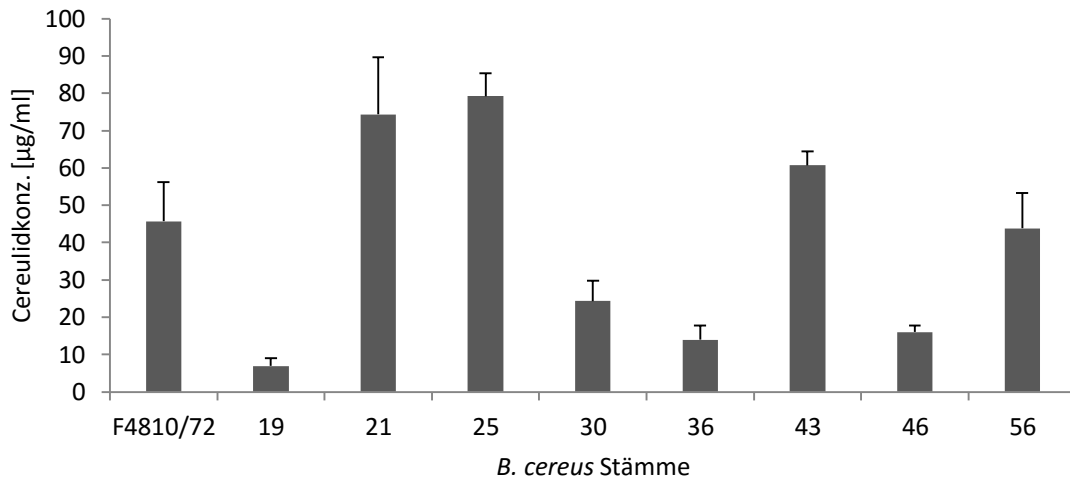
**Tab. 6:** Einteilung der 77 *B. cereus* Stämme nach ihrem Cereulidproduktionsvermögen. Die Klassifizierung erfolgte anhand des Verhältnisses der Fläche des durch UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS ermittelten Cereulidpeaks und der  $OD_{600}$  der Kulturen nach 24 Stunden Inkubation in LB<sub>80</sub>-Medium. Die fett gedruckten Stämme wurden für weitere Versuche ausgewählt.

Cereulidproduktion	Cereulidpeakfläche/ $OD_{600}$	Stammnummer
keine bis gering	$\leq 50$	10, 11, <b>19</b> , 27, <b>30</b> , <b>36</b> , 38, <b>46</b> , 53, 67, 70
mittel	$\geq 50$ und $\leq 250$	<b>F4810/72</b> , 3, 4, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 48, 49, 54, 55, 58, 59, 61, 62, 65, 68, 71, 72, 74, 75, 78, 79,
hoch	$\geq 250$	2, 12, 13, <b>21</b> , <b>25</b> , <b>43</b> , 45, 47, 50, 51, 52, <b>56</b> , 57, 60, 63, 64, 66, 69, 73, 80

Für weitere Validierungs- und Cereulidproduktionsversuche wurde aus den insgesamt 77 untersuchten *B. cereus* Stämmen ein kleines Stammset mit vier Geringproduzenten (19, 30, 36, 46), dem Stamm F4810/72 als Mittelproduzent und vier starken Cereulidbildnern (21, 25, 43, 56) zusammengestellt.

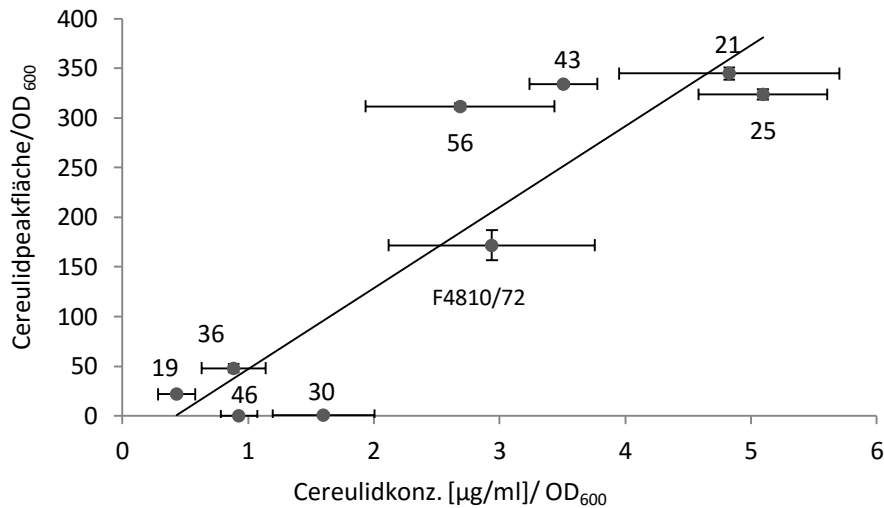
### 1.3 Vergleich der Hochdurchsatz-Quantifizierungsmethode mit der HPLC-MS/MS-SIVA

Um die neue UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode zu überprüfen, wurde die von den neun Stämmen des kleinen Stammsets produzierte Cereulidmenge mittels der HPLC-MS/MS-SIVA nach Bauer *et al.* 2010 genau quantifiziert. Dazu wurden alle Stämme für 24 Stunden in LB<sub>80</sub>-Medium bei 24 °C kultiviert und ethanolische Extrakte der Proben hergestellt. Vor Extraktionsbeginn wurden in jede Probe 1 µg/ml <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulid zugegeben, das als interner Standard zur Cereulidquantifizierung diente. Nach Auswertung der Messergebnisse zeigte sich, dass die mittels der HPLC-MS/MS-SIVA detektierten Cereulidkonzentrationen der neun Stämme im Bereich von 6,92 µg/ml bis 79,21 µg/ml lagen (Abb. 5).



**Abb. 5:** Cereulidkonzentrationen [µg/ml] in ethanolischen Extrakten von neun ausgewählten *B. cereus* Stämmen, die für 24 Stunden in LB<sub>80</sub>-Medium kultiviert wurden. Die Extrakte wurden mit der HPLC-MS/MS-SIVA vermessen und die Toxinkonzentration anhand des eingesetzten <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulidstandards errechnet. Von jedem Stamm wurden drei unabhängige biologische Replikate je dreimal vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Messwerte.

Vergleicht man die Quantifizierungsergebnisse mit den anhand der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode errechneten Cereulidwerten, ergab sich tendenziell eine gute Übereinstimmung. So konnte der emetische Referenzstamm F4810/72 auch nach der HPLC-MS/MS-SIVA mit 45,66 µg/ml Cereulid als mittlerer Toxinproduzent eingestuft werden. In den Extrakten der Stämme 21, 25 und 43 die mittels der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode als starke Toxinproduzenten klassifiziert wurden, konnte mit der HPLC-MS/MS-SIVA ebenfalls eine vergleichsweise hohe Cereulidmenge von 60,7 bis 79,21 µg/ml detektiert werden. Die vier Stämme 19, 30, 36 und 46 waren nach dem UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Screening als Stämme mit geringem Toxinproduktionsvermögen klassifiziert worden und enthielten in den mittels HPLC-MS/MS-SIVA vermessen Extrakten Cereulidmengen von 6,92 bis 24,37 µg/ml. Leichte Unterschiede ergaben sich bei Stamm 56. Dieser war nach der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode als Hochproduzent klassifiziert worden. Im ethanolischen Extrakt dieses Stammes konnten mittels der exakten Quantifizierungsmethode aber nur Toxinmengen von 43,86 µg/ml nachgewiesen werden, ähnlich wie beim Mittelproduzent F4810/72. Im Allgemeinen zeigte sich bei der direkten Gegenüberstellung der Messergebnisse, die mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS und HPLC-MS/MS-SIVA generiert wurden, eine relativ gute Korrelation hinsichtlich der Cereulidlevel, auch wenn die Standardabweichungen der quantifizierten Cereulidkonzentrationen/OD<sub>600</sub> verhältnismäßig hoch ausfielen (Abb. 6).



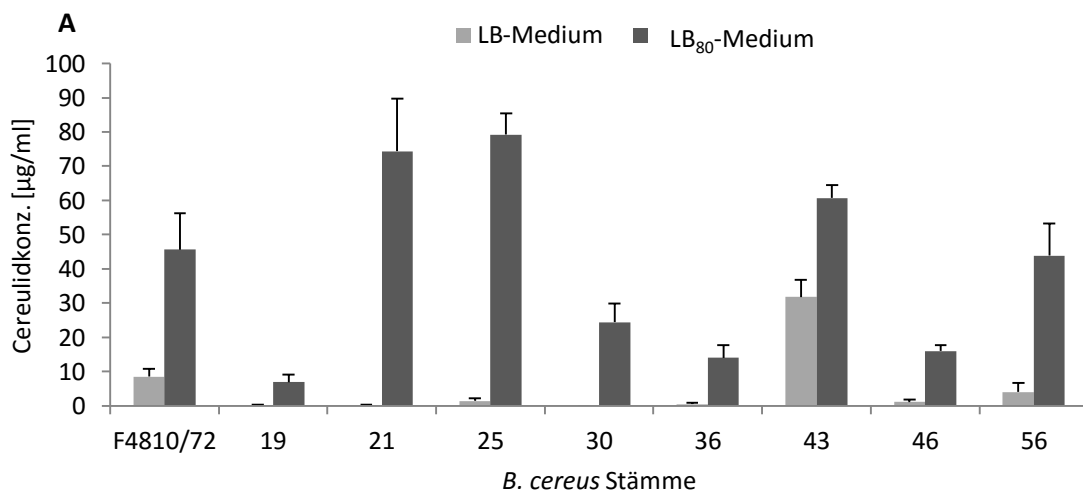
**Abb. 6:** Korrelation der mittels TOF MS bestimmten Cereulidpeakfläche/OD<sub>600</sub> mit der exakten Cereulidkonzentration/OD<sub>600</sub> die mittels HPLC-MS/MS-SIVA ermittelt wurde. Die gezeigten Standardabweichungen der Cereulidkonzentrationen/OD<sub>600</sub> resultierten aus drei unabhängigen Messungen biologischer Replikate und die der Cereulidpeakflächen/OD<sub>600</sub> aus fünf technischen Replikaten.

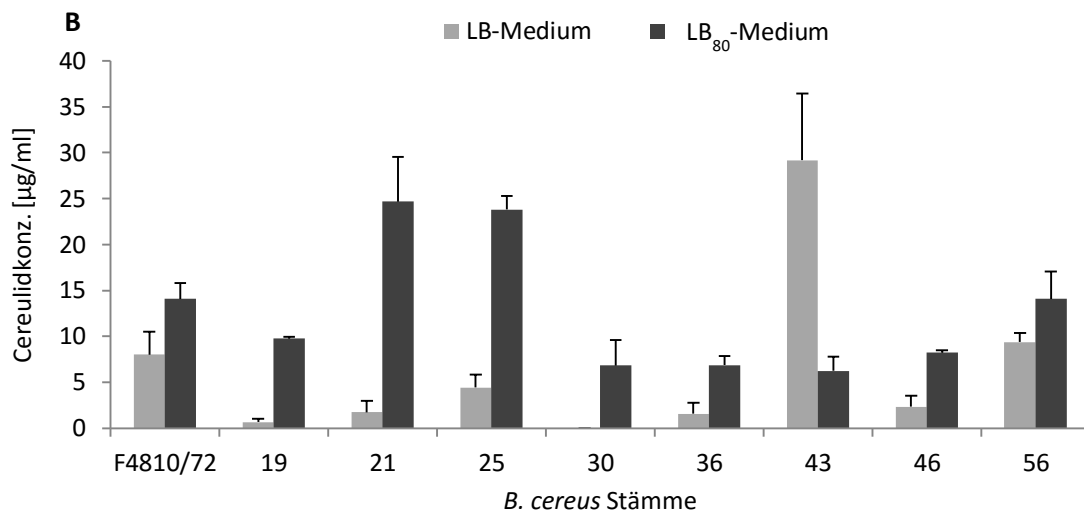
#### 1.4 Cereulidproduktion in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium

Für die Klassifizierung der 77 *B. cereus* Stämme nach ihrem Cereulidproduktionsvermögen mittels der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode, wurde zur Kultivierung ein LB<sub>80</sub>-Medium mit einer verringerten NaCl Konzentration von 0,5 % NaCl und 0,2 % Glucose verwendet. Die verringerte NaCl Konzentration und die Glucosezugabe wurden speziell gewählt, weil bekannt war, dass unter diesen Bedingungen die Cereulidbildung unterstützt wird (Dommel, 2008; Bauer 2012). Da die Stämme unter dieser Kultivierungsbedingung eine sehr große Variabilität hinsichtlich der Cereulidproduktion aufwiesen, sollte in folgenden Versuchen getestet werden, ob diese stammspezifische Tendenz zur starken bzw. schwachen Toxinbildung auch unter anderen Wachstumsbedingungen erhalten bleibt. Hierfür wurden die produzierten Cereulidkonzentrationen der neun Stämme des kleinen Stammsets zunächst in LB-Medium ohne Glucose und mit 1 % NaCl mittels der HPLC-MS/MS-SIVA bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die ermittelten Cereulidkonzentrationen in LB-Medium stark von den Werten abwichen, die sich nach der Kultivierung in LB<sub>80</sub>-Medium ergaben (Abb. 7 A). Generell bildeten alle Stämme in LB<sub>80</sub>-Medium deutlich höhere Toxinmengen als in LB-Medium. Zudem konnte die nach der Kultivierung in LB<sub>80</sub>-Medium durchgeführte Einteilung der neun Stämme in Hoch- und Niedrigproduzenten nach der Kultivierung in LB-Medium nicht für alle Stämme verifiziert werden. Der emetische Referenzstamm F4810/72 bildete in beiden Medien mittlere Mengen an Toxin und auch der starke Cereulidbildner Stamm 43 zeigte in beiden Flüssigmedien eine relativ starke Toxinproduktion mit Cereulidkonzentrationen von 60,7 µg/ml in Proben aus LB<sub>80</sub>-Medium und 31,81 µg/ml in Proben aus LB-Medium. Dagegen bildeten die als Hochproduzenten eingestuft

Stämme 21, 25 und 56 in LB<sub>80</sub>-Medium Cereulidmengen von 74,37 bis 79,21 µg/ml. In den Proben aus LB-Medium hingegen konnten nur vergleichsweise geringe Mengen an Toxin von 0,19 µg/ml bis 1,42 µg/ml nachgewiesen werden. Die vier in LB<sub>80</sub>-Medium als Niedrigproduzenten eingestuft Stämme 19, 30, 36 und 46 produzierten auch in LB-Medium keine oder sehr geringe Cereulidmengen (Abb. 7 A).

Zur Bestätigung der HPLC-MS/MS-SIVA Messwerte wurden die Cereulidkonzentrationen zusätzlich mit einer gängigen biologischen Quantifizierungsmethode, dem HEp-2 Test, bestimmt (Abb.7 B). Hierfür wurden die neun ausgewählten Stämme für 24 Stunden erneut in LB<sub>80</sub>- sowie LB-Medium angezogen und daraus Proben für den Zellkulturtest gewonnen. Es zeigte sich, dass die berechneten Cereulidmengen, die mit beiden Methoden in den Proben aus LB-Medium gemessen wurden, relativ gut übereinstimmten. Die Messwerte, welche mittels HPLC-MS/MS-SIVA in den ethanolischen Extrakten der Proben aus LB<sub>80</sub>-Medium detektiert wurden, waren jedoch in den meisten Fällen deutlich höher als die Ergebnisse, die mit dem HEp-2 Test in den Kulturproben nachgewiesen wurden. Abgesehen davon zeigte sich, dass mit beiden Methoden große Abweichungen zwischen den produzierten Toxinmengen von Proben aus LB- und LB<sub>80</sub>- Medium festzustellen waren, was darauf hin deutet, dass die produzierten Cereulidmengen sehr stark von der Zusammensetzung des Mediums abhängig sind, in dem die emetischen Stämme kultiviert wurden.

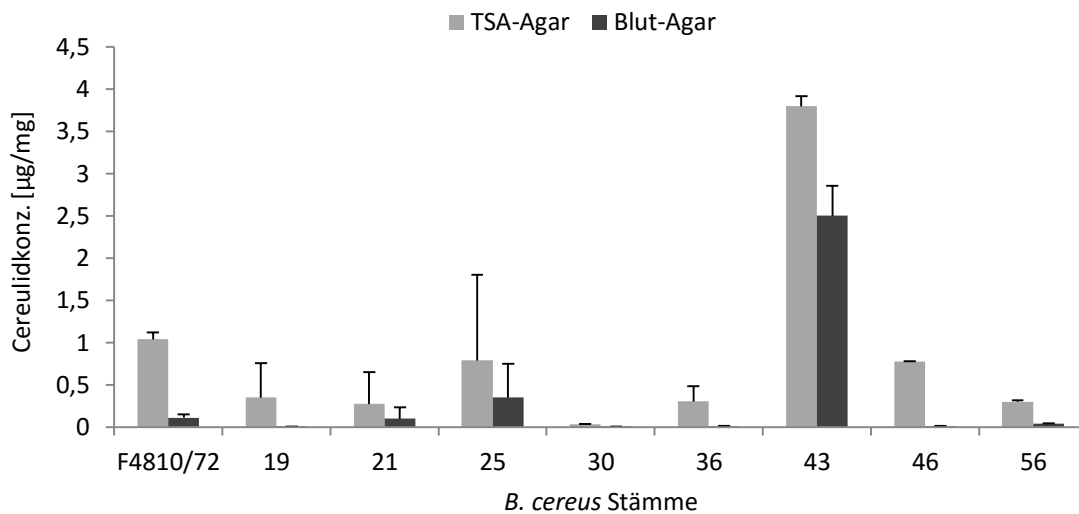




**Abb. 7:** Cereulidkonzentrationen in den Extrakten von neun ausgewählten *B. cereus* Stämmen, die für 24 Stunden in LB-Medium (dunkelgrau) mit 1% NaCl und ohne Glucose und in LB<sub>80</sub>-Medium (hellgrau) mit 0,5 % NaCl und mit 0,2 % Glucose kultiviert wurden. **A:** Mittels HPLC-MS/MS-SIVA ermittelte Cereulidkonzentrationen der ethanolischen Extrakte. Pro Stamm wurden drei biologische Replikate vermessen. Gezeigt sind Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen. **B:** Mittels HEp-2 Test ermittelte Cereulidkonzentrationen in den Kulturproben. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der Messungen von drei biologischen Replikaten und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Neben der Anzucht in Flüssigmedien wurden die neun ausgewählten *B. cereus* Stämme auf den zwei unterschiedlichen Festmedien, TSA- und Blut-Agar, kultiviert, um festzustellen, wie sich die Cereulidproduktionskapazität der Stämme unter diesen Bedingungen verhält. Die beimpften Platten wurden für 48 Stunden bei 24 °C inkubiert. Vom entstandenen Bakterienrasen wurde 20 mg Bakterienmasse abgenommen und zur Cereulidextraktion in Ethanol resuspendiert. Die so gewonnenen Extrakte wurden mittels HPLC-MS/MS-SIVA vermessen und die darin enthaltene Toxinmenge quantifiziert. Es zeigte sich, dass alle Stämme auf TSA-Agar mehr Toxin produzierten als auf Blut-Agar (Abb. 8). Im Vergleich zu den aus Flüssigkulturen isolierten Cereulidmengen, fielen die aus den beiden Agarkulturen extrahierten Toxinmengen geringer aus und lagen im Bereich zwischen 2,2 ng/mg und 3,8 µg/mg. Stamm 43 produzierte mit 3,8 µg/mg auf TSA-Agar und 2,5 µg/ml auf Blut-Agar unter Berücksichtigung der anderen getesteten Stämme am meisten Cereulid, ähnlich wie in den Kultivierungen in flüssigem LB-Medium (Abb. 7A).





**Abb. 8:** Cereulidkonzentrationen, die mittels HPLC-MS/MS-SIVA in ethanolischen Extrakten von neun *B. cereus* Stämmen nach Kultivierung auf den zwei verschiedenen Festmedien, TSA-Agar (hellgrau) und Blut-Agar (dunkelgrau), gemessen wurden. Pro Stamm wurden drei biologische Replikate analysiert. Gezeigt sind die gemittelten Cereulidkonzentrationen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Beschaffenheit des Mediums sowie die Kultivierungsbedingungen eine deutliche Auswirkung auf die Cereulidbildung haben. Die ursprünglich anhand der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode vorgenommene Einstufung der Stämme in geringe, mittlere und hohe Cereulidproduzenten, wurde unter anderen Wachstumsbedingungen nicht für alle Stämme des kleinen Stammsets bestätigt (Tab. A2). Dennoch konnte für sechs der insgesamt neun genauer untersuchten Stämme festgestellt werden, dass unter allen getesteten Bedingungen zumindest die grobe Tendenz des Cereulidproduktionsverhaltens erhalten blieb. Stamm F4810/72 kann anhand der Untersuchungsergebnisse, bis auf die Messung des Blutagarextrakts mittels HPLC-MS/MS-SIVA, als mittlerer Cereulidbildner eingestuft werden. Die Stämme 19, 30, 36 und 46 produzierten in allen durchgeführten Versuchen vergleichsweise geringe Mengen an Toxin. Die Stämme 21, 25 sowie 56 konnten nicht eindeutig klassifiziert werden, da sich die detektierten Cereulidkonzentrationen, welche unter den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gebildet wurden, deutlich unterscheiden. In der Einteilung, die anhand der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode (Tab. 6) durchgeführt wurde, konnten diese Stämme zwar alle als Hochproduzenten eingestuft werden, aber diese Klassifizierung konnte in Versuchen, in denen die Stämme in verschiedenen Medien kultiviert und die produzierte Toxinmenge anschließend mittels HPLC-MS/MS-SIVA genau quantifiziert wurde, nicht immer bestätigt werden. Generell bildeten alle untersuchten emetischen Stämme unter den gewählten Versuchsbedingungen in LB<sub>80</sub>-Medium die höchsten und auf Blut-Agarplatten allgemein die geringsten Cereulidmengen (Abb. 7A; Abb. 8).

### 1.5 Analyse der Sporen emetischer Stämme hinsichtlich Hydrophobizität und Hitzeresistenz

Neben dem Cereulidproduktionsverhalten wurden auch die Sporen einiger starker und schwacher Toxinbildner hinsichtlich ihrer Hitzeresistenz und Hydrophobizität untersucht, um zu analysieren ob eine Korrelation zwischen diesen Eigenschaften besteht. Hierfür wurden sechs emetische *B. cereus* Stämme (F4810/72, 11, 19, 21, 36, 43) mit unterschiedlichem Cereulidproduktionsvermögen aus den 77 Stämmen ausgewählt. Die Einteilung der Stämme in Hoch,- Mittel- und Niedrigcereulidproduzenten erfolgte mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS anhand von Proben, die aus der Stammkultivierung in LB<sub>80</sub>-Medium gewonnen wurden (Kap. III. 1.2). Zusätzlich wurde die Cereulid-negative Mutante F48ΔcesP/polar eingesetzt, die aufgrund einer Deletion im *ces* Genlokus nicht in der Lage ist Cereulid zu produzieren. Alle Stämme wurden mindestens 24 Stunden bei 30 °C in 2 x SG-Medium kultiviert, bis ca. 80 % der Kultur aus Sporen bestand. Durch eine Percolldichtegradientenzentrifugation wurden die Sporen im Anschluss von den restlichen vegetativen Zellen abgetrennt. Die Hydrophobizität der Sporen wurde dann mittels eines Hexanphasenversuchs bestimmt. Dabei ergaben sich für alle getesteten Sporen sehr hohe Hydrophobizitätswerte von 93,3 bis 97,9 % (Tab. 7). Die geringste Hydrophobizität wurde bei den Sporen des starken Cereulidproduzenten 43 gemessen, gefolgt vom Niedrigproduzenten 19. Die Sporen des ebenfalls als geringen Cereulidproduzenten eingestuften Stammes 11, wiesen mit 97,9 % die verhältnismäßig stärkste Hydrophobizität auf. Eine Korrelation zwischen Toxinbildungspotential und der Hydrophobizität der Sporen zeigte sich bei den getesteten Stämmen nicht. Auch die Hydrophobizitätswerte des emetischen Referenzstammes F4810/72 und der dazugehörigen Cereulid-negativen Mutante F48ΔcesP/polar lagen relativ nahe beieinander, woraus zu schließen ist, dass die Cereulidproduktion emetischer Stämme die Hydrophobizität der Sporen nicht beeinflusst.

Zur Analyse der Hitzeresistenz wurden die Sporensuspensionen der ausgewählten Stämme auf eine OD<sub>600</sub> von 0,17 eingestellt und in kleine Reaktionsgefäße verteilt. Die Proben wurden dann für 0, 10, 20, 30, 60, 120 und 180 Minuten bei 90 °C erhitzt, anschließend verdünnt auf Agarplatten ausplattiert und für 24 Stunden bei 30° C inkubiert. Anhand der ausgezählten Kolonien konnten die Gesamtkeimzahlen pro Milliliter berechnet und der D-Wert ermittelt werden. Insgesamt lagen die D-Werte der verschiedenen Stämme zwischen 47 und 77 Minuten, wobei die Abweichungen bei Wiederholungsmessungen mit bis zu 25 % recht hoch ausfielen (Tab. 7). Der geringste D-Wert wurde bei Sporen des emetischen Referenzstammes F4810/72, der im Stammscreening als mittlerer Toxinproduzent eingestuft wurde, mit 46,9 Minuten gemessen. Der D-Wert der Mutante F48ΔcesP/polar, die nicht in der Lage ist Cereulid zu produzieren, fiel mit 53,3 Minuten ähnlich gering

aus. Am hitzeresistentesten erwiesen sich die Sporen der Stämme 36, 19 und 11, die mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS als niedrige Cereulidproduzenten eingestuft worden waren. Ihre D-Werte lagen im Bereich von 69,4 bis 76,6 Minuten. Die Tests mit den Sporenproben der beiden als hohe Cereulidproduzenten eingestuften Stämme 21 und 43 ergaben dagegen mittlere bis niedrige D-Werte von 66,6 und 50,95 Minuten. Ein Zusammenhang zwischen Cereulidbildungspotential der Stämme und der Sporenhitzeresistenz zeigte sich somit unter den gewählten Bedingungen nicht. Darüber hinaus war auch keine Korrelation zwischen der Hydrophobizität und der Hitzeresistenz der Sporen zu erkennen, woraus zu schließen ist, dass es sich hierbei um unabhängige, eher stammspezifische Sporenparameter handelt.

**Tab. 7:** Hydrophobizität [%] und Hitzeresistenz D [min] von Sporen emetischer *B. cereus* Stämme mit unterschiedlichem Cereulidbildungsvermögen. Von jeder Sporenprobe wurden zwei unabhängige biologische Replikate hergestellt und analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung.

<i>B. cereus</i> Stamm	Cereulidproduktion*	Hydrophobizität [%]	Hitzeresistenz D [min]
F48ΔcesP/polar	nicht vorhanden	95,0 ± 0,9	53,3 ± 11
F4810/72	mittel	97,5 ± 1,3	46,9 ± 5,1
21	hoch	95,9 ± 1,3	66,6 ± 19,1
43	hoch	93,3 ± 2,1	51 ± 4,7
11	gering	97,9 ± 0,8	74,9 ± 0,4
19	gering	94,6 ± 0,4	69,4 ± 4,5
36	gering	95,5 ± 0,5	76,6 ± 14,7

\*Bestimmung des Cereulidbildungsvermögens erfolgte anhand der Cereulidkonzentrationen, die in den Proben der Stämme aus LB<sub>80</sub>-Medium gewonnen und mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS (Kap. II. 2.1) bestimmt wurden.

## 1.6 Biofilmbildung und Cereulidproduktion

Aus Studien mit *B. subtilis* ist bekannt, dass die Biofilmbildung durch eine Reihe von Sekundärmetaboliten, wie zum Beispiel Valinomycin verstärkt werden kann (Lopez *et al.*, 2009a). Da Cereulid ähnliche Eigenschaften wie Valinomycin besitzt, stellte sich die Frage, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Cereulidproduktion und Biofilmbildung bei *B. cereus* besteht. In einem Versuchsansatz sollte daher die Biofilmbildung von acht *B. cereus* Stämmen (F48ΔcesP/polar, F4810/72, 3, 7, 10, 13, 19, 25 und 27) untersucht werden, die laut UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Analyse ein unterschiedliches Cereulidbildungspotential aufweisen (siehe Tab. 6). Zum Vergleich der Biofilmbildungseigenschaften wurde ein Mikrotiterplatten-Assay (nach Auger *et al.*, 2006) verwendet und die Stämme in jeweils zwei verschiedenen Medien (EPS und LBB) für 24 und 48 Stunden inkubiert. Die Quantifizierung des gebildeten Biofilms erfolgte im Anschluss mit Hilfe

einer Kristallviolettfröbung. Dabei stellte sich heraus, dass in LBB-Medium nach 24 Stunden bei allen getesteten Stämmen nur eine sehr geringe oder keine Biofilmbildung nachgewiesen werden konnte (Tab. 8). Dagegen wurde nach 48 Stunden Inkubation bei den drei Stämmen 3, 19 und 25, die sowohl starke als auch schwache Cereulidbildner repräsentierten, eine mittlere Biofilmproduktion nachgewiesen. In EPS-Medium dagegen war die Biofilmbildung aller Stämme nach 24 Stunden bereits ausgeprägter als im LBB-Medium. Stamm 10, der als geringer Cereulidproduzent eingestuft worden war, zeigte hier im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen eine relativ starke Biofilmbildung. Nach 48 Stunden Inkubation war zu beobachten, dass sich bei vier der acht Stämme die Biofilme wieder zurückgebildet hatten. Unter den gewählten Biofilmwachstumsbedingungen zeigten sich sowohl im LBB-Medium als auch im EPS-Medium keine Korrelation zwischen dem Biofilmbildungspotential und dem Cereulidproduktionsvermögen der getesteten Stämme. Die Eigenschaft zur Biofilmbildung scheint stammspezifisch zu variieren und wird ebenfalls durch die Kultivierungsbedingungen stark beeinflusst.

**Tab. 8:** Biofilmbildungspotential verschiedener *B. cereus* Stämme mit unterschiedlichem Cereulidproduktionsvermögen. Die Kulturen wurden in LBB- bzw. EPS-Medium für 24 und 48 Stunden in Mikrotiterplatten kultiviert. Die gebildete Menge an Biofilm wurde anschließend mittels einer Kristallviolettfröbung analysiert.

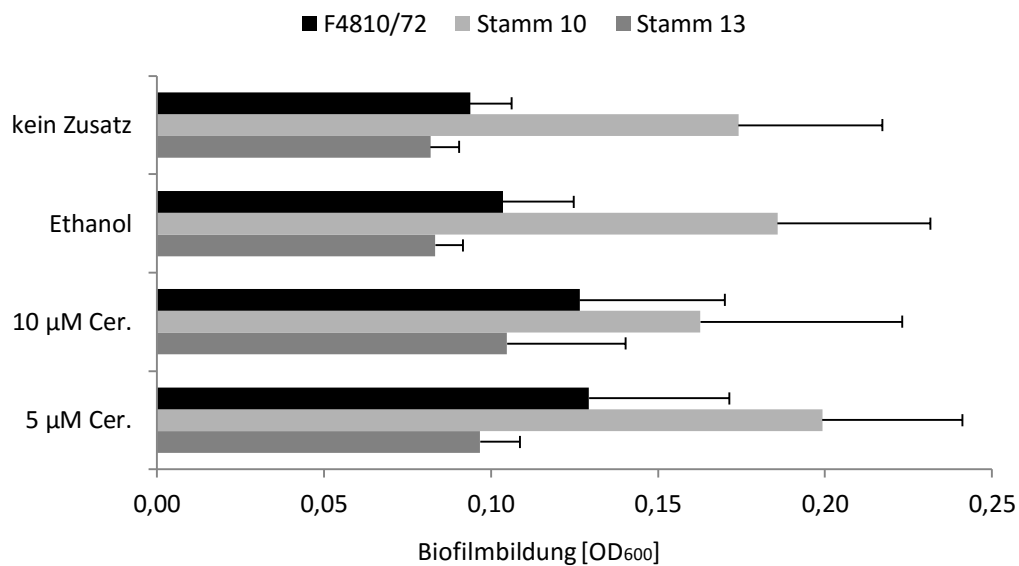
Stamm	Cereulidproduktion <sup>a</sup> in LB <sub>80</sub> -Medium nach TOF MS	Biofilmbildungspotential (BBP <sup>b</sup> )			
		in LBB-Medium		in EPS-Medium	
		24h	48h	24h	48h
F48ΔcesP/polar	keine	-	-	+	-
F4810/72	mittel	+/-	+/-	+	+/-
7	mittel	+/-	+/-	+	+
3	gering	+/-	+	+	+/-
10	gering	+/-	-	++	-
19	gering	+/-	+	+	+
27	gering	+/-	+/-	+	+
13	hoch	+/-	-	+	+
25	hoch	-	+	+	-

<sup>a</sup>: Bestimmung des Cereulidbildungsvermögens erfolgte anhand der Cereulidkonzentrationen, die in den Proben der Stämme aus LB<sub>80</sub>-Medium gewonnen und mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS (Kap. II. 2.1) bestimmt wurden.

<sup>b</sup>: - kein BBP; +/- geringes BBP; + mittleres BBP; ++ hohes BBP

Um heraus zu finden, ob möglicherweise extern zugegebenes Cereulid die Biofilmbildung beeinflussen kann, wurden von den drei *B. cereus* Stämmen F4810/72, 10 und 13 Vorkulturen in EPS-Medium hergestellt. Diese wurden anschließend für den Biofilmversuch in die Wells von Mikrotiterplatten verteilt. Zu den Kulturen wurden jeweils noch 5 bzw. 10 µM in Ethanol gelöstes Cereulid gegeben und die Ansätze dann für 24 Stunden bei 24°C inkubiert. Um auszuschließen, dass das zugegebene Lösungsmittel einen Effekt auf das Biofilmbildungsverhalten der Kulturen hat,

wurden auch Kontrollen mitgeführt, denen nur Ethanol zugegeben worden war. Es zeigte sich, dass unter allen getesteten Bedingungen Stamm 10 am meisten Biofilm bildete, gefolgt von Stamm F4810/72 und 13 (Abb. 9). Eine signifikante Veränderung der Biofilmbildung durch Zugabe von Cereulid konnte nicht nachgewiesen werden und die detektierte Biofilmbildung der getesteten Stämme schien unter den gewählten Bedingungen unverändert zu bleiben. Zusätzlich wurde der Biofilmtest mit den Stämmen F4810/72 und 13 noch in LBB-Medium durchgeführt, aber die Ergebnisse unterschieden sich nicht auffällig von den gezeigten, in EPS-Medium gemessenen Werten.



**Abb. 9:** Einfluss von externem Cereulid auf die Biofilmbildungsraten der drei *B. cereus* Stämme 13, 10 und F4810/72. Die Kulturen wurden für 24 Stunden in Mikrotiterplatten kultiviert und die gebildete Biofilmmenge anschließend mittels einer Kristallviolettffärbung analysiert. Vor der Inkubation wurden zu den Kulturen reines Cereulid in zwei Konzentrationen (10 µM und 5 µM in Ethanol gelöst), Ethanol oder kein Zusatz zugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen.

## Teil II

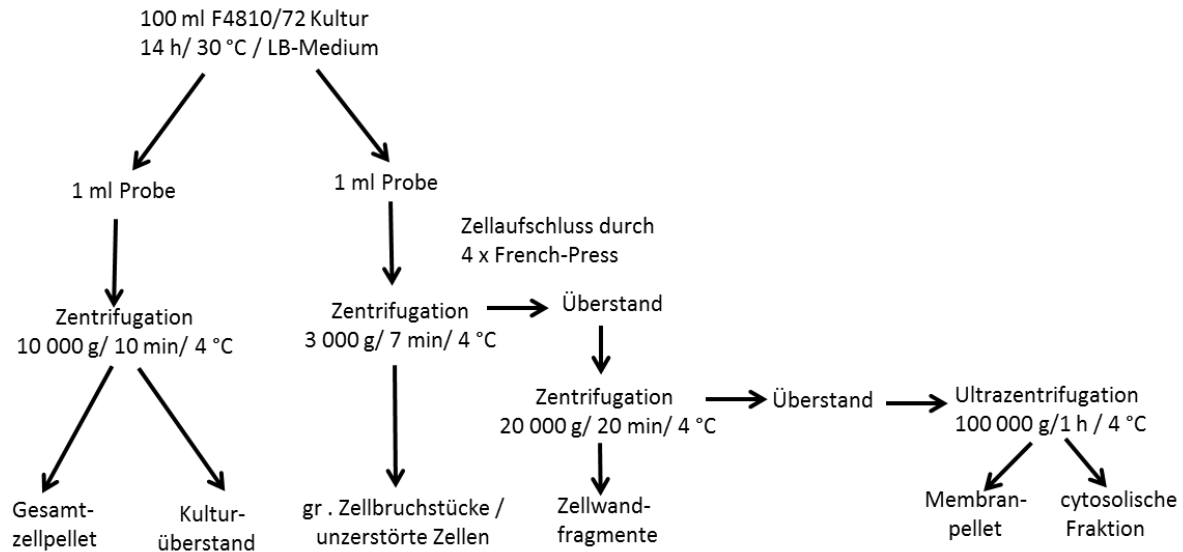
### 2. Untersuchungen zum potentiellen Toxintransporter CesCD und zur zellulären Lokalisation von Cereulid und dessen Synthetasekomplex

#### 2.1 Zelluläre Lokalisation und Verbreitung von Cereulid

Obwohl die genetischen Voraussetzungen und der Syntheseprozess der Cereulidbildung in emetischen *B. cereus* weitgehend aufgeklärt sind, ist nicht bekannt, was mit dem Toxin nach seiner Bildung in der Zelle passiert und auf welche Weise es transportiert wird bzw. in welchen Zellkompartimenten es sich nach der Synthese detektieren lässt. Um genauere Aussagen über diese Fragestellungen treffen zu können, wurden Experimente zur Cereulidlokalisation mit vegetativen *B. cereus* Zellen und Sporen durchgeführt, die Hinweise über die Verbreitung und den vermuteten Toxinexportmechanismus liefern könnten.

#### 2.2 Lokalisation von Cereulid in Zellfraktionen vegetativer Zellen

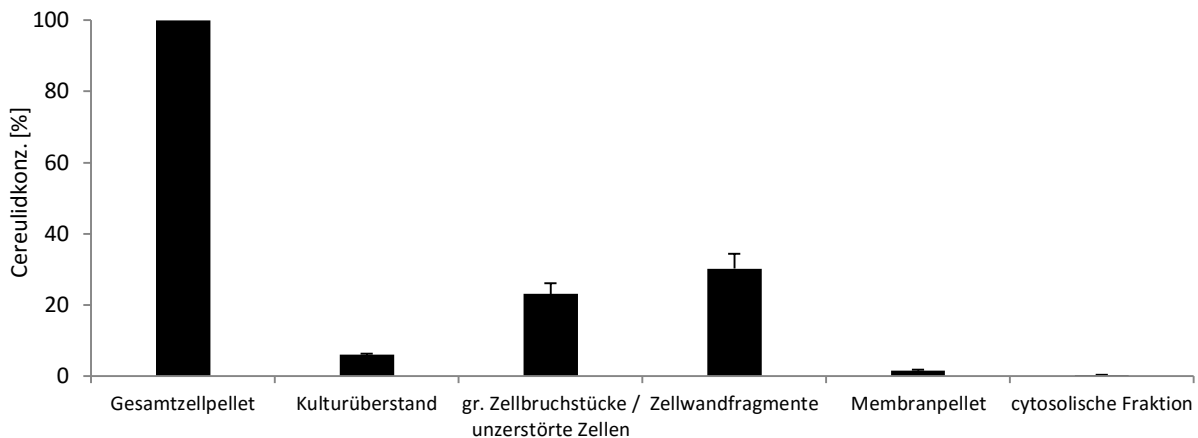
Um Cereulid in bzw. an vegetativen *B. cereus* Zellen zu lokalisieren, wurden die Zellen in unterschiedliche Fraktionen aufgeteilt, um die einzelnen Zellbestandteile voneinander zu separieren. Für den Versuch wurden 1 ml Proben aus für 14 Stunden in LB-Medium inkubierten Kulturen des Stammes F4810/72 gewonnen, die sich zu diesem Zeitpunkt am Beginn der stationären Wachstumsphase befanden und eine  $OD_{600}$  von 16 bis 17 aufwiesen. Die Kulturproben wurden nach der Entnahme anhand folgenden Protokolls zur Zellfraktionierung weiterverarbeitet (Abb. 10). Zur Bestimmung des Gesamtcereulidgehalts, den die Zellen bis zum Probenahmezeitpunkt produziert hatten, wurde eine 1 ml Probe abzentrifugiert, um ein Zellpellet mit intakten Zellen sowie den Kulturüberstand zu gewinnen. Zellen einer weiteren 1 ml Kulturprobe wurden durch viermalige Behandlung in der French-Press aufgeschlossen, um anschließend größere Zellbruchstücke und unzerstörte Zellen durch einen 7-minütigen Zentrifugationsschritt bei 3 000 g abzutrennen. Der erhaltene Überstand wurde 20 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert, woraus ein Pellet aus Zellwandfragmenten resultierte. Abschließend wurde der verbleibende Überstand für 1 Stunde ultrazentrifugiert, um die darin enthaltenen Membranbruchstücke zu sedimentieren und die cytosolische Fraktion zu gewinnen.



**Abb. 10:** Schema zur Fraktionierung von *B. cereus* Zellen durch differentielle Zentrifugation. Zur Herstellung der sechs Fraktionen wurden zwei 1 ml Proben aus einer Kultur des Stammes F4810/72 gewonnen, der für 14 Stunden in LB-Medium kultiviert wurde. Eine Probe wurde für 10 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert. Die Zellen der anderen Probe wurden viermal mittels French-Press-Hochdruckbehandlung aufgeschlossen und anschließend nach dem in der Abbildung gezeigten Verfahren behandelt.

Die Effizienz des mittels der French-Press durchgeführten Zellaufschlusses wurde überprüft, in dem eine viermalig hochdruckbehandelte und eine unbehandelte Kontrollprobe ausplattiert und die Koloniezahlen verglichen wurden. Das Ergebnis zeigte, dass 97 % der Zellen mittels French-Press Verfahren erfolgreich aufgeschlossen werden konnten, was Ausgangsvoraussetzung für die Gewinnung von Zellwandfragmenten und Membranfraktionen war (Daten nicht gezeigt). Vom Gesamtzellpellet und dem dazugehörigen Kulturüberstand sowie von den vier definierten Zellfraktionen (Fraktion aus großen Zellbruchstücken und unzerstörten Zellen, Zellwandfraktion, Membranfraktion und der cytosolischen Fraktion) wurden ethanolische Cereulidextrakte hergestellt und die darin enthaltene Toxinkonzentration nach Zugabe von 1 ng/ $\mu$ l  $^{13}\text{C}_6$ -Cereulidstandard mittels UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt. Anhand der Quantifizierungsergebnisse zeigte sich, dass im Gesamtzellpellet (10 000 g) die höchste Cereulidkonzentration von  $3,7 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden konnte. Dieser Cereulidwert wurde auf 100 % gesetzt und die Konzentrationswerte des Kulturüberstands und der Zellfraktionen dazu ins Verhältnis gebracht (Abb. 11). Im Allgemeinen war auffällig, dass durch Zellaufschluss und Fraktionierungsverfahren ein relativ hoher Cereulidverlust von ca. 39 % auftrat. Abgesehen davon wurden im Extrakt des Kulturüberstandes 6 % Cereulid nachgewiesen und in der cytosolischen Fraktion konnten mit 0,3 % Cereulid nur sehr geringe Toxinmengen detektiert werden. Das hydrophobe Cereulid löste sich folglich nicht im wässrigen Medium oder im Cytosol, sondern haftete an den Zellfragmenten und konnte fast ausschließlich von diesen extrahiert werden. In den untersuchten Zellfraktionen wurde Cereulid vorwiegend in der

Zellwandfraktion (30 %) und der Fraktion mit größeren Zellbruchstücken sowie unzerstörten Zellen (23 %) nachgewiesen, während in der Membranfraktion nur geringe Mengen (1,6 %) detektiert werden konnten. Dies könnte darauf hin deuten, dass Cereulid zum untersuchten Wachstumszeitpunkt nicht in der Membran selbst vorliegt, sondern vorwiegend in oder an der Zellwand haftet.



**Abb. 11:** Prozentualer Vergleich der Cereulidkonzentrationen, die mittels UPLC-MS/MS-SIVA in den ethanolischen Extrakten von sechs verschiedenen Zellfraktionen von *B. cereus* F4810/72 gemessen wurden. Die Toxinkonzentration, die im Gesamtzellpellet detektiert werden konnte, wurde auf 100 % gesetzt und die in den anderen Fraktionen gemessenen Toxinkonzentrationen dazu ins Verhältnis gebracht. Für jede Fraktion sind Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt, die aus Messwerten von vier biologischen Replikaten errechnet wurden.

Um zu überprüfen, ob sich in der aufgereinigten Membranfraktion auch tatsächlich Membrankomponenten befinden und wie deren Verteilung im Vergleich zur Zellwandfraktion und zur Fraktion der unaufgeschlossenen Zellen aussieht, wurden die in den Proben enthaltenen Fettsäuren analysiert. Ihre Anwesenheit und Menge wurde mittels der UPLC-ESI-TOF MS-Methode in Hexanextrakten der Fraktionen bestimmt. In den aus der Messung resultierenden Chromatogrammen wurden dann stellvertretend insgesamt fünf Markerphospholipide ausgewählt welche zu den Hauptkomponenten der *B. cereus* Cytoplasmamembran gehören. Drei davon zählen zur Gruppe der Phosphoethanolamine ( $C_{37}H_{75}NO_8P$ ;  $C_{35}H_{69}NO_8P$ ;  $C_{36}H_{71}NO_8P$ ) und zwei zur Gruppe der Phosphatidylglycerole ( $C_{38}H_{74}NO_{10}P$ ;  $C_{36}H_{70}NO_{10}P$ ) wobei von  $C_{36}H_{70}NO_{10}P$  zwei Isomere für die Auswertung herangezogen wurden (Haque & Russell, 2004). Die Flächen dieser Fettsäurepeaks wurden integriert und miteinander verglichen (Tab. 9). Dabei zeigte sich, dass in der Fraktion mit unaufgeschlossenen Zellen und Zellbruchstücken die höchsten Mengen an Fettsäuren detektiert werden konnten. Mittlere Mengen an Fettsäuren wurden in der Zellwandfraktion nachgewiesen und die geringsten in der Membranfraktion. Die große Menge an Membranen in der Fraktion mit den



nichtaufgeschlossenen Zellen und den Zellbruchstücken lässt sich dadurch erklären, dass hier viel Zellmaterial und folglich auch viele Membranreste vorhanden sind. Zur Herstellung der Zell- sowie Membranfraktion waren zudem noch mehr Aufreinigungsschritte nötig, was mit einem gewissen Verlust an Zellmaterial verbunden war. Auch wenn nur noch in vergleichsweise geringen Mengen, sind Fettsäuren in der Membranfraktion nachweisbar und es zeigte sich, dass das verwendete Protokoll zur Aufreinigung der Membranen geeignet ist. Zudem ergab sich aus den Messergebnissen der drei Fraktionen kein Zusammenhang zwischen detektierter Menge an Fettsäuren und der Cereulidkonzentration. In der Fraktion mit unaufgeschlossenen Zellen und Zellbruchstücken waren zwar am meisten Fettsäuren enthalten und in der Membranfraktion am wenigsten, aber die höchsten Cereulidkonzentrationen ( $1,4 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) wurden in der Zellwandfraktion mit mittleren Fettsäuremengen nachgewiesen. Dies deutet daraufhin, dass das Vorhandensein von Cereulid unabhängig von der Menge der gemessenen Fettsäuren ist und Cereulid somit wahrscheinlich nicht an Membrankomponenten gekoppelt vorliegt.

**Tab. 9:** Vergleich der Peakflächen von sechs unterschiedlichen Markerphospholipiden, die mittels UPLC-ESI-TOF MS in Hexanextrakten von drei Zellfraktionen detektiert wurden. Zusätzlich sind die Cereulidkonzentrationen angegeben, die in den ethanolischen Extrakten der Fraktionen mit der UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt wurden. Wenn nicht anders vermerkt, sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Messungen mit zwei unabhängigen biologischen Proben gezeigt.

Fettsäure	gr. Zellbruchstücke / nicht aufgeschlossene Zellen	Zellwandfragmente	Membranpellet
Phosphoethanolamine	Flächen der Fettsäurepeaks		
(C <sub>37</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>8</sub> P)	4086 ± 1607	1619 ± 122	1195 ± 289
(C <sub>35</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>8</sub> P)	3681 ± 2059	1008 ± 28	763 ± 207
(C <sub>36</sub> H <sub>71</sub> NO <sub>8</sub> P) <sup>A</sup>	2665 ± 1725	949 ± 66	503 ± 86
(C <sub>36</sub> H <sub>71</sub> NO <sub>8</sub> P) <sup>B</sup>	1493 ± 761	523 ± 74	359 ± 165
Phosphatidylglycerole			
(C <sub>38</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>10</sub> P)	14145 ± 14360	9232 ± 9826	1644 <sup>C</sup>
(C <sub>36</sub> H <sub>70</sub> NO <sub>10</sub> P)	9860 ± 10141	5676 ± 6472	969 <sup>C</sup>
Gesamtfläche	35929	19006	4132
Cereulid [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1,1 ± 0,5	1,4 ± 0,5	0,08 ± 0,01

<sup>A/B</sup> Peakflächen der Isomere des Phosphoethanolamins (C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>8</sub>P).

<sup>C</sup> Die beiden Phosphatidylglycerole wurden jeweils nur in einem der zwei vermessenen biologischen Replikate der Membranpellets detektiert.

## 2.3 Versuche zur Cereulidextraktion von der Oberfläche vegetativer Zellen

### 2.3.1 Extraktion von Cereulid mittels Ethanol

Zur Präzisierung der Aussage über die Lokalisation von Cereulidmolekülen in oder an der Zellwand, wurde versucht, das Toxin, welches sich an der Zelloberfläche befinden könnte, mit Hilfe von Ethanol zu isolieren. Dazu wurden 1 ml Kulturproben mit vegetativen Zellen des *B. cereus* Stammes F4810/72 während der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 12-14) abpelletiert und die Zellen anschließend zur Cereulidextraktion für 5 Minuten und 10 Minuten in 100 % Ethanol inkubiert. Die Cereulidkonzentrationen in den gewonnenen Extrakten wurden anschließend mit <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Cereulidstandard versetzt und mittels UPLC-MS/MS-SIVA vermessen. Da das Toxin nur von der Oberfläche isoliert werden sollte und bekannt ist, dass Ethanol ab einer bestimmten Inkubationsdauer sowohl tiefer in vegetative Zellen eindringt als auch zellschädigende Effekte hat, wurden zusätzlich die Zellzahlen nach der Ethanolbehandlung analysiert. Zur Bestimmung der ursprünglichen Zellkonzentration wurde eine unbehandelte Probe ausplattiert. Eine weitere Probe wurde über eine Zeitspanne von 15 Stunden mit Ethanol extrahiert, um den Gesamtcereulidgehalt zu ermitteln.

Nach der Bestimmung der Toxinkonzentrationen in den Extrakten zeigte sich, dass Extraktionszeiten von 5 bis 10 Minuten ausreichend sind, um bis zu 80 % des Cereulids zu lösen, das an den Zellen haftet. Somit ergab sich kein großer Unterschied zu der Cereulidmenge, die nach 15 Stunden Ethanolbehandlung aus den Zellpellets extrahiert werden konnten (Tab. 10). Allerdings wirkte sich die Kurzzeitbehandlung mit Ethanol bereits deutlich auf die Zellzahlen aus, da selbst eine 5 bis 10-minütige Inkubation mit Ethanol die Zellzahlen im Vergleich zu einer unbehandelten Probe um 4 bis 5 Log-Stufen reduzierte. Eine Aussage, ob das Toxin an der Zellaußenseite oder im Inneren lokalisiert ist, konnte daher anhand dieses Versuchsansatzes nicht getroffen werden.

**Tab. 10:** Vergleich der aus 1 ml Zellpellets von *B. cereus* F4810/72 extrahierten Cereulidmengen [%] und der Zellzahlen [KBE/ml], die nach variierender Inkubationsdauer mit 100 % Ethanol ermittelt wurden. Die Cereulidkonzentrationen der gewonnenen ethanolischen Extrakte wurden mittels UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Inkubationszeit	extrahierte Cereulidmenge [%]	Zellzahl [KBE/ml]
0 min	0	9,5E+08
5 min	76 ± 14	5,2E+03
10 min	80 ± 19	5,1E+03
15 h	100	0

In einem weiteren Versuchsansatz wurden 1 ml Zellpellets des Stammes F4810/72 für 10 Minuten mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen behandelt, um zu testen, ob eine Reduktion der Ethanolkonzentration ermöglicht, Cereulid ohne schädigenden Effekt von der Oberfläche der Zellen zu extrahieren. Es zeigte sich, dass Cereulid erst ab einer Ethanolkonzentration von 50 % effektiv aus dem Zellpellet gelöst wurde (Tab. 11). Am wirkungsvollsten erwies sich die Extraktion mit 70 und 100 % Ethanol. Mit der Zunahme der Ethanolkonzentration stieg zwar die Cereulidextraktionsrate, gleichzeitig sank aber auch die Zahl der Zellen, welche die Inkubation mit dem Lösungsmittel überlebten. Bereits durch eine Behandlung mit 30 % Ethanol wurde die Zellzahl im Vergleich zu einer unbehandelten Probe um 4 Log-Stufen reduziert. Es konnte somit keine optimale Ethanolkonzentration gefunden werden, die Cereulid zwar löst, aber die Zellzahl nicht stark beeinträchtigte.

**Tab. 11:** Vergleich der Effektivität der Cereulidextraktion aus 1 ml Zellpellets von *B. cereus* F4810/72 mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen sowie deren Auswirkungen auf die Zellzahlen nach 10-minütiger Inkubation. Die Cereulidmengen in den gewonnenen ethanolischen Extrakten wurden mittels UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Versuchen.

Ethanolkonzentration [%]	extrahierte Cereulidmenge [%]	Zellzahl [KBE/ml]
0	0	5,7E+07
10	0	3,9E+07
30	1 ± 0,3	1,2E+04
50	67 ± 2	1,1E+04
70	100	8,5E+03
100	94 ± 8	7,9E+03

### 2.3.2 Zellschonende Cereulidextraktionsmethoden

Neben Ethanol wurde DMSO als weiteres Lösungsmittel zur Cereulidextraktion getestet und zunächst hinsichtlich seiner zellschädigenden Wirkung analysiert. Die Behandlung der vegetativen Zellen erfolgte hier ebenso wie die oben beschriebene 10-minütige Inkubation mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen (Kap. III. 2.3). Dabei stellte sich heraus, dass 100 % DMSO die Zellen stark schädigte und zu einer Zellzahlreduktion von bis zu 4 Log-Stufen kam. Die Cereulidmenge in den gewonnenen Extrakten wurden aus diesem Grund nicht bestimmt. Die Behandlung der Zellen mit 50 % DMSO verursachte hingegen eine geringere Zellschädigung, als die getesteten Ethanolkonzentrationen und 100 % DMSO. Im Vergleich zur in PBS-Puffer gelösten, unbehandelten Probe betrug die Zellzahlreduktion hier nur ca. eine Log-Stufe (Tab. 12). Wie wirkungsvoll die Cereulidextraktion mit 50 % DMSO war, zeigte sich durch die Bestimmung der Toxinkonzentration mittels UPLC-MS/MS-SIVA. Dabei konnten bis zu 19 % des Gesamtcereulidgehalts in der Probe

detektiert werden. Zusätzlich zu unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Lösungsmittel wurden die Zellen auch mit speziellen Silika-Kugeln inkubiert, deren Oberfläche mit C18-Alkylgruppen bestückt war. Durch die Modifizierung der Oberfläche mit Alkylgruppen erhalten die Kugeln einen sehr hydrophoben Charakter. Falls Cereulid vorwiegend an der Zelloberfläche vorliegt, könnten Cereulidmoleküle bei direktem Kontakt zwischen vegetativen *B. cereus* Zellen und den Silika-Kugeln möglicherweise an diesen haften und anschließend wieder von den Kugeln gewaschen werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden 1 ml Kulturproben des Stammes F4810/72 für 10 Minuten und eine Stunde mit 50 µl Silika-Kugeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kugeln magnetisch von den Zellen separiert und in Puffer gewaschen, um verbleibende Zellen abzutrennen. Anschließend wurden die Kugeln zur Extraktion des Toxins mit Ethanol behandelt. Dabei zeigte sich, dass innerhalb von 10 Minuten bereits ca. 22 % des Gesamtcereulidgehalts der Probe von den Silika-Kugeln extrahiert werden konnte. Nach einer einstündigen Inkubationszeit von Zellen mit Kugeln blieb mit etwa 29 % nur unwesentlich mehr Cereulid an den Kugeln haften als nach 10 Minuten. Die Zellzahlreduktion fiel zudem weitaus geringer aus als mit den getesteten Lösungsmitteln (Tab. 11 und 12). Die Behandlung der Zellen mit 50 % DMSO oder den Silika-Kugeln erwiesen sich somit als zellschonendere Cereulidextraktionsmethode und es konnte gezeigt werden, dass sich auf diese Weise bereits nach kurzen Extraktionszeiten ca. ein Viertel des Gesamtcereulidgehalts von den Zellen isolieren lässt. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass ein bestimmter Anteil an Cereulid in oder auf der Zellwand vorliegt.

**Tab. 12:** Vergleich der Effektivität der Cereulidextraktion mittels unterschiedlicher Extraktionsmittel und deren Auswirkungen auf die Zellzahl nach 10- und 60-minütiger Inkubation. Behandelt wurden 1 ml Zellpellets des Stammes F4810/72. Die Cereulidkonzentrationen in den Extrakten wurden abgesehen von der 100 % DMSO Probe mittels UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Versuchen.

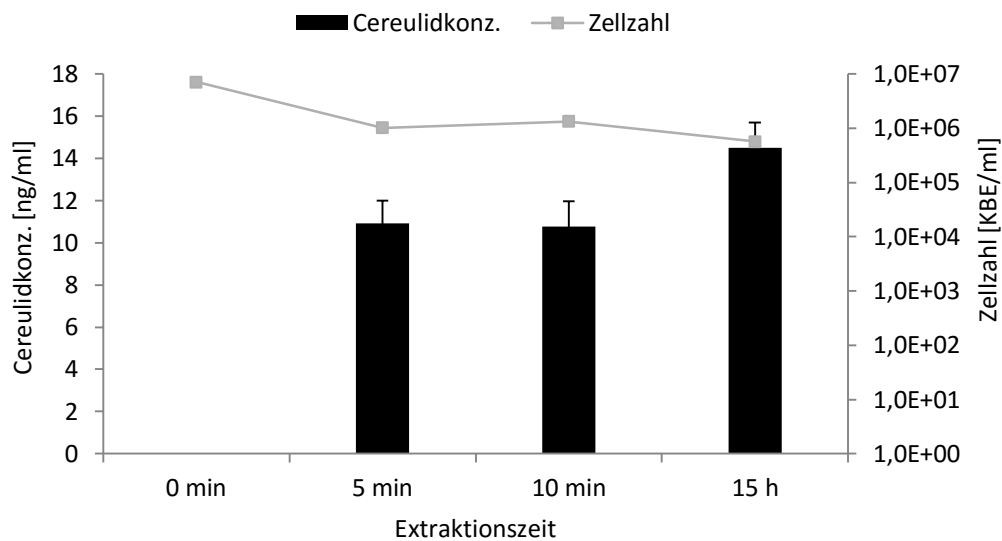
Extraktionsmittel	Inkubationsdauer [min]	extrahierte Cereulidmenge [%]	Zellzahl [KBE/ml]
PBS	10 und 60	0	9,3E+08
100 % ETOH	60	100	0
100 % DMSO	10	n.b.	1,4E+04
50 % DMSO	10	19 ± 0,6	5,1E+07
50 µl C18-Kugeln	10	29 ± 5	2E+08
50 µl C18-Kugeln	60	22 ± 6	4E+08

n.b.: nicht bestimmt

## 2.4 Potentielle Cereulidbindung und -verbreitung durch Sporen

In einigen Untersuchungen (siehe Kap. III. 1.5) sowie in anderen Studien wurde gezeigt, dass die Sporen von *B. cereus* Stämmen sehr hydrophob sind (Buhr *et al.*, 2008; Doyle, 1984). Somit bestand die Vermutung, dass Cereulid an den Sporen haften und auf diese Weise auch verbreitet werden könnte. Um dies zu überprüfen, wurde anhand der Sporen des emetischen Referenzstamms F4810/72 getestet, ob sich Cereulid an der Sporenoberfläche befindet und welche Toxinmengen extrahiert werden können. Hierfür wurde der Stamm F4810/72 ca. 48 Stunden in LB-Medium bis zur Sporulation kultiviert. Im Anschluss wurden die Sporen mittels Percolldichtegradientenzentrifugation von den noch vorhandenen vegetativen Zellen abgetrennt. Die Sporen wurden in Sporenpuffer gewaschen, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt und abzentrifugiert. Die erhaltenen Sporenpellets wurden dann für 5 und 10 Minuten sowie 15 Stunden mit 100 % Ethanol inkubiert, um das an oder in den Sporen haftende Cereulid zu extrahieren. Das Toxin in den Extrakten wurde dann mittels UPLC-MS/MS-SIVA quantifiziert und die mit Ethanol behandelten Zellen zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl ausplattiert.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse zeigte sich, dass von den Sporen nach kurzen Extraktionszeiten von 5 und 10 Minuten durchschnittlich 11 ng/ml Cereulid extrahiert werden konnten. Nach 15 Stunden Extraktionszeit lag die detektierte Cereulidmenge bei 15 ng/ml. Die Behandlung der Sporen mit Ethanol bewirkte neben der Cereulidextraktion aber zugleich auch eine Reduktion der Zellzahlen. Enthielt eine unbehandelte Sporenprobe mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 durchschnittlich 7,1 E+6 KBE/ml, so wurde die Zellzahl durch die ethanolische Cereulidextraktion um ca. eine Log-Stufe reduziert und lag nach 15-stündiger Inkubation der Sporen in Ethanol bei 5,65 E+05 KBE/ml. Verglichen zu den auf gleiche Weise behandelten vegetativen Zellen (Tab. 12) fiel die Zellzahlreduktion bei den Sporen deutlich geringer aus, was sich durch die höhere Resistenz der Sporen gegenüber Ethanol erklären lässt. Die Tatsache, dass sich Cereulid durch eine Kurzzeitbehandlung mit Ethanol von Sporen isoliert werden kann, wenn auch in relativ geringen Mengen, unterstreicht die Hypothese, dass Sporen als Cereulidträger fungieren und zur Verbreitung des Toxins beitragen können.



**Abb. 12:** Cereulidkonzentrationen [ng/ml] und Gesamtkeimzahlen [KBE/ml] von Sporextrakten des Stammes F4810/72, die für 5 und 10 Minuten oder 15 Stunden mit Ethanol extrahiert wurden. Die aufgereinigte Sporensuspension wurde vor Versuchsbeginn auf eine Konzentration von  $OD_{600}$  0,2 eingestellt und für die verschiedenen Versuchsansätze aliquotiert. Für die Cereulidquantifizierung wurden die Extrakte von jeweils zwei unabhängigen biologischen Replikaten mittels UPLC-MS/MS-SIVA vermessen und die behandelten Sporen zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl ausplattiert. Gezeigt sind die aus den Ergebnissen erhaltenen Mittelwerte und Standardabweichungen.

## 2.5 Analyse des putativen ABC-Transporters CesCD

### 2.5.1 *In silico* Analyse von CesCD

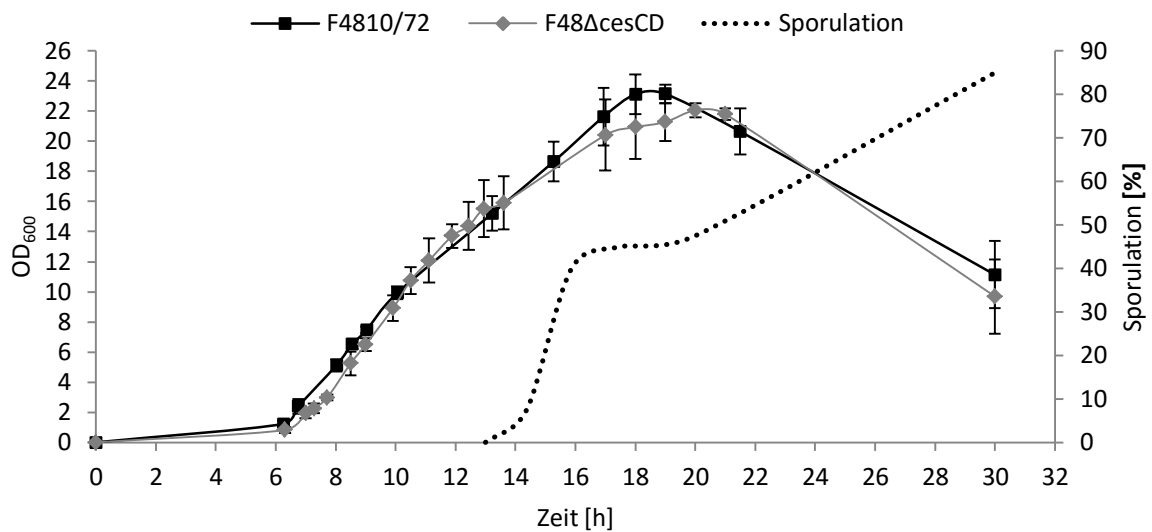
Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die beiden Gene *cesC* und *cesD*, die am 3'Ende des *ces* Operons lokalisiert sind und für einen möglichen ABC-Transporter codieren, eine entscheidende Rolle im Cereulidsyntheseprozess spielen (Lücking, 2009a). *In silico* Analysen der Gensequenzen und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten, dass es sich bei CesC um ein ATP-Bindeprotein handeln könnte, das 50 % Ähnlichkeit zu BerA aus *B. thuringiensis* aufweist und in diesem Organismus eine entscheidende Rolle bei der Produktion von  $\beta$ -Exotoxin I übernimmt (Espinasse *et al.*, 2002). Ein weiteres zu CesC homologes Protein ist BcrA aus *B. licheniformis* (32 % Ähnlichkeit) von dem bekannt ist, dass es eine Funktion im Resistenzmechanismus gegen Tetronasin und Bacitracin übernimmt (Podlesek *et al.*, 1995). Bei CesD führte die Gensequenzanalyse zur Vermutung, dass es sich hierbei um ein Transmembranprotein handelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Um die Positionierung des Proteins in der Zellmembran zu prognostizieren, wurde die Sequenz von CesD mit verschiedenen Onlinetools (TMHMM, TopPred und TMpred) untersucht. Dabei stellte es sich als sehr wahrscheinlich heraus, dass CesD in der Membran lokalisiert ist und über fünf Transmembrandomänen verfügt. Zusätzlich weist CesD 33-44 % Ähnlichkeit zur möglichen Permease

---

BerB aus *B. thuringiensis* auf. Abgesehen von BerB konnten aber keine weiteren bereits charakterisierten Permeasen wie beispielsweise BcrB oder TnrB3 als CesD-Homologe identifiziert werden. Der Sequenzvergleich von CesCD mit bekannten ABC-Transportern von antimikrobiellen Peptiden aus verschiedenen Untergruppen (Gebhard, 2012) zeigte, dass CesCD am meisten Ähnlichkeit mit den ABC-Transportern der „BcrAB Untergruppe“ hat, die typischerweise aus einer ATPase und einer Permease mit sechs Transmembranhelices bestehen.

### **2.5.2 Charakterisierung der Deletionsmutante F48 $\Delta$ cesCD hinsichtlich Wachstum und Cereulidbildung**

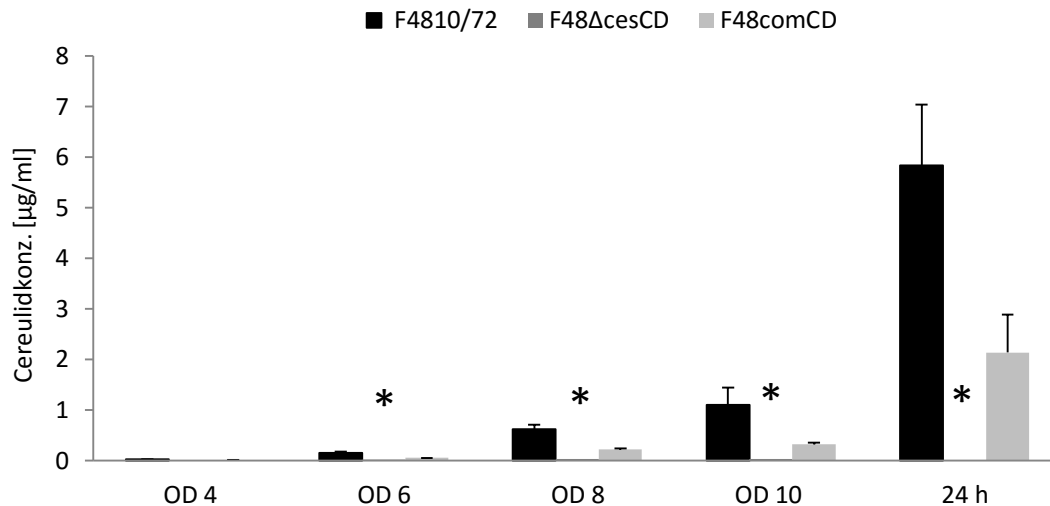
Um festzustellen, welche Bedeutung die Gene *cesC* und *cesD* in Zusammenhang mit der Cereulidsynthese haben, wurde für weitere Versuche eine *cesCD* defiziente Mutante F48 $\Delta$ cesCD (Lücking, 2009a) verwendet. In einem ersten Vergleich sollte festgestellt werden, ob sich zwischen Mutante und Stamm F4810/72 grundlegende Unterschiede in Wachstums- und Sporulationsverhalten zeigen. Hierfür wurden beide Stämme über die Dauer von 30 Stunden bei 30°C inkubiert und die OD<sub>600</sub> der Kulturen währenddessen photometrisch verfolgt. Dabei zeigten sich im Wachstumsverlauf von Wildtypstamm F4810/72 und Mutante keine Unterschiede (Abb. 13). Bei beiden Stämmen begann die exponentielle Wachstumsphase nach 6 Stunden und nach ca. 18 Stunden gingen die Kulturen in die stationäre Phase über. Die Sporulation begann in beiden Kulturen nach ungefähr 12,5 Stunden, da zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch erste Endosporen detektiert werden konnten. Nach 30 Stunden waren beide Stämme fast vollständig sporuliert und in den Kulturen lagen mindestens 85 % freie Sporen vor. Folglich scheinen Sporulation und Wachstumsverhalten der getesteten Stämme nicht durch die Gene *cesCD* beeinflusst zu werden.



**Abb. 13:** Wachstumsverhalten sowie der durchschnittliche Sporulationsfortschritt des emetischen *B. cereus* Stamms F4810/72 und der *cesCD* defizienten Mutante F48Δ*cesCD*. Beide Stämme wurden bei 30 °C in LB-Medium kultiviert. Das Wachstum wurde photometrisch und der Sporulationsfortschritt mittels Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Für jeden Stamm sind Mittelwerte und Standardabweichungen der OD<sub>600</sub> von zwei unabhängigen biologischen Replikaten dargestellt.

Für den Vergleich des Cereulidproduktionsverhaltens von Stamm F4810/72 und der *cesCD* defizienten Mutante wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 4 bis 10) und nach 24 Stunden (stationäre Phase) Proben aus den Kulturen entnommen. Zusätzlich wurde die Komplementationsmutante F48comCD (Lücking 2009a), bei der die beiden Gene *cesC* und *cesD* *in trans* auf einem Vektor in die Deletionsmutante erneut eingebracht wurden, auf die gleiche Weise kultiviert und beprobt. Aus allen Proben wurden ethanolische Extrakte hergestellt und der Cereulidgehalt darin mittels der UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt. Die Toxinkonzentrationsmessung ergab, dass die Cereulidmengen in den Proben des Stamms F4810/72 zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich zunahm. Lag die Cereulidkonzentration bei einer OD<sub>600</sub> von 6 anfänglich noch bei 0,15 µg/ml, so stieg sie über 1,11 µg/ml bei OD<sub>600</sub> 10, bis hin zu einer Konzentration von 6,69 µg/ml nach 24 Stunden Kultivierung an. In den Proben der Deletionsmutante F48Δ*cesCD* konnte kein Cereulid bzw. nur sehr geringe Mengen von beispielsweise 30 ng/ml zum Wachstumszeitpunkt OD<sub>600</sub> 10 detektiert werden. In den Proben der Komplementationsmutante F48comCD hingegen konnte wieder Cereulid nachgewiesen werden. So war die nach 24 Stunden Inkubation von der Mutante produzierte Cereulidmenge fast halb so hoch wie die des Wildtypstamms. Die essentielle Rolle der Proteine CesCD für den Cereulidbildungsprozess wurde somit bestätigt.



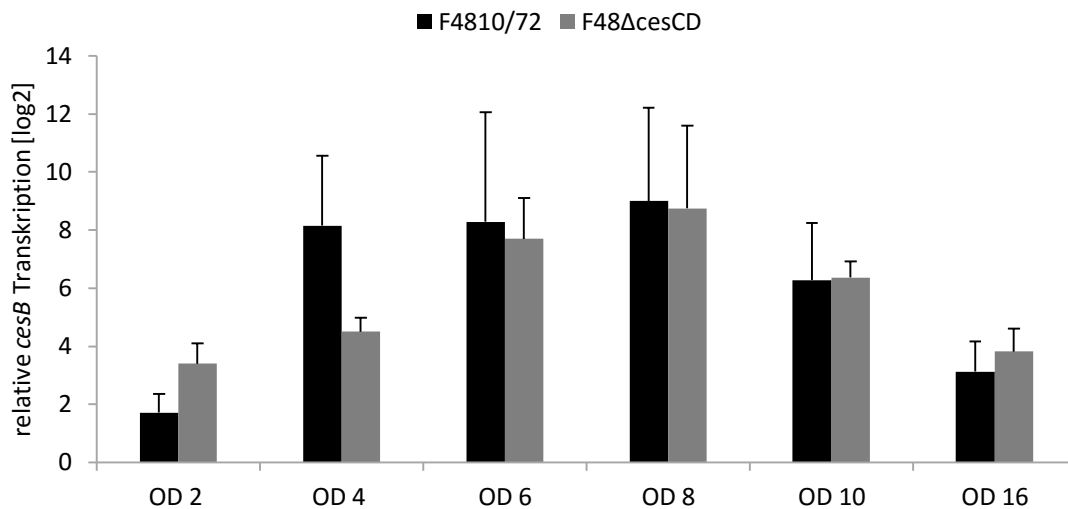


**Abb. 14:** Vergleich der Cereulidproduktion von Stamm F4810/72, der Deletionsmutante F48ΔcesCD und der Komplementationsmutante F48comCD zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen (OD<sub>600</sub> 4, 6, 8 und 10) sowie der stationären Wachstumsphase (24 h). Die Cereulidkonzentration wurde mittels UPLC-MS/MS-SIVA in ethanolischen Extrakten der Proben gemessen. Pro Stamm und Zeitpunkt wurden jeweils zwei unabhängige biologische Replikate analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Mit Sternchen (\*) angedeutet wurden die Positionen der Proben von der Deletionsmutante F48ΔcesCD in denen nur geringe bis keine Toxinkonzentrationen detektiert wurden.

### 2.5.3 Vergleich der Transkriptionsrate des Synthetasegens *cesB*

Zur Analyse, ob das Toxindefizit der Mutante F48ΔcesCD sich auf Transkriptionsebene der Cereulidsynthetasegene widerspiegelt, wurde die Transkriptmenge des Gens *cesB* mittels quantitativer Real-Time PCR gemessen. Für die Transkriptionsanalyse wurden der Wildtyp F4810/72 und die Mutante F48ΔcesCD zunächst in LB-Medium bei 30 °C kultiviert. Während des Wachstumsverlaufes wurden kontinuierlich Proben entnommen und die darin enthaltene RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und für die Bestimmung der Transkriptionsrate von *cesB* verwendet.

Es zeigte sich, dass im Wachstumsverlauf die *cesB* mRNA-Konzentrationen in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen anstiegen und nach ca. 8 bis 9 Stunden bei OD<sub>600</sub> 6 bis 8 ihr Maximum erreichten (Abb. 15). Generell konnten keine Unterschiede zwischen Mutante F48ΔcesCD und Stamm F4810/72 festgestellt werden. Die Transkription des Cereulidsynthetasegens *cesB* scheint in der Mutante somit nicht durch das Fehlen der Gene *cesC* und *cesD* beeinflusst zu sein. Die Ursache für das veränderte Cereulidproduktionsverhalten des Stammes F48ΔcesCD kann daher nicht durch die Transkription des Synthetasegens *cesB* begründet werden.

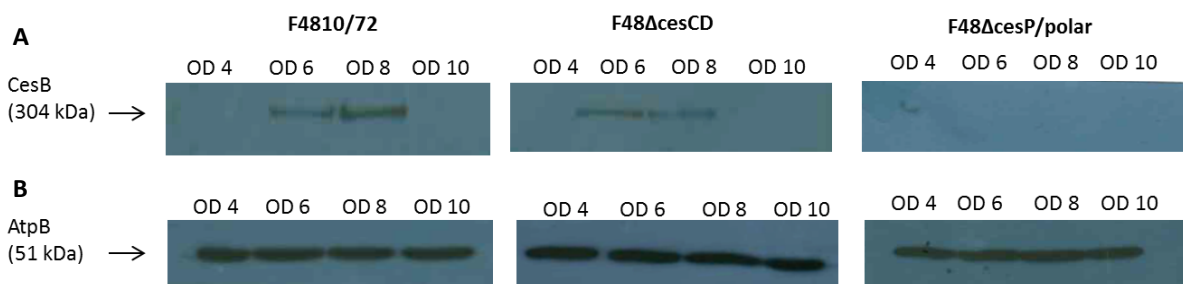


**Abb. 15:** Transkription des Cereulidsynthetasegens *cesB* im Stamm F4810/72 und der Deletionsmutante F48Δ*cesCD* über den Wachstumsverlauf von OD<sub>600</sub> 2 bis OD<sub>600</sub> 16. Die *cesB* mRNA Konzentrationen wurden mittels qPCR bestimmt und auf 16S *rrn* Werte der jeweiligen Probe normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus Datensätzen die für jeden Stamm aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten gewonnen wurden.

#### 2.5.4 Expressionsanalyse des Cereulidsynthetase-Moduls CesB1

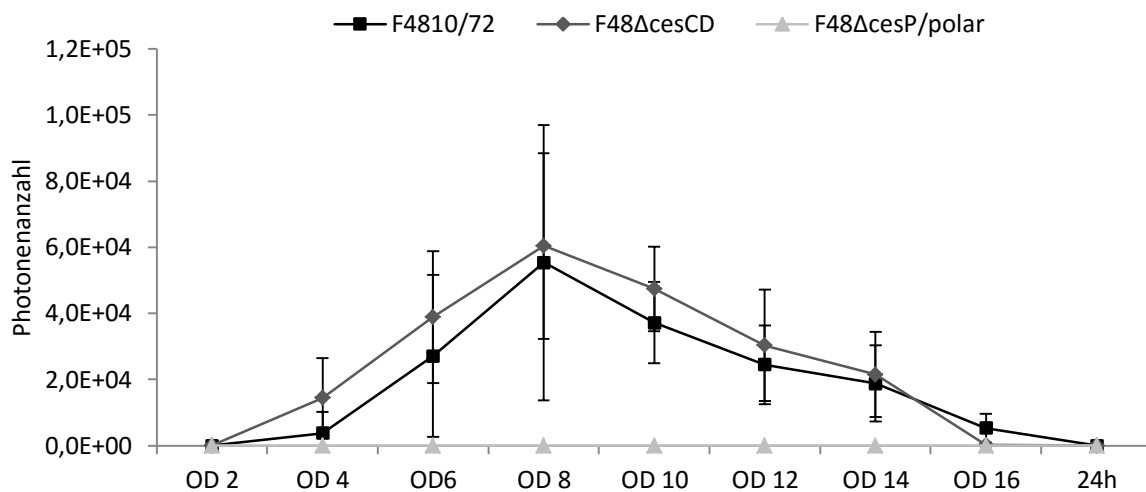
Nachdem der Stamm F4810/72 und die transporterdefiziente Mutante F48Δ*cesCD* keine Differenzen in der Transkription des *cesB* Gens aufwiesen (Kap. III. 2.5.3), wurde mittels des Western Blot Verfahrens die Expression der CesB1-Synthetaseuntereinheit im Wachstumsverlauf von beiden Stämmen verglichen. Es sollte überprüft werden, ob sich eventuell Unterschiede auf Ebene der Proteinexpression der Synthetase ergeben, die mit der mangelnden Cereulidproduktion in der Mutante in Zusammenhang gebracht werden könnten. Hierfür wurden der Stamm F4810/72 und die Mutante F48Δ*cesCD* in LB-Medium bei 30 °C kultiviert und nach Erreichen der OD<sub>600</sub> von 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 über einen Zeitraum von ca. 14 Stunden beprobt. Mit dem Stamm F48Δ*cesP/polar*, dessen Proben als Negativkontrollen eingesetzt werden sollten, wurde ebenfalls so verfahren. Alle gesammelten Proben wurden anschließend aufgeschlossen, die Zellen abzentrifugiert und der Proteingehalt der Überstände, welche der cytosolischen Zellfraktion entspricht, bestimmt. Von jeder Probe wurde eine Proteinmenge von 30 µg auf ein 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde dann mit dem monoklonalen Anti-CesB1 Primärantikörper und einem peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach der Behandlung der Membran mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Lichtemission der durch Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol mit einem Röntgenfilm detektiert (Abb. 16 A). Als Kontrolle, dass von jeder Probe die gleiche Menge an Gesamtprotein aufgetragen wurde, diente der Nachweis des in *B. cereus* kontinuierlich exprimierten Proteins AtpB (Abb. 16 B).

Das Kontrollprotein AtpB konnte bei allen Proben als vergleichbar dicke Bande detektiert werden. CesB hingegen wurde in den Proben des Wildtyps F4810/72 und der Mutante F48 $\Delta$ cesCD zu den Wachstumszeitpunkten OD<sub>600</sub> 6 und OD<sub>600</sub> 8 nachgewiesen. Hier zeigte sich eine deutliche Bande auf Höhe von ca. 300 kDa, was mit der berechneten Größe des CesB1-Moduls (304 kDa) gut übereinstimmt. Im Blot mit den Proben des Stammes F48 $\Delta$ cesP/polar wurden keine CesB-Banden sichtbar. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Spezifität des anti-CesB1 Antikörpers. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass CesB auch in der Deletionsmutante F48 $\Delta$ cesCD vergleichbar zum Wildtyp exprimiert wird.



**Abb. 16:** Western Blot Analyse zur Detektion des Cereulidsynthetasemoduls CesB1 und des Kontrollproteins AtpB (**B**) in Proben der Stämme F4810/72, F48 $\Delta$ cesCD und F48 $\Delta$ cesP/polar. Aufgetragen wurden je 30  $\mu$ g Gesamtprotein, die aus Proben von ausgewählten Zeitpunkten während der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 4, 6, 8, 10) isoliert wurden. Für jede Probe ist ein repräsentativer Western Blot von insgesamt drei unabhängigen Experimenten mit biologischen Replikaten gezeigt.

Um die CesB-Konzentrationen in den Proben von F4810/72 und F48 $\Delta$ cesCD auch quantitativ vergleichen zu können, wurden zusätzlich Slot Blots durchgeführt und die Signalstärke der resultierenden Banden quantifiziert. Die Membranen wurden in diesem Fall nach der Behandlung mit einem peroxidase-gekoppelten Anti-CesB1 Zweitantikörper entwickelt und die Lichtintensität der Banden mit Hilfe einer ICCD-Kamera gemessen. Als Negativkontrolle dienten erneut Proben des Stammes F48 $\Delta$ cesP/polar, bei denen sich kein Signal detekieren ließ (Abb. 17). Die höchste CesB-Lichtintensität und folglich CesB-Menge wurde in den Proben des Stammes F4810/72 und der Deletionsmutante D48 $\Delta$ cesCD von den Zeitpunkten OD<sub>600</sub> 6, 8 und 10 gemessen und schien bei einer OD<sub>600</sub> von 8 in beiden Stämmen am stärksten zu sein. Nach 24 Stunden zeigte sich kein detektierbares Signal mehr. Zwischen Wildtyp und F48 $\Delta$ cesCD waren keine signifikanten Differenzen in der produzierten CesB-Menge festzustellen. Es konnten also keine Unterschiede auf Translationsebene gefunden werden, welche Hinweise auf das veränderte Cereulidproduktionsverhalten von F48 $\Delta$ cesCD liefern könnten.

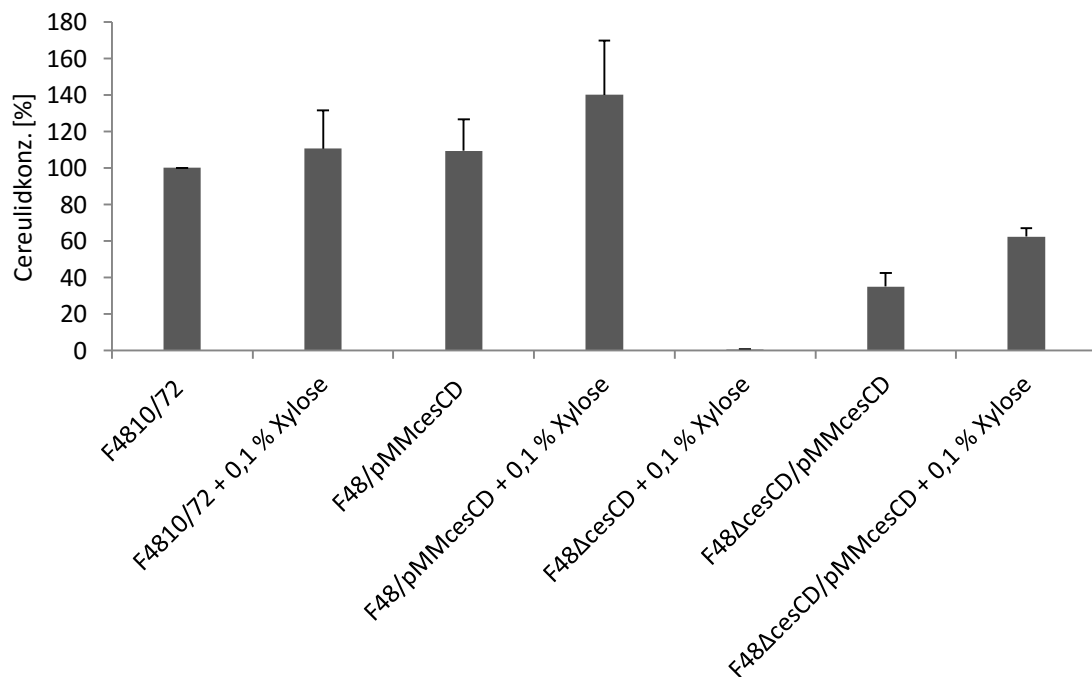


**Abb. 17:** Quantitativer Vergleich der CesB Expression zwischen den Stämmen F4810/72 und F48ΔcesCD sowie der Negativkontrolle F48ΔcesP/polar im Wachstumsverlauf. Mit je 25 µg/µl Gesamtprotein pro Probe wurden Slot Blots durchgeführt sowie die PVDF-Membran mit dem Anti-CesB und anschließend einem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper entwickelt. Das Lichtsignal der resultierenden Banden wurde mittels einer ICCD-Kamera detektiert und mit der Software Living Image 2.10 als Photonenzahl quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit biologischen Replikaten.

### 2.5.5 Cereulidproduktion von *cesCD* Überexpressionsmutanten

Zur weiteren Analyse, welche Rolle die Proteine CesC und CesD beim Cereulidproduktionsprozess übernehmen könnten, wurde untersucht, welchen Einfluss eine induzierte *cesCD* Überexpression auf die Toxinbildung hat. Dazu wurden die Gene *cesCD* in den Expressionsvektor pMM1522 hinter einen xyloseinduzierbaren Promotor kloniert. Das Plasmid pMMcesCD wurde im Anschluss in den Stamm F4810/72 und die Mutante F48ΔcesCD eingebracht und die Stämme entweder mit oder ohne Xylose kultiviert. Aus den Kulturen wurden nach 24 Stunden Proben entnommen und die darin enthaltenen Cereulidkonzentrationen mittels UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die alleinige Zugabe von 0,1 % Xylose zu den Kulturen von F4810/72 und F48ΔcesCD keinen Einfluss auf die Cereulidproduktion hatte (Abb. 18). Zusätzlich schien im Wildtypstamm F4810/72 die Existenz des nicht induzierten Vektors pMMcesCD keine signifikanten Auswirkungen auf das Cereulidbildungsverhalten zu haben. Bei der Mutante F48ΔcesCD/pMMcesCD hingegen zeigte sich auch ohne Induktion des Vektors ein Effekt und im Vergleich zur Deletionsmutante F48ΔcesCD konnte durch die Komplementation von *cesCD* die Toxinproduktion bereits auf eine Rate von 35 % Cereulid erhöht werden. Wurden die Gene *cesCD* dann durch die Zugabe von Xylose verstärkt transkribiert, schien dies sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante eine zusätzliche Steigerung der produzierten Cereulidmenge zur Folge zu haben. Für beide Stämme konnten in den Proben der induzierten Kulturen etwa 30 % mehr Cereulid nachgewiesen werden, als in den Proben der nicht

induzierten Kulturen. Allerdings schwankten die detektierten Toxinmengen, des mit 0,1 % Xylose kultivierten Stamms F48/pMMcesCD relativ stark (Abb. 18). Auch wenn der Effekt folglich nicht signifikant ist, scheint die Überexpression von CesC und CesD eine leicht gesteigerte Cereulidproduktion zu bewirken.

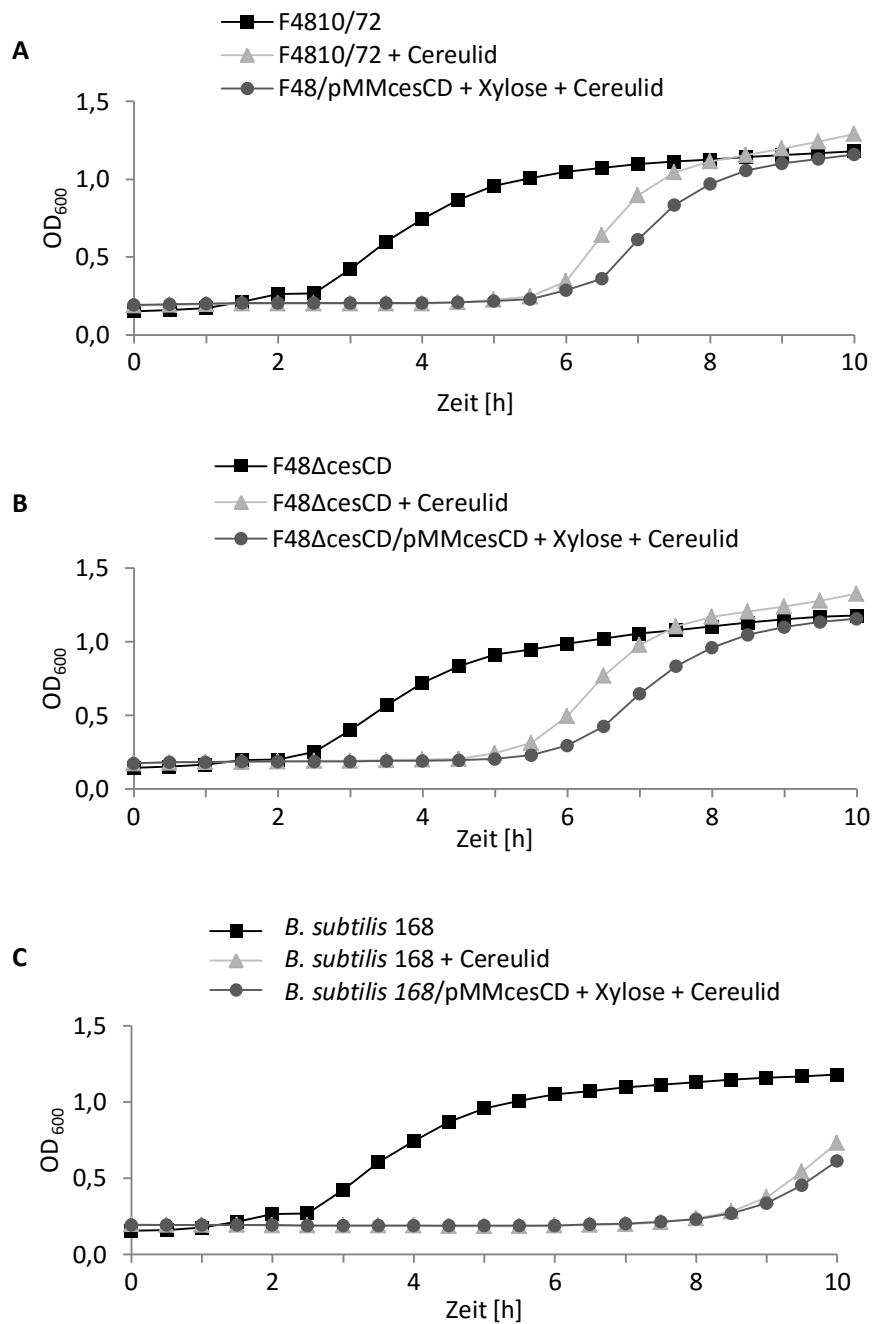


**Abb. 18:** Auswirkungen der mit 0,1 % Xylose induzierten *cesCD* Überexpression auf die Cereulidproduktion verschiedener *B. cereus* Stämme. Gezeigt sind die prozentualen Cereulidmengen, die mittels UPLC-MS/MS-SIVA in den Proben des Wildtypstammes F4810/72 und der Deletionsmutante F48ΔcesCD mit und ohne Überexpressionsvektor pMMcesCD gemessen wurden. Die Stämme wurden in LB-Medium entweder mit oder ohne 0,1 % Xylose kultiviert. Die gemessene Cereulidmenge in der Probe des Stamms F4810/72 wurde auf 100 % gesetzt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen mit biologischen Replikaten.

### 2.5.6 Einfluss von externem Cereulid in Zusammenhang mit dem potentiellen Transporter CesCD

Falls der potentielle Transporter CesCD eine Rolle beim Cereulidexport spielen sollte, wäre es auch denkbar, dass er ebenfalls zu einer Selbstimmunität des Toxinproduzenten gegenüber Cereulid beiträgt. Um dies zu überprüfen wurden mit den Stämmen *B. cereus* F4810/72, *B. cereus* F48ΔcesCD und *B. subtilis* 168 sowie den entsprechenden *cesCD* Überexpressionsmutanten F48/pMMcesCD, F48ΔcesCD/pMMcesCD und *B. subtilis* 168/pMMcesCD Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten mit Hilfe des Bioscreen Readers durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in BHI-Medium mit einem pH-Wert von 8,5 bei 30°C, entweder mit oder ohne Zugabe von reinem, in Ethanol gelöstem Cereulid.

Zu den Kulturen der Stämme, die den Überexpressionsvektor pMMcesCD enthielten, wurde zur Induktion zusätzlich 0,1 % Xylose in das Medium gemischt. Anhand mitgeführter Kontrollansätze wurde nachgewiesen, dass die alleinige Zugabe von Xylose oder Ethanol ohne darin gelöstes Cereulid keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Stämme hatte. Ohne Zusatzstoffe wuchsen alle getesteten Stämme ebenfalls vergleichbar (Daten nicht gezeigt). In Kulturen der Stämme F4810/72, F48ΔcesCD und *B. subtilis* 168 wurden zunächst unterschiedliche Cereulidkonzentrationen von 5,5 µg/ml bis 120 µg/ml eingesetzt, um den Effekt des Toxin auf das Wachstumsverhalten zu analysieren. Dabei bewirkten schon geringe Cereulidmengen von 11 bis 20 µg/ml bei *B. subtilis* 168 Kulturen eine Verlängerung der Lag-Phase von ca. 1 Stunde. Bei den *B. cereus* Stämmen F4810/72 und F48ΔcesCD hingegen waren bei diesen geringen Konzentrationen keine Einflüsse festzustellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Ab Konzentrationen von 60 µg/ml Cereulid zeigten sich dann nicht nur bei *B. subtilis* 168, sondern auch beim Wildtypstamm F4810/72 und der CesCD defizienten Mutante F48ΔcesCD verlängerte Lag-Phasen (Abb. 19). Die Verzögerung bis zum Beginn der exponentiellen Phase betrug bei den Stämmen F4810/72 und F48ΔcesCD ca. 3,5 Stunden und bei *B. subtilis* 168 bis zu 5 Stunden. *B. subtilis* 168 schien somit sensitiver auf Cereulid zu reagieren, als die beiden *B. cereus* Stämme F4810/72 und F48ΔcesCD, welche sich in ihrem Wachstumsverhalten insgesamt sehr ähnlich waren. Das Fehlen von CesCD in der Deletionsmutante F48ΔcesCD wirkte sich bei Anwesenheit von externem Cereulid nicht nachteilig auf das Wachstum aus. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CesCD bei allen Stämmen keine Wachstumsvorteile brachte. Sowohl die beiden *B. cereus* Stämme als auch der *B. subtilis* Stamm 168, die den pMMcesCD Überexpressionsvektor enthielten, reagierten auf die zugegebene Cereulidmenge ebenso mit einer verlängerten Lag-Phase, wie die entsprechenden Stämme ohne den Vektor (Abb. 19). Sowohl die cesCD Überexpression als auch das Fehlen der Proteine CesC und CesD zeigte mit oder ohne Zugabe von externem Cereulid unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten. Vermutlich übernehmen die Proteine also keine Schutzfunktion oder führen zur Immunität durch Toxinexport. Die Veränderung der Lag-Phase bei Anwesenheit von hohen Cereulidkonzentrationen scheint durch CesCD nicht beeinflusst zu werden.



**Abb. 19:** Einfluss von externem Cereulid und der *cesCD* Überexpression auf das Wachstum der *B. cereus* Stämme F4810/72 (**A**) und F48Δ*cesCD* (**B**) sowie des *B. subtilis* Stamms 168 (**C**). Die Kulturen wurden entweder mit oder ohne Cereulid [60 μg/ml] in BHI-Medium, pH 8,5 bei 30°C kultiviert. Im Medium der Stämme mit dem *cesCD* Überexpressionsvektor pMMcesCD war neben Cereulid [60 μg/ml] auch 0,1 % Xylose zur Induktion von *cesCD* enthalten. Die gezeigten Messwerte entsprechen Mittelwerten aus je vier unabhängigen Versuchsansätzen.

### 2.5.7 Vergleichende Transkriptomstudien von F4810/72 und F48 $\Delta$ cesCD

Da sich auf Transkriptions- und Expressionsebene für das Cereulidsynthetasegen *cesB* keine Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm F4810/72 und der Deletionsmutante F48 $\Delta$ cesCD ergaben, welche das unterschiedliche Toxinproduktionsverhalten der beiden Stämme begründen könnte (Kap. III. 2.5.3 und 2.5.4), wurden die kompletten Transkriptome beider Stämme mittels Next-Generation Sequencing analysiert. Hiefür wurden Kulturen vom Wildtypstamm F4810/72 und der Mutante F48 $\Delta$ cesCD in LB-Medium bei 30°C bis zum Wachstumszeitpunkt OD<sub>600</sub> 8 kultiviert und die Proben für die RNA-Sequenzierung präpariert. Insgesamt wurden für jeden Stamm zwei unabhängige Transkriptomsequenzierungen ausgehend von zwei unabhängig angezogene Kulturen durchgeführt. Bei der Datenauswertung galt ein Gen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp F4810/72 als signifikant hoch oder runter reguliert, wenn der logFC Wert  $\geq 2$  bzw.  $\leq -2$  und der p-Wert  $\leq 0,05$  war. Die Auswertung der Ergebnisse des ersten Sequenzierlaufs ergab, dass für insgesamt 270 chromosomal codierte Gene diese Kriterien erfüllt waren, von denen 110 in der Mutante F48 $\Delta$ cesCD im Vergleich zum Wildtyp F4810/72 hoch und 160 Gene runter reguliert waren. Nach der zweiten Sequenzierung konnten anhand diesen Richtlinien nur noch 61 chromosomale Gene identifiziert werden, von denen 20 in der Mutante hoch und 41 Gene runter reguliert waren. Als Schnittmenge beider Sequenzierungen resultierten 20 Gene (Tab. 13). Davon waren in der *cesCD* defizienten Mutante im Vergleich zum Stamm F4810/72 fünf signifikant hoch reguliert. Drei dieser fünf Gene (BCAH187\_A1153, BCAH187\_A1160 und BCAH187\_A1166) sind nicht annotiert und codieren für hypothetische Proteine, während die anderen beiden (BCAH187\_A5459 und BCAH187\_A5460) für eine mögliche ABC-Transporter-Permease sowie ein ABC-Transporter ATP-Bindeprotein codieren. Die BLAST-Analyse der Proteine ergab, dass die Aminosäuresequenz der Permease keine Homologie zu CesD oder anderen Permeasen des Stamms F4810/72 aufweist, aber durchaus homologe Proteine in anderen *B. cereus* und *B. thuringiensis* Stämmen vorhanden sind. Das ABC-Transporter ATP-Bindeprotein ist identisch zu einem Bacitracin ABC-Transporter ATP-Bindeprotein aus einigen *B. cereus* Stämmen und der Gensequenzvergleich von BCAH187\_A5460 mit *cesC* resultierte in einer Sequenzidentität von 31 %. Die BLAST Recherche der drei nicht annotierten Gene ergab, dass BCAH187\_A1153 für ein Protein codieren könnte, welches von *B. cereus* und *B. thuringiensis* allgemein bei Stress produziert wird. Das Gen BCAH187\_A1160 scheint für ein Bacterioferritin zu codieren, welches in *B. cereus* als auch *B. thuringiensis* vorkommt (99 % Gleichheit). Zum Produkt des Genes BCAH187\_A1166 konnten keine aufschlussreichen Informationen gefunden werden. Unter den in der Mutante signifikant runter regulierten Genen konnten zwei identifiziert werden, die in *B. cereus* für ATP-Bindeproteine von Antibiotikaresistenz-ABC-Transportern codieren (BCAH187\_A1033, BCAH187\_A1034), sowie



ein Gen (BCAH187\_A1024), das für ein ABC-Transporter Substrat-Bindeprotein codiert und 98 % Ähnlichkeit zu einem periplasmatischen Oligopeptid-Bindeprotein (OppA) aus *B. cereus* zeigte. Zwei weitere in der *cesCD* Deletionsmutante runter regulierten Gene spielen wohl im Cystein-Transport eine Rolle (BCAH187\_A1035 und BCAH187\_A1037). Es handelt sich hierbei um ein Cystein-Transportsystem Substrat-Bindeprotein und ein Cystein-Transportsystem ATP-Bindeprotein. Zudem wurden ein Gen für eine Glutamat Racemase (BCAH187\_A1031) und zwei Gene, deren Produkte in den Thiaminmetabolismus eingegliedert sind (BCAH187\_A0884, BCAH187\_A0887) als reguliert eingestuft. Der deutlichste Unterschied der Transkriptome von Stamm F4810/72 und der *cesCD* defizienten Mutante zeigte sich bei dem Gen BCAH187\_A1052, welches für eine Fettsäure-CoA-Ligase codiert. Die Mutante wies für dieses Gen kein Transkript auf, wohingegen in den Proben des Wildtypstammes F4810/72 die höchste Anzahl an Read Counts zu verzeichnen war (1 Sequenzierung: 240 Read Counts; 2. Sequenzierung: 679 Read Counts). Interessanterweise ergab die Transkriptomauswertung der auf dem Plasmid pCer270 lokalisierten 273 Gene, abgesehen von den in der Deletionsmutante nicht vorhandenen Genen *cesC* und *cesD*, keine signifikanten Unterschiede zwischen F4810/72 und F48 $\Delta$ *cesCD*. Insgesamt betrachtet zeigten sich bei der vergleichenden Transkriptomsequenzierung, dass die Transkriptome der Stämme F4810/72 und F48 $\Delta$ *cesCD* relativ identisch sind und nur wenige Gene signifikant sowie unterschiedlich transkribiert werden. Die 20 regulierten Gene, die hier identifiziert wurden, konnten vorerst keine offensichtlichen Hinweise zur Aufklärung der Funktion von *CesCD* oder des Cereulid-negativen Phänotyps von F48 $\Delta$ *cesCD* liefern.

**Tab. 13:** Ergebnisse zweier NGS-Transkriptomsequenzierungen von *B. cereus* F4810/72 und F48ΔcesCD, die mit je zwei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt wurden. Gezeigt sind die 20 signifikant regulierten Gene (logFC Wert  $\geq 2$  bzw.  $\leq -2$  und der p-Wert  $\leq 0,05$ ), welche die Schnittmengen der ersten und zweiten Sequenzierung darstellen. Die fünf in der Mutante F48ΔcesCD hoch regulierten Gene sind grau hinterlegt.

Gen	1. Transkriptomsequenzierung			2. Transkriptomsequenzierung			Annotation
	RPKM <sup>a)</sup>	RPKM <sup>a)</sup>	logFC <sup>b)</sup>	RPKM <sup>a)</sup>	RPKM <sup>a)</sup>	logFC <sup>b)</sup>	
	Stamm	Stamm		Stamm	Stamm		
F4810/72	F48ΔcesCD	F4810/72	F48ΔcesCD				
BCAH187_A0884	12	0	-6	28	1	-3	Glycin Oxidase
BCAH187_A0887	18	2	-3	56	2	-4	ThiF/MoeB-ähnliches Protein
BCAH187_A1024	20	0	-7	28	0	-7	mögliches ABC-Transporter Substrat-Bindeprotein
BCAH187_A1031	43	0	-7	43	0	-8	Glutamat Racemase
BCAH187_A1033	64	0	-7	64	0	-9	ABC-Transporter Permease/ ATP-Bindeprotein
BCAH187_A1034	20	0	-7	68	0	-9	ABC-Transporter Permease/ ATP-Bindeprotein
BCAH187_A1035	20	0	-7	40	0	-8	Aminosäure ABC-Transporter/ Aminosäure-Bindeprotein
BCAH187_A1037	11	0	-6	29	0	-7	Aminosäure ABC-Transporter/ ATP-Bindeprotein
BCAH187_A1043	45	0	-8	130	0	-10	mögliches Protein
BCAH187_A1048	11	0	-6	15	0	-6	3-Methyladenin DNA Glycosylase
BCAH187_A1051	9	0	-6	31	0	-7	Coproporphyrinogen III Oxidase
BCAH187_A1052	240	0	-11	679	0	-12	langkettige Fettsäure-CoA-Ligase
BCAH187_A1153	19	68	2	3	0	2	mögliches Protein
BCAH187_A1160	35	160	3	110	165	2	mögliches Protein
BCAH187_A1166	0	9	7	6	12	2	mögliches Protein
BCAH187_A1981	97	22	-2	225	29	-2	Chlorohydrolase
BCAH187_A4508	84	2	-5	78	10	-2	mögliches Protein
BCAH187_A5167	37	4	-3	85	5	-3	Transporter der Major-Facilitator Familie
CAH187_A5459	21	188	4	90	135	2	mögliche ABC-Transporter Permease
BCAH187_A5460	50	445	4	162	285	2	ABC-Transporter ATP-Bindeprotein

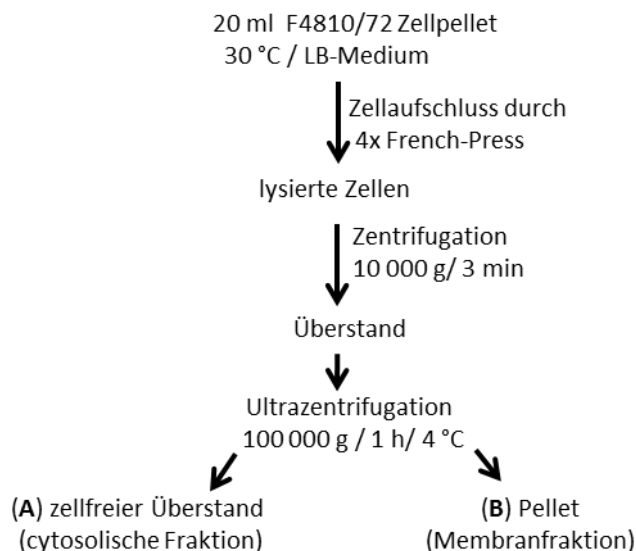
<sup>a)</sup> RPKM: Reads pro Kilobase pro eine Million gemappte Reads

<sup>b)</sup> logFC: log2FoldChange: relatives Transkriptionslevel= Transkriptionslevel von F4810/72 im Vergleich zu F48ΔcesCD

## 2.6 Untersuchungen zur Lokalisation der Cereulidsynthetase

### 2.6.1 Detektion der Synthetase in Zellfraktionen im Wachstumsverlauf

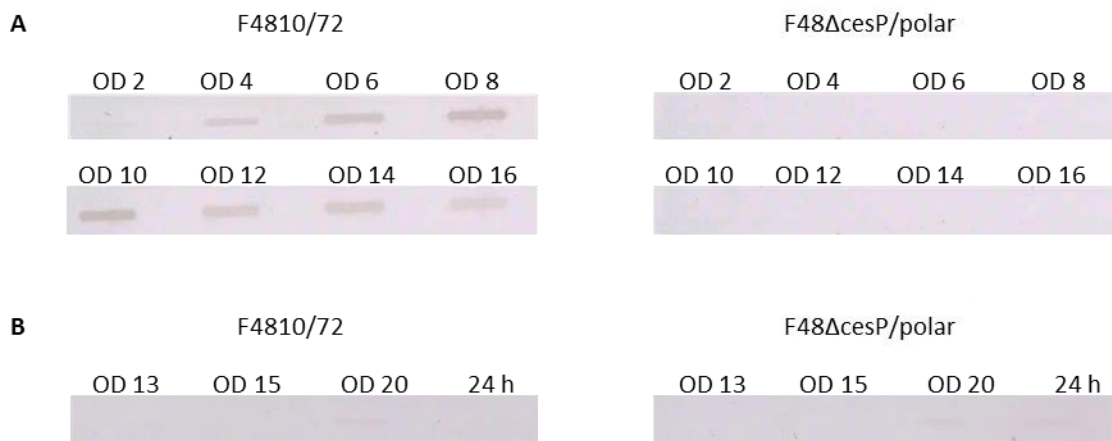
Um Erkenntnisse über eine mögliche Interaktion des möglichen Transporters CesCD mit der Cereulidsynthetase zu gewinnen, die entscheidend für die Cereulidproduktion sein könnte, wurde die zelluläre Lokalisation des Enzymkomplexes untersucht. Insbesondere sollte dabei analysiert werden, ob die Synthetase im Wachstumsverlauf möglicherweise verstärkt an der Membran und somit in der Nähe der in der Zellmembran verankerten Permease CesD zu finden ist. Für den Versuch wurden verschiedene Zellfraktionen von Stamm F4810/72 hergestellt und mittels spezifischem Anti-CesB1 Antikörper und dem Slot Blot Verfahren auf das Vorhandensein des Cereulidsynthetasemoduls CesB1 getestet. Als Negativkontrolle dienten wiederum Proteinproben der Cereulid-negativen Mutante F48 $\Delta$ cesP/polar. Während der Kultivierung beider Stämme wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Wachstumsverlauf Proben entnommen und nach Zellaufschluss und differentieller Zentrifugation zum einen cytosolische Proteinfractionen und zum anderen Membranfraktionen gewonnen (Abb. 20).



**Abb. 20:** Verfahren zur Herstellung der cytosolischen Proteinfraction und der Membranfraktion. Die fraktionierten Proben wurden anschließend mittels Slot Blot Verfahren auf Vorhandensein der Cereulidsynthetaseuntereinheit CesB1 überprüft.

Die Analyse der Slot Blots von F4810/72 zeigte, dass sich CesB nur in den Proben der cytosolischen Fraktion, welche in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  4 bis 16) gewonnen wurden, nachweisen lässt und sich bei  $OD_{600}$  8 ein Expressionspeak zeigt (Abb. 21 A). In den Proben der Membranfraktionen konnte dagegen zu keinem der gewählten Wachstumszeitpunkte ( $OD_{600}$  13 bis 20 und nach 24 h) CesB detektiert werden (Abb. 21 B). Wie erwartet wurden in allen Proben der

Negativkontrolle F48 $\Delta$ cesP/polar keine positiven Signale detektiert. Es besteht folglich die Vermutung, dass die Cereulidsynthetase in der exponentiellen Wachstumsphase intrazellulär im Cytosol vorliegt und auch zu späteren Wachstumszeitpunkten nicht fest mit der Zellmembran verbunden ist.



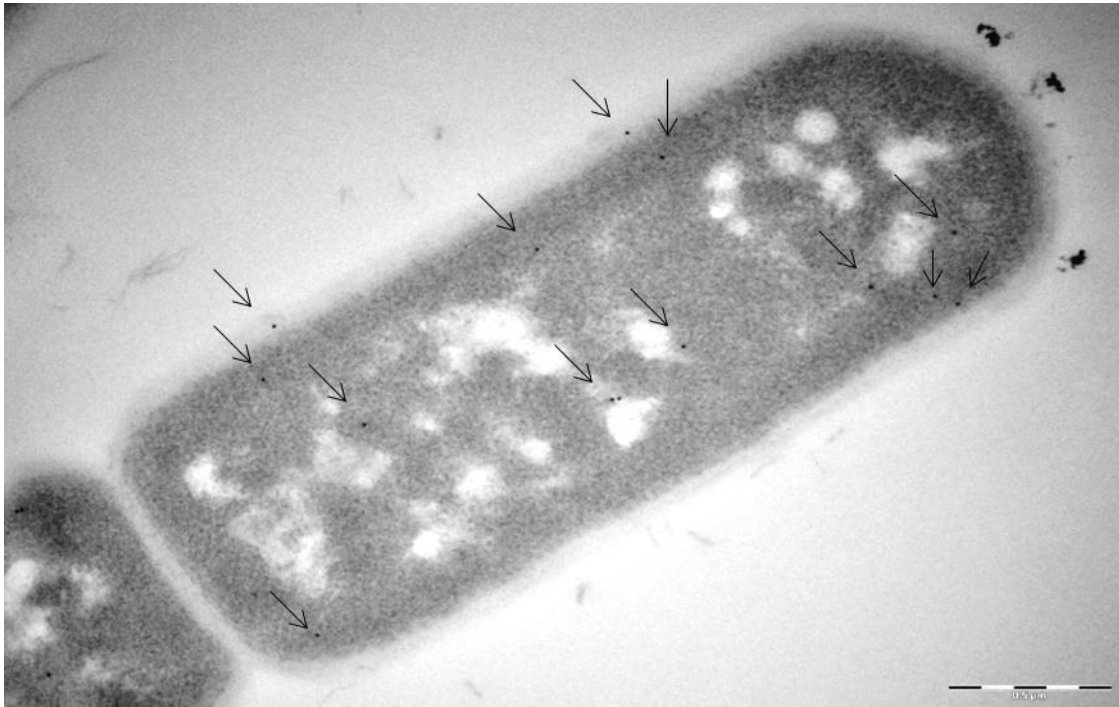
**Abb. 21:** Slot Blot Analyse zum Nachweis der Cereulidsynthetaseuntereinheit CesB1 in der cytosolischen Proteinfraction (**A**) und der Membranfraction (**B**) von *B. cereus* F4810/72 und F48 $\Delta$ cesP/polar. Aufgetragen wurde pro Slot je 25  $\mu$ g/ $\mu$ l Gesamtprotein, das aus Kulturproben zu verschiedenen Zeitpunkten (OD<sub>600</sub> 2 bis 20 und nach 24 h) während des Wachstumsverlaufs gewonnen wurde. Gezeigt sind repräsentative Slot Blot Ergebnisse von insgesamt drei unabhängigen Versuchen, für die jeweils unabhängig gewonnene Proteinproben der beiden Stämme verwendet wurden.

### 2.6.2 Immunogoldlokalisation der Cereulidsynthetase

Neben dem Nachweis des Cereulidsynthetasemoduls CesB1 in verschiedenen Zellfraktionen mit Hilfe von Immunoblots, wurde zusätzlich die Methode der Immunogoldlokalisation angewendet, um die zelluläre Position der Synthetase mittels Transelektronenmikroskopie zu erfassen. Hierfür wurden von Zellen des emetischen Stammes F4810/72 und des „emetic-like“ *B. cereus* Stammes ATCC 10987 Präparate hergestellt. Stamm ATCC 10987 diente als Negativkontrolle, da dieser zwar auch ein Megaplasmid besitzt, darauf aber kein *ces* Operon lokalisiert ist. Nach der Kultivierung bis OD<sub>600</sub> 8 wurden die vegetativen Zellen der Stämme mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, anschließend mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen dehydriert und mit Uranylacetat kontrastiert. Nach dieser Präparation konnten die Zellen in LR-White eingebettet werden.

Von den gewonnenen LR-White Blöcken wurden Ultradünnschnitte (65 nm) angefertigt und die Zellen in den Dünnschnitten dann mit dem monoklonalen CesB1 Antikörper sowie einem goldgekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Anschließend erfolgte die Betrachtung der Präparate unter dem Elektronenmikroskop (Abb. 22). Insgesamt wurde die Goldpartikelverteilung in

35 Zellen des Stamms F4810/72 analysiert, die von Aufnahmen zweier unabhängig voneinander präparierter Schnitte stammten.



**Abb. 22:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellpräparates des Stamms F4810/72. Maßstab 0,5  $\mu\text{m}$ . Die Zellquerschnitte wurden mit dem monoklonalen Primärantikörper gegen die Synthetaseuntereinheit CesB1 und einem immunogoldgelabelten Sekundärantikörper behandelt. Die 10 nm großen Goldpartikel erscheinen aufgrund ihrer hohen Elektronendichte als schwarze Punkte und wurden mit Pfeilen markiert.

Vom Kontrollstamm ATCC 10987 wurden elf Zellen analysiert, die sich auf Schnitten befanden, welche alle mit einer 1:100 verdünnten Primärantikörperlösung behandelt worden waren. Die Spezifität der Antikörperbindung zeigte sich zum einen dadurch, dass kaum Goldpartikel außerhalb der Zellen des Stamms F4810/72 gefunden wurden und auch auf Schnitten von Zellen des Stammes F4810/72, die nur mit dem gold-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt wurden, keine Goldpartikel sichtbar waren. In der Kontrollgruppe konnten zwar auch Goldpartikel auf den Zellquerschnitten der Negativkontrolle ATCC 10987 detektiert werden, doch mit einer durchschnittlichen Anzahl von zwei Partikeln pro Zelle und einer dazugehörigen Standardabweichung von zwei schien es sich hierbei um unspezifische Bindungen zu handeln.

In den Zellen des Stamms F4810/72 konnten insgesamt 139 Goldpartikel detektiert werden, 128 der Partikel befanden sich im Cytosol und elf an der Membran. Somit wurden 92 % der Goldpartikel im Cytosol lokalisiert, was ein weiterer Hinweis darauf sein könnte, dass sich die CesB Synthetaseuntereinheit zum Wachstumszeitpunkt  $\text{OD}_{600}$  8 vorwiegend im Cytosol und nicht an der Membran befindet (Tab. 14).

**Tab. 14:** Zusammenfassung der ausgezählten Goldpartikel zur Lokalisation der Cereulidsynthetase-untereinheit CesB1. Präparate der Stämme F4810/72 und ATCC 10987 wurden mit einem 1:100 verdünnten CesB1 Primärantikörper sowie einem immunogoldgelabelten Sekundärantikörper behandelt und elektronenmikroskopisch analysiert.

<b>F4810/72</b>	<b>gesamt</b>	<b>Position Goldpartikel</b>	
		<b>Cytosol</b>	<b>Membran</b>
Summe Goldpartikel in 35 Zellen	139	128	11
Durchschnittliche Anzahl Goldpartikel pro Zelle	4 ± 2	4 ± 2	0,3 ± 0,5
<b>ATCC 10987</b>			
Summe Goldpartikel in 11 Zellen	23	17	4
Durchschnittliche Anzahl Goldpartikel pro Zelle	2 ± 2	2 ± 2	0,4 ± 0,8

Dennoch bestand die Vermutung, dass sich die Cereulidsynthetase womöglich im späteren Wachstumsverlauf verstärkt in Membrannähe detektieren lässt und dort eventuell mit dem Transporter CesCD interagiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden von Stamm F4810/72 zusätzlich zu den Präparaten von OD<sub>600</sub> 8 auch Präparate von den späteren Wachstumszeitpunkten OD<sub>600</sub> 12 und 16 hergestellt. Ebenso verfahren wurde mit Proben des Stammes F48ΔcesCD. Leider war es nicht möglich, die gewonnenen Präparate so zu behandeln, dass ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden konnte. Es erfolgten zahlreiche Versuche mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen, aber entweder konnten keine oder zu viele unspezifisch gebundene Goldpartikel auf den Schnitten gefunden werden. Um die unspezifischen Bindungen zu reduzieren, wurde versucht die Anzahl und Länge der Waschschriffe zwischen den Inkubationen mit den Antikörpern zu erhöhen. Desweiteren wurde getestet, ob sich unspezifische Antikörperbindung mit Ziegenalbumin statt des verwendeten Rinderserumalbumins verhindern lassen. Es zeigte sich jedoch durch keine Variation der Präparationsbedingungen ein gewünschter Erfolg, sodass eine Auswertung dieser Präparate nicht möglich war.

---

## IV. Diskussion

### Teil I

#### 1.1 Erfolgreiche Anwendung einer neuen UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode zur Analyse des Cereulidproduktionsverhaltens von 77 emetischen *B. cereus* Stämmen

Die Anzahl der gemeldeten Erkrankungen, die allgemein durch *B. cereus* verursacht wurden, hat in den letzten Jahren zugenommen. Lag die Rate der in Europa auftretenden Fälle 2007 noch bei 1062, so wurden 2012 bereits 2022 Erkrankungen registriert (Anonymous, 2009; Anonymous, 2014). Neben den Enterotoxinen birgt das emetische Toxin Cereulid ein hohes Gefahrenpotential für Lebensmittelvergiftungen. Stetig wird von größeren Ausbrüchen berichtet, die durch Aufnahme von kontaminierter Nahrung ausgelöst wurden (Delbrassinne *et al.*, 2015; Kamga Wambo *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014). Dabei verlaufen nicht alle Intoxikationen mild und es sind auch Fälle bekannt, in denen Patienten innerhalb von 7 bis 13 Stunden nach Verzehr einer mit Cereulid belasteten Mahlzeit verstarben oder beispielsweise nur durch eine Lebertransplantation gerettet werden konnten (Dierick *et al.*, 2005; Saleh *et al.*, 2012; Tschiedel *et al.*, 2014). Im Hinblick auf eine präzise Diagnose und eine wirksame Behandlung werden zuverlässige Cereuliddetektionsmethoden benötigt. Nicht nur in der Klinik, sondern auch in der Lebensmittelindustrie besteht Bedarf an einer Cereulidnachweismethode, mit der es möglich ist in kurzer Zeit eine hohe Anzahl von Proben zu kontrollieren. Bei Verdachtsfällen oder Reklamationen von Nahrungsmitteln könnte so umgehend eine Risikoanalyse durchgeführt und im Ernstfall rasch gehandelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine neu entwickelte UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode angewendet, um eine große Probenanzahl, nämlich 77 emetischen *B. cereus* Stämmen hinsichtlich der produzierten Cereulidmenge zu untersuchen (Kap. III. 1.2). Im Vergleich zu einer exakten Cereulidquantifizierungstechnik, wie zum Beispiel der HPLC-MS/MS-SIVA nach Bauer *et al.*, 2010 war es hierbei nicht erforderlich, die Proben mit aufwendig herzustellendem, internem Standard zu versetzen. Außerdem wurde keine Kalibriergerade benötigt, was bei anderen biologischen oder massenspektrometrischen Cereuliddetektionsmethoden unabdingbar ist, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten (Bauer *et al.*, 2010; Finlay *et al.*, 1999). Hinsichtlich des Zeitaufwands, der für die Probenvorbereitung investiert werden muss, bringt die neue UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode somit einen deutlichen Vorteil. Darüber hinaus war es mit dieser Messtechnik möglich Cereulid direkt nachzuweisen und nicht nur indirekt, wie es bei biologischen Detektionsmethoden mit unterschiedlichen Zelltypen, wie HEp-2 Zellen, Rattenleberzellen oder Eberspermien der Fall ist (Finlay *et al.*, 1999; Hoornstra *et al.*, 2003; Kawamura-Sato *et al.*, 2005). Allerdings erfolgt bei der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode keine exakte Toxinquantifizierung, sondern die detektierte

Cereulidmenge kann nur anhand der Cereulidpeakfläche im Chromatogramm der Messung semiquantitativ abgeschätzt werden (Stark *et al.*, 2013). Die UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode ist dennoch ausreichend, um relativ schnell zu ermitteln, ob und welche Cereulidmengen sich im Untersuchungsmaterial befinden. Im Rahmen dieser Arbeit war es mit Hilfe der neu etablierten Messtechnik möglich, die gebildeten Toxinmengen in den Proben der 77 *B. cereus* Stämmen zu vergleichen und sie hinsichtlich ihres Cereulidbildungsvermögens zu klassifizieren. In Extrakten von 11 der insgesamt 77 Stämme wurden auf diese Weise keine bis geringe, in den Proben von 46 weiteren Stämmen mittlere und in Proben von 20 Stämmen hohe Cereulidmengen gemessen. Folglich konnten sowohl geringe als auch hohe Toxinkonzentrationen mit Hilfe der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Messmethode zuverlässig detektiert werden. Zusätzlich wurde anhand der Analyseergebnisse deutlich, dass die untersuchten Stämme eine hohe Varianz bezüglich ihres Cereulidproduktionsverhaltens aufweisen. Diese Beobachtung kann durch andere Studien belegt werden, in denen verschiedene emetische *B. cereus* Stämme ebenfalls deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Cereulidbildungseigenschaft aufzeigten, obwohl die Stämme unter identischen Bedingungen kultiviert wurden (Andersson *et al.*, 2004; Carlin *et al.*, 2006; Rajkovic *et al.*, 2006). Die genauen Hintergründe, mit denen sich das unterschiedliche Cereulidbildungsverhalten emetischer *B. cereus* erklären ließe, sind aber noch weitgehend unbekannt. In einer anderen Studie konnte bereits nachgewiesen werden, dass die gemessenen Raten an *cesA*-, *cesB*- und *cesP*- Transkripten in Proben eines Stammes mit geringer Cereulidproduktion erheblich niedriger waren als in Proben des mittelstarken Cereulidproduzenten F4810/72, obwohl die DNA-Sequenzen der *ces* Loci beider Stämme nahezu identisch waren (Dommel *et al.*, 2011). Da außerdem bekannt ist, dass die Cereulidbiosynthese durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Spo0A, AbrB und CodY sehr eng kontrolliert wird, könnten die unterschiedlichen *ces* Transkriptionsprofile von Hoch- und Niedrigproduzenten auf Unterschiede in der Transkriptionskontrolle zurückzuführen sein (Frenzel *et al.*, 2012; Lücking *et al.*, 2009b). Eventuell unterscheiden sich die Transkriptionsfaktoren verschiedener emetischer Stämme in ihrer DNA-Sequenz oder den Synthesemengen. Hinweise hierzu könnten Genomsequenzierungen von *B. cereus* Stämmen mit unterschiedlichem Cereulidbildungspotential liefern.

Zur Validierung der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Cereuliddetektionsmethode wurden Proben von neun ausgewählten Stämmen (vier Geringproduzenten, ein mittlerer und vier starke Cereulidbildner) zusätzlich mittels HPLC-MS/MS-SIVA vermessen, um die in den Proben enthaltenen Cereulidmengen genau zu quantifizieren und die Klassifizierung der Stämme zu überprüfen. Die tatsächlichen Cereulidmengen, die mittels HPLC-MS/MS-SIVA in den Proben quantifiziert wurden, korrelierten gut mit der Einteilung der Stämme nach ihrem Toxinbildungsvermögen, die anhand der



UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode durchgeführt worden war. Zudem wurden die Proben der neun Stämme auch mittels des HEp-2 zellbasierten Cereuliddetektionstests untersucht, um einen Vergleich eines biologischen Quantifizierungsassays mit einer massenspektroskopischen Messmethode durchzuführen. Auch hier zeigte sich, dass die Cereulidmengen in den ethanolischen Extrakten der Proben, die mit der HPLC-MS/MS-SIVA bestimmt wurden, relativ gut mit den Toxinkonzentrationen übereinstimmten, die anhand des HEp-2 Tests in den Kulturproben ermittelt wurden (Kap. III. 1.4). In ähnlichen Vergleichsanalysen zwischen einer biologischen und chemischen Cereuliddetektionsmethode ergaben sich ebenfalls gute Korrelationen der Testergebnisse (Hägglom *et al.*, 2002; Jaaskelainen *et al.*, 2004). Somit waren alle in dieser Arbeit angewendeten methodischen Ansätze gut geeignet, um Cereulid zu detektieren und quantifizieren. Auffallend war jedoch, dass bei den Quantifizierungsmethoden (HPLC-MS/MS-SIVA und HEp-2 Test) in Wiederholungsmessungen mit biologisch unabhängigen Proben eines Stammes oftmals größere Abweichungen in der gemessenen Cereulidkonzentrationen von bis zu 40 % auftraten (Kap. III. 1.4). Diese Unterschiede bei den detektierten Cereulidmengen können verschiedene Ursachen haben. Einerseits wäre es möglich, dass leichte Schwankungen durch die Messgeräte bedingt sind. Auf der anderen Seite ließen sich Abweichungen dadurch erklären, dass bei Bakterienkulturen heterogene Expressionsmuster für Sekundärmetabolite, wie Toxine existieren und somit nicht immer die gleiche Anzahl an Zellen einer Kultur dazu befähigt ist diese Stoffe zu produzieren. Für *B. subtilis* konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass nur eine geringe Anzahl an Zellen einer Kultur das ebenfalls nichtribosomal synthetisierte Molekül Surfactin produzieren. Schwankt die Zahl der produzierenden Zellen in verschiedenen Kulturen, so ergaben sich folglich auch Unterschiede in der gebildeten Surfactinmenge (Lopez *et al.*, 2009b). Hinweise für dieses Phänomen der sogenannten Bistabilität gibt es ebenfalls für *B. cereus* in Bezug auf die Cereulidproduktion (Frenzel, 2011).

### **1.2 Einfluss des Kultivierungsmediums auf das stammspezifische Cereulidbildungsvermögen**

Es existieren bereits einige Studien, die zeigen, dass Wachstumsparameter und externe Faktoren, wie Nährstoffangebot, Sauerstoffversorgung oder Temperatur deutliche Auswirkungen auf die Cereulidbildung haben (Agata *et al.*, 1999; Dommel, 2008; Hägglom *et al.*, 2002; Jaaskelainen *et al.*, 2004). Um den Einfluss des Mediums auf die Cereulidproduktionsfähigkeit der neun *B. cereus* Stämme des kleinen Stammsets zu überprüfen und zu testen, ob sich die Stämme dann noch in die ursprüngliche Klassifikation einfügen lassen, wurden die Cereulidmengen, welche die Stämme nach Kultivierung in vier unterschiedlichen Medien gebildet hatten, verglichen (Kap. III. 1.4). Bei der Gegenüberstellung der Messergebnisse, die sich aus der Analyse der Proben aus LB- und

LB<sub>80</sub>-Medium ergaben, zeigte sich deutlich, dass sich die um 0,5 % verminderte Salzkonzentration und die Zugabe von 0,2 % Glucose in LB<sub>80</sub>-Medium förderlich auf die Cereulidproduktion auswirkten, da alle neun Stämme unter diesen Bedingungen deutlich mehr Toxin bildeten (Abb. 7A). Ein Effekt durch Glucosezugabe zeigte sich ebenfalls in anderen Arbeiten, in denen aber auch demonstriert wurde, dass Glucose sich nicht nur positiv auf die Toxinbildung auswirkte. So wurde deutlich, dass Konzentrationen ab 2 % zur Runterregulation der *ces* Gentranskription bei *B. cereus* Stamm F4810/72 führte, was wiederum eine verminderte Cereulidproduktion in der exponentiellen Wachstumsphase zur Folge hatte (Agata *et al.*, 1999; Dommel, 2008; Lücking, 2009). Wie genau Glucose jedoch Einfluss auf den Cereulidbildungsprozess nimmt, ist nicht bekannt. Neben Glucose scheint auch der Na<sup>+</sup>-Ionen-Gehalt einen Effekt auf die Cereulidsynthese zu haben, was auch aus anderen Studien ersichtlich wird (Apetroaie-Constantin *et al.*, 2008; Dommel, 2008; Dommel *et al.*, 2011).

Beim Vergleich der Toxinmengen nach Kultivierung auf zwei unterschiedlichen Festmedien zeigte sich, dass die Stämme mehr Cereulid auf TSA- als auf Blut-Agar produzierten (Abb. 8). Die ursprüngliche Einstufung der neun Stämme in Hoch-, Mittel- und Niedrigproduzenten konnte unter diesen Wachstumsbedingungen für sechs Stämme bestätigt werden, während sich bei drei Stämmen Abweichungen bei der Klassifizierung ergaben (Tab. A2). Der emetische Referenzstamm F4810/72 bildete im Vergleich zu Hochproduzent Stamm 43 und Niedrigproduzent Stamm 30 unter allen getesteten Kultivierungsbedingungen mittlere Mengen an Toxin. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien erbracht, in denen sich Stamm F4810/72 verglichen mit den anderen getesteten Stämmen ebenfalls als mittlerer bis starker Cereulidproduzent einstufen ließ (Apetroaie-Constantin *et al.*, 2008; Jaaskelainen *et al.*, 2004; Thorsen *et al.*, 2010). Der hier mit 19 bezifferte Stamm RIVM BC 379 wurde in einer weiteren Studie von Carlin *et al.* 2006 ebenfalls getestet. Dabei ergab sich, dass dieser Stamm dort auch vergleichsweise geringe Cereulidmengen produziert hatte und die in dieser Arbeit vorgenommene Einstufung als niedriger Cereulidproduzent damit bestätigt wird. Zusammenfassend zeigten die Medienversuche mit den neun emetischen Stämme zwar, dass die gebildeten Cereulidmengen der einzelnen Stämme in Abhängigkeit des Kultivierungsmediums variierten, aber die grobe Tendenz einzelner Stämme, viel oder wenig Cereulid zu bilden, weitgehend erhalten blieb.

### **1.3 Hitzeresistenz sowie Hydrophobizität der Sporen von emetischen *B. cereus* Stämmen mit unterschiedlichem Cereulidbildungspotential**

Aus der Studie von Carlin *et al.* 2006 war bekannt, dass Sporen emetischer Stämme höhere Hitzeresistenz besitzen, als Sporen von nicht emetischen Stämmen. Ob die geringere Sensitivität gegenüber Hitze jedoch auch abhängig vom stammspezifischen Cereulidbildungspotential eines

emetischen *B. cereus* Stammes ist, blieb offen und sollte hier genauer analysiert werden. Insgesamt wurden die Sporen von sieben *B. cereus* Stämmen mit unterschiedlichem Cereulidproduktionsvermögen auf ihre Hitzeresistenz getestet, wobei keine Korrelation zwischen der Hitzeresistenz von Sporen und des Cereulidbildungspotentials der Stämme ersichtlich war (Tab.7). Die Sporen, die am sensitivsten auf Hitze reagierten, waren die des mittelstarken Cereulidproduzenten F4810/72 und die des Hochproduzenten 43, während die höchste Resistenz gegenüber Hitzeeinwirkung bei Sporen der niedrigproduzierenden Stämme 11 und 19 nachgewiesen wurde. Es zeigte sich somit, dass die Widerstandsfähigkeit der Sporen gegenüber Hitzebehandlung zwar stammsspezifisch ist, aber nicht mit dem Cereulidbildungspotential in Zusammenhang steht. Entscheidender für die Hitzeresistenz von Sporen scheinen wohl eher die Sporulationsbedingungen, der Wassergehalt im Mantel der Sporen sowie die Menge und Art der Kationen zu sein, mit denen Dipicolinsäuremoleküle im Kern der Spore komplexiert vorliegen (Cazemier *et al.*, 2001; Kort *et al.*, 2005; Setlow *et al.*, 2006; van der Voort & Abee, 2013).

Neben der Hitzeresistenz wurde auch die Hydrophobizität von sieben verschiedenen emetischen Stämmen analysiert, da in Studien gezeigt wurde, dass *B. cereus* Sporen eine deutlich höhere Hydrophobizität besitzen als ihre vegetativen Zellen oder Sporen anderer Mitglieder dieser Familie (Buhr *et al.*, 2008; Doyle, 1984; Wiencek *et al.*, 1990). Daher stellte sich die Frage, ob Sporen von tendenziell starken Toxinproduzenten möglicherweise hydrophober sind als von Stämmen, die kein oder eher nur geringe Mengen an Cereulid bilden. Die Analyse der Sporen ausgewählter emetischer *B. cereus* Stämme bestätigte, dass die Hydrophobizitätswerte im Allgemeinen sehr hoch waren und im Bereich von 93,25 % bis 97,9 % lagen (Tab. 7). In Studien von Wiencek *et al.* 1990 wurden für *B. cereus* Sporen ähnlich hohe Hydrophobizitätswerte von ca. 95 % ebenfalls anhand des Hexadekantests ermittelt. Unter Berücksichtigung der Cereulidbildungskapazität der untersuchten *B. cereus* Stämme zeigte sich in dieser Arbeit jedoch keine Korrelation zwischen Toxinbildungsvermögen und Hydrophobizität. Ausschlaggebend für die hydrophoben Eigenschaften der Sporen scheint vor allem das Exosporium und dessen Zusammensetzung zu sein, da gezeigt wurde, dass Sporen ohne diese äußere Hülle eine weitaus geringere Hydrophobizität besitzen (Koshikawa *et al.*, 1989). Darüber hinaus konnte auch keine eindeutige Verbindung zwischen der Hitzeresistenz und der Hydrophobizität der untersuchten Sporen erkannt werden. In Versuchen von Furukawa *et al.* 2005 und Wiencek *et al.* 1990 konnte durchaus ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Eigenschaften hergestellt werden, da hydrophobe Sporen eine stärkere Tendenz zur Agglomeration haben und dann im Verbund besser vor schädlichen Hitzeeinwirkungen geschützt sind. Außerdem verändern sich die Proteine des Exosporiums durch Wärmebehandlung so, dass die

---

Sporen noch hydrophober werden und beispielsweise noch besser an Oberflächen adhären können.

#### 1.4 Analyse der Korrelation von Biofilmbildung und Toxinproduktionsvermögen

Unter Biofilmbildung wird allgemein die Anheftung von Zellen an Oberflächen mittels extrazellulären polymeren Substanzen verstanden (Karunakaran & Biggs, 2011). Von *B. cereus* ist bekannt, dass er auf unterschiedlichen Oberflächen Biofilme ausbilden kann, die beispielsweise eine hohe Resistenz gegenüber Reinigungskemikalien besitzen (Peng *et al.*, 2002). Biofilmbildung kann gerade in der Lebensmittelindustrie zu einer verminderten Produktqualität und –sicherheit führen, was wiederum Auswirkungen auf die Gesundheit der Verbraucher sowie wirtschaftliche Faktoren hat (Hsueh *et al.*, 2006). In Studien mit *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die Biofilmbildung durch eine Reihe von Molekülen, wie den nichtribosomal synthetisierten Peptiden Surfactin oder Valinomycin, angeregt werden kann. Es wird vermutet, dass diese Moleküle das Ausströmen von Kaliumionen aus den Zellen stimulieren, wodurch eine Membranproteinkinase KinC aktiviert wird, die wiederum die Expression wichtiger Biofilmbildungsgene induziert. Möglich wäre, dass *B. subtilis* mit der Produktion von oberflächenaktiven Molekülen, wie Surfactin, auf bestimmte Umweltreize reagiert und in der Population so die Bildung von polymeren Substanzen stimulieren kann (Lopez *et al.*, 2009a). Es bestand die Hypothese, dass Cereulid in *B. cereus* Kulturen ähnliche Effekte auslöst, da das Toxin vergleichbar mit Valinomycin eine hohe Affinität zu Kaliumionen besitzt und unter bestimmten Wachstumsbedingungen ihren Ausstrom aus Zellen begünstigt (Ekman *et al.*, 2012; Teplova *et al.*, 2006). Um eine mögliche Korrelationen zwischen dem Cereulidbildungsvermögen und der Biofilmbildungskapazität von *B. cereus* zu ermitteln, wurden Mikrotiterplattenassays mit neun emetischen Stämmen durchgeführt, bei denen die adherierenden Zellen mittels Kristallviolett färbung detektiert werden konnten (Auger *et al.*, 2006; Karunakaran & Biggs, 2011). Die Kultivierung der Stämme erfolgte in den Medien LBB und EPS, da sich diese in anderen Studien als förderlich für die Biofilmbildung erwiesen hatten (Auger *et al.*, 2006; Hsueh *et al.*, 2006). Unter den gewählten Kultivierungsbedingungen ergaben sich bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stämmen Absorptionswerte von 0,02 bis 0,13 (Kap. III. 1.6). Verglichen mit anderen Studien, in denen die Biofilmbildung von *B. cereus* Stämmen auf ähnliche Weise analysiert wurde, fielen die hier gemessenen Werte gering aus (Auger *et al.*, 2006; Lücking, 2009a). Der Grund hierfür könnte die niedrige Inkubationstemperatur von 24 °C anstatt der in den anderen Studien verwendeten 30 °C sein. Die Temperatur von 24 °C wurde jedoch bewusst gewählt, da bekannt war, dass unter diesen Bedingungen die Cereulidproduktion gefördert werden kann (Dommel, 2008). Eine Verbindung zwischen dem Cereulidproduktionsverhalten der Stämme und den Biofilmbildungseigenschaften ließ

sich in beiden Medien und nach beiden Inkubationszeiten (24 h und 48 h) nicht bestätigen. So hatte beispielsweise Stamm 25, der anhand der UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Methode als starker Toxinproduzent eingestuft wurde, zwar in LBB-Medium nach 24 Stunden vergleichsweise viel Biofilm produziert, aber in EPS-Medium wiederum weniger als Stamm 27, der als niedriger Cereulidbildner klassifiziert worden war. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich beim geringen Cereulidproduzenten Stamm 3, der unter allen getesteten Bedingungen mehr Biofilm gebildet hatte als Stamm F4810/72, der generell als mittlerer Toxinproduzent eingestuft worden war (Tab. 8).

Um den Effekt von Cereulid unabhängig von der eigenen Toxinbildungsfähigkeit der Stämme auf die Biofilmbildung zu überprüfen, wurden in einem weiteren Versuch 10 oder 5 µM Cereulid zu den Kulturen von drei ausgewählten Stämmen gegeben. Hier zeigte sich durch die Toxinzugabe kein Effekt in Bezug auf die Biofilmbildung (Abb. 9). In einer anderen Studie konnte durch die Zugabe von 10 µM Cereulid zwar bei manchen der dort getesteten *B. cereus* Stämmen eine gesteigerte Biofilmbildung detektiert werden, die Korrelation erscheint jedoch auch unter den dort verwendeten Versuchsbedingungen nicht ganz eindeutig, da beispielsweise der *B. cereus* Stamm ATCC 14579 unter Cereulidzugabe in unverdünntem TSB-Medium weniger Biofilm produzierte als mit Toxin (Ekman *et al.*, 2012). Die Daten dieser Arbeit legen dagegen nahe, dass das Biofilmbildungsvermögen stammspezifisch variiert und darüber hinaus stark von den Kultivierungsbedingungen, wie Medium, Temperatur oder Inkubationszeit beeinflusst wird. Die Cereulidsynthese konnte unter den getesteten Bedingungen nicht in Verbindung mit dem Biofilmbildungsprozess gebracht werden und auch durch extern zugegebenes Cereulid war es nicht möglich Biofilmbildung zu induzieren.

## Teil II

### 2.1 Lokalisation von Cereulid an der Oberfläche von vegetativen Zellen und Sporen

Cereulid wird in emetischen *B. cereus* nichtribosomal an einem Enzymkomplex synthetisiert, dessen codierende Gene Teil des *ces* Operons sind (Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Neben den Synthetasegenen *cesA* und *cesB* beinhaltet das auf dem Plasmid pCER270 lokalisierte Gencluster unter anderem die Gene *cesC* und *cesD*, die für einen möglichen ABC-Transporter codieren (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Es besteht die Hypothese, dass CesCD am Transport von Cereulid durch die Plasmamembran beteiligt sein könnte (Lücking, 2009a). Generell ist bekannt, dass beim mehrstufigen Zellaufbau Gram-positiver Organismen auf die cytoplasmaumhüllende Phospholipidmembran ein dünner periplasmatischer Raum folgt. Dieser wird von der Zellwand umgeben, die aus Peptidoglycannetzwerk besteht, das kovalent mit Teichon- und Teichuronsäuren verbunden ist und von einer Oberflächenschicht aus Protein- oder Glycoproteinuntereinheiten überzogen wird. (Matias

& Beveridge, 2005; Matias & Beveridge, 2006; Sidhu & Olsen, 1997). Um genauer zu analysieren, in welchen Zellschichten Cereulid möglicherweise nach der Synthese akkumuliert, wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellen in Fraktionen zerlegt und die Toxinkonzentrationen darin mittels UPLC-MS/MS-SIVA bestimmt (Kap. III. 2.2). Hier zeigte sich, dass in der Membran sowie der cytosolischen Fraktion mit ca. 0,3 % Cereulid vergleichsweise wenig Toxin detektiert werden konnte. Die 6 % Cereulid, welche im Kulturüberstand gemessen wurden, stammten womöglich von kleinen Zellwandbestandteilen, die sich bei der Zentrifugationsgeschwindigkeit von 10 000 g nicht mit ins Pellet abgesetzt hatten. Ebenso könnten die 0,3 % Cereulid erklärt werden, die in der cytosolischen Fraktion detektiert wurden. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften ist Cereulid nämlich nicht wasserlöslich (Teplova *et al.*, 2006). Somit wäre es eher unwahrscheinlich, dass sich das Toxin in den wässrigen Fraktionen befindet. Die höchsten Toxinkonzentrationen wurden in der Fraktion aus Zellwandfragmenten nachgewiesen, was vermuten lässt, dass Cereulid nach seiner Synthese in die äußeren Zellschichten abgegeben wird und sich vorwiegend in oder an der Zellwand befindet. Möglich wäre, dass sich in der hergestellten Zellwandfraktion noch ein größerer Anteil an Membrankomponenten befand, an denen das nachgewiesene Toxin haftete. Durch eine Fettsäureanalyse konnten zwar in der Membranfraktion verglichen zur Fraktion mit unaufgeschlossenen Zellen und größeren Zellbruchstücken die geringsten Mengen an Phospholipiden nachgewiesen werden, aber es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Cereulidkonzentration in den drei Fraktionen und der Menge an gemessenen Fettsäuren, was darauf schließen lässt, dass sich Cereulid vorwiegend an oder in der Zellwand befindet (Tab. 9). Wo genau das Toxin dort akkumuliert, sollte in Versuchen geklärt werden, in denen die Zellen kurzzeitig mit Lösungsmitteln behandelt wurden, um auf diese Weise nur Cereulidmoleküle von der Außenseite zu isolieren (Kap. III. 2.3.2). Mit Ethanolkurzzeitbehandlungen von 10 Minuten konnten zwar bis zu 80 % des von den Zellen produzierten Cereulids extrahiert werden, allerdings schädigte diese Behandlung die Zellen erheblich, was eine Zellzahlreduktion von 4 bis 5 Log-Stufen zur Folge hatte. Dies deutet darauf hin, dass das Lösungsmittel in die Zellen eindringen konnte und die Cereulidmoleküle eventuell nicht nur von der Zellaußenseite extrahiert wurden. Versuche mit anderen getesteten Lösungsmitteln erwiesen sich ebenfalls als zellschädigend. Eine schonendere Cereulidisolationstechnik stellte hingegen die Behandlung der Zellen mit Silika-Kugeln dar, deren Oberfläche mit hydrophoben C18-Alkylgruppen beschichtet war. Mit dieser neu etablierten Technik ließen sich innerhalb von 10 Minuten Inkubationszeit ca. 29 % des von den Zellen produzierten Cereulids extrahieren ohne die Zellen zu schädigen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Cereulid im Anschluss an die Synthese an die Zellaußenseite gelangt, wie schon in anderen Studien vermutet wurde (Lücking, 2009a). Wie weit die C18-Alkylgruppen jedoch in das Peptidoglycangeflecht der Zellwand hineinragen können und wo sich die Toxinmoleküle darin genau befinden, ließ sich nicht näher bestimmen.

Möglich wäre, dass Cereulid mittels dem putativen Transporter CesCD durch die Membran transportiert wird und dann in das offene Peptidoglycancellwandgeflecht eindiffundiert, was für Moleküle mit einer Größe bis zu 57 kDa durchaus möglich ist (Lambert, 2002). Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft und der hohen Affinität für Kaliumionen wäre die Position in oder auf der Zellwand auch günstig, falls Cereulid die Funktion übernimmt den Zellen beispielsweise unter kaliumarmen Wachstumsbedingungen einen Vorteil zu verschaffen (Ekman *et al.*, 2012; Kroten *et al.*, 2010; Tempelaars *et al.*, 2011).

Gelangt Cereulid nach seiner Synthese tatsächlich an die Zellaußenseite, wäre es denkbar, dass das Toxin auch an Sporen übertragen wird. Wie in dieser und auch anderen Arbeiten gezeigt, ist die Oberfläche von *B. cereus* Sporen hoch hydrophob und könnte daher eine gute Adhärenzfläche für Cereulid in wässrigem Kultivierungsmilieu bilden (Doyle, 1984; Koshikawa *et al.*, 1989; Tauveron *et al.*, 2006). Darüber hinaus weiß man von den hydrophoben und bioaktiven Kurstakinen, die von *Bacillus* Spezies nichtribosomal synthetisiert werden, dass diese ebenfalls an der Oberfläche vegetativer Zellen und insbesondere an Sporen haften (Abderrahmani *et al.*, 2011; Bechet *et al.*, 2012; Hathout *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2007). Ausgehend von diesen Informationen wurde bei Sporen des emetischen Referenzstammes F4810/72 untersucht, ob sich Cereulid von der Sporenoberfläche mit Ethanol extrahieren lässt. Dabei zeigte sich, dass bereits nach kurzen Extraktionszeiten von 5 bis 10 Minuten mehr als 50 % Toxin isoliert werden konnte (Abb. 12). Die Zellschädigung betrug nur ca. eine Log-Stufe, was darauf hin deutet, dass Cereulid im oder am Exosporium von *B. cereus* Sporen angelagert ist und nicht aus dem Inneren der Spore extrahiert wurde. Eine Aufnahme von Cereulid in die Spore ist auch eher unwahrscheinlich, da die Vorspore während der Sporenbildung in einer kleinen Kammer entsteht, die am Zellpol der Mutterzelle durch ein Septum im Cytosol abgetrennt ist. Im weiteren Sporulationsverlauf umschließt dieses Septum die Spore und die Mutterzelle lysiert (Errington, 2003). Cereulid müsste daher bei der Sporenbildung direkt aus dem Cytosol in die Spore aufgenommen werden. Deswegen wird vermutet, dass Cereulid über direkten Kontakt mit vegetativen Zellen an die Sporenhülle gelangt. Zudem sporulieren in einer Bakterienkultur nicht alle Zellen gleichzeitig und somit wäre ein Kontakt zwischen vegetativen Zellen und Sporen sowie die damit verbundene Übertragung von Cereulid gut möglich (de Vries *et al.*, 2004).

## **2.2 Die essentielle Bedeutung des putativen ABC-Transporters CesCD für die Cereulidsynthese**

Die strukturellen Elemente und die Ähnlichkeit zu anderen Transportproteinen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei CesCD um einen ABC-Transporter handelt, der vergleichbar zu verschiedenen

Systemen sein könnte, welche für die Resistenz gegenüber kleinen antimikrobiellen Molekülen wie Bacteriocinen oder aber für die Immunität gegenüber Lantibiotika sorgen (Kjos 2011, Rince 1997, Stein 2002). Während CesC große Homologien zu verschiedenen ATP-Bindeproteinen mit typischen Walker A und B Motiven aufweist, ergaben *in silico* Analysen von CesD, dass es sich hierbei um eine putative Permease mit fünf möglichen Transmembrandomänen handeln könnte. Sequenzvergleiche von CesD zeigten größte Ähnlichkeiten (33 % Identität) zu BerB, einer Permease aus *B. thuringiensis*, die sechs Transmembrandomänen aufweist (Espinasse *et al.*, 2002; Lücking, 2009a). Darüber hinaus wies CesC eine starke Ähnlichkeit (49,8 % Identität) zum ATP-Bindeprotein BerA auf. In Studien über BerAB konnte zwar gezeigt werden, dass der Transporter essentiell für die  $\beta$ -Exotoxin I –Bildung ist, aber ein experimenteller Beweis des Transportmechanismus fehlt (Espinasse *et al.*, 2002; Lücking, 2009a). Im Gegensatz zur CesD-Permease, für die sehr wenig homologe Proteine gefunden werden konnten, existieren für CesC mehrere bekannte ATP-Bindeproteine mit großer Ähnlichkeit, wie zum Beispiel BcrA aus *B. licheniformis* und DrrA aus *Streptomyces peucetius*. Beides sind Bestandteile von ABC-Transportsystemen, die in den Organismen für eine Eigenimmunität gegenüber den produzierten Stoffen Bacitracin im Falle von *B. licheniformis* sowie Daunorubicin und Doxorubicin bei *S. peucetius* verantwortlich sind (Kaur, 1997; Podlessek *et al.*, 1995).

In Studien mit dem Bacitracinproduzenten *B. licheniformis* wurde zudem gezeigt, dass Mutationen im Bacitracin ABC-Transportergen *bcr* zu Verzögerungen der Sporulation führten (Podlessek 1989). Bei emetischen *B. cereus* hingegen scheint die Sporulation ebenso wie das Wachstumsverhalten durch die Transporterproteine CesCD nicht beeinflusst zu sein, wie Untersuchungen mit der Transporterdefizienten Mutante F48 $\Delta$ cesCD im Vergleich zum Wildtyp ergaben (Kap. III. 2.5.2). Für die Cereulidbildung ist der potentielle Transporter CesCD jedoch essentiell, da die Deletionsmutante F48 $\Delta$ cesCD einen Cereulid-negativen Phänotyp aufwies. Ebenso waren Insertionsmutanten, bei denen nur eine Transporterkomponente exprimiert wurde, nicht toxisch, was darauf hin deutet, dass sowohl das ATP-Bindeprotein CesC, als auch das Transmembranprotein CesD notwendig für die Cereulidsynthese sind (Lücking, 2009a). Auch in dieser Arbeit konnten in ethanolschen Extrakten von 20 ml F48 $\Delta$ cesCD Kulturproben nur minimale Mengen an Cereulid (0,17  $\mu$ g/ml) nachgewiesen werden, während aus einer vergleichbaren Kulturprobe des Wildtypstammes F4810/72 das 300fache (58,76  $\mu$ g/ml) an Cereulid extrahiert wurde. In Extrakten aus sehr kleinen F48 $\Delta$ cesCD-Kulturproben volumina von nur 1 ml war die Toxinkonzentration so gering, dass kein Cereulid nachgewiesen werden konnte (Kap. III. 2.5.2). Ein vergleichbarer Effekt ist auch von den Transporterproteinen BerAB aus *B. thuringiensis* bekannt. Waren die Transporterproteine nicht funktionstüchtig, so wurde nur wenig  $\beta$ - Exotoxin I produziert. Als Ursache wird hier ein negativer Feedbackmechanismus vermutet, der die Synthese des Gifts unterbindet, um den Produzent zu



schützen, da  $\beta$ -Exotoxin I sonst wahrscheinlich in den Zellen des Produzenten seine toxische Wirkung entfaltet (Espinasse *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Studien mit *Mycobacterium smegmatis* erbracht, in denen gezeigt wurde, dass der ABC-Transporter ExiT essentiell für die Synthese des nichtribosomalen Peptids Exochelin ist (Zhu *et al.*, 1998). Bei emetischen *B. cereus* liegt die Vermutung nahe, dass CesCD ebenfalls eine Toxinexportfunktion übernimmt und bei Abwesenheit der Proteine die Cereulidsynthese ebenfalls gestoppt wird, weil fertige Cereulidmoleküle nicht von der Synthetase abgelöst werden können, wenn kein Transporter vorhanden ist. Eine völlig andere Hypothese wäre, dass CesCD anstatt Toxinexporter, ähnlich wie die Oligopeptidpermease OppA aus *B. subtilis* als Importer für Aminosäurebausteine fungiert (Solomon *et al.*, 2003), die essentiell für die Cereulidbildung sein könnten. Es wäre in diesem Zusammenhang denkbar, dass Cereulid keinen Transporter benötigt, sondern nach der Synthese im Cytosol an die Membran gelangt und diese mittels Diffusion passieren kann, wie es zum Beispiel bei dem zu Cereulid strukturverwandten Ionentransporter Valinomycin der Fall ist (Berezin, 2015). Dagegen spricht jedoch, dass die Aminosäuresequenz von CesCD nur geringe Homologien zu bekannten Aminosäureimportern aufweist und sich zudem bei Wachstumsversuchen in Minimalmedium unter Zugabe verschiedener Aminosäuren keine inhibitorischen Effekte auf das Wachstum bei der transporterdefizienten Mutante ergaben (Daten nicht gezeigt).

### **2.3 Rolle des Transporters CesCD bei der Toxinproduktion unabhängig von der Transkription und Translation des Cereulidsynthetasegens *cesB***

Obwohl die Proteine CesCD scheinbar eine essentielle Rolle bei der Cereulidsynthese spielen, zeigte sich, dass sie keinen Einfluss auf die Transkription oder Translation der Synthetasegene nehmen. Die Untersuchung der Transkriptionsraten der Synthetaseuntereinheit *cesB* mittels qPCR ergab keine Unterschiede zwischen Stamm F4810/72 und F48 $\Delta$ cesCD. Folglich wird die Synthetaseuntereinheit in beiden Stämmen zu vergleichbaren Mengen transkribiert und die mangelnde Cereulidbildung in der transporterdefizienten Mutante kann hierdurch nicht begründet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer Studie von Pearson *et al.* 2004 gemacht, in denen die partielle Deletion des potentiellen ABC-Transporters *mcyH* von *Microcystis aeruginosa* ebenfalls keinen Effekt auf die Transkription der restlichen Gene des Microcystin-Biosynthese-Clusters hatte. Allerdings wirkte sich die Deletion von *mcyH* auf Translationsebene aus und ein an der Microcystinsynthese beteiligtes Protein (McyF) konnte in der Deletionsmutante nicht nachgewiesen werden. In Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von Immunoblots mit Proteinproben von F4810/72 und der transporterdefizienten Mutante F48 $\Delta$ cesCD gezeigt, dass die Synthetaseuntereinheit CesB1 in beiden Stämmen vergleichbar exprimiert wird (Abb. 16). Die Cereulidsynthetase sollte daher auch in der Mutante vorliegen und die

Toxinproduktion durch den Enzymkomplex theoretisch möglich sein. Die Cereulidbildung scheint aber nur voll funktionstüchtig abzulaufen, wenn Synthetase und CesCD vorhanden sind (Kap. III. 2.5.2). Vielleicht müssen beide Komponenten miteinander interagieren und CesCD sorgt neben seiner Transportfunktion für eine Stabilisierung oder Aktivierung der Synthetase, wie es beim Nisinproduzenten *Lactococcus lactis* oder der Subtilinbildung in *B. subtilis* der Fall ist (Kiesau *et al.*, 1997; Siegers *et al.*, 1996).

Um genaueres über die Position der Cereulidsynthetase in emetischen *B. cereus* und eine mögliche Interaktion des Enzymkomplexes mit dem potentiellen ABC-Transporter CesCD zu erfahren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Immunoblots mit cytosolischen und Membranfraktionen von verschiedenen Wachstumszeitpunkten durchgeführt (Abb. 21). Die Synthetaseuntereinheit CesB1 ließ sich dabei nur in den Proben der cytosolischen Fraktion des Stammes F4810/72 nachweisen, nicht aber in den Proben der Membranfraktionen. Dies deutet darauf hin, dass sich die Synthetase während des Cereulidbildungsprozesses im Cytoplasma befindet und eine direkte Interaktion mit dem membrangebundenen Transporter CesCD eher unwahrscheinlich ist. Ein vergleichbares Beispiel wäre die Surfactin-Synthetase aus *B. subtilis*, die ebenso im Cytoplasma verteilt zu sein scheint, wie mittels fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte (Straight *et al.*, 2007). Möglich wäre aber auch, dass die Verbindung zwischen Cereulidsynthetase und CesCD an der Membran sehr schwach ist und sich die CesB1-Synthetaseuntereinheit im Verlaufe der Immunoblotprobenpräparation löst, dann verstärkt im Überstand vorhanden ist und in der Membranfraktion aufgrund der geringen Konzentration nicht mehr nachgewiesen werden kann. Dagegen würden jedoch die Immunogoldlokalisationsstudien sprechen, die mit Zellen des Stammes F4810/72 durchgeführt wurden (Kap. III. 2.6.2). Diese deuten nämlich auch darauf hin, dass die Synthetase zum Wachstumszeitpunkt OD<sub>600</sub> 8 vermehrt im Cytosol vorliegt. Ähnliche Versuche wurden zur Lokalisation der Gramacidin S Synthetase in *Aneurinibacillus migulanus* durchgeführt, bei denen sich herausstellte, dass in diesem Fall die Synthetase an der Membran lokalisiert ist und Gramacidin vermutlich in Vesikeln in der Membran eingelagert oder nach außen transportiert wird (Hartmann 2012).

Eine weitere Methode, um die Cereulid-Synthetase eventuell indirekt lokalisieren zu können, wäre die Detektion von Cereulid-Syntheseintermediaten in verschiedenen Zellfraktionen (Marxen *et al.* 2015). Neben dem vollständigen cyclischen Cereulidmolekül wurden nämlich mittels UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS-Analyse in Methanolextrakten von emetischen *B. cereus* Kulturproben auch in geringen Mengen lineare Peptide bestehend aus 4, 8 und 12 Aminosäuren detektiert. Handelt es sich bei diesen Peptiden tatsächlich um Syntheseintermediate des Toxins, sollten diese theoretisch eng mit dem Synthetase-Enzymkomplex verbunden sein, so wie es bereits für Surfactinintermediate in *B. subtilis*

gezeigt wurde (Vater *et al.*, 2009). Erste Versuchsergebnisse mit verschiedenen Zellfraktionen von F4810/72 ergaben, dass diese linearen Peptide in sehr geringer Menge und in starker Korrelation mit dem vollständigen Cereulidmolekül auftraten, also vorwiegend in der Zellwand- und teilweise in der Membranfraktion, nicht aber in der cytosolischen Fraktion detektiert werden konnten (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein Zusammenhang der linearen Peptide mit der Lokalisation der Synthetase bleibt fraglich, da die Daten eher dafür sprechen, dass die mutmaßlichen Vorstufen ebenso wie Cereulid sofort nach der Synthese in Zellwandnähe wandern. Eventuell handelt es sich bei den Peptiden auch nicht um Intermediate, sondern um Abbauprodukte von Cereulid, die natürlicherweise in der Zelle vorkommen oder als Artefakte während der Extrakterstellung entstehen können.

#### **2.4 Transporter CesCD übernimmt scheinbar keine Resistenzfunktion gegenüber Cereulid**

Aus Studien mit *B. licheniformis* ist bekannt, dass eine verstärkte Amplifikation des Bacitracin ABC-Transportergens *bcr* bis zu einem gewissen Grad eine erhöhte Produktion des Antibiotikums hervorrief (Podlesek *et al.*, 1997). In Untersuchungen mit *Streptomyces aureofaciens* konnte eine äquivalente Beobachtung für das Transportergen *trcC* und die damit gekoppelte Produktion von Oxytetracyclin gemacht werden (Dairi *et al.*, 1995). Im emetischen *B. cereus* Stamm F4810/72 und der Deletionsmutante F48 $\Delta$ cesCD bewirkte eine induzierte Überexpression der *cesCD* Transportergene eine um etwa 30 % erhöhte Cereulidproduktion (Abb. 18). Allerdings wurden bei Wiederholungsmessungen größere Schwankungen bei den detektierten Cereulidmengen der getesteten Stämme deutlich, so dass kein signifikanter Effekt der verstärkten Expression von *cesCD* auf die Toxinbildung festgestellt werden konnte. Darüber hinaus war die erhöhte Amplifikation von *bcr* in Bacitracin sensitiven Organismen auch mit einer Resistenzentwicklung gegenüber dem Antibiotikum gekoppelt und es ist bekannt, dass ABC-Transporter neben ihrer Notwendigkeit für den Export der Peptide nach der Biosynthese oftmals auch eine Resistenzfunktion gegenüber antimikrobiellen Peptiden übernehmen können (Dassa & Bouige, 2001; Gebhard *et al.*, 2014; Podlesek *et al.*, 1997). Strukturanalysen von CesC ergaben zwar Ähnlichkeiten zu ABC-Transportersystemen, die für eine Eigenimmunität gegenüber toxischen Stoffen verantwortlich sind, aber dennoch zeigten sich durch eine induzierte *cesCD* Überexpression sowohl im *B. subtilis* Stamm 168 als auch in *B. cereus* F4810/72 und F48 $\Delta$ cesCD keine Veränderungen im Wachstumsverhalten der Stämme in Gegenwart von Cereulid (Abb. 19). Vermutlich übernehmen die Transporterproteine CesCD also keine Schutzfunktion und scheinen nicht für eine Immunität gegenüber Cereulid zu sorgen.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob überhaupt eine Eigenimmunität gegenüber Cereulid existiert bzw. notwendig ist. In Versuchen mit den *B. cereus* Stämmen F4810/72, F48ΔcesCD und Stamm *B. subtilis* 168 bewirkten Cereulidmengen von 11 bis 20 µg/ml nur bei *B. subtilis* 168 eine Verlängerungen der Lag-Phase und erst bei sehr hohen Cereulidmengen von 60 µg/ml zeigten sich auch bei F48ΔcesCD und dem Toxinproduzenten F4810/72 Lag-Phasenverzögerungen von 3,5 Stunden. Allerdings lag die in den Versuchen verwendete Cereulidkonzentration sehr hoch, wenn man berücksichtigt, dass die durchschnittlich produzierte Toxinmenge des Stammes F4810/72 unter Laborbedingungen in LB-Medium ca. 8 µg/ml betrug (Kap. III. 1.4). Auf der anderen Seite wird aber auch von Wachstumsversuchen berichtet, in denen der emetische *B. cereus* Stamm F4810/72 im Vergleich zu anderen ausgewählten Gram-positiven Organismen völlig resistent gegenüber extern zugegebenem Cereulid waren und dieses Phänomen mit einer Eigenimmunität erklärt wird, deren Mechanismus noch unbekannt ist (Tempelaars *et al.*, 2011). In anderen Studien mit nicht emetischen *B. cereus* Stämmen, die unter Einfluss von 2 bis 3 µM Cereulid inkubiert wurden, zeigten sich wiederum keine wachstumshemmenden Effekte durch das Toxin (Ekman *et al.*, 2012). Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen, in denen verschiedene *Bacillus* Spezies mit dem Cereulidproduzenten F4810/72 kokultiviert wurden und sich keine bakteriostatischen Auswirkungen zeigten (Altayar & Sutherland, 2006). Bei Gram-negativen Bakterien scheint Cereulid ebenfalls wirkungslos zu sein, da diese Organismen durch ihre äußere Membran geschützt sind und der Zugang für Stoffe zur inneren Membran somit nicht möglich ist (Bauer, 2012). Allgemein ist die biologische Funktion von Cereulid noch unklar und die Wirkung des Toxins auf Gram-positive Bakterien scheint von der Toxinkonzentration und externen Faktoren, wie dem pH-Wert oder der Kaliumkonzentration des Mediums abhängig zu sein, was die unterschiedlichen Beobachtungen in den verschiedenen Versuchsansätzen begründen könnte (Tempelaars *et al.*, 2011). Neben ABC-Transportern existieren aber auch noch weitere Resistenzmechanismen, welche eine Schutzfunktion gegenüber Cereulid übernehmen könnten, wie zum Beispiel eine Veränderung der Teichonsäuren in der Zellwand oder Variationen im Membranaufbau (Gebhard *et al.*, 2014).

### **2.5 Geringe Unterschiede im Transkriptom von F4810/72 und F48ΔcesCD**

Mittels Next-Generation Sequencing war es möglich Gesamttranskriptomanalysen von *B. cereus* F4810/72 und der transporterdefizienten Mutante F48ΔcesCD durchzuführen (Kap. III. 2.5.7). Daraus ergab sich eine Schnittmenge von nur 20 Genen, die in Wildtyp und Mutante unterschiedlich reguliert waren, woraus zu schließen ist, dass die Transporterproteine CesCD keine genregulatorischen Funktionen übernehmen. Zu den fünf signifikant hochregulierten Genen in der Deletionsmutante zählten unter anderem zwei (BCAH187A5459 und A5460), die für eine mögliche

ABC-Transporter Permease sowie ein ATP-Bindeprotein codieren. Die Aminosäuresequenz der Permease zeigte keine Homologie zu CesD oder anderen Permeasen von F4810/72 und daher ist es eher unwahrscheinlich, dass in F48 $\Delta$ cesCD dieses Gen verstärkt transkribiert wurde, um die CesD-Defizienz auszugleichen. Möglich wäre noch, dass das hochregulierte ATP-Bindeprotein, welches zu 31 % identisch zu einem Bacitracin ABC-Transporter ATP-Bindeprotein aus *B. cereus* ist, eine ähnliche Funktion wie CesC ausüben kann (Ohki *et al.*, 2003). Des Weiteren war das Gen BCAH187\_A1160 in der Mutante hochreguliert, welches für ein in *B. cereus* und *B. thuringiensis* vorkommendes Bacterioferritin codiert. Ein Zusammenhang zwischen Cereulidsynthese und diesem Protein, das eine wichtige Rolle im Eisenhaushalt der Zelle spielt (Carrondo, 2003), konnte aber nicht hergestellt werden. Unter den Genen, die in der Mutante F48 $\Delta$ cesCD runter reguliert waren, zeigte sich der deutlichste Unterschied der Transkriptome von Wildtyp und Mutante bei Gen BCAH187\_A1052, das für eine Fettsäure-CoA-Ligase codiert. Diese Enzyme wandeln Fettsäuren in ihre CoA-Thioester um und übernehmen damit Schlüsselrollen in verschiedenen metabolischen sowie regulatorischen Prozessen (Dong *et al.*, 2012). Außerdem sind sie bedeutend für die Aufnahme von Fettsäuren über die Membran und konnten sowohl dort als im Cytosol lokalisiert werden (Black & DiRusso, 2003; Overath *et al.*, 1969). Eventuell sorgt das Enzym für Veränderung des Membranaufbaus, um Cereulidmoleküle, die mit K<sup>+</sup>-Ionen komplexiert sind, wieder aufzunehmen. Diese Umstrukturierung der Membran wäre aber nur nötig, wenn Cereulid gebildet wird und somit wäre das Enzym in F48 $\Delta$ cesCD überflüssig. Interessant ist zudem, dass in F48 $\Delta$ cesCD weniger Transkript für ein ABC-Transporter Substrat Bindeprotein (BCAH187\_A1024) vorliegt als im Wildtyp. Dieses Protein weist Ähnlichkeit zu OppA aus *B. subtilis* auf. OppA sitzt an der Außenseite der Zellmembran und bindet Peptid-Substrate mit der Länge von drei bis fünf Aminosäuren unabhängig von ihrer Sequenz und ermöglicht ihre Aufnahme durch Interaktion mit dem OppBCDF-Komplex (Gominet *et al.*, 2001; Perego *et al.*, 1991; Solomon *et al.*, 2003). Eventuell übernimmt das von BCAH187\_A1024 codierte Protein bei *B. cereus* eine vergleichbare Funktion und da in F48 $\Delta$ cesCD aufgrund der eingeschränkten Cereulidsynthese vielleicht weniger Bedarf an Peptidsubstraten besteht, ist dieses Gen runter reguliert. Anhand dieser Analyse konnten zwar keine offensichtlichen Erklärungen zur Funktion von CesCD gefunden werden, aber eventuell wäre es möglich unter anderen Anzuchtbedingungen der Stämme stärkere genregulatorischen Unterschiede zu provozieren und deutlichere Hinweise zu generieren.

Zusammenfassend ergaben die Versuche zur Lokalisation von Cereulid und der Synthetase, dass das Toxin sich vermutlich verstärkt an der Zellaußenseite und in oder auf der Zellwand befindet, während die CesB1-Synthetaseuntereinheit hauptsächlich im Cytosol detektiert wurde. Eine Interaktion der Synthetase mit dem Transporter CesCD bleibt daher weiterhin fraglich, ebenso wie die eigentliche

Funktion von CesCD. Die Proteine sind zwar essentiell für die Cereulidsynthese, aber ein vermuteter Toxinexport oder Resistenzmechanismus konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere Analysen sind daher notwendig, um den Cereulidtransport aus der Zelle und die Rolle des CesCD Transporters aufzuklären. Eine geeignete Methode, um eine mögliche Interaktion von Cereulid und dem potentiellen Transporter nachzuweisen, könnte die Oberflächenresonanz-Spektroskopie darstellen. Mit dieser Technik gelang es beispielsweise zu zeigen, dass die Transporterpermease des BceAB ABC-Transporters aus *B. subtilis* das nichtribosomal synthetisierte Peptidantibiotika Bacitracin spezifisch bindet (Dintner *et al.*, 2014). Im Falle des Cereulidbildungsprozesses und der Rolle von CesCD wäre eine mögliche Hypothese, dass Cereulid vermutlich in Membrannähe synthetisiert wird und dann eventuell direkt oder über ein Transportprotein an CesCD abgegeben und durch die Cytoplasmamembran auf die Zellaußenseite gelangt. Sind *cesC* und *cesD* deletiert wird kein Cereulid produziert, da die Toxinsynthese am Enzymkomplex möglicherweise gestoppt wird, weil die gebildeten Cereulidmoleküle nicht abtransportiert werden können.

## V. Literatur

- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclere, V., Wathelet, B., Hacene, H. & Jacques, P. (2011).** Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Applied microbiology and biotechnology* **92**, 571-581.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. & Isobe, M. (1994).** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS microbiology letters* **121**, 31-34.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M. & Isobe, M. (1995).** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* **129**, 17-20.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M. & Shibayama, K. (1999).** Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids. *Microbiology and immunology* **43**, 15-18.
- Agata, N., Ohta, M. & Yokoyama, K. (2002).** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International journal of food microbiology* **73**, 23-27.
- Akesson, A., Hedstrom, S. A. & Ripa, T. (1991).** *Bacillus cereus*: a significant pathogen in postoperative and post-traumatic wounds on orthopaedic wards. *Scandinavian journal of infectious diseases* **23**, 71-77.
- Altayar, M. & Sutherland, A. D. (2006).** *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *Journal of applied microbiology* **100**, 7-14.
- Andersson, A., Granum, P. E. & Ronner, U. (1998).** The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International journal of food microbiology* **39**, 93-99.
- Andersson, M. A., Jaaskelainen, E. L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L. M. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004).** Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *International journal of food microbiology* **94**, 175-183.
- Anonymous (2009).** The Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* **271**, 1-128.
- Anonymous (2014).** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* **12 (2)**, 1-312.
- Apetroaie-Constantin, C., Shaheen, R., Andrup, L., Smidt, L., Rita, H. & Salkinoja-Salonen, M. (2008).** Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology* **127**, 60-67.
- Aronson, A. I. & Shai, Y. (2001).** Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS microbiology letters* **195**, 1-8.
- Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. & Collins, M. D. (1991).** Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International journal of systematic bacteriology* **41**, 343-346.
- Auger, S., Krin, E., Aymerich, S. & Gohar, M. (2006).** Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* **72**, 937-941.
- Bauer, T., Stark, T., Hofmann, T. & Ehling-Schulz, M. (2010).** Development of a stable isotope dilution analysis for the quantification of the *Bacillus cereus* toxin cereulide in foods. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**, 1420-1428.
- Bauer, T. (2012).** The *Bacillus cereus* toxin cereulide: Quantification and its biological actions. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Technischen Universität München.
- Bechet, M., Caradec, T., Hussein, W. & other authors (2012).** Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied microbiology and biotechnology* **95**, 593-600.
- Beecher, D. J. & Wong, A. C. (1997).** Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *The Journal of biological chemistry* **272**, 233-239.
- Berezin, S. K. (2015).** Valinomycin as a Classical Anionophore: Mechanism and Ion Selectivity. *The Journal of membrane biology*.
- Bernlohr, R. W. & Novelli, G. D. (1963).** Bacitracin Biosynthesis and Spore Formation: The Physiological Role of an Antibiotic. *Archives of biochemistry and biophysics* **103**, 94-104.
- Black, P. N. & DiRusso, C. C. (2003).** Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **67**, 454-472.
- Blight, E. G. & Dyer, W.J. (1959).** A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37 (8)**: 911-917, 10.1139/o59-099.

- Britton, R. A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R. & Grossman, A. D. (2002).** Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **184**, 4881-4890.
- Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T. & Stubbs, M. T. (2002).** Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **10**, 301-310.
- Buhr, T. L., McPherson, D. C. & Gutting, B. W. (2008).** Analysis of broth-cultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereus* spores. *Journal of applied microbiology* **105**, 1604-1613.
- Bustin, S. A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* **25**, 169-193.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salonen, M. S., Svensson, B., Nguyen-the, C. & Ehling-Schulz, M. (2006).** Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International journal of food microbiology* **109**, 132-138.
- Carrondo, M. A. (2003).** Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *The EMBO journal* **22**, 1959-1968.
- Cazemier, A. E., Wagenaars, S. F. & ter Steeg, P. F. (2001).** Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of applied microbiology* **90**, 761-770.
- Ceuppens, S., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Tsilia, V., Van De Wiele, T., Boon, N. & Uyttendaele, M. (2011).** Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical reviews in microbiology* **37**, 188-213.
- Cohn, F., (1872).** Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen Heft **2**, 127-224
- Dairi, T., Aisaka, K., Katsumata, R. & Hasegawa, M. (1995).** A self-defense gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in *Streptomyces aureofaciens*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **59**, 1835-1841.
- Dassa, E. & Bouige, P. (2001).** The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in microbiology* **152**, 211-229.
- David, D. B., Kirkby, G. R. & Noble, B. A. (1994).** *Bacillus cereus* endophthalmitis. *The British journal of ophthalmology* **78**, 577-580.
- de Vries, Y. P., Hornstra, L. M., de Vos, W. M. & Abee, T. (2004).** Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under defined conditions: temporal expression of genes for key sigma factors. *Applied and environmental microbiology* **70**, 2514-2519.
- Delbrassinne, L., Botteldoorn, N., Andjelkovic, M., Dierick, K. & Denayer, S. (2015).** An Emetic *Bacillus cereus* Outbreak in a Kindergarten: Detection and Quantification of Critical Levels of Cereulide Toxin. *Foodborne pathogens and disease* **12**, 84-87.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I. & other authors (2005).** Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of clinical microbiology* **43**, 4277-4279.
- Dietrich, R., Fella, C., Strich, S. & Martlbauer, E. (1999).** Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* **65**, 4470-4474.
- Dintner, S., Heermann, R., Fang, C., Jung, K. & Gebhard, S. (2014).** A Sensory Complex Consisting of an ATP-binding Cassette Transporter and a Two-component Regulatory System Controls Bacitracin Resistance in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* **289**, 27899-27910.
- Dommel (2008).** Molecular characterization of the genetic locus responsible for cereulide toxin production in emetic *Bacillus cereus*. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Technischen Universität München.
- Dommel, M. K., Frenzel, E., Strasser, B., Blochinger, C., Scherer, S. & Ehling-Schulz, M. (2010).** Identification of the main promoter directing cereulide biosynthesis in emetic *Bacillus cereus* and its application for real-time monitoring of *ces* gene expression in foods. *Applied and environmental microbiology* **76**, 1232-1240.
- Dommel, M. K., Lücking, G., Scherer, S. & Ehling-Schulz, M. (2011).** Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiol* **28**, 284-290.
- Dong, Y., Du, H., Gao, C., Ma, T. & Feng, L. (2012).** Characterization of two long-chain fatty acid CoA ligases in the Gram-positive bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Microbiological research* **167**, 602-607.
- Doyle, R. J. (1984).** Hydrophobic Characteristics of *Bacillus* Spores. *CURRENT MICROBIOLOGY* **10**.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer, S. (2004a).** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular nutrition & food research* **48**, 479-487.



- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer, S. (2004b).** Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS microbiology letters* **232**, 189-195.
- Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Martlbauer, E. & Scherer, S. (2005).** Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* **71**, 105-113.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M. & Scherer, S. (2006).** Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC microbiology* **6**, 20.
- Ehling-Schulz, M. K., R.; Scherer, S. (2011).** *Bacillus cereus*. In *Genomes of Foodborne and Waterborne Pathogens*. Edited by P. L. Fratamico, Y.; Kathariou, S. Washington, DC: ASM Press.
- Ekman, J. V., Kruglov, A., Andersson, M. A., Mikkola, R., Raulio, M. & Salkinoja-Salonen, M. (2012).** Cereulide produced by *Bacillus cereus* increases the fitness of the producer organism in low-potassium environments. *Microbiology (Reading, England)* **158**, 1106-1116.
- Errington, J. (2003).** Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews* **1**, 117-126.
- Espinasse, S., Gohar, M., Lereclus, D. & Sanchis, V. (2002).** An ABC Transporter from *Bacillus thuringiensis* Is Essential for  $\epsilon$ -Exotoxin I Production. *Journal of bacteriology* **184**, 5848-5854.
- Fagerlund, A., Lindback, T., Storset, A. K., Granum, P. E. & Hardy, S. P. (2008).** *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology (Reading, England)* **154**, 693-704.
- Finlay, W. J., Logan, N. A. & Sutherland, A. D. (1999).** Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Applied and environmental microbiology* **65**, 1811-1812.
- Franco, D. (2002).** Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC microbiology*, 1-15.
- Frenzel, E. (2011).** Regulation of the biosynthesis of the food-borne *Bacillus cereus* toxin cereulide. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Technischen Universität München.
- Frenzel, E., Doll, V., Pauthner, M., Lücking, G., Scherer, S. & Ehling-Schulz, M. (2012).** CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Molecular microbiology* **85**, 67-88.
- Fricker, M., Messelhauser, U., Busch, U., Scherer, S. & Ehling-Schulz, M. (2007).** Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and environmental microbiology* **73**, 1892-1898.
- Furukawa, S., Narisawa, N., Watanabe, T., Kawarai, T., Myozen, K., Okazaki, S., Ogihara, H. & Yamasaki, M. (2005).** Formation of the spore clumps during heat treatment increases the heat resistance of bacterial spores. *International journal of food microbiology* **102**, 107-111.
- Gebhard, S. (2012).** ABC transporters of antimicrobial peptides in Firmicutes bacteria - phylogeny, function and regulation. *Molecular microbiology* **86**, 1295-1317.
- Gebhard, S., Fang, C., Shaaly, A., Leslie, D. J., Weimar, M. R., Kalamorz, F., Carne, A. & Cook, G. M. (2014).** Identification and characterization of a bacitracin resistance network in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 1425-1433.
- Glatz, B. A. & Goepfert, J. M. (1976).** Defined conditions for synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin by fermenter-grown cultures. *Applied and environmental microbiology* **32**, 400-404.
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M. & Lereclus, D. (2001).** Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Molecular microbiology* **40**, 963-975.
- Granum, P. E., Andersson, A., Gayther, C., te Giffel, M., Larsen, H., Lund, T. & O'Sullivan, K. (1996).** Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* **141**, 145-149.
- Guinebretiere, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A. & other authors (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental microbiology* **10**, 851-865.
- Guinebretiere, M. H., Auger, S., Galleron, N. & other authors (2013).** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **63**, 31-40.
- Hägglom, M. M., Apetroaie, C., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2002).** Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Applied and environmental microbiology* **68**, 2479-2483.
- Hartmann M. (2012)** Mikrobiologische Untersuchungen an der Gramicidin S Synthetase in *A. migulanus* und der Tat-Translokase in *B. subtilis*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie

- Haque, M. A. & Russell, N. J. (2004).** Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 1397-1404.
- Hathout, Y., Ho, Y. P., Ryzhov, V., Demirev, P. & Fenselau, C. (2000).** Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of natural products* **63**, 1492-1496.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. & Kolsto, A. B. (2000).** *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental microbiology* **66**, 2627-2630.
- Hong, H. A., Duc le, H. & Cutting, S. M. (2005).** The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS microbiology reviews* **29**, 813-835.
- Hoorstra, D., Andersson, M. A., Mikkola, R. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2003).** A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicol In Vitro* **17**, 745-751.
- Hoorstra, D., Andersson, M. A., Teplova, V. V., Mikkola, R., Uotila, L. M., Andersson, L. C., Roivainen, M., Gahmberg, C. G. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2013).** Potato crop as a source of emetic *Bacillus cereus* and cereulide-induced mammalian cell toxicity. *Applied and environmental microbiology* **79**, 3534-3543.
- Horwood, P. F., Burgess, G. W. & Oakey, H. J. (2004).** Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* **236**, 319-324.
- Hsueh, Y. H., Somers, E. B., Lereclus, D. & Wong, A. C. (2006).** Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator. *Applied and environmental microbiology* **72**, 5089-5092.
- Hughes, S. (1988).** Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *FEMS microbiology letters* **52**.
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I. & other authors (2003).** Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**, 87-91.
- Jaaskelainen, E. L., Haggblom, M. M., Andersson, M. A., Vanne, L. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2003a).** Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products: quantitative analysis by chemical and biological methods. *Journal of food protection* **66**, 1047-1054.
- Jaaskelainen, E. L., Teplova, V., Andersson, M. A. & other authors (2003b).** In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicol In Vitro* **17**, 737-744.
- Jaaskelainen, E. L., Haggblom, M. M., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004).** Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *International journal of food microbiology* **96**, 75-83.
- Jimenez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A. & other authors (2013).** Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and applied microbiology* **36**, 383-391.
- Kamba Wambo, G. O., Burckhardt, F., Frank, C. & other authors (2011).** The proof of the pudding is in the eating: an outbreak of emetic syndrome after a kindergarten excursion, Berlin, Germany, December 2007. *Euro Surveill* **16**.
- Karunakaran, E. & Biggs, C. A. (2011).** Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Applied microbiology and biotechnology* **89**, 1161-1175.
- Kaur, P. (1997).** Expression and characterization of DrrA and DrrB proteins of *Streptomyces peucetius* in *Escherichia coli*: DrrA is an ATP binding protein. *Journal of bacteriology* **179**, 569-575.
- Kawamura-Sato, K., Hirama, Y., Agata, N., Ito, H., Torii, K., Takeno, A., Hasegawa, T., Shimomura, Y. & Ohta, M. (2005).** Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria. *Microbiology and immunology* **49**, 25-30.
- Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U. & Marahiel, M. A. (2004).** The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *The Journal of biological chemistry* **279**, 7413-7419.
- Kiesau, P., Eikmanns, U., Gutowski-Eckel, Z., Weber, S., Hammelmann, M. & Entian, K. D. (1997).** Evidence for a multimeric subtilin synthetase complex. *Journal of bacteriology* **179**, 1475-1481.
- Kort, R., O'Brien, A. C., van Stokkum, I. H., Oomes, S. J., Crielaard, W., Hellingwerf, K. J. & Brul, S. (2005).** Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release. *Applied and environmental microbiology* **71**, 3556-3564.
- Koshikawa, T., Yamazaki, M., Yoshimi, M., Ogawa, S., Yamada, A., Watabe, K. & Torii, M. (1989).** Surface hydrophobicity of spores of *Bacillus* spp. *Journal of general microbiology* **135**, 2717-2722.

- Kotiranta, A., Lounatmaa, K. & Haapasalo, M. (2000).** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2**, 189-198.
- Krotten, M. A., Bartoszewicz, M. & Swiecicka, I. (2010).** Cereulide and valinomycin, two important natural dodecadepsipeptides with ionophoretic activities. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists* **59**, 3-10.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227 (259)**: 680-685.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T. (1996).** A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & biology* **3**, 923-936.
- Lambert, P. A. (2002).** Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symposium series*, 46S-54S.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Pruss, B. M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G. S. & Scherer, S. (1998).** *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic bacteriology* **48 Pt 4**, 1373-1382.
- Liesack, W. & Stackebrandt, E. (1992).** Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *Journal of bacteriology* **174**, 5072-5078.
- Lopez, D., Fischbach, M. A., Chu, F., Losick, R. & Kolter, R. (2009a).** Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 280-285.
- Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R. & Kolter, R. (2009b).** Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & development* **23**, 1631-1638.
- Lücking, G. (2009a).** Molecular characterization of cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus*. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Technischen Universität München.
- Lücking, G., Dommel, M. K., Scherer, S., Fouet, A. & Ehling-Schulz, M. (2009b).** Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology (Reading, England)* **155**, 922-931.
- Lücking G., Frenzel E., Rüttschle A., Marxen S., Stark T., Hofmann T., Scherer S., Ehling-Schulz M. (2015)** Function of *ces* operon genes in regulation of cereulide toxin synthesis of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* **6**:1101.
- Lund, T., De Buyser, M. L. & Granum, P. E. (2000).** A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular microbiology* **38**, 254-261.
- Magarvey, N. A., Ehling-Schulz, M. & Walsh, C. T. (2006).** Characterization of the cereulide NRPS alpha-hydroxy acid specifying modules: activation of alpha-keto acids and chiral reduction on the assembly line. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 10698-10699.
- Mahler H. & Pasi Aurelio. (1997).** Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *The New England Journal of Medicine* **17**, 1142-1148.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997).** Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chemical reviews* **97**, 2651-2674.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M. & Bergeron, M. G. (1996).** Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of clinical microbiology* **34**, 2888-2893.
- Marxen, S., Stark, T.D., Rüttschle A., Lücking, G. Frenzel E., Scherer S., Ehling-Schulz, M., Hofmann, T. (2015).** Depsipeptide Intermediates of Biosynthesis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific Reports*
- Matias, V. R. & Beveridge, T. J. (2005).** Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Molecular microbiology* **56**, 240-251.
- Matias, V. R. & Beveridge, T. J. (2006).** Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **188**, 1011-1021.
- Melling, J., Capel, B. J., Turnbull, P. C. & Gilbert, R. J. (1976).** Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *Journal of clinical pathology* **29**, 938-940.
- Melling, J. & Capel, B. J. (1978).** Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin. *FEMS microbiology letters* **4**, 133-135.
- Messelhauser, U., Frenzel, E., Blochinger, C., Zucker, R., Kampf, P. & Ehling-Schulz, M. (2014).** Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007-2013). *BioMed research international* **2014**, 465603.

- Mikkola, R., Saris, N. E., Grigoriev, P. A., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M. S. (1999). Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *European journal of biochemistry / FEBS* **263**, 112-117.
- Miller, J. M., Hair, J. G., Hebert, M., Hebert, L., Roberts, F. J., Jr. & Weyant, R. S. (1997). Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus*. *Journal of clinical microbiology* **35**, 504-507.
- Mock, M. & Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annual review of microbiology* **55**, 647-671.
- Nakamura, L. K. (1998). *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* **48 Pt 3**, 1031-1035.
- Ohki, R., Tateno, K., Okada, Y., Okajima, H., Asai, K., Sadaie, Y., Murata, M. & Aiso, T. (2003). A Bacitracin-Resistant *Bacillus subtilis* Gene Encodes a Homologue of the Membrane-Spanning Subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC Transporter. *Journal of bacteriology* **185**, 51-59.
- Overath, P., Pauli, G. & Schairer, H. U. (1969). Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *European journal of biochemistry / FEBS* **7**, 559-574.
- Pauli, G. F., Jaki, B. U. & Lankin, D. C. (2005). Quantitative <sup>1</sup>H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of natural products* **68**, 133-149.
- Pearson, L. A., Hisbergues, M., Borner, T., Dittmann, E. & Neilan, B. A. (2004). Inactivation of an ABC transporter gene, *mcvH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and environmental microbiology* **70**, 6370-6378.
- Peng, J. S., Tsai, W. C. & Chou, C. C. (2001). Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International journal of food microbiology* **65**, 105-111.
- Peng, J. S., Tsai, W. C. & Chou, C. C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International journal of food microbiology* **77**, 11-18.
- Perego, M., Higgins, C. F., Pearce, S. R., Gallagher, M. P. & Hoch, J. A. (1991). The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Molecular microbiology* **5**, 173-185.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Pitchayawasin, S., M., I., Kuse, M., Franz, T., N., A. & Ohta, M. (2004). Molecular diversity of cereulide detected by means of nano-HPLC-ESI-Q-TOF-MS. *International Journal of Mass Spectrometry* **235**, 123-129.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R. & Grabnar, M. (1995). *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Molecular microbiology* **16**, 969-976.
- Podlesek, Z., Herzog, B. & Comino, A. (1997). Amplification of bacitracin transporter genes in the bacitracin producing *Bacillus licheniformis*. *FEMS microbiology letters* **157**, 201-205.
- Price, N. P., Rooney, A. P., Swezey, J. L., Perry, E. & Cohan, F. M. (2007). Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS microbiology letters* **271**, 83-89.
- Priest, F. G. & Alexander, B. (1988). A frequency matrix for probabilistic identification of some bacilli. *Journal of general microbiology* **134**, 3011-3018.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Ombregt, S. A., Jaaskelainen, E., Salkinoja-Salonen, M. & Debevere, J. (2006). Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. *Journal of food protection* **69**, 847-852.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., in 't Veld, P., Denon, Q., Verhe, R. & Debevere, J. (2008). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in applied microbiology* **46**, 536-541.
- Rasko, D. A., Ravel, J., Okstad, O. A. & other authors (2004). The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic acids research* **32**, 977-988.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Okstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolsto, A. B., Gill, S. R. & Ravel, J. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of bacteriology* **189**, 52-64.
- Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G. A., Schmitdt, T. M. & Snyder, L. R. (2007). *Methods for General and Molecular Microbiology* ASM Press.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140.

- Rosenberg, M., Gutnick, D. & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS microbiology letters* **9**, 29-33.
- Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A. & Schmitt, P. (2005). Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Canadian journal of microbiology* **51**, 149-158.
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S. R., Jensen, G. B. & Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS microbiology letters* **250**, 129-136.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A. & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**, 944-945.
- Saleh, M., Al Nakib, M., Doloy, A., Jacqmin, S., Ghiglione, S., Verroust, N., Poyart, C. & Ozier, Y. (2012). *Bacillus cereus*, an unusual cause of fulminant liver failure: diagnosis may prevent liver transplantation. *Journal of medical microbiology* **61**, 743-745.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual.
- Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U. & Marahiel, M. A. (2002). Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14083-14088.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K. & Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins. *Journal of bacteriology* **188**, 3740-3747.
- Shinagawa, K., Konuma, H., Sekita, H. & Sugii, S. (1995). Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* **130**, 87-90.
- Sidhu, M. S. & Olsen, I. (1997). S-layers of *Bacillus* species. *Microbiology (Reading, England)* **143 ( Pt 4)**, 1039-1052.
- Siegers, K., Heinzmann, S. & Entian, K. D. (1996). Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *The Journal of biological chemistry* **271**, 12294-12301.
- Solomon, J., Su, L., Shyn, S. & Grossman, A. D. (2003). Isolation and characterization of mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport. *Journal of bacteriology* **185**, 6425-6433.
- Stark, T., Marxen, S., Rüttschle, A., Lücking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. & Hofmann, T. (2013). Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEp-2 bioassay. *Analytical and bioanalytical chemistry* **405**, 191-201.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology reviews* **32**, 579-606.
- Straight, P. D., Fischbach, M. A., Walsh, C. T., Rudner, D. Z. & Kolter, R. (2007). A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 305-310.
- Strieker, M., Tanovic, A. & Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current opinion in structural biology* **20**, 234-240.
- Suwan, S., Isobe, M., Ohtani, I., Agata, N., Mori, M. & Ohta, M. (1995). Structure of cereulide, a cyclic dodecadepsipeptide toxin from *Bacillus cereus* and studies on NMR characteristics of its alkali metal complexes including a conformational structure of the K<sup>+</sup> complex *J CHEM SOC PERKIN TRANS* 765-775.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C. & Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International journal of food microbiology* **110**, 254-262.
- Tempelaars, M. H., Rodrigues, S. & Abee, T. (2011). Comparative analysis of antimicrobial activities of valinomycin and cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin. *Applied and environmental microbiology* **77**, 2755-2762.
- Teplova, V. V., Mikkola, R., Tonshin, A. A., Saris, N. E. & Salkinoja-Salonen, M. S. (2006). The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicology and applied pharmacology* **210**, 39-46.
- Thorsen, L., Azokpota, P., Hansen, B. M., Hounhouigan, D. J. & Jakobsen, M. (2010). Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments. *International journal of food microbiology* **142**, 247-250.

- Tschiedel, E., Rath, P. M., Steinmann, J., Becker, H., Dietrich, R., Paul, A., Felderhoff-Muser, U. & Dohna-Schwake, C. (2014). Lifesaving liver transplantation for multi-organ failure caused by *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatric transplantation*.
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M., Jorgensen, K., Gilbert, R.J. & Melling, J. (1979). Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *The American journal of clinical nutrition* **32**, 219-228.
- van der Voort, M. & Abee, T. (2013). Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. *Journal of applied microbiology* **114**, 1201-1210.
- Vangoitsenhoven, R., Rondas, D., Crevecoeur, I. & other authors (2014). Foodborne cereulide causes Beta-cell dysfunction and apoptosis. *PLoS one* **9**, e104866.
- Vater, J., Wilde, C. & Kell, H. (2009). In situ detection of the intermediates in the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide from *Bacillus subtilis* OKB 105, by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in combination with mutant analysis. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **23**, 1493-1498.
- von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R. (1997). Multifunctional Peptide Synthetases. *Chemical reviews* **97**, 2675-2706.
- von Stetten, F., Mayr, R. & Scherer, S. (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environmental microbiology* **1**, 503-515.
- Wiencek, K. M., Klapes, N. A. & Foegeding, P. M. (1990). Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied and environmental microbiology* **56**, 2600-2605.
- Zhou, G., Bester, K., Liao, B., Yang, Z., Jiang, R. & Hendriksen, N. B. (2014). Characterization of three *Bacillus cereus* strains involved in a major outbreak of food poisoning after consumption of fermented black beans (Douchi) in Yunan, China. *Foodborne pathogens and disease* **11**, 769-774.
- Zhu, W., Arceneaux, J. E., Beggs, M. L., Byers, B. R., Eisenach, K. D. & Lundrigan, M. D. (1998). Exochelin genes in *Mycobacterium smegmatis*: identification of an ABC transporter and two non-ribosomal peptide synthetase genes. *Molecular microbiology* **29**, 629-639.

## VI. Anhang

### 1. *B. cereus* Stammset

**Tab. A1:** Auflistung der 77 *B. cereus* Stämme mit der in dieser Arbeit verwendeten Nummerierung, der original Stammnummer, der Angabe des Isolationsmaterials und des Isolationsortes.

verwendete Nummerierung	original Stammnummer	isoliert aus	Land
1	F4810/72 <sup>a</sup>	Erbrochenem	England
2	MHI 87	Kindernahrung	Deutschland
3	MHI 1305	Reisgericht	Deutschland
4	NC7401 <sup>b</sup>	Erbrochenem	Japan
6	F3080B/87	Hühnchen Korma mit Reis	England
7	F3351/87	Faeces	England
8	F3876/87	Patient mit Fieber und Keuchhusten	England
9	SDA GR177	Rohmilch	Schweden
10	IH41385	Dialyseflüssigkeit	Finnland
11	RIVM BC 51	Reisgericht	Niederlande
12	RIVM BC 62	Erbrochenem	Niederlande
13	RIVM BC 67	Faeces	Niederlande
14	SDA JO303	Rohmilch	Schweden
15	INRA I9	Mehl	Frankreich
16	UHDAM B315	Kuchen	Finnland
17	UHDAM 3/pkl	Filtermaterial Krankenhaus	Finnland
18	RIVM BC 124	Faeces	Niederlande
19	RIVM BC 379	Hühnchen	Niederlande
20	F2938/03	Faeces	England
21	WSBC 10925	Wasserflasche	Deutschland
22	WSBC 10927	Blumenkohl	Deutschland
23	A529 <sup>c</sup>	Reisgericht	Niederlande
24	UHDAM NS-58	Endophyt aus einer Fichte	Finnland
25	F5881/94	gebratener Reis	England
26	F4552/75	Erbrochenem	England
27	UHDAM ML127	Nudeln	Finnland
28	UHDAM B308	Risotto	Finnland
29	UHDAM 1IFI(3)	Kindernahrung	Finnland
30	UHDAM 143/pl	Staub	Finnland
31	WSBC 10879	Reis	Deutschland
32	WSBC 10914	Kindernahrung (Milchbasis)	Deutschland
33	WSBC 10935	Nudeln	Schweiz
34	WSBC 10938	Kindernahrung (Milchbasis)	Deutschland

<b>verwendete Nummerierung</b>	<b>original Stammmnummer</b>	<b>isoliert aus</b>	<b>Land</b>
35	WSBC 10939	Käse	Deutschland
36	WSBC 10942	Kräuterbutter	Deutschland
37	WSBC 10941	Erdbeermus	Deutschland
38	WSBC10954	Milchreispudding	Deutschland
39	WSBC 10940	Flüssigei	Deutschland
40	05812 TP2 <sup>d</sup>	Reis mit Gemüse	Deutschland
41	07395/2 <sup>d</sup>	Nudeln mit Ei, Gemüse und Hühnchen	Deutschland
42	10262/1 I <sup>d</sup>	chinesische Nudeln	Deutschland
43	WSBC 10950	UHT Milch	Brasilien
44	BC 164	UHT Milch	Brasilien
45	BC 165	Faeces	Deutschland
46	WSBC 10951	Ohr	Deutschland
47	BC 167	Katheter	Deutschland
48	BC 168	Penisabstrich	Deutschland
49	BC 169	Bindehautabstrich	Deutschland
50	BC 170	Mastitis	Deutschland
51	BC 171	getrocknete Steinpilze	Deutschland
52	BC 172	Taramas	Deutschland
53	MC 67 <sup>e</sup>	Erde	Dänemark
54	MC 118 <sup>e</sup>	Erde	Dänemark
55	BC 173	Nudeln	Deutschland
56	WSBC 10952	Mortadella	Deutschland
57	BC 175	Mozzarella	Deutschland
58	BC 176	Fleischbällchen	Deutschland
59	BC 177	Nudeln	Deutschland
60	BC 178	Gemüsesalat	Deutschland
61	BC 179	Presssack	Deutschland
62	BC 180	Rindfleisch mit Kartoffeln und Lauch	Deutschland
63	BC 181	Apfelkuchen	Deutschland
64	BC 182	Eiskrem (Limone)	Deutschland
65	BC 183	Eiskrem (Vanille)	Deutschland
66	BC 184	Sesam	Deutschland
67	BC 185	Frischkäse	Deutschland
68	BC 186	gekochte Kartoffeln	Deutschland
69	BC 187	Wassermelone	Deutschland
70	BC 188	Ohr	Deutschland
71	BC 189	Erbsensuppe	Deutschland
72	BC 190	Eiskrem	Deutschland
73	BC 191	Nudeln	Deutschland
74	BC 192	Frischkäse	Deutschland
75	BC 193	Truthahn mit Tomatenragout	Deutschland



verwendete Nummerierung	original Stammnummer	isoliert aus	Land
78	BC 196	Faeces	Deutschland
79	BC 197	Kräuter	Deutschland
80	BC 198	Rinderfilet	Deutschland

**INRA**, Institut National de la Recherche Agronomique; **SDA**, Svensk Mjolk, Swedish Dairy Association, Lund Schweden; **WSBC**, Weihenstephan *Bacillus cereus* Sammlung, Weihenstephan, Deutschland; **F strains** erhalten vom Public Health Laboratory Service (PHLS), London, UK; **RIVM**, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, Niederlande; **UHDAM**, University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, Finnland; **MIH** erhalten von Ludwig Maximilians-Universität, München, Deutschland, **BC strains** bezogen vom Institut für Funktionelle Mikrobiologie, Wien, Österreich.

<sup>a</sup> Emetischer Referenzstamm, alternative Bezeichnung AH187, Wild Typ Stamm, Turnbull *et. al.* 1979

<sup>b</sup> Nagoya City Public Health Institute, Japan (Agata *et al.*, 1994)

<sup>c</sup> University of Wageningen, Niederlande

<sup>d</sup> Von Herr Dr. Mäde, Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Deutschland

<sup>e</sup> Von Dr. Thorsen, Copenhagen University, Dänemark (Thorsen *et al.*, 2009)

## 2. Vergleich des Cereulidproduktionspotentials von neun *B. cereus* Stämmen

**Tab. A2:** Übersicht über das Cereulidproduktionspotential von neun ausgewählten *B. cereus* Stämmen, die in verschiedenen Medien kultiviert und die Cereulidkonzentrationen in den Proben mit unterschiedlichen Methoden detektiert wurden. Anhand der in Tab. A3 aufgeführten Kriterien wurden die Stämme dann als geringe, mittlere oder hohe Cereulidproduzenten eingestuft.

<b><i>B. cereus</i> Stämme/ Messmethode</b>	<b>BC3</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>36</b>	<b>43</b>	<b>46</b>	<b>56</b>
<b>LB<sub>80</sub>- Medium UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS</b>	mittel	gering	hoch	hoch	gering	gering	hoch	gering	hoch
<b>LB<sub>80</sub>- Medium HPLC-MS/MS-SIVA</b>	mittel	gering	hoch	hoch	gering	gering	hoch	gering	mittel
<b>LB-Medium HPLC-MS/MS-SIVA</b>	mittel	gering	gering	gering	gering	gering	hoch	gering	mittel
<b>LB-Medium HEp-2 Test</b>	mittel	gering	gering	gering	gering	gering	hoch	gering	mittel
<b>LB<sub>80</sub> -Medium HEp-2 Test</b>	mittel	gering	hoch	hoch	gering	gering	gering	gering	mittel
<b>TSA-Agar HPLC-MS/MS-SIVA</b>	mittel	gering	gering	mittel	gering	gering	hoch	mittel	gering
<b>Blut-Agar HPLC-MS/MS-SIVA</b>	gering	gering	gering	gering	gering	gering	hoch	gering	gering

**Tab. A3:** Kriterien, die zur Einteilung der neun ausgewählten *B. cereus* Stämme in Tab A2. verwendet wurden. Proben der Stämme wurden mit verschiedenen Messmethoden auf ihre Cereulidkonzentration untersucht und dann als geringe, mittlere oder hohe Cereulidproduzenten klassifiziert.

<b>Einteilung/ Messmethode</b>	<b>gering</b>	<b>mittel</b>	<b>hoch</b>
<b>LB<sub>80</sub>-Medium UPLC-ESI<sup>+</sup>-TOF MS</b>	Cereulidpeakfläche/OD <sub>600</sub> ≤ 50	Cereulidpeakfläche/ OD <sub>600</sub> ≥ 50 und ≤ 250	Cereulidpeakfläche/OD <sub>600</sub> ≥ 250
<b>LB<sub>80</sub>-Medium HPLC-MS/MS-SIVA</b>	≤ 30 µg/ml	≥ 30 µg/ml und ≤ 60 µg/ml	≥ 60 µg/ml
<b>LB-Medium HPLC-MS/MS-SIVA</b>	≤ 4 µg/ml	≥ 4 µg/ml und ≤ 10 µg/ml	≥ 10 µg/ml
<b>LB-Medium HEp-2 Test</b>	≤ 10 µg/ml	≥ 10 µg/ml und ≤ 20 µg/ml	≥ 20 µg/ml
<b>LB<sub>80</sub>-Medium HEp-2 Test</b>	≤ 4 µg/ml	≥ 4 µg/ml und ≤ 10 µg/ml	≥ 10 µg/ml
<b>TSA-Agar HPLC-MS/MS-SIVA</b>	≤ 0,5 µg/ml	≥ 0,5 µg/ml und ≤ 1,5 µg/ml	≥ 1,5 µg/ml
<b>Blut-Agar HPLC-MS/MS-SIVA</b>	≤ 0,5 µg/ml	≥ 0,5 µg/ml und ≤ 1,5 µg/ml	≥ 1,5 µg/ml

### 3. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden oder werden auf Konferenzen oder in Fachzeitschriften veröffentlicht.

**Rütschle A., Lücking G., Marxen S., Monika Ehling-Schulz M., Scherer S. (2013).** Functional characterization of transporter genes of the cereulide synthetase gene cluster in *Bacillus cereus*. International conference on Gram-positive microorganisms. Montecatini Terme Italy (23.- 27.06.2013).

**Stark T., Marxen S., Rütschle A., Lücking G., Scherer S., Ehling-Schulz M., Hofmann T. (2013)** Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEP-2 bioassay. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405:191-201.

**Marxen S., Stark T., Frenzel E., Rütschle A., Lücking G., Prüstinger G., Pohl E., Scherer S., Ehling-Schulz M., Hofmann T. (2015)** Chemodiversity of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407(9):2439-53.

**Marxen S., Stark T., Rütschle A., Lücking G., Frenzel E., Scherer S., Ehling-Schulz M., Hofmann T. (2015)** Depsipeptide Intermediates of Biosynthesis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific Reports* 5:10637

**Marxen S., Stark T., Rütschle A., Lücking G., Frenzel E., Scherer S., Ehling-Schulz M., Hofmann T. (2015)** Multiparametric quantitation of the *Bacillus cereus* toxins Cereulide and Isocereulides A-G in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(37):8307-13

**Lücking G., Frenzel E., Rütschle A., Marxen S., Stark T., Hofmann T., Scherer S., Ehling-Schulz M. (2015)** Function of *ces* operon genes in regulation of cereulide toxin synthesis of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 6:1101

**Rütschle A., Lücking G., Marxen S., Stark T., Hofmann T., Scherer S.** Subcellular localisation of cereulide and cereulide synthetase in *Bacillus cereus*. (In Vorbereitung)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen und mir neben viel experimenteller Freiheit, hilfreiche Ratschläge und gute Denkanstöße gab. Danke für die vielen Besprechungen und Ihre Unterstützung.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Dr. Genia Lücking, die sich über den gesamten Zeitraum für meine Arbeit interessiert hat, mir mit ihrem Wissen zur Seite stand, mich bis zum Ende sehr geduldig betreut und beraten hat.

Vielen Dank auch an meine engagierten Kooperationspartner vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik, Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann, Dr. Timo Stark und insbesondere Sandra Marxen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich sowie Dr. Mareike Hartmann vom Lehrstuhl für Biochemie des Karlsruher Instituts für Technologie, wo ich die Möglichkeit hatte viel über die Probenpräparation für, sowie die Transelektronenmikroskopie selbst kennenzulernen. In diesem Zusammenhang danke ich auch Heidemarie Gensler vom Lehrstuhl für Systematische Zoologie der LMU für Ihre Hilfe bei weiteren elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Vielen lieben Dank an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder des Lehrstuhls für Mikrobielle Ökologie, die zur guten Arbeitsatmosphäre beigetragen und mich während meiner Promotion begleitet haben. Danke für die motivierende Worte, Anregungen, Ideen, die interessante Zeit mit euch am Institut und auch drum herum.

Ganz besonders bedanke ich mich bei allen meinen Freunden aus nah und fern, die mir Kraft und Mut gegeben haben, für Ablenkung sorgten und mein Leben reicher machen.

Von tiefstem Herzen danke ich meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung, die Geduld und die vielen aufbauenden Worte. Ihr gebt mir die Energie eine solche Arbeit und noch viel mehr zu meistern. Ihr seid unbeschreiblich wertvoll!